

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANDROGÉNICA DE
CINCO VARIEDADES DE CEBADA (*Hordeum vulgare* L.)
MEDIANTE LA TÉCNICA DE CULTIVO *IN VITRO*
DE ANTERAS”**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

PAOLA VIVIANA PARRA GALLARDO

SANGOLQUÍ, Julio 2010

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR:

Paola Viviana Parra Gallardo

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Vanessa Andrade

Sangolquí, 28 de Julio de 2010

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. PAOLA VIVIANA PARRA GALLARDO como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, 28 de Julio de 2010

Fecha

M.Sc. Mónica Jadán

DIRECTORA

Ing. Tatiana Páez

CODIRECTORA

CERTIFICACIÓN

Los suscritos certifican:

Que el trabajo titulado “Evaluación de la capacidad androgénica de cinco variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.) mediante la técnica de cultivo *in vitro* de anteras”, realizado por el (la) egresado (a) Paola Viviana Parra Gallardo ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que este estudio es parte de las investigaciones realizadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP y financiado por el proyecto “Mutation breeding in Agriculture/ Mejoramiento genético a través de mutaciones (Agencia Internacional de Energía Atómica AIEA)”, se deja en libertad de la autora y del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP, para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Se autoriza a Paola Viviana Parra Gallardo que lo entregue al Ing. Rafael Vargas, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, 28 de Julio de 2010

Ing. Rafael Vargas

COORDINADOR DE CARRERA

Ing. Jacqueline Benítez

CODIRECTOR (INIAP)

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

PAOLA VIVIANA PARRA GALLARDO

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “Evaluación de la capacidad androgénica de cinco variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.) mediante la técnica de cultivo *in vitro* de anteras”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 28 de Julio de 2010

Paola Viviana Parra Gallardo

AUTORIZACIÓN

Yo, PAOLA VIVIANA PARRA GALLARDO

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución de la tesis de grado titulada “Evaluación de la capacidad androgénica de cinco variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.) mediante la técnica de *cultivo in vitro* de anteras”, cuyo contenido, ideas, y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 28 de Julio de 2010

Paola Viviana Parra Gallardo

DEDICATORIA

Este trabajo representa para mí un esfuerzo de superación tanto en mi vida profesional como personal, y está dedicado a todas esas personas que al igual que yo tienen sueños e ilusiones, luchan y perseveran aún cuando estén a punto de caer, pongan el alma y corazón por conseguir lo que se han propuesto...porque todo llega en el momento que debe llegar....

Paola

AGRADECIMIENTO

En estas líneas quiero expresar mi gratitud a todas las personas que, de alguna manera, han contribuido a la realización de esta tesis.

En primer lugar a Dios por estar siempre a mi lado, por darme la fortaleza de encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento, por darme salud, inteligencia y perseverancia para alcanzar este triunfo.

A mi madre, Pilar quien con su ejemplo de fuerza y fe me ha enseñado a rebasar todas las barreras y problemas que la vida nos presenta, gracias por la comprensión, por soportar todos mis errores, por enseñarme a ser una persona de bien, y por todo el amor y apoyo incondicional. A ella le debo lo que soy...

De igual manera agradezco, a mi padre Ernesto, el cariño, comprensión y apoyo brindado para culminar mi carrera profesional.

A mi hermana María Augusta, por ser para mí ejemplo de valentía, capacidad y superación, gracias por apoyarme en cada etapa de mi vida aunque muchas veces no sea quien tú esperas...que Dios te bendiga y te recompense por todo lo que has hecho por mí...

Mis sinceros agradecimientos, a mis abuelitos, Inesita y Timito, por su cariño y constante preocupación, de quienes he recibido siempre enseñanzas, consejos, valores y principios de vida...

No puedo olvidarme de Paquito, a quien extraño tanto..., gracias porque siento que me cuidas, que me escuchas y permaneces en mi corazón, tu fortaleza me enseñó el valor de cada segundo en la vida...

A Andrés, por ser quien es y caminar a mi lado durante todo este tiempo, gracias por el apoyo, comprensión, consejos, y sobre todo su amor...

Agradezco, al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias “Estación Experimental Santa Catalina”; y a la Comisión Internacional de Energía Atómica, que por medio del Proyecto “Mutation Breeding in Agriculture”, financió los costos operativos para el desarrollo de esta investigación.

De igual manera al Departamento Nacional de Biotecnología y al Programa de Cereales del INIAP por la confianza y la responsabilidad que depositaron en mí al confiarme la ejecución del presente trabajo.

A la Ing. Jacqueline Benítez encargada del área de Cultivo de Tejidos del Departamento Nacional de Biotecnología, por sus adecuadas indicaciones y correcciones durante todo el proceso de este estudio.

Expreso mis sinceros agradecimientos, al Ing. Esteban Falconí Jefe del Programa de Cereales, al Ing. Xavier Garófalo y el Ing. César Vaca, por proporcionarme todas las facilidades para llevar a cabo el desarrollo de la tesis.

A mi Directora M.Sc. Mónica Jadán y a mi Codirectora Ing. Tatiana Paéz, por respaldar la ejecución de la tesis, su orientación y acertadas sugerencias en la corrección de la misma.

Al Ing. Marquito Taípe, por el asesoramiento en la parte de estadística, su paciencia, apoyo y sugerencias.

Un eterno agradecimiento a Mary, quien desde el primer momento que llegue al INIAP hasta la culminación de este trabajo, invirtió su tiempo en capacitarme, compartiendo desinteresadamente sus conocimientos, experiencia y sobre todo su amistad.

No puedo olvidarme de todos mis compañeros y amigos del laboratorio, Analía, Adri, Verito, Diani, Doña Geo, Rodrigo, Diego y Carlos, con quienes compartí el día a día entre alegrías y dificultades, y quienes siempre estuvieron dispuestos a echarme una

mano. En especial a mi amiga incondicional Anita, por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, gracias por hacerme sentir que siempre cuento contigo...

Finalmente, a todos aquellos que estuvieron, los que están y continuarán a mi lado....

Paola

ÍNDICE DE CONTENIDO

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	II
CERTIFICACIÓN	III
CERTIFICACIÓN	IV
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	V
AUTORIZACIÓN	VI
DEDICATORIA	VII
AGRADECIMIENTO	VIII
ÍNDICE DE CONTENIDO	XI
LISTADO DE TABLAS	XV
LISTADO DE CUADROS	XVI
LISTADO DE FIGURAS	XVIII
LISTADO DE GRÁFICOS	XX
LISTADO DE ANEXOS	XXI
RESUMEN	XXIV
ABSTRACT.....	XXV
CAPÍTULO I.....	26
1.1. Formulación del Problema	26
1.2. Justificación.....	26
1.3. Objetivos	27
1.3.1. Objetivo General	27
1.3.2. Objetivos específicos.....	27

1.4. Marco Teórico	28
1.4.1 Introducción	28
1.4.2 Taxonomía de <i>Hordeum vulgare</i> L.	30
1.4.3 Morfología de planta de <i>Hordeum vulgare</i> L.....	31
1.4.4 Desarrollo del grano de polen en la antera	32
1.4.5 Crecimiento vegetativo de la cebada.....	33
1.4.6 Producción de Haploides y Dobles Haploides	35
1.4.7. Métodos para la producción de dobles haploides.....	38
1.4.8 Cultivo <i>in vitro</i> de Anteras (Androgénesis).....	39
1.4.8 Factores que influyen en el cultivo de anteras.....	41
CAPÍTULO II	56
MATERIALES Y MÉTODOS	56
2.1. Participantes	56
2.2. Zona de Estudio.....	56
2.2.1 Fase de Invernadero.....	56
2.2.2 Fase de Laboratorio	57
2.3. Periodo de tiempo de investigación	57
2.4. Diseño Estadístico	57
2.4.3 Diseño completamente al azar (DCA) para tiempo máximo de días de pre- tratamiento frío 4°C.....	60
2.4.4 Diseño completamente al azar (DCA) tanto para la formación de callos y formación de embriones	61
2.5. Equipos y materiales	64

2.6	Procedimientos	66
2.6.1	Selección de las variedades en estudio.....	66
2.6.2.	Siembra del material donante	67
2.6.3.	Colecta del material vegetal	68
2.6.4.	Esterilización superficial de las espigas	69
2.6.5.	Correlación entre el estado vegetativo de la planta y el estado de desarrollo de las microsporas.	69
2.6.6	Determinación del estado de desarrollo de las microsporas.....	70
2.6.7	Pre-tratamiento de las espigas a temperatura fría 4°C.....	71
2.6.8	Formulación del medio de cultivo.....	71
2.6.9.	Aislamiento de las anteras	72
2.6.10	Inducción de Androgénesis	73
2.7.	Análisis de Datos.....	74
2.7.1.	Variables y métodos de evaluación	74
CAPÍTULO III	77
RESULTADOS	77
3.1	Correlación entre el estado vegetativo de la planta y el estado de desarrollo de las microsporas.	77
3.2	Evaluación del tiempo de exposición máximo de las espigas de cebada al pre-tratamiento frío.....	78
3.2.1	Análisis de Sobrevivencia de las Microsporas	78
3.3.	Respuestas androgénicas.....	83
3.3.2	Formación de Embriones.....	91

CAPÍTULO IV	94
DISCUSIÓN	94
4.1 Correlación entre el estado vegetativo de la planta y el estado de desarrollo de las microsporas.	94
4.2 Efecto del Estado de Desarrollo de las Microsporas.....	95
4.3 Efecto del Pre-tratamiento Frío.....	96
4.4 Efecto del Genotipo.....	97
4.5 Efecto del Medio de Inducción BAC3	99
4.5.1 Efecto de los reguladores de crecimiento.....	100
4.5.2 Efecto de la fuente de Carbono	101
4.5.3 Efecto de los Agentes Gelificantes.....	102
4.6. Limitaciones de la técnica.....	105
4.6.1. Maduración de callos y embriones.....	105
4.6.2. Regeneración de Plantas.....	106
CAPÍTULO V	108
CONCLUSIONES	108
CAPÍTULO VI	110
RECOMENDACIONES.....	110
CAPÍTULO VII	111
BIBLIOGRAFÍA	111

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Fases de desarrollo siguiendo la escala decimal Zadoks (Z0.0 a Z9.9).....	34
Tabla.1.2 Variedades de Cebada obtenidas con la aplicación del sistema de producción de dobles haploides	36
Tabla 3.3.1. Prueba de Tukey (α 0.05) para la determinación de diferencias en el efecto A (Variedades de Cebada) sobre la respuesta androgénica.	84
Tabla 3.3.2 Prueba de Tukey (α 0.05) para la determinación de diferencias en el efecto B (Medio de Inducción BAC3 suplementado con Ficoll, Gelrite y PEG) sobre la respuesta androgénica.	84
Tabla 3.3.1.1 Prueba de Tukey (α 0.05) determinando el número de callos formados por tratamiento evaluado.	89
Tabla 3.3.2.1 Prueba de Tukey (α 0.05) determinando el número de embriones por tratamiento evaluado.....	92

LISTADO DE CUADROS

Cuadro. 2.4.3.1 Tratamientos resultantes para la evaluación del tiempo de pre-tratamiento a 4°C para las cinco variedades de cebada. Quito-Pichincha, 2010.	60
Cuadro. 2.4.4.1 Tratamientos resultantes de la interacción de cinco variedades de cebada con tres medios de cultivo <i>in vitro</i> de anteras. Quito-Pichincha, 2010.	61
Cuadro 4.1 ADEVA para la evaluación de respuestas androgénicas en 15 tratamientos resultantes de la interacción de cinco variedades de cebada con tres medios de cultivo <i>in vitro</i> de anteras. Quito-Pichincha, 2010.	62
Cuadro 4.2 ADEVA para la evaluación del tiempo máximo de pre-tratamiento frío 4°C (4, 7, 10,14 días) en 20 tratamientos resultantes para las cinco variedades de cebada. Quito-Pichincha, 2010.	63
Cuadro 4.3 ADEVA para la evaluación de respuestas androgénicas (formación de callos y formación de embriones) en 15 tratamientos resultantes de la interacción de cinco variedades de cebada con tres medios de cultivo <i>in vitro</i> de anteras. Quito-Pichincha, 2010.....	63
Cuadro 3.1.1. Correlación entre el estado vegetativo de la planta y el estado de desarrollo de las microsporas para las variedades de estudio. Quito-Pichincha, 2010...	77
Cuadro 3.2.1 Número de Días de Pre-tratamiento Frío 4°C obtenidos del Análisis de Probabilidades (PROBIT) para la sobrevivencia del 90% de microsporas para las variedades de estudio. Quito-Pichincha, 2010.....	78
Cuadro. 3.2.2 Análisis de efectos y estimador del parámetro, obtenidos para determinar la probabilidad de los días de pre-tratamiento frío 4°C entre 1% al 99% de sobrevivencia de microsporas para la Variedad INIAP-Cañicapa, Quito-Pichincha, 2010.	79
Cuadro. 3.2.3 Análisis de efectos y estimador del parámetro, obtenidos para determinar la probabilidad de los días de pre-tratamiento frío 4°C entre 1% al 99% de sobrevivencia de microsporas para la Variedad Clipper. Quito-Pichincha, 2010.	79

Cuadro 3.2.4 Análisis de efectos y estimador del parámetro, obtenidos para determinar la probabilidad de los días de pre-tratamiento frío 4°C entre 1% al 99% de sobrevivencia de microsporas para la Variedad Diferencial Emir. Quito-Pichincha, 2010.	80
Cuadro. 3.2.5 Análisis de efectos y estimador del parámetro, obtenidos para determinar la probabilidad de los días de pre-tratamiento frío 4°C entre 1% al 99% de sobrevivencia de microsporas para la Variedad Diferencial I5. Quito-Pichincha, 2010.	80
Cuadro. 3.2.6 Análisis de efectos y estimador del parámetro, obtenidos para determinar la probabilidad de los días de pre-tratamiento frío 4°C entre 1% al 99% de sobrevivencia de microsporas para la Variedad INIAP-Quilotoa. Quito-Pichincha, 2010.	80
Cuadro 3.2.7 Análisis de Varianza para determinación de diferencias entre los días de pre-tratamiento frío 4,7,10,14 con respecto a la sobrevivencia de microsporas de las variedades de estudio. Quito-Pichincha, 2010.....	82
Cuadro 3.3.1 Análisis de Varianza para el número de respuestas androgénicas en 5 variedades de Cebada y el medio de inducción BAC3 con diferentes gelificantes aplicando un Diseño factorial 5x3. Quito-Pichincha, 2010.....	83
Cuadro 3.3.1.1 Análisis de Varianza para el número de callos, en 15 tratamientos evaluados mediante un DCA.	88
Cuadro 3.3.2.1. Análisis de Varianza para el número de embriones, en 15 tratamientos evaluados mediante un DCA. Quito-Pichincha, 2010.	91

LISTADO DE FIGURAS

Figura.1.1. Espiguillas de cebada de seis hileras (izquierda) y de dos hileras (derecha)	32
Figura 1.2 Estado de desarrollo de la microspora <i>in vivo</i> , dentro de la antera: (A) tétrada de microsporas; (B) uninucleado temprano; (C) uninucleado tardío; (D) binucleado temprano; (E) binucleado tardío; y (F) grano de polen maduro.....	33
Figura.1.3. Estados Fenológicos de los Cereales.....	34
Figura 1.4. Estados de desarrollo de las microsporas de cebada. Los estados adecuados para cultivo <i>in vitro</i> de anteras de cebada son el c) y d).a) Tétrada de microsporas; b) uninucleado temprano; c) uninucleado medio; d) uninucleado tardío; e) Primera división de la microsporas-Anafase; d) Binucleado Temprano.....	44
Figura 2.1. Variedades de Cebada. a. Variedad Diferencia I5 (dos hileras); b. INIAP-Quilotoa 2003 (seis hileras); c. INIAP-Cañicapa 2003; d. Variedad Clipper (dos hileras); e. Variedad Diferencial Emir (dos hileras).....	67
Figura 2.2. Cultivo de las 5 variedades de Cebada en el Invernadero del Programa de Cereales.....	68
Figura 2.3. Espigas de cebada en diferentes estados de desarrollo vegetativo.....	69
Figura.2.4. Tinción de anteras en solución de acetorcamín 2%, para observar el estado de desarrollo del polen.....	70
Figura 2.5. Procedimiento de extracción de las espigas de cebada para pre-tratamiento frío 4°C	71
Figura 2.6 Preparación de medios: a) Esterilización por filtro milipore b) Dispensión del medio en cajas Petri.	72
Figura 2.7 a. Aislamiento de anteras bajo estéreo microscopio. b. Anteras sembradas en medio de cultivo BAC3 c. Microfotografía de Anteras en el medio de cultivo BAC3..	72
Figura 2.8 Incubación de anteras en medio de cultivo BAC3 suplementados con Ficoll, Gelrite y PEG a 25°C en oscuridad.	73

Figura 3.3.1. Anteras con Respuesta Androgénica a los 15 días de inducción a) Micrografía Antera -Variedad Clipper en el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll b) Microfotografía Antera-Variedad Cañicapa en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll y c) Micrografía Antera-Variedad Quilotoa medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll	83
Figura 3.3.2 Gráfica de perfil mostrando la influencia de las interacciones Variedades de Cebada vs medio de Inducción BAC3 suplementado con Ficoll, Gelrite y PEG sobre la respuesta androgénica.	85
Figura 3.3.3 Gráfica de perfil mostrando la influencia del efecto A (Variedades de Cebada) sobre la repuesta androgénica.....	86
Figura 3.3.4 Gráfica de perfil mostrando la influencia del efecto B (Medio BAC3 suplementado con Ficoll, Gelrite y PEG) sobre la repuesta androgénica.....	86
Figura 3.3.1.1 Formación de Callos a los 30 días de inducción a) Micrografía de Callos Variedad Clipper en el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll b) Microfotografía de Callos Variedad Cañicapa en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll y c) Micrografía de Callos Variedad Quilotoa medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll	88
Figura 3.3.1.2 Gráfico de medias determinando el promedio de callos formados en los tratamientos para la respuesta androgénica.	90
Figura 3.3.2.1 Formación de embriones a los 50 días de inducción a) y b) Micrografía de Embriones Variedad Clipper en el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll c) Microfotografía de Embriones Variedad Quilotoa en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll.....	91
Figura 3.3.2.2 Gráfico de medias determinando el promedio de embriones formados en los tratamientos para la respuesta androgénica.....	92

LISTADO DE GRÁFICOS

Gráfico 3.1.1 Estado de desarrollo adecuado de las espigas de cebada, a) Distancia entre la penúltima hoja y la hoja bandera. b) Estado Z3-Z4 de la Escala de Zadocks. Quito-Pichincha, 2010.	77
Gráfico 3.2.1. Curvas del Análisis PROBIT para las variedades INIAP-Cañicapa, Diferencial Emir, Diferencial I5, INIAP-Quilotoa y Clipper a los diferentes días de pre-tratamiento frío. Quito-Pichincha, 2010.	81
Gráfico 3.3.1 Porcentaje del número de respuestas androgénicas para las variedades de estudio en el Medio de Inducción BAC3 suplementado de Ficoll, Gelrite y PEG, con respecto al total de anteras inoculadas. Quito-Pichincha, 2010.....	87
Gráfico 3.3.1.1. Porcentaje del número de callos formados para las variedades de estudio en el Medio de Inducción BAC3 suplementado de Ficoll, Gelrite y PEG, con respecto al total de anteras inoculadas. Quito-Pichincha, 2010.....	90
Gráfico 3.3.2.1. Porcentaje del número de embriones formados para las variedades de estudio en el Medio de Inducción BAC3 suplementado de Ficoll, Gelrite y PEG, con respecto al total de anteras inoculadas. Quito-Pichincha, 2010.....	93

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO I	129
Cultivo <i>in-vitro</i> de anteras de cebada de la variedad Clipper en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll	129
ANEXO II	130
Cultivo <i>in-vitro</i> de anteras de cebada de la variedad INIAP-Quilotoa 2003 en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll	130
ANEXO III	131
Cultivo <i>in-vitro</i> de anteras de cebada de la variedad INIAP-Cañicapa 2003 en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll	131
ANEXO IV	132
Cultivo <i>in-vitro</i> de anteras de cebada de la variedad diferencial Emir en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll	132
ANEXO V	133
Cultivo <i>in-vitro</i> de anteras de cebada de la variedad diferencial I5 en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll	133
ANEXO VI	134
Variedad Clipper	134
A. Diferenciación de tallos a los 85 días en el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll. B. Plántula en el medio de Regeneración.	134
ANEXO VII	135
Variedad INIAP- Quilotoa 2003	135
A .Diferenciación de tallos a los 85 días en el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll. B. Plántula en el medio de regeneración.	135

ANEXO VIII	136
Número de días de pre-tratamiento frío 4°C obtenidos del Análisis de Probabilidades (PROBIT) para la sobrevivencia de 1 al 99% de microsporas para la variedad diferencial Emir	136
ANEXO IX	137
Número de días de pre-tratamiento frío 4°C obtenidos del Análisis de Probabilidades (PROBIT) para la sobrevivencia de 1 al 99% de microsporas para la variedad diferencial I5	137
ANEXO X	138
Número de días de pre-tratamiento frío 4°C obtenidos del Análisis de Probabilidades (PROBIT) para la sobrevivencia de 1 al 99% de microsporas para la variedad INIAP-Quilotoa	138
ANEXO XI	139
Número de días de pre-tratamiento frío 4°C obtenidos del Análisis de Probabilidades (PROBIT) para la sobrevivencia de 1 al 99% de microsporas para la variedad INIAP-Cañicapa	139
ANEXO XII	140
Número de días de pre-tratamiento frío 4°C obtenidos del Análisis de Probabilidades (PROBIT) para la sobrevivencia de 1 al 99% de microsporas para la variedad Clipper	140
ANEXO XIII	141
Formulación básica de los medios de inducción BAC3, FHG y N6 para Cultivo <i>in vitro</i> de anteras de cebada.	141
ANEXO XIV	142
Composición del medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll, Gelrite y Polietilenglicol	142

ANEXO XV	143
Composición del medio de regeneración BAC3	143

RESUMEN

El cultivo *in vitro* de anteras de cebada (*Hordeum vulgare* L.) representa una herramienta útil y de apoyo a los programas convencionales de mejoramiento genético de esta especie.

El propósito de este trabajo fue estudiar la capacidad androgénica de cinco variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.) INIAP-Cañicapa, INIAP-Quilotoa, Clipper, Diferencial Emir y Diferencial I5 mediante la técnica de cultivo *in vitro* de anteras. Sin embargo, la respuesta de los genotipos a androgénesis está sujeta a ciertos factores limitantes, así, fue indispensable evaluar el tiempo de exposición máximo de las espigas de cebada en estado uninucleado medio y tardío al pre-tratamiento frío (4, 7, 10 y 14 días), estado vegetativo de las plantas donantes en correlación con el estado de desarrollo de las microsporas, así como la eficiencia del medio de inducción BAC3(2mg/L de ANA y 1m/l de BAP, 6% de maltosa) al ser suplementado con Ficoll 20%, Gelrite 0.035% y Polietilenglicol 25%.

Los mejores resultados para todas las variedades se obtuvieron, al aplicar 4 días de pre-tratamiento frío 4°C (90% de sobrevivencia de microsporas), espigas en estado Z4.0 y Z4.9 según la escala de Zadocks y distancia de 5-6 cm entre la penúltima hoja y la hoja bandera, estados en los cuales prevalecía la fase de desarrollo uninucleado medio y tardío de las microsporas. Sin embargo, se aprecian diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) entre los diferentes genotipos, y al suplementar al medio BAC3 con distintos agentes gelificantes; alcanzando mayores porcentajes de repuestas androgénicas (36.75%), callos (36.25%) y embriones (19.78%) para la variedad Clipper y cuando se suplementa al medio BAC3 con Ficoll (20%) por cada 40 anteras en inducción.

Estos resultados, sugieren que los principales factores que influyen sobre el cultivo *in vitro* de anteras de cebada son el genotipo, duración del pre-tratamiento frío, estado de desarrollo de las microsporas, y el agente gelificante en el medio de inducción BAC3.

Palabras claves: *Hordeum vulgare* L., capacidad androgénica, cultivo *in vitro*, callos, embriones.

ABSTRACT

In vitro anther culture of barley (*Hordeum vulgare* L.) is a useful tool to support conventional breeding programs of this crop.

This investigation was conducted to study the androgenic capacity of five barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) INIAP-Cañicapa, INIAP-Quilotoa 2003, Clipper, Diferencial Emir and Diferencial I5 by *in vitro* anther culture technique. However, the genotype response to androgenesis is subject to certain limiting factors. In this way, it was necessary to evaluate maximum exposure time of barley spikes at mid to late uninucleate state to pre-cold treatment (4, 7, 10 and 14 days), vegetative state of donor plants correlated with microspore development stage, and BAC3 medium induction efficiency (2mg / L NAA and 1 mg / l of BAP, 6% maltose) when it was supplemented with 20% Ficoll, 0.035% Gelrite and 25% polyethylene glycol.

In all genotypes, the best results were obtained by applying four days of cold pre-treatment 4 °C (90% survival of microspores), collecting spikes in Z4.0 and Z4.9 state (as Zadocks scale), and distance between the flag and penultimate leaf of 5-6 cm in which spikes contained microspores at mid to late uninucleate development stage. However, highly significant differences were found ($p < 0.0001$) between different genotypes, and by supplementing BAC3 medium with different gelling agents. Achieving higher percentages of androgenic responses (36.75%), calli (36.25%), and embryoids (19.78%) for Clipper genotype and when BAC3 medium was supplemented with Ficoll (20%) per 40 anthers on induction.

These results suggest that the main critical factors for androgenic response in barley are genotype, cold pretreatment duration, microspore development stage, and gelling agent in BAC3 induction medium.

Keywords: *Hordeum vulgare* L., androgenic response, *in vitro* anther culture, calli, embryoids.

CAPÍTULO I

1.1. Formulación del Problema

En los programas de mejoramiento mediante métodos convencionales que se aplican en el desarrollo de líneas de alto rendimiento en cultivos autógamos uno de los principales inconvenientes es el largo período que se necesita para producir una variedad mejorada, desde que se realizan los primeros cruzamientos en los que se requieren sucesivas generaciones de autopolinización para lograr líneas homocigotas en las cuales consecutivamente se debe evaluar caracteres de interés industrial y agronómico para finalmente poder ser entregada a los agricultores.

Actualmente se vienen empleando métodos y técnicas de mejoramiento que aceleren la formación de líneas homocigotas, siendo una de ellas la producción de dobles haploides que se pueden lograr a través del cultivo *in vitro* de anteras; con esta técnica se pueden obtener líneas homocigotas en sólo un ciclo. Así, optimizando la metodología para la obtención de dobles haploides y principalmente identificando genotipos androgénicos se podría incorporar esta técnica como herramienta complementaria en los programas de mejoramiento tradicionales, en este contexto, esto se traduce en una disminución de recursos económicos, mano de obra, y espacio en el campo experimental.

1.2. Justificación

La disponibilidad de una técnica que reduzca el número de generaciones para obtener líneas puras permitiría lograr una mayor eficiencia en un programa de mejoramiento genético, reduciendo el tiempo y los recursos económicos. En este contexto, la técnica del cultivo *in vitro* de anteras permite producir líneas homocigotas a partir de poblaciones segregantes mediante el doblamiento cromosómico del polen haploide y la regeneración de plantas en un ciclo de cultivo, por lo que constituye una herramienta muy útil para el fitomejorador.

No obstante debido a que la capacidad androgénica está sujeta a una serie de factores limitantes de la técnica específicamente el genotipo en estudio, es indispensable evaluar y estandarizar un protocolo de cultivo in-vitro de anteras de cebada bajo las condiciones del Laboratorio Nacional de Biotecnología del INIAP y probar metodologías encaminadas a determinar los factores específicos que influyen en la regeneración de plantas, como el pre-tratamiento de las anteras, estado adecuado de desarrollo de las microsporas, así como también la influencia de la concentración de algunos micronutrientes para la formación de callos; y de esta manera llegar a identificar genotipos androgénicos que favorezcan a la producción de plántulas haploides y dobles haploides, las mismas que en futuro inmediato constituirán un marco de apoyo para el mejoramiento genético y la liberación de nuevas variedades con excelentes características agronómicas y de calidad que puedan ser distribuidas a los agricultores ecuatorianos en menor tiempo.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad androgénica de cinco variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.) mediante la técnica de cultivo *in vitro* de anteras.

1.3.2. Objetivos específicos

- Establecer el tiempo de exposición máximo de las espigas de cebada al pre-tratamiento frío 4°C en el cual el 90% de microsporas permanezcan viables.
- Determinar el estado de desarrollo vegetativo de cada variedad en estudio en el cual prevalezca el estado de desarrollo uninucleado en fase media y tardía de las microsporas, indispensable para la inducción de respuesta androgénica.

- Evaluar la capacidad de inducción de androgénesis del medio de cultivo BAC3 suplementado con Ficoll, Polietilenglicol, y Gelrite.

1.4. Marco Teórico

1.4.1 Introducción

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es uno de los cultivos de mayor explotación en el mundo. Actualmente ocupa el cuarto lugar en importancia entre los cereales después del trigo, maíz y arroz, esto obedece a su extensa superficie de cultivo de 56.774.297 hectáreas (FAO, 2010), amplia adaptación ecológica pudiendo desarrollarse desde el nivel del mar hasta 4260 msnm (Galeón, 2003) y a su diversidad de aplicaciones en alimentos y bebidas de consumo humano y en mínima proporción, como forraje para el ganado (Méndez, 2004).

La cebada fue una de las primeras especies cultivadas por el hombre con más de 10.000 años de antigüedad de acuerdo a evidencias arqueológicas (Zohary y Hopf, 1988). Es un cultivo originario del Medio Oriente y Norte de Africa y se expandió rápidamente a regiones de Asia, partes tropicales como la India, altas montañas de Etiopía y a fines del siglo XIV fue introducida en América. En la década de los cincuenta la superficie sembrada en el mundo alcanzó los 100 millones de hectáreas con una producción que superó las 100 millones de toneladas (Zohary y Hopf, 1988).

Para la década de los noventa la superficie sembrada a nivel mundial fue alrededor de 76 millones de hectáreas y la producción de grano se ubicó entre las 150 y 160 millones de toneladas (Giménez y Tomaso, 2002). Durante el período 2003-2004 la superficie mundial cultivada fue de 57.2 millones de hectáreas, obteniendo una producción de 141.5 millones de toneladas con un rendimiento promedio de 2.5 toneladas por hectárea, ubicando a Europa como el principal productor con el 43% de la producción mundial (Méndez, 2004).

En Ecuador, según datos de la FAO en el año 2008 la superficie dedicada al cultivo de cebada fue de 32.790 hectáreas distribuidas en las provincias de la sierra. Esta superficie superó a la ocupada por otros cultivos básicos como papa (47.494 ha) y trigo (21.945 ha), y a excepción de la reversión de las áreas cebaderas a pasturas formadas o artificiales, no existe otro cultivo o sistema competitivo que elimine al cultivo de la cebada sobre los 3000 metros de altitud (Chicaiza *et al.*, 2003).

Desde el punto de vista social, Villacrés (1996) menciona a la cebada como un cultivo de gran importancia en todos los países andinos, al considerarse como una fuente de subsistencia para un gran número de agricultores pequeños y medianos. Es así que en los últimos tiempos se ha dedicado muchos esfuerzos para su mejoramiento a través de métodos convencionales.

En los programas de mejoramiento mediante métodos convencionales la liberación de una variedad comercial de cebada tarda alrededor de ocho años debido a que se requiere de 4 a 7 ciclos sucesivos de autofecundaciones y pruebas de características complejas y cuantitativas que garanticen su estabilidad varietal y que cumplan con los requerimientos del agricultor (Chahal y Gosal, 2002; Chávez, 1995). Una manera de reducir el tiempo necesario para la obtención de nuevas líneas es la implementación del cultivo *in vitro* de anteras. Mediante esta técnica se pueden llegar a obtener plantas haploides (Dodds y Roberts, 1985) las mismas que mediante doblaje de cromosomas pueden generar líneas puras u homocigóticas (fértils), normalmente llamadas doble haploides (Thomas *et al.*, 2003). Las plantas doble haploides presentan un alto porcentaje de homocigocidad, por lo que pueden ser usadas como base para la creación de nuevas variedades comerciales (Kasha y Maluszynski, 2003). Todo este proceso una vez estandarizado ahorra tiempo y recursos a los programas de fitomejoramiento (Thomas *et al.*, 2003).

Los métodos que son más usados para la obtención de haploides y dobles haploides pueden basarse en la fertilización interespecífica o intergenérica (vía partenogénesis o mediante reducción cromosómica), en el cultivo de esporas masculinas, esto es, de anteras o polen (androgénesis), o en el cultivo de esporas femeninas, o sea de ovarios u óvulos (ginogénesis). De los métodos señalados, el más

rápido y aplicable a un mayor número de especies para la producción de dobles haploides es el cultivo de anteras o polen aislado (Lentini *et al.*, 1997).

Cabe recalcar también que la obtención de plántulas haploides está sujeta a una serie de factores que influyen sobre el cultivo *in vitro* de anteras, estos factores son: el genotipo, el estado de desarrollo del polen al iniciarse el cultivo, las condiciones ambientales, el estado fisiológico de la planta donante, los tratamientos de las anteras antes del cultivo, el medio de cultivo y las condiciones físicas de cultivo e incubación de las anteras, todos ellos de alguna u otra manera influyen en la respuesta androgénica de cada genotipo (Afza *et al.*, 1999).

A pesar de todos los factores limitantes que se presentan, la inducción de dobles haploides a nivel *in vitro* se está utilizando de forma rutinaria en varias especies de elevado interés agronómico, entre ellas las más importantes son el arroz y naranjilla desarrollados en Colombia (CIAT, 1984) y el maíz y trigo en España (Simarro y Nuez, 2002). En estos cuatro cultivos se ha producido 14 cultivares mejorados por el medio del cultivo de anteras y otros cuatro en cuya genealogía interviene un haploide duplicado (Baenzinger *et al.*, 1984; Hu, 1986; Bollon y Raquin, 1987).

Recientemente se ha incrementado considerablemente la eficiencia del proceso de cultivo *in vitro* de anteras de cebada mediante cambios en la composición de los medios y condiciones de cultivo. Sin embargo, es importante mencionar que no todos los genotipos se adaptan a la mismas condiciones (Cistué *et al.*, 1994, 1995 y 1999; Castillo *et al.*, 2000) de tal modo que la selección de genotipos androgénicos frente a un conjunto de condiciones específicas de medios y cultivo representa el punto de partida para el mejoramiento de la cebada a través de técnicas biotecnológicas a nivel de laboratorio.

1.4.2 Taxonomía de *Hordeum vulgare* L.

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es una planta monocotiledónea anual, diploide ($2n = 2x = 14$). Taxonómicamente está dentro del género *Hordeum*, perteneciente a la familia Poaceae (Prontuario de Agricultura, 2005).

La especie *Hordeum vulgare* L. consta de tres subespecies: *vulgare* (cebadas hexásticas), *distichum* (cebadas dísticas) y *spontaneum* (cebadas de raquis frágil, en general silvestres). En variedades hexásticas o de seis hileras todas las espiguillas son fértiles y en las dísticas, o de dos hileras sólo lo son las centrales (Molina, 1989).

1.4.3 Morfología de planta de *Hordeum vulgare* L.

La inflorescencia de la cebada es una espiga, formada por un eje central, el raquis, el cual lleva en su base dos brácteas inferiores pequeñas llamadas glumas (Figura 1.1). Por encima, se encuentra otras brácteas o glumillas, que llevan en su axila las flores. La bráctea inferior se denomina pálea y la exterior lemma. Esta última se continúa con una arista o barba (Molina, 1989).

El raquis presenta normalmente simetría bilateral, alternando nudos y entrenudos. Normalmente se forman tres espiguillas en cada nudo. Cuanto más cortos son los entrenudos, más compacta y densa es la espiga. Los raquis son generalmente de entre 2,5-13 cm de longitud, y pueden llevar 25-60 granos en variedades de seis hileras o 15-30 granos en variedades de dos hileras (Plantpro, 2006).

Las flores son hermafroditas, constituidas por tres estambres libres con filamentos largos y finos y anteras dosificadas; el gineceo consta de dos carpelos soldados, abiertos y dos estigmas plumosos. El ovario súpero es unilocular y encierra un solo óvulo (Molina, 1989).

La floración generalmente comienza en las espiguillas entorno a la mitad de las espigas y se extiende hacia arriba y hacia abajo tardando entre 1 y 2 o incluso 4 días en completarse. (Plantpro, 2006).

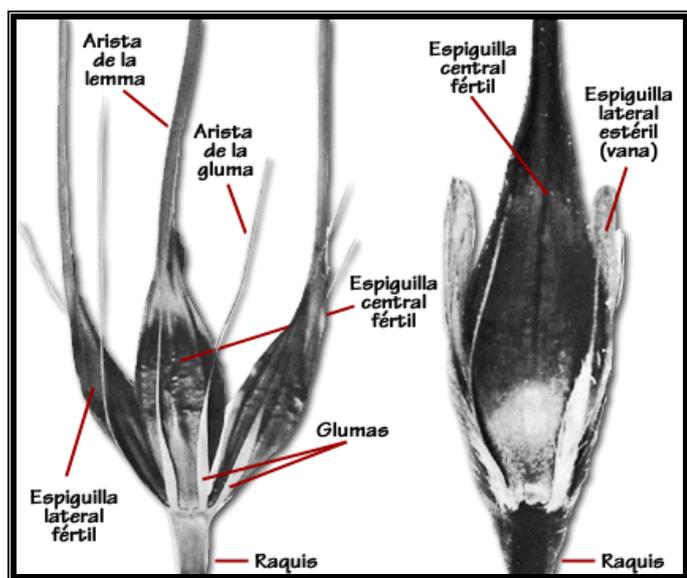


Figura.1.1. Espiguillas de cebada de seis hileras (izquierda) y de dos hileras (derecha) (Muñoz, 2007).

1.4.4 Desarrollo del grano de polen en la antera

Dentro de los sacos polínicos se originan células jóvenes diploides, denominadas células madres del polen o microsporocitos primarios. Después de que el microsporocito alcanza cierto desarrollo, ocurre la meiosis o división reduccional, de la cual resultan dos células con la mitad del número de cromosomas que existe en las células somáticas de la cebada, formándose así dos microsporocitos secundarios haploides. En seguida los microsporocitos secundarios sufren una división mitótica o ecuacional dando origen a dos células, también haploides. Así, por cada microsporocito primario, se forman cuatro células haploides, que se denominan microsporas (Lentini *et al.*, 1997).

Posteriormente las microsporas se separan, iniciándose el estado uninucleado que comprende 3 etapas: uninucleado temprano, cuando la doble pared de la microspora (intina y exina) no está todavía bien conformada y el núcleo está situado en el centro de la microspora; uninucleado medio cuando ya la doble pared está bien definida y el núcleo empieza a ser desplazado hacia un costado por la presencia de una vacuola grande, y uninucleado tardío cuando el núcleo localizado en el costado de la

microspora se presenta agigantado con pequeñas vacuolas nucleolares y listo para entrar en mitosis (Lentini *et al.*, 1997).

Luego viene el estado binucleado de la microspora que comprende: el binucleado temprano, que se presenta inmediatamente después de la primera división mitótica del núcleo, a partir del cual se forman dos núcleos: el vegetativo generalmente de mayor tamaño y el generatriz o espermático más pequeño, y el binucleado tardío cuando se forman gránulos de almidón en el citoplasma. El núcleo generativo sufre una segunda división mitótica obteniéndose así un conjunto de tres núcleos haploides que constituyen el grano de polen. Normalmente el grano de polen germina unas pocas horas después de entrar en contacto con el estigma originándose el tubo polínico. El núcleo vegetativo se degenera y uno de los núcleos generativos se fusiona con el núcleo de la ovocélula para formar el cigoto (Figura 1.2). (Lentini *et al.*, 1997).

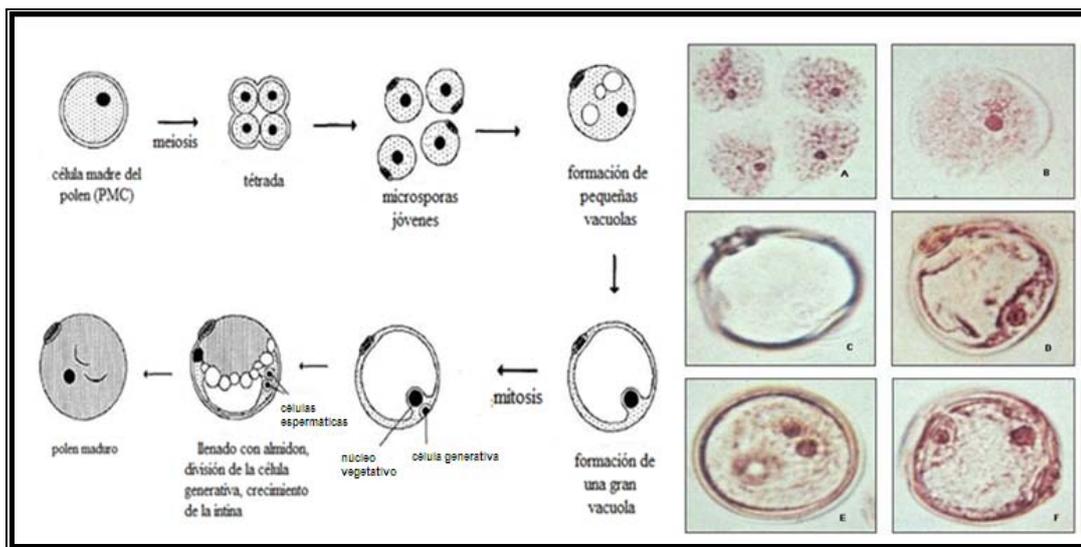


Figura.1.2. Estado de desarrollo de la microspora *in vivo*, dentro de la antera: (A) tétrada de microsporas; (B) uninucleado temprano; (C) uninucleado tardío; (D) binucleado temprano; (E) binucleado tardío; y (F) grano de polen maduro. (Lentini *et al.*, 1997).

1.4.5 Crecimiento vegetativo de la cebada

Se han desarrollado diversos sistemas para describir el desarrollo de los cereales como la cebada. El sistema de Zadoks es un código de dos dígitos que describe estados

morfológicos externos del cultivo, que involucran algunos procesos de desarrollo y otros de crecimiento (Tabla 1.1, Figura 1.3). El primer dígito, de 0 a 9, corresponde con el estadio de desarrollo principal, desde la germinación hasta la maduración del grano. Y el segundo dígito, de 0 a 9, subdivide el estadio principal, correspondiendo el valor 5 al punto intermedio de ese estado (Rawson *et al.*, 2001).

Tabla 1.1 Fases de desarrollo siguiendo la escala decimal Zadoks (Z0.0 a Z9.9). (Zadoks et al., 1974)

Etapa principal	Descripción	Sub-fase
0	Germinación	0.0-0.9
1	Producción de hojas TP	1.0-1.9
2	Producción de Macollos	2.0-2.9
3	Producción de nudos TP (encañado)	3.0-3.9
4	Vaina engrosada	4.0-4.9
5	Espigado	5.0-5.9
6	Antesis	6.0-6.9
7	Estado lechoso del grano	7.0-7.9
8	Estado pastoso del grano	8.0-8.9
9	Madurez	9.0-9.9

TP = Tallo Principal

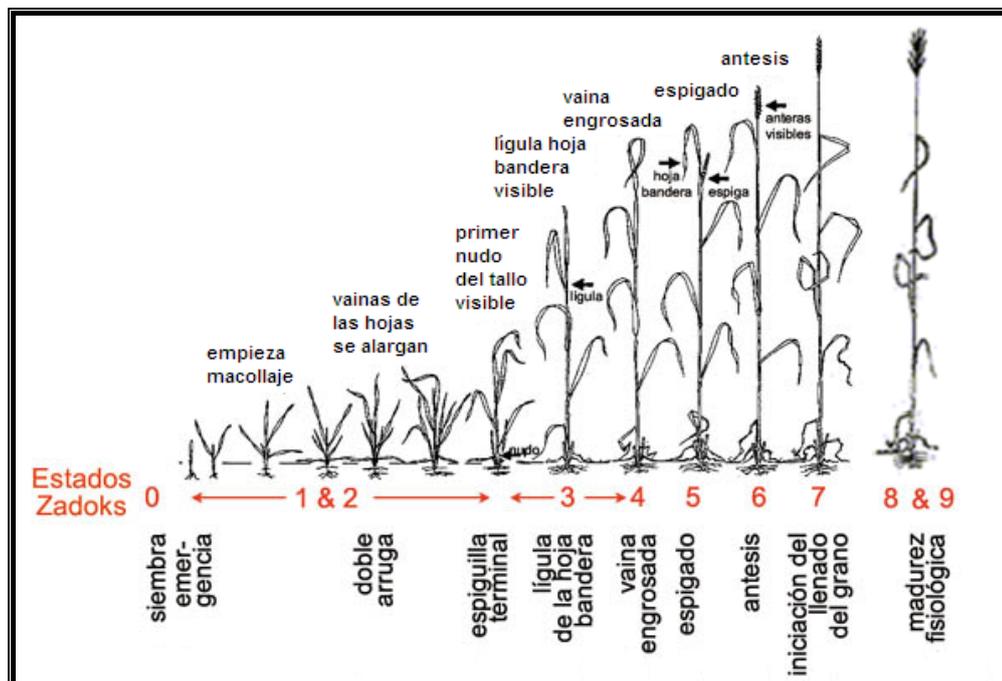


Figura.1.3. Estados Fenológicos de los Cereales (Rawson *et al.*, 2001).

1.4.6 Producción de Haploides y Dobles Haploides

1.4.6.1 Antecedentes

Las plantas dobles haploides se definen como esporofitos cuya dotación cromosómica es la gamética ($2n=2x$) (Kasha, 2005), por el contrario los haploides poseen sólo un juego de cromosomas ($n = 1$) y es el mismo que el de las gametas (ovocélula ó polen). Cuando se duplica la dotación cromosómica de un haploide, espontáneamente o mediante inducción química, se obtienen plantas dobles haploides (DH) que pueden formar ovocélulas y granos de polen viables (Lacadena, 1970). Los haploides pueden diferenciarse de los dobles haploides usando marcadores moleculares que permiten analizar homocigocidad o heterocigocidad, también por sus características físicas mediante ensayos de campo, o verificando el número cromosómico a través de análisis citológicos.

El valor de los haploides es conocido desde 1922, cuando se descubrió la producción espontánea de los mismos en *Datura stramonium* (Blakeslee *et al.*, 1922). Desde entonces se ha visto que son numerosas las especies capaces de producirlos de manera natural (Horlow *et al.*, 1996). Sin embargo, la frecuencia con la cual se producen es muy baja, con valores que van de 0,001% a 0,01%. No fue hasta 1966 cuando Guha y Maheshwari descubrieron que las anteras de *Datura innoxia* generaban plantas haploides al ser cultivadas *in vitro*. Este proceso confirmado posteriormente por Nitsch y Nitsch (1969) en tabaco se ha utilizado para producir haploides en numerosas especies.

En muchas especies cultivadas, particularmente los cereales, se ha desarrollado el sistema de producción de dobles haploides (Hu y Yang, 1986) mediante androgénesis, ginogénesis e hibridación interespecífica.

En arroz la técnica de cultivo de anteras ha sido utilizada exitosamente para producir cultivares mejorados, según Brar *et al.* (1994), más de una docena de

variedades y una centena de líneas de arroz fueron desarrolladas en la China empleando esta técnica.

Los autores De Buyser *et al.* (1987) reportaron el desarrollo de una variedad de trigo invernal a la que le denominaron “Florin”, a partir del cultivo *in vitro* de anteras de una población F1.

En tanto, en los programas de mejoramiento de la cebada, los sistemas mayormente empleados son el del cruce de *H. vulgare* L. y *H. bulbosum* L (Kasha y Kao, 1970) y el cultivo de anteras (Foroughi-Wehr y Friedt, 1984). Devaux *et al.* (1996) reportaron una lista de 59 cultivares de cebada desarrollados a través del sistema de dobles haploides hasta 1995. Es así que los dobles haploides han sido aceptados como una herramienta útil en el mejoramiento de este cereal (Choo *et al.*, 1985).

Tabla.1.2 Variedades de Cebada obtenidas con la aplicación del sistema de producción de dobles haploides (Devaux, *et al.*, 1996).

Compañía/Instituto	País	Nombre de la Variedad	Referencia
Abed PBS	Dinamarca	Etna, Give, Loma, Loke, Riga, Rima, Verona, Perma Paloma, Bereta, Aberdeen, Pondus, Tender.	Comunicación personal Rasmussen
Agriculture Canada	Canadá	DB202	Choo <i>et al.</i> , 1995
Canterbury Malting	Nueva Zelanda	Valetta	Comun. Pers. Pickering.
Crop & Food Res	Nueva Zelanda	Gwylan	Coles, 1986.
Florimond Desprez	Francia	Michka, Lombard, Anka, Vodka, Gaelic, Gotic, Logic, ZF3642, Lyric Moka, Tattoo, Jerka, Jing Zhuo, Douchka.	Pickering y Devaux, 1992 comun. Pers. Lefebvre
ICI sedes	Inglaterra	Waveney	NIAB 1988.
IPG/PBS	Polonia	KA7/3	Adamski <i>et al.</i> , 1995.
NSW Agriculture	Australia	Tantangara	Read 1995
Saaten-Union	Alemania	Anthere, Henni	Comun. Pers. Jager-Gussen.
Semino	Canadá	HD87-18.14, HD87-12.1	Choo <i>et al.</i> , 1995.
WG Thompson	Canadá	Mingo, Rodeo, Craig, Winthrop, Lester Ontario, TB891-6, Prospect, Bronco, Sandrina, Beluga McGregor, T090-017, T086-156, T081-009, T103-003, H30-11.	Ho y Jones, 1980 Campbell <i>et al.</i> , 1984. Shugar y Etienne, 1994. Choo <i>et al.</i> , 1985. Comun. Pers. Shugar
WPBS	Inglaterra	Doublet, Pipkin.	Jones <i>et al.</i> , 1985;1986

1.4.6.2 Importancia y aplicaciones de los dobles haploides (DH)

Entre las aplicaciones más importantes de los dobles haploides (DH) podemos citar:

- Acortamiento de los programas de mejora, la producción de plantas dobles haploides tiene una característica única y es que permite obtener, en una sola generación, líneas completamente homocigotas (líneas puras) a partir de padres heterocigotos, mientras que por el método tradicional de autofecundación hacen falta de 5 a 6 generaciones para producir una homocigosis del 99%. Además, se incrementa la eficiencia en la evaluación y selección de líneas, ya que el fenotipo de la planta no es enmascarado por los efectos de la dominancia. Todo esto hace que la principal ventaja de los dobles haploides (DH) sea la reducción del tiempo necesario para la obtención de nuevos cultivares (Snape *et al.*, 1986).
- Mejora la eficiencia de la selección, en comparación con la selección en las generaciones tempranas efectuada en el sistema de pedigrí, debido a la falta de dominancia y fijación temprana de características recesivas y genes menores. Tal aumento en la eficiencia ocurre tanto para caracteres cualitativos como cuantitativos, lo que facilita, la identificación de los genotipos superiores fácilmente en etapas tempranas. Dichas ventajas han sido discutidas por Lentini *et al.* (1997), Martínez *et al.* (1996B), Raina y Zapata (1997).
- Permite desarrollar germoplasma con características específicas para determinados ecosistemas como líneas tolerantes al frío, precoces y de buena calidad (Sathish *et al.*, 1997).
- Generación de poblaciones de mapeo, una población de dobles haploides producida a partir de una F2 es un material ideal para el mapeado genético, ya que las líneas doble haploides han sufrido solo una ronda de recombinación y por tanto muestran una expresión máxima de las relaciones de ligamiento (Forster y Powell, 1997). Además, las poblaciones de DH son especialmente útiles para el análisis de QTLs (*Quantitative Trait Loci*). Esto es debido a que, al tratarse de poblaciones

“inmortales”, permiten realizar la evaluación fenotípica en diferentes años y ambientes, obteniéndose estimaciones más precisas de los parámetros de caracteres cuantitativos (Muñoz, 2007).

- Facilita la introgresión de caracteres deseables entre acervos genéticos de origen distinto (Martínez *et al.*, 1996A).
- Elimina en parte el problema de esterilidad que se presenta en ciertos tipos de cruzamientos amplios (Martínez *et al.*, 1996A).
- Mutagénesis y Transformación, la producción de (DH), en combinación con técnicas de biotecnología como la mutagénesis o la transformación, facilita la obtención de nuevas fuentes de variabilidad que quedan fijadas en la primera generación (Muñoz, 2007).

1.4.7. Métodos para la producción de dobles haploides

Los dobles haploides pueden originarse espontáneamente pero las frecuencias son demasiado bajas como para que puedan usarse en los programas de mejora (Palmer y Keller, 2005). Por todo ello, han sido muchos los esfuerzos realizados para desarrollar métodos que incrementen las frecuencias de producción de (DH). Los métodos más utilizados para la obtención de haploides y dobles haploides pueden basarse en la fertilización interespecífica o intergenérica (vía partenogénesis o mediante reducción cromosómica), en el cultivo de esporas masculinas, esto es, de anteras o polen (androgénesis), o en el cultivo de esporas femeninas, o sea, de ovarios u óvulos (ginogénesis) (Muñoz, 2007).

La elección del método para producir dobles haploides es dependiente de la especie aunque el cultivo de anteras es el más comúnmente utilizado (Touraev *et al.*, 2001).

1.4.8 Cultivo *in vitro* de Anteras (Androgénesis)

La androgénesis obtenida mediante el cultivo de anteras es la técnica más ampliamente usada para la inducción de haploides y ha demostrado gran importancia para el fitomejorador.

El cultivo de anteras es la manipulación *in vitro* de los granos de polen inmaduros (microsporas) contenidos dentro de la antera para inhibir el desarrollo gametofítico (formación de granos de polen maduros) e inducir el desarrollo esporofítico (formación de un embrión haploide que da lugar a una planta completa) (Obert, 2005).

Las plantas haploides no son fértiles pero si se produce la duplicación cromosómica en algún momento del proceso, las plantas regeneradas son fértiles y completamente homocigotas (dobles haploides). Esta duplicación cromosómica puede ocurrir espontáneamente, aunque en algunas especies es necesario hacer un tratamiento con agentes diploidizantes (Wang *et al.*, 2000).

Desde que Guha y Maheshwari en 1964 consiguieron la inducción de este proceso *in vitro* usando la planta solanácea *Datura innoxia*, se han realizado enormes esfuerzos para inducir la androgénesis en un gran número de especies (Muñoz, 2007). Sin embargo, aunque en general los cereales habían respondido mal a los sistemas de producción de dobles haploides *in vitro*, actualmente se han producido grandes avances que han proporcionado frecuencias de producción de embriones equivalentes a las de algunas dicotiledóneas (Kasha *et al.*, 1990). En cebada se ha incrementado considerablemente la eficiencia del proceso mediante cambios en la composición de los medios y condiciones de cultivo (Cistué *et al.*, 1994, 1995 y 1999; Castillo *et al.*, 2000).

El proceso de androgénesis supone el desarrollo de plantas a partir de microsporas, distinguiéndose dos fases, la primera de inducción y la segunda de embriogénesis y regeneración (Kasha *et al.*, 1992).

- **Fase de Inducción de Microcallos**

En esta primera fase se siembran las anteras inmaduras en un medio de cultivo con altas concentraciones de auxinas con o sin citoquininas, las que estimulan la formación del microcallo a partir de las microsporas (Lentini *et al.*, 1997).

Después de dos días de cultivo ocurre la primera división mitótica de la microspora que da como resultado la formación de dos núcleos: el vegetativo de mayor tamaño y generativo más pequeño, los cuales están separados por una membrana. El núcleo generativo se degenera rápidamente y generalmente desaparece antes de que el núcleo vegetativo se divida de nuevo. Alrededor del quinto día de cultivo *in vitro* el núcleo vegetativo inicia la división mitótica. En las primeras divisiones generalmente se originan membranas celulares que permiten la formación de núcleos independientes, cuyo número puede variar de 2 a 8 por cada microspora. A los 20 días de cultivo se forma una masa de tejido amorfo con más de 100 células por cada microspora involucrada en el proceso; éste es el denominado microcallo, que alrededor de los 40 ó 50 días dependiendo del genotipo, alcanza un tamaño de 2mm, considerado como el más apropiado para iniciar el proceso de regeneración de plantas (Lentini *et al.*, 1997).

Aunque aún no se sabe con exactitud cómo sucede el doblamiento cromosómico del de las plantas regeneradas por cultivo de anteras, las observaciones citológicas del desarrollo de las microsporas en esta etapa permiten suponer dos formas, mediante las cuales puede ocurrir la diploidización o poliploidización. En la primera, llamada fusión nuclear, cuando el cultivo inicia a partir de microsporas en estado uninucleado temprano a medio, no hay formación de membrana celular entre los núcleos en las primeras divisiones mitóticas del núcleo vegetativo, haciendo posible la fusión de dos o más núcleos, lo cual origina callos diploides o poliploides; o cuando el proceso de cultivo se ha producido a partir de microsporas en estado uninucleado tardío, el núcleo vegetativo se fusiona con el núcleo generativo y origina callo diploide. En la segunda forma, llamada endoreduplicación, al presentarse la mitosis de las células haploides no hay separación de los cromosomas duplicados, lo cual conduce a la formación de un solo núcleo con un número doble de cromosomas (Lentini *et al.*, 1997).

- **Fase de Diferenciación celular para regenerar plantas**

Una vez los microcallos han alcanzado el desarrollo adecuado, o sea un tamaño de 2mm, son transferidos a otro medio de cultivo que contiene concentraciones baja de auxinas pero altas de citiquininas (kinetina o bencil aminopurina), las que estimulan la diferenciación de las células del microcallo hasta regenerar plantas (Lentini *et al.*, 1997).

En los primeros estados de desarrollo el microcallo es una masa de células sin diferenciación; posteriormente las células desarrollan vacuolas y se empieza a formar el tejido parenquimatoso. En este tejido se diferencian meristemas localizados algunos en la periferia, denominados meristemas periféricos, y otros están dispersos dentro de la masa parenquimatoso, denominados endomeristemas dispersos. Los meristemas periféricos originan los puntos de crecimiento o yemas de la plántula, mientras que de los endomeristemas dispersos se originan los primordios de las raíces. En los primeros estados del proceso de morfogénesis, las yemas y las raíces de desarrollan independientemente, sin ninguna conexión de tejido vascular entre ellos. Posteriormente de desarrolla tejido vascular que conecta el vástago con la raíz, conformándose así la nueva plántula. Estas plántulas tienden a macollar dentro del medio de cultivo y desarrollan hojas típicas a los 30 ó 45 días después de ocurrida la transferencia de los callos al medio de regeneración (Lentini *et al.*, 1997).

1.4.8 Factores que influyen en el cultivo de anteras

La capacidad androgénica (inducción de plantas haploides a partir de microesporas inmaduras) es dependiente de varios factores entre los que destacan el genotipo, los factores medio ambiente-crecimiento de plantas donantes, pre-tratamientos, estado de desarrollo de las microsporas, medios nutritivos, condiciones de incubación, entre otros. Dentro de estos el medio de cultivo y el genotipo son los factores más importantes para la inducción de androgénesis (Mercy, 1990).

- **Genotipo**

Es el factor más importante que afecta al cultivo de anteras y el que más influye en el desarrollo de las microsporas *in vitro* tanto en la inducción de callos como en la regeneración de órganos y plantas y posiblemente en el albinismo. La variabilidad en la respuesta al cultivo de anteras existe entre especies, y se ha demostrado la heredabilidad de esta respuesta (Wenzel y Uhring, 1981).

Genotipos androgénicos son aquellos que responden de una manera favorable a la manipulación y al ambiente del cultivo *in vitro*, produciendo callos y/o embriones los cuales son capaces de regenerar plantas, más específicamente, plantas fértiles (Büter, 1997).

Un genotipo recalcitrante por el contrario, es aquel que no resiste las condiciones *in vitro* y por tanto no produce o tiene pobre producción de callos y/o embriones friables (Büter, 1997). Esto se debe a que casi todos los procesos fisiológicos que se dan en el cultivo *in vitro* son controlados por genes y la inducción de androgénesis no es la excepción.

Existe suficiente evidencia que sugiere que la androgénesis *in vitro* está bajo control génico y que este carácter puede ser transferido desde clones con alta respuesta a otros no respondedores (Luckett y Smithard, 1992).

Gresshoff y Doy (1972) trabajando con 43 cultivares de *Lycopersicum esculentum* y 18 líneas de *Arabidopsis thaliana*, pudieron inducir tejido haploide únicamente en tres casos, para cada una de las especies. Del mismo modo, de 21 cultivares de *Triticum aestivum*, sólo se obtuvo tejido haploide en 10 cultivares (Ascanio, 1988). En *Hordeum vulgare* L. los mayores resultados se han conseguido con el cultivar de invierno Igri (Kasha *et al.*, 1990). Por lo tanto, el mejoramiento de la capacidad androgénica no parece difícil, siendo la identificación de genotipos con gran

capacidad de respuesta un paso indispensable para su incorporación en los bloques de cruzamiento (Polci *et al.*, 2000).

Los primeros estudios sobre el control genético de la embriogénesis de la microspora en cebada fueron realizados antes de la optimización del proceso, revelando una gran complejidad del mismo (Foroughi-Wehr *et al.*, 1982; Powell, 1988; Knudsen *et al.*, 1989; Larsen *et al.*, 1991; Hou *et al.*, 1994). Los resultados que se obtuvieron de esos trabajos eran muy diversos y en ellos se describe la presencia de distintos genes nucleares, con efectos aditivos y de dominancia, que actúan independientemente en cada uno de los pasos del proceso y frecuentemente interaccionan con las condiciones ambientales. También se describe la presencia de efectos citoplásmicos y maternos.

Se ha evaluado que el gen *shd1* que está en la segundo cromosoma de la cebada afecta a la formación de embriones y de las plantas verdes en un 65,0%, por lo tanto el principal factor que afecta la regeneración de plantas verdes en el cultivo *in vitro* de anteras es la predeterminación genética de las plantas donantes (Beck *et al.*, 2000).

- **Condiciones de crecimiento de las plantas donantes**

La mayor eficacia del cultivo de anteras de cebada se logra cuando las plantas donantes se cultivan en invernaderos donde se logra manejar el crecimiento controlado de las plantas, a temperatura relativamente baja, 15° C durante el día y 12°C durante la noche, o alternativamente temperatura constante de 12°C; 16h de fotoperiodo a 350-450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$, y humedad relativa del 60-80%. Durante todo el período de crecimiento, las plantas deben tener riego adecuado y fertilización en períodos específicos para mantener un crecimiento vigoroso. Fungicidas e insecticidas se pueden aplicar si es necesario, pero deben evitarse dos semanas antes de la recolección de las espigas. Es posible el uso de material de campo como plantas donantes, pero se espera una menor eficiencia. Se debe tener en cuenta que manejar condiciones controladas y uniformes durante el crecimiento de las plantas donantes, más uniforme será el desarrollo de microsporas y plantas verdes en el cultivo *in vitro* (Szarejko, 2003).

La calidad de las plantas donantes es un aspecto crítico para la posterior respuesta al cultivo de anteras. Las plantas donantes deben crecer en condiciones óptimas con respecto al fotoperiodo, intensidad y calidad de la luz, temperatura y nutrición. Además, las plantas deben estar libres de plagas y enfermedades, y el uso de pesticidas o fungicidas debe ser evitado o reducido al mínimo (Cistué *et al.*, 2003).

- **Estado de desarrollo de las microsporas**

Dependiendo de la especie, la inducción de la androgénesis puede ocurrir desde el estado de desarrollo uninucleado medio hasta el binucleado temprano de las microsporas. Por ello, las espigas deben seleccionarse y colectarse cuando la mayoría de las microsporas estén en este estado de desarrollo. Para identificarlo, se ha establecido una correlación entre los estados de desarrollo de las microsporas y distintos estados vegetativos de la planta (Cistué *et al.*, 2003).

En cebada, como para la mayoría de los cereales, el estado más apropiado de desarrollo de la microspora es el uninucleado medio o tardío (Hoekstra *et al.* 1992). Para confirmar el estado de desarrollo de las microsporas se debe realizar tinción de las anteras en solución de acetocarmín 2-4% y examinar bajo microscopio óptico. La etapa de desarrollo de las microsporas puede ser determinado en base del tamaño y la posición del núcleo y vacuolas en la célula (Szarejko, 2003).

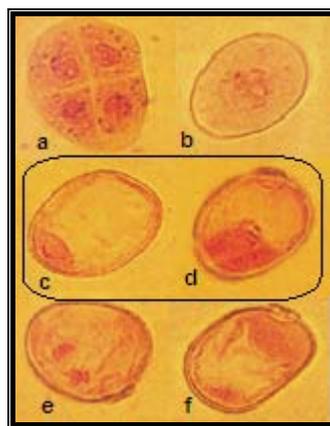


Figura.1.4 Estados de desarrollo de las microsporas de cebada. Los estados adecuados para cultivo *in vitro* de anteras de cebada son el c) y d). a) Tétrada de microsporas; b) uninucleado temprano; **c) uninucleado medio; d) uninucleado tardío**; e) Primera división de la microsporas-Anafase; d) Binucleado Temprano. (Maluszynski, 2003).

- **Tratamiento de estrés (Pre-tratamiento)**

Es necesario un tratamiento de estrés para que se induzca la embriogénesis de la microspora (Touraev *et al.*, 1997). Distintos tipos de estrés aplicados durante el estadio adecuado pueden enmascarar el programa gametofítico e inducir la expresión de genes específicos del desarrollo esporofítico. Si bien las bajas temperaturas son consideradas como el mejor pre-tratamiento, también otros pueden estimular la androgénesis, como el calor, el choque osmótico, la centrifugación de las anteras o hasta una incisión en la parte superior de la inflorescencia donante. También se citan la poda, la irradiación, la reducción en la presión atmosférica, la anaerobiosis, y la aplicación de gametocidas (Szarka *et al.*, 2001).

Bajo las condiciones de estrés se produce un agrandamiento de las microsporas y el citoplasma se caracteriza por la carencia de almidón y de acumulación de lípidos, la presencia de regiones libres de orgánulos y un descenso en el número de ribosomas (Hoekstra *et al.*, 1992; Telmer *et al.*, 1995; Maraschin *et al.*, 2005). En cebada estos cambios en el citoplasma están asociados con la presencia de una intina delgada, lo que contrasta con la intina gruesa que aparece en los granos de polen que han continuado el desarrollo gametofítico (Maraschin *et al.*, 2005). En base a estas observaciones morfológicas se ha propuesto que el estrés conduce a una desdiferenciación de las microsporas por la represión del desarrollo gametofítico (Maraschin *et al.*, 2005).

Las bajas temperaturas aplicadas sobre la planta madre, sobre las yemas florales jóvenes o sobre las anteras generalmente estimulan la embriogénesis. Según investigaciones sobre la fisiología de las anteras, los efectos benéficos del tratamiento con frío y en la oscuridad se debe a que dicho tratamiento reduce la actividad respiratoria de las anteras disminuyendo el consumo de reservas en la pared de las mismas, lo cual prolonga la actividad biológica del arqueosporio, que alberga los granos de polen, mantiene la viabilidad de los mismos, evita la dehiscencia prematura de las anteras en el cultivo, y retrasa la senescencia del polen (Sunderland, 1981). Actualmente se piensa que el pre-tratamiento con frío, podría además, inhibir la

expresión de los genes que controlan el desarrollo gametofítico, o la actividad de las enzimas, producto de su expresión, permitiendo la inducción del desarrollo esporofítico (Chen, 1977).

En general las temperaturas citadas varían entre 2 y 10 °C y la duración del tratamiento de 2 a 30 días. Es importante determinar la temperatura adecuada para cada especie vegetal, aun para variedades dentro de la misma especie. La inducción óptima se consigue en anteras con microsporas en estado uninucleado medio o tardío, con un pre-tratamiento de 4-10°C por 7 días y en la oscuridad. Este tratamiento no solamente incrementa la formación de callo sino que también la diferenciación de plantas verdes. Un pre-tratamiento frío por más de 14 días reduce la capacidad de regeneración de las plantas de los callos, e incrementa la producción de plantas albinas (Tsay y Chen, 1984). Los dos tratamientos de estrés más comunes en cebada son el choque térmico por frío y la inanición por carbohidratos (Cistué *et al.*, 1999).

Huang y Sunderland (1982) informaron de la eficacia de diferentes pre-tratamientos fríos y demostraron que para *H. vulgare* L. se produce un alto porcentaje de callos y embriones después de 28 días a 4°C. Powell (1988) también informó que 21 días de pre-tratamiento frío 4°C podría ser óptimo para la inducción de androgénesis en algunas variedades de *Hordeum vulgare* L.

- **Medio de Cultivo**

Un factor determinante para el cultivo de polen o anteras es el medio nutritivo sobre el cual sean capaces de crecer. No existe una recomendación general y las variaciones dependen de la especie a cultivar (Polci *et al.*, 2000). Normalmente se utilizan dos medios de cultivo, uno para la inducción de callos a partir de polen inmaduro y otro para la regeneración de plántulas a partir de los callos.

En general los medios de cultivo que se utilizan están constituidos por dos grupos de sustancias. Al primer grupo se lo denomina medio basal y está compuesto por

macro y micro elementos (nutrimentos inorgánicos), hidratos de carbono, vitaminas y dependiendo del genotipo algunos aditivos orgánicos, como aminoácidos, proteínas y anti-oxidantes. El segundo grupo de sustancias lo conforman los reguladores de crecimiento de tipo hormonal. Sin embargo, la concentración de cada una de estas sustancias en el medio depende de la influencia que ejercen el genotipo, las condiciones ambientales y fisiológicas de la planta donante, el estado de desarrollo del polen, y el pre-tratamiento frío dado a las anteras. Sin embargo, esto no le resta importancia a la composición del medio de cultivo ya que es común que para un mismo genotipo la frecuencia de inducción varíe según la composición del medio (Lentini *et al.*, 1997).

- **Componentes de los medios de cultivo**

Sales Inorgánicas (Macroelementos y Microelementos)

El nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio, y azufre (y carbono, que se añade por separado) se consideran como macroelementos, estos elementos son necesarios en grandes cantidades; mientras que el manganeso, yodo, cobre, cobalto, boro, molibdeno, hierro y zinc por lo general comprenden los microelementos, aunque otros elementos como el níquel y el aluminio se encuentran con frecuencia en algunas formulaciones, estos elementos son necesarios en pequeñas cantidades. El crecimiento y diferenciación de los callos están determinados por las concentraciones de estas sales inorgánicas, especialmente las de amonio por eso, la relación entre la concentración de amonio (NH_4^+) y la de nitrato (NO_3) es uno de los principales factores en la composición del medio y son suministrados en forma de NH_4NO_3 y KNO_3 (Lentini *et al.*, 1997).

Para el suministro de hierro se puede utilizar el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en relación con el sulfato de hierro. Los complejos de EDTA con hierro permiten la liberación lenta y continua de hierro en el medio.

Fuente de Carbono

Comprenden los carbohidratos (azúcares) del medio y satisfacen los requerimientos de moléculas de carbono como fuente de energía. La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada, y se emplea a una concentración de 2 a 3%; sin embargo, en ciertas especies se emplean concentraciones muy elevadas (5 a 12%). Ocasionalmente se emplea glucosa o maltosa en cultivos de monocotiledóneas, así como la fructuosa y el almidón para otras especies (Lentini *et al.*, 1997).

Desde 1983 la maltosa se ha conocido como una mejor fuente de carbono en comparación con la sacarosa para la androgénesis en muchas especies (Sun *et al.*, 1993), incrementando la inducción de embriogénesis y la regeneración de plantas verdes en trigo (Last y Brettell, 1990; Orshinsky *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 1991) y cebada (Hunter, 1987; Kuhlmann y Foroughi-Wehr, 1989). Hunter (1987) patentó la utilización de maltosa como sustituto de sacarosa en cultivo de anteras.

En algunos estudios la utilización de esta fuente de carbono para la producción de plantas verdes a partir de callos y embriones de anteras de cebada, fue mucho más alta que cuando se usó maltosa (Hunter, 1988). El modo de acción de la maltosa es todavía desconocida. El efecto beneficioso de la maltosa se ha relacionado con su capacidad de permitir una osmolaridad más estable que la sacarosa en el medio de cultivo durante el desarrollo de los embriones (Kuhlmann y Foroughi-Wehr, 1989, Zhou *et al.*, 1991).

Vitaminas

Las vitaminas tiamina (vitamina B1) y myoinositol (vitamina B) son considerados importantes en el cultivo de células *in vitro* y satisfacen las necesidades que tiene el polen de cofactores enzimáticos (Hurtado y Merino, 1987). Genovesi y

Yingling (1995) reportaron que la tiamina y el ácido nicotínico son benéficos para inducir buenos niveles de respuesta androgénica, mientras que la piridoxina, inositol y el pantotenato al parecer reprimen la respuesta androgénica. El medio BAC3 contiene ácido nicotínico (0.5mg/L), piridoxina (0.5mg/L), tiamina (1mg/L), ácido ascórbico (1mg/L) y mioinositol (2000mg/L) (Szarejko, 2003).

Aminoácidos y amidas

Los aminoácidos y amidas han demostrado tener efectos benéficos en el cultivo *in vitro*, los más utilizados son la L-argina, ácidos L-aspártico, L-aspargina, ácido L-glutámico, L-glutamina, y la L-serina. La caseína hidrolizada es una mezcla de aminoácidos que juega un papel muy importante en la iniciación de embriones haploides en cultivos de anteras (Hurtado y Merino, 1987).

Reguladores de Crecimiento

Los constituyentes más cruciales en el cultivo de anteras son las auxinas y las citoquininas, entre las auxinas más utilizadas se destacan ANA (ácido naftalenacético), 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), AIA (ácido indolacético), AIB (ácido indolbutírico), Picloramo, Dicamba y AFA (ácido fenilacético); y entre las citoquininas se encuentran BAP (6-benzilaminopurina), Kinetina, y Zeatina. Para el desarrollo de los callos, las auxinas, en concentraciones medias y altas, actúan en sinergia con las citoquininas en concentraciones bajas.

Para la etapa de diferenciación, las auxinas, a bajas concentraciones estimulan el enraizamiento, mientras que las citoquininas, en altas concentraciones, favorecen el desarrollo de brotes, tallos y hojas, pero inhiben el enraizamiento. Para generar plantas enraizadas es muy importante realizar una combinación de auxinas y citoquininas en una proporción de 1:4 ó 1:2 (Lentini *et al.*, 1997).

Según Cai *et al.* (1992), la combinación de la auxina ANA (ácido naftalenacético 2 mg / L) y citoquininas BAP (6-benzilaminopurina 1 mg /L) para el cultivo *in vitro* de *Hordeum vulgare* L. mostró mejores resultados que al utilizar auxina 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) combinada ya sea con zeatina o BAP (6-benzilaminopurina) como citoquininas. El efecto beneficioso del medio suplementado con ANA (ácido naftalenacético) y BAP (6-benzilaminopurina) se asoció con una mejor formación de embriones y regeneración de plantas en comparación con las combinaciones de otro regulador de crecimiento.

En otro estudio se observó que el uso de la combinación de reguladores de crecimiento BAP (6-benzilaminopurina) y IAA (ácido indolacético) en cultivo *in vitro* de anteras de cereales favorecían la disminución de la oxidación de las anteras; ello podría deberse a que los reguladores de crecimiento mantienen la viabilidad de la pared de la antera facilitando la absorción de nutrimentos (Jing-li *et al.*, 1983).

El estudio sobre los efectos del genotipo y medio de cultivo en la inducción de callos y la regeneración de plantas a partir del cultivo *in vitro* de anteras de cebada, Gupta *et al.* (1995) expresaron que al utilizar NAA (ácido naftalenacético) o 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético 2mg/L) existe una efectiva formación callos y embriones; y además muestran que los callos que provenían de los medios de inducción conteniendo NAA (ácido naftalenacético), presentaban una frecuencia mayor de regeneración de plantas verdes en comparación con aquellos callos que provenían de los medios de cultivo de inducción suplementados con 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético).

Agentes Gelificantes

Los medios para el cultivo *in vitro* de anteras para la fase de inducción pueden ser utilizados en forma líquida o sólida, conformado por algún gelificante inerte.

La concentración del gelificante podría ser crítica para la maduración de embriones somáticos (Klimaszewska *et al.*, 2000). La etapa de maduración depende del

potencial osmótico, lo que determina una mayor disponibilidad de agua para permitir mejor crecimiento del callo (Prehn *et al.*, 2003).

Por otro lado, Pullman *et al.* (2005) reportaron que los agentes gelificantes afectan fuertemente la absorción de las auxinas, lo que sugiere que un aumento en la concentración del gelificante podría influir negativamente en la maduración de los embriones somáticos.

Tradicionalmente para el cultivo *in vitro* de anteras se utilizó agar como gelificante de los medios de cultivo debido a su disponibilidad y bajo costo pero los resultados sobre la respuesta androgénica no eran tan exitosos y podría existir tener un efecto inhibitorio. En la búsqueda de alternativas para la sustitución del agar en cultivos de callos embriogénicos en distintas especies se ha utilizado Agarosa, Almidón, Ficoll, y Gelrite. (George y Sherrington, 1984).

El uso de Gelrite como agente gelificante en cultivo *in vitro* se ha extendido cada vez más, ya que al producir un gel claro permite una mejor observación de los cultivos y su costo es mucho menor que otros gelificantes.

Jaramillo (1988) al realizar cultivo *in vitro* de anteras de *Lycopersicon esculentum* suplemento con distintas concentraciones al medio con 4 tipos de agar (Noble, Difco, Gelrite y Phytagar), de los cuales los mejores resultados obtenidos fueron con Agar Noble y Gelrite, concluyendo que las dosis mayores de cada solidificante ejercen influencias negativas en la inducción de callos y las intermedias tienden a inducir el máximo de callos, lo cual significa que los medios para el cultivo de anteras no deben ser ni muy duros ni muy suaves.

De acuerdo con la información existente podría utilizarse PEG (polietilenglicol) un poliéter como agente gelificante. Se indica que para el desarrollo de embriones somáticos maduros se requiere de una fase de acumulación de reservas en las células proembriogénicas. En base a estos antecedentes y de evidencias experimentales en distintas especies sugieren que esta fase se puede activar utilizando PEG (Pullman *et al.*,

2003) y auxinas en el medio de cultivo *in vitro* (Linossier *et al.*, 1997; Stasolla *et al.*, 2002; Stasolla y Yeung, 2003).

Sin embargo, para el cultivo *in vitro* de anteras de *Hordeum vulgare* L se han sugerido el uso de Ficoll 400 como gelificante, éste medio líquido que se obtiene perfecciona la inducción de callos (Szarejko, 2003).

El Ficoll es un polímero sintético de la sacarosa, inerte, no iónico y de alto peso molecular que incrementa la tensión superficial y la viscosidad del medio. De esta manera, las microsporas en división y los embriones flotan sobre el medio líquido, evitando las condiciones anaeróbicas y permitiendo elevadas tasas de embriogénesis y de producción de plantas verdes. (Cistué *et al.*, 1999). Un incremento progresivo en la concentración de Ficoll durante el periodo de cultivo también aumenta el número de plantas verdes regeneradas (Cistué *et al.*, 1995).

En el estudio para mejora del método del cultivo de anteras en trigo se utilizó medios de cultivo MS que contenían 6g/L de agarosa y otros 20% de Ficoll, los resultados mostraron mayor proporción de plantas verdes que plantas albinas con el uso de Ficoll (Lashermes, 1991).

Medio de Inducción

El medio de Inducción comprende dos tipos de estrés: uno osmótico por las elevadas concentraciones de azúcar que se utiliza; y otro nutricional, este último influye en la formación de callos y embriones.

Se han estudiado diferentes concentraciones de azúcares, distintas fuentes de nitrógeno orgánico, y la adición de diferentes auxinas al medio. En general se sugiere la sustitución de sacarosa por maltosa como fuente de carbohidratos y altas concentraciones de auxinas (2,4-D y/o ácido naftalenacético) con o sin citoquininas, las que estimulan la formación del microcallo a partir de las microsporas (Polci *et al.*, 2000).

El medio líquido de Inducción BAC3 (Anexo XIV) ha sido propuesto para cultivo *in vitro* de anteras de cebada (Szarejko y Kasha, 1991; Cai *et al.*, 1992), está basado en el medio BAC1 desarrollado por (Marsolais y Kasha, 1985) pero con algunas modificaciones dentro de las principales y con los cuales se han reportado mejores resultados en cuanto a formación de callos y embriones y regeneración de plantas verdes, se han mencionado el uso de alta concentración de maltosa como fuente de carbono, la combinación de auxina y citoquinina como reguladores de crecimiento y la adición de Ficoll como agente gelificante,

El medio BAC3 se ha utilizado de forma rutinaria en el cultivo de anteras de cebada obteniéndose mejores respuestas androgénicas que otros medios como FHG. Usando el medio de inducción de BAC3 ha sido posible producir plantas verdes en un amplio rango de genotipos cebada, incluidos aquellos que son recalcitrantes (Szarejko, 2003).

Al utilizar el medio líquido de inducción BAC3 suplementado de Ficoll 400 para el cultivo de anteras de *Hordeum vulgare* L. se han obtenido alta proporción de callos y embriones. El medio líquido proporciona aireación de los callos en la superficie sin hundirse en el fondo. Al flotar las anteras en el medio líquido condujo a un incremento en la inducción de embriones (Kao, 1981).

Medio de Regeneración

La composición del medio de regeneración permite la diferenciación y maduración de callos y embriones y la obtención de plantas verdes. A pesar de haber recibido una menor atención, la composición del medio de regeneración puede influir en el vigor de las plantas y, por lo tanto, en su supervivencia al ser transferidas a tierra. Generalmente, el medio de regeneración es el mismo que el usado para la inducción, con algunas modificaciones (Polci *et al.*, 2000).

Los más utilizados son modificaciones derivadas del medio Murashige y Skoog (MS) con concentraciones de carbohidratos similares a las utilizadas en los medios de cultivo de tejidos tradicionales (30g/L de sacarosa), utilizando agar (0,6 %) como gelificante, auxinas menos poderosas, y un balance hormonal a favor de las citoquininas (Polci *et al.*, 2000). Se ha visto que una reducción de la concentración de maltosa, la eliminación del nitrógeno orgánico y el uso de las auxinas IAA (ácido indolacético) o NAA (ácido naftalenacético) favorecen la producción de plantas verdes más vigorosas (Castillo *et al.*, 2000).

El tipo de agente gelificante para el medio de cultivo empleado en la etapa de regeneración de plantas también influye en la respuesta al cultivo de anteras, obteniéndose mejores resultados cuando se utiliza agarosa y gelrite en comparación con el agar (Nuñez *et al.*, 1989).

El medio sólido de regeneración BAC3 (Anexo XV) ha sido propuesto para el cultivo *in vitro* de *Hordeum vulgare* L., y está basado en la misma composición del medio BAC3 de inducción pero con algunas modificaciones como el reemplazo de Ficoll por Gelrite. Adicionalmente la sustitución de maltosa por sucrosa, la reducción de la concentración de myo-inositol y la utilización de IAA (ácido indolacético) y de Kinetina como reguladores de crecimiento (Szarejko, 2003).

- **Condiciones físicas de incubación de las anteras**

La temperatura y la luz juegan un papel importante en la androgénesis (Maheshwari *et al.*, 1980).

La temperatura adecuada para los procesos de formación de callos y de regeneración de plantas está entre los 24 y 26°C. Con temperaturas por encima de 28°C las anteras se degeneran rápidamente, disminuyen la formación de callos y la tasa de

regeneración de plantas y aumenta la presencia de plantas albinas (Lentini, Z. Martínez, C. Roca, R. 1997).

La calidad e intensidad de la luz no afectan drásticamente los resultados del cultivo *in vitro* de anteras; sin embargo, mantener el cultivo en la oscuridad durante la etapa de formación de callos favorece su rápido crecimiento. Una vez que los callos son transferidos al medio de regeneración, la luz es necesaria para el proceso de fotosíntesis en el desarrollo de las pequeñas plantas (Lentini *et al.*, 1997).

Para anteras de cebada la temperatura de incubación es de 25-28°C en oscuridad durante la fase de inducción y para la fase de regeneración la temperatura es de 22-26°C bajo condiciones de luz (Szarejko, 2003).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

El proyecto de investigación se realizó en La Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en las instalaciones del Departamento de Biotecnología (área de Cultivo de Tejidos), siendo este uno de los departamentos auspiciantes junto con el Programa de Cereales.

Los colaboradores científicos del proyecto fueron: M.Sc. Mónica Jadán (Directora), Ing. Tatiana Páez (Codirectora), Ing. Agr. Jacqueline Benítez (Responsable del área de Cultivo de Tejidos), el Dr. Eduardo Morillo (Líder del Departamento Nacional del Biotecnología), el Ing. Esteban Falconí (Jefe del Programa de Cereales) y la Ing. María de Cisne Aguilar (Tesista y Técnica del Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP, período 2009).

2.2. Zona de Estudio

2.2.1 Fase de Invernadero

El material vegetal donante para esta investigación fue recolectado de siembras semanales en el invernadero del Programa de Cereales, en macetas de plástico de 2kg de capacidad, conteniendo 12 semillas por variedad. Las condiciones del Invernadero son, temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, y humedad relativa del 80%.

2.2.2 Fase de Laboratorio

El cultivo *in-vitro* de anteras se desarrolló en el laboratorio de Cultivo de tejidos del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental “Santa Catalina” ubicada en la parroquia Cutuglagua del cantón Mejía, provincia de Pichincha, donde para la inducción de androgénesis se mantuvieron condiciones de oscuridad y temperatura de 25-28°C; y luz y 24±2°C para la fase de regeneración, estas condiciones se logran manejar dentro de una incubadora y en los cuartos de cultivo respectivamente.

Esta localidad se encuentra a 3058 metros sobre el nivel del mar, a 00° 22’ 00” de latitud sur y a 79° 32’ 00” de longitud occidental. La precipitación anual es de 1487 mm, y la temperatura promedio es de 12.04°C. La Estación presenta una humedad relativa del 76%.¹

2.3. Periodo de tiempo de investigación

La investigación se la desarrolló en un periodo de 9 meses.

2.4. Diseño Estadístico

En la presente investigación se realizó análisis de probabilidades (Análisis PROBIT) y un Diseño Completamente al Azar para evaluar tiempo de exposición máximo de las espigas al pre-tratamiento frío 4°C. Y para evaluar la influencia del genotipo y de los agentes gelificantes en el medio BAC3 propuestos para el cultivo *in vitro* sobre la capacidad androgénica se realizó un Diseño Completamente al Azar dispuesto en un arreglo factorial 5x3, los mismos fueron completados y analizados estadísticamente.

¹ Datos proporcionados por la Estación Meteorológica Izobamba, perteneciente al Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI), 2008

2.4.1 Supervivencia de Microsporas por medio del Análisis de Probabilidades (PROBIT)

Se determinó la supervivencia de las microsporas mediante tinción de anteras en solución de acetocarmín al 2% y las respectivas observaciones al microscopio (40x), a los 4, 7, 10 y 14 días de pre-tratamiento frío 4°C. Se considero microsporas muertas aquellas que bajo observación al microscopio se aprecian transparentes y sin color.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de probabilidades (PROBIT) en el programa estadístico SAS, el mismo que proporcionó valores del número de días de pre-tratamiento frío para una supervivencia de microsporas del 1 al 99%, que permitieron establecer las curvas de supervivencia para cada variedad.

2.4.2 Diseño para la evaluación de la influencia del genotipo y de medios de inducción propuestos para el cultivo *in vitro*, sobre la capacidad androgénica.

2.4.2.1 Unidad Experimental

La unidad experimental estuvo conformada por una caja Petri de 60 mm de diámetro por 15 mm de alto, conteniendo 40 anteras cultivadas en 3 ml de medio líquido de inducción.

2.4.1.2 Diseño experimental

Para determinar la influencia del genotipo y de los medios de inducción propuestos para el cultivo *in vitro* sobre la capacidad androgénica de cada variedad en estudio se utilizó un Diseño Completamente al Azar dispuesto bajo un arreglo Factorial con dos factores en estudio genotipo o variedad y medios de cultivo de inducción respectivamente. Se realizaron 10 observaciones por cada tratamiento.

2.4.2.3 Factores de estudio para el Diseño Factorial 5 x 3

a) Factor A: Variedades de cebada (V)

V_1 = INIAP-Cañicapa 2003

V_2 = Clipper

V_3 = INIAP-Quilotoa 2003

V_4 = variedad diferencial EMIR

V_5 = variedad diferencial I5

b). Factor B: Medio de Inducción BAC3 (m)

m_1 = BAC3+200 g/l Ficoll

m_2 = BAC3+250 g/l PEG (Polietilenglicol)

m_3 = BAC3+0.35 g/l Gelrite

Las concentraciones de Ficoll, PEG y Gelrite que se utilizaron fueron elegidas de acuerdo a ensayos preliminares realizados (Anexo XIV).

2.4.2.4 Modelo Estadístico

El siguiente modelo estadístico de efectos es el que se siguió para este diseño (Diseño Factorial Ax B).

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$i = 1, 2, \dots, 4; \quad j = 1, 2, \dots, 3; \quad k = 1, 2, 3, \dots, 20$

Donde:

μ = media general

α_i = efecto debido al i-ésimo nivel del factor A

β_j = efecto debido al j-ésimo nivel del factor B

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción en la combinación ij

ε_{ijk} = error aleatorio.

2.4.3 Diseño completamente al azar (DCA) para tiempo máximo de días de pre-tratamiento frío 4°C.

Cuadro. 2.4.3.1 Tratamientos resultantes para la evaluación del tiempo de pre-tratamiento a 4°C para las cinco variedades de cebada. Quito-Pichincha, 2010.

SÍMBOLO	INTERACCIÓN	TRATAMIENTO
T ₁	V ₁ D ₁	Espigas de la variedad INIAP-Cañicapa 2003 sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 4 días.
T ₂	V ₁ D ₂	Espigas de la variedad INIAP- Cañicapa 2003 sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 7 días.
T ₃	V ₁ D ₃	Espigas de la variedad INIAP- Cañicapa 2003 sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 10 días.
T ₄	V ₁ D ₄	Espigas de la variedad INIAP- Cañicapa 2003 sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 14 días.
T ₅	V ₂ D ₁	Espigas de la variedad Clipper sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 4 días.
T ₆	V ₂ D ₂	Espigas de la variedad Clipper sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 7 días.
T ₇	V ₂ D ₃	Espigas de la variedad Clipper sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 10 días.
T ₈	V ₂ D ₄	Espigas de la variedad Clipper sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 14 días.
T ₉	V ₃ D ₁	Espigas de la variedad INIAP-Quilotoa 2003 sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 4 días.
T ₁₀	V ₃ D ₂	Espigas de la variedad INIAP-Quilotoa 2003 sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 7 días.
T ₁₁	V ₃ D ₃	Espigas de la variedad INIAP-Quilotoa 2003 sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 10 días.
T ₁₂	V ₃ D ₄	Espigas de la variedad INIAP-Quilotoa 2003 sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 14 días.
T ₁₃	V ₄ D ₁	Espigas de la variedad diferencial EMIR sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 4 días.
T ₁₄	V ₄ D ₂	Espigas de la variedad diferencial EMIR sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 7 días.
T ₁₅	V ₄ D ₃	Espigas de la variedad diferencial EMIR sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 10 días.
T ₁₆	V ₄ D ₄	Espigas de la variedad diferencial EMIR sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 14 días.
T ₁₇	V ₅ D ₁	Espigas de la variedad diferencial I5 sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 4 días.
T ₁₈	V ₅ D ₂	Espigas de la variedad diferencial I5 sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 7 días.
T ₁₉	V ₅ D ₃	Espigas de la variedad diferencial I5 sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 10 días.
T ₂₀	V ₅ D ₄	Espigas de la variedad diferencial I5 sometidas a pre-tratamiento frío 4°C por 14 días.

Donde:

V₁ = INIAP-Cañicapa 2003,

D₁ = 4 días

V₂ = Clipper,

D₂ = 7 días

V₃ = INIAP-Quilotoa 2003,

D₃ = 10 días

V₄ = variedad diferencial EMIR,

D₄ = 14 días

V₅ = variedad diferencial I5

2.4.4 Diseño completamente al azar (DCA) tanto para la formación de callos y formación de embriones

Cuadro. 2.4.4.1 Tratamientos resultantes de la interacción de cinco variedades de cebada con tres medios de cultivo *in vitro* de anteras. Quito-Pichincha, 2010.

SÍMBOLO	INTERACCIÓN	TRATAMIENTO
T ₁	V ₁ M ₁	Anteras de la variedad INIAP-Cañicapa 2003 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 200 g/l de Ficoll
T ₂	V ₁ M ₂	Anteras de la variedad INIAP-Cañicapa 2003 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 250 g/l de PEG
T ₃	V ₁ M ₃	Anteras de la variedad INIAP-Cañicapa 2003 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 0.35 g/l de Gelrite
T ₄	V ₂ M ₁	Anteras de la variedad Clipper cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 200 g/l de Ficoll
T ₅	V ₂ M ₂	Anteras de la variedad Clipper cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 250 g/l de PEG
T ₆	V ₂ M ₃	Anteras de la variedad Clipper cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 0.35 g/l de Gelrite
T ₇	V ₃ M ₁	Anteras de la variedad INIAP-Quilotoa 2003 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 200 g/l de Ficoll
T ₈	V ₃ M ₂	Anteras de la variedad INIAP-Quilotoa 2003 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 250 g/l de PEG
T ₉	V ₃ M ₃	Anteras de la variedad INIAP-Quilotoa 2003 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 0.35 g/l de Gelrite
T ₁₀	V ₄ M ₁	Anteras de la variedad diferencial EMIR cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 200 g/l de Ficoll
T ₁₁	V ₄ M ₂	Anteras de la variedad diferencial EMIR cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 250 g/l de PEG
T ₁₂	V ₄ M ₃	Anteras de la variedad diferencial EMIR cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 0.35 g/l de Gelrite
T ₁₃	V ₅ M ₁	Anteras de la variedad diferencial I5 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 200 g/l de Ficoll
T ₁₄	V ₅ M ₂	Anteras de la variedad diferencial I5 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 250 g/l de PEG
T ₁₅	V ₅ M ₃	Anteras de la variedad diferencial I5 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 0.35 g/l de Gelrite

Donde:

V₁ = INIAP-Cañicapa 2003

V₂ = Clipper

V₃ = INIAP-Quilotoa 2003

V₄ = variedad diferencial EMIR

V₅ = variedad diferencial I5

M₁ = BAC3+200 g/l Ficoll

M₂ = BAC3+250 g/l PEG (Polietilenglicol)

M₃ = BAC3+0.35 g/l Gelrite

2.4.5. Modelo Estadístico

El siguiente modelo estadístico de efectos es el que se siguió para los diseños (DCA).

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde: μ = media general
 τ_i = efecto del tratamiento i
 ε_{ijk} = error atribuible a la medición Y_{ij} .

2.4.6. Análisis de Varianza

Dependiendo de cada variable de estudio se realizaron tres Análisis de Varianza (ADEVA), uno para evaluar la influencia del genotipo y de medios de inducción propuestos para el cultivo *in vitro* sobre la capacidad androgénica con el Diseño factorial 5 x 3, y los otros dos para evaluar el tiempo máximo de pre-tratamiento frío y respuestas androgénicas (callos o embriones) aplicando el Diseño Completamente al Azar.

El análisis de varianza para cada diseño experimental se detalla a continuación:

Cuadro 4.1 ADEVA para la evaluación de respuestas androgénicas en 15 tratamientos resultantes de la interacción de cinco variedades de cebada con tres medios de cultivo *in vitro* de anteras. Quito-Pichincha, 2010.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de Libertad (G L)
Total	149
Variedades de Cebada (V)	4
Medios de cultivo (M)	2
V x M	8
Error Experimental	135

Cuadro 4.2 ADEVA para la evaluación del tiempo máximo de pre-tratamiento frío 4°C (4, 7, 10,14 días) en 20 tratamientos resultantes para las cinco variedades de cebada. Quito-Pichincha, 2010.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de Libertad (G L)
Total	59
Tratamientos	19
Error Experimental	40

Cuadro 4.3 ADEVA para la evaluación de respuestas androgénicas (formación de callos y formación de embriones) en 15 tratamientos resultantes de la interacción de cinco variedades de cebada con tres medios de cultivo *in vitro* de anteras. Quito-Pichincha, 2010.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de Libertad (G L)
Total	149
Tratamientos	14
Error Experimental	135

2.4.7 Pruebas de significación

Las diferencias estadísticas presentadas en los análisis de varianzas para todos los diseños experimentales de los factores de estudio fueron determinadas por medio de la prueba de Tukey al 5%.

2.5. Equipos y materiales

2.5.1. Materiales de Campo

- Semillas de las cinco variedades de cebada. (ver factores en estudio)
- Macetas de 2 kg de capacidad
- Urea (fertilizante)

2.5.2. Materiales de Laboratorio

- Material de vidrio de laboratorio
- Cajas Petri de vidrio de 60mm y 100mm
- Agitador
- Micropipetas
- Recipientes plásticos
- Papel Aluminio
- Papel Toalla
- Equipo de disección
- Filtros milipore 0.22um
- Jeringas de 10ml
- Cinta Parafilm

2.5.3 Reactivos para cultivo *in Vitro*

- Gelrite
- Alcohol Potable
- Ácido ascórbico (C₆H₈O₆)
- Hidróxido de Potasio (KOH)
- Tiamina (B1)
- Ácido nicotínico

- Ficoll (polímero sintético de sacarosa)
- PEG (Polietilenglicol)
- Piridoxina
- Acido Bórico (HBO_3)
- Sulfato de Manganeso Heptahidratado ($\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de Zinc Heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)
- Yoduro de Potasio (KI)
- Molibdato de Sodio Dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de Cobre Pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de Cobalto Hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)
- Nitrato de Plata (AgNO_3)
- Nitrato de Potasio (KNO_3)
- Nitrato de Amonio (NH_4NO_3)
- Sulfato de Amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
- Fosfato diácido de Potasio (KH_2PO_4)
- Fosfato diácido de Sodio Monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de Calcio heptahidratado ($\text{CaCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)
- Acido Cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)
- EDTA Sal de Sodio (FeNa_2EDTA)
- Maltosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)
- Acido Pirúvico ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$)
- Myo-Inositol
- Ácido naftalenacético (NAA)
- 6-bencilaminopurina (BAP)
- Acido Indol acético (IAA)
- Kinetina
- Acido Acético Glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)
- Carmín

2.5.4 Equipos de laboratorio

- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Balanza de precisión
- Estéreo microscopio
- Refrigeradora
- Destilador de agua
- pHmetro
- Estufa
- Microscopio óptico
- Hot plate

2.6 Procedimientos

Los procedimientos están divididos en dos etapas, la Etapa I incluye la selección de las variedades de estudio, siembra, colecta, esterilización superficial de las espigas, correlación entre la morfología de las espigas de cebada y el estado de desarrollo de las microsporas y la determinación del pre-tratamiento frío óptimo para las espigas. La Etapa II incluye la formulación de medios de cultivo, aislamiento de las anteras y la inducción de androgénesis de las mismas. La mayoría de los procedimientos para ambas etapas se han aplicado en base al protocolo sugerido por Szarejko (2003) para el cultivo *in vitro* de anteras de cebada.

ETAPA I

2.6.1 Selección de las variedades en estudio.

Para la presente investigación las cinco variedades de cebada fueron seleccionadas por el Programa de Cereales del INIAP Estación Experimental Santa

Catalina de acuerdo a sus características agronómicas, demanda en el mercado y niveles de producción (Figura 2.1).

- INIAP-Cañicapa 2003 seleccionada por ser la variedad élite del INIAP debido a sus niveles de resistencia intermedia a enfermedades y productividad.
- INIAP-Quilotoa 2003 seleccionada por ser una línea hexástica (seis carreras), característica agronómica de preferencia de los agricultores.
- Clipper seleccionada debido a que es una variedad para uso en la industria cervecera por ende de gran interés económico.
- I5 y EMIR variedades diferenciales seleccionadas debido a los genes de resistencia a roya amarilla que poseen.



Figura.2.1 Variedades de Cebada. a. Variedad Diferencia I5 (dos hileras); b. INIAP-Quilotoa 2003 (seis hileras); c. INIAP-Cañicapa 2003; d. Variedad Clipper (dos hileras); e. Variedad Diferencial Emir (dos hileras).

2.6.2. Siembra del material donante

La siembra del material vegetal fue realizada semanalmente en el invernadero del Programa de Cereales (Figura.2.2), en macetas de plástico de 2kg de capacidad, conteniendo 12 semillas por variedad, previamente desinfectadas con Carboxín 20% y Captan 20%.

El material de invernadero recibió todas las prácticas normales de manejo del cultivo de cebada según Rivadeneira *et al.*, 2003.



Figura 2.2. Cultivo de las 5 variedades de Cebada en el Invernadero del Programa de Cereales.

2.6.3. Colecta del material vegetal

Las espigas luego de ser cortadas fueron colocadas en un frasco con agua destilada, de tal manera que la base de las espigas permanezca sumergida en el agua y cubiertas con una funda plástica para evitar el contacto con el ambiente hasta llegar al laboratorio.

Inicialmente se recolectaron espigas de cada variedad en estudio en diferentes estados de desarrollo, las mismas que sirvieron para establecer una correlación entre el estado de desarrollo vegetativo de la planta y el estado de desarrollo uninucleado en fase media y tardía de la microspora, debido a que este estado es indispensable para el cultivo *in-vitro*.

Las siguientes colectas se realizaron para evaluar tiempo de exposición máximo de las espigas al pre-tratamiento frío, en el cual el 90% de microsporas permanecían viables; y las colectas posteriores para evaluar la influencia del genotipo y de medios de inducción propuestos para el cultivo *in vitro*, sobre la capacidad androgénica de las cinco variedades de cebada, para esto ya se tomó en cuenta la correlación entre el estado de desarrollo vegetativo de la planta de cebada y el estado de desarrollo del polen.

2.6.4. Esterilización superficial de las espigas

Las espigas una vez recolectadas y aún envueltas en la vaina de la hoja bandera fueron esterilizadas rociando superficialmente alcohol al 75% durante un minuto y se retiró cuidadosamente el follaje sobrante, es decir, eliminando las hojas que empiezan desde las bases hasta aquellas que se encuentren a la altura de la penúltima hoja.

2.6.5. Correlación entre el estado vegetativo de la planta y el estado de desarrollo de las microsporas.

Se debe establecer para cada variedad una relación que nos indique el momento en el que las espigas deben ser recolectadas para que la mayoría de las microsporas estén en estado adecuado de desarrollo, indispensable para el cultivo *in vitro* de anteras.

Para identificar el adecuado estado vegetativo de la planta se utilizó dos criterios la Escala Zadocks de los estados Fenológicos de los cereales y la distancia que existe entre la penúltima hoja y la hoja bandera de la espiga (Szarejko, 2003); y para identificar el adecuado estado de desarrollo de las microsporas (uninucleado medio y tardío) se realizó tinciones en solución de acetocarmín al 2% y observaciones al microscopio (apartado 2.6.6) para identificar diferentes estados de desarrollo del polen y establecer el estado uninucleado adecuado.

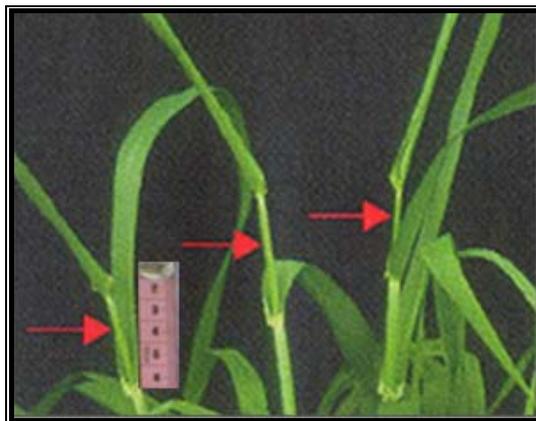


Figura.2.3 Espigas de cebada en diferentes estados de desarrollo vegetativo (Szarejko, 2003).

2.6.6 Determinación del estado de desarrollo de las microsporas

Para verificar el estado uninucleado medio y tardío de las microsporas antes de ser inoculadas en los medios de inducción se realizaron tinciones de las anteras en solución de acetocamin al 2%.

Para las tinciones se extrajeron anteras al azar de dos o tres espiguillas, fueron colocadas sobre portaobjetos y posteriormente teñidas con una gota del colorante (acetocarmin al 2%) (Rush y Shao Q, 1996). Con ayuda de una varilla de vidrio se presionó las anteras para permitir la salida de las microsporas, teniendo cuidado de no dañar el tejido. A continuación con una pinza se extrajeron los restos de anteras tratando de dejar sólo la masa de células en las placas (tejido esporógeno), e inmediatamente se añadió otra gota de colorante.

Después de 45 minutos se colocaron los cubre objetos en las muestras y fueron observadas en un microscopio óptico con un aumento de 40x a fin de verificar el estado uninucleado medio y tardío del polen para continuar con el proceso (Brifht S,W; y Jones M,G., 1985).

Este procedimiento se realizó también para establecer la correlación entre el estado de desarrollo del polen y el estado de desarrollo vegetativo de la planta; y el tiempo máximo de tratamiento frío 4°C en el cual el 90% de microsporas permanecían viables.



Figura.2.4 Tinción de anteras en solución de acetocarmin 2%, para observar el estado de desarrollo del polen.

2.6.7 Pre-tratamiento de las espigas a temperatura fría 4°C

Para evaluar el tiempo máximo de tratamiento frío 4°C en el cual el 90% de microsporas permanecían viables y previo a la inducción de anteras, se extrajeron las anteras de las espigas esterilizadas dentro de cámara de flujo laminar y se las colocó en cajas Petri de doble compartimento. En el compartimento pequeño se adicionó unas gotas de agua estéril (aproximadamente 1ml), mientras que en el compartimento grande se colocó de 3 a 4 espigas de cebada. Las cajas de doble compartimento fueron selladas con parafilm, envueltas en papel aluminio, y colocadas en refrigeración a 4°C durante cuatro, siete, diez y catorce días para cada variedad, terminado estos períodos se realizó tinciones de anteras en acetocarmín al 2% (apartado 2.6.6) de esta manera se pudo diferenciar y contabilizar microsporas viables y no viables y finalmente establecer una relación porcentual entre el tiempo de exposición y la sobrevivencia de las microsporas.

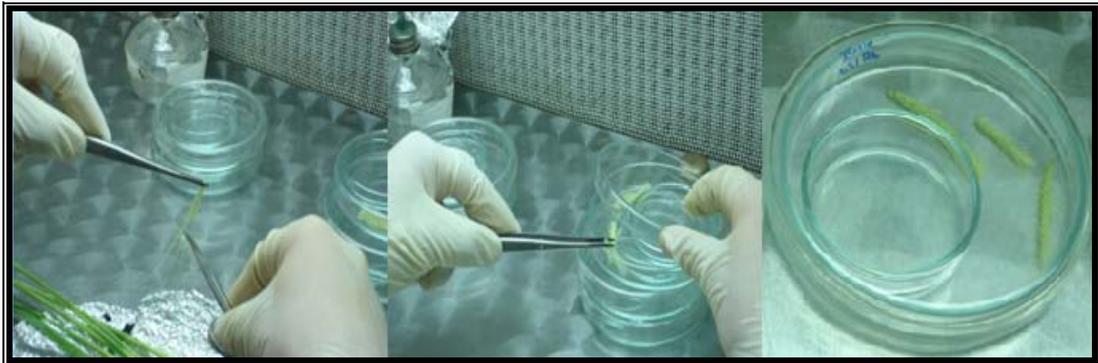


Figura.2.5 Procedimiento de extracción de las espigas de cebada para pre-tratamiento frío 4°C

ETAPA II

2.6.8 Formulación del medio de cultivo

Para el cultivo de las anteras de cebada (*H. vulgare* L.) se formuló el medio de cultivo de inducción BAC3 suplementado con Ficoll, PEG y Gelrite respectivamente (Anexo XIV), para estimular la formación de callos y embriones.

Los componentes el medio fueron esterilizados utilizando un filtro de membrana Milipore de tamaño de poro 0.22 micras, el pH del medio fue ajustado con NaOH 1N y HCl 1N a 6.2 y finalmente los agentes gelificantes PEG, Gelrite y Ficoll fueron autoclavados y adicionados al medio.

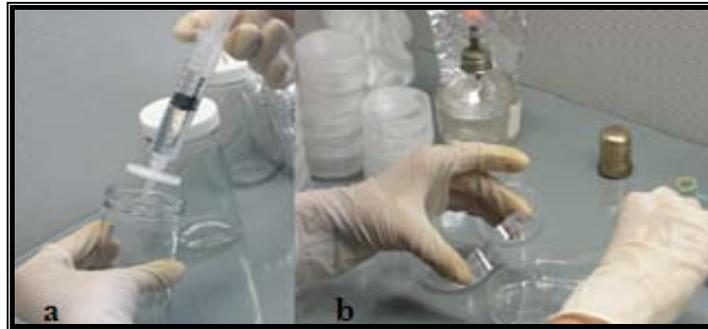


Figura.2.6. Preparación de medios: a) Esterilización por filtro milipore b) Dispensión del medio en cajas Petri.

2.6.9. Aislamiento de las anteras

Las anteras de las espigas del pre-tratamiento frío antes de ser inoculadas en los medios de inducción fueron nuevamente teñidas en solución de acetocamin al 2% (apartado 2.6.6) para verificar el estado uninucleado de las microsporas. Aquellas espigas que poseían más del 20% de microsporas no viables fueron descartadas.

Con el fin de aislar las anteras de los filamentos se cortaron las flores por su base y posteriormente se extrajo una densidad de 40 anteras con pinzas estériles utilizando el estéreo microscopio e inmediatamente colocadas en las cajas Petri que contenían 3 ml de medio de cultivo de inducción para cada tratamiento.

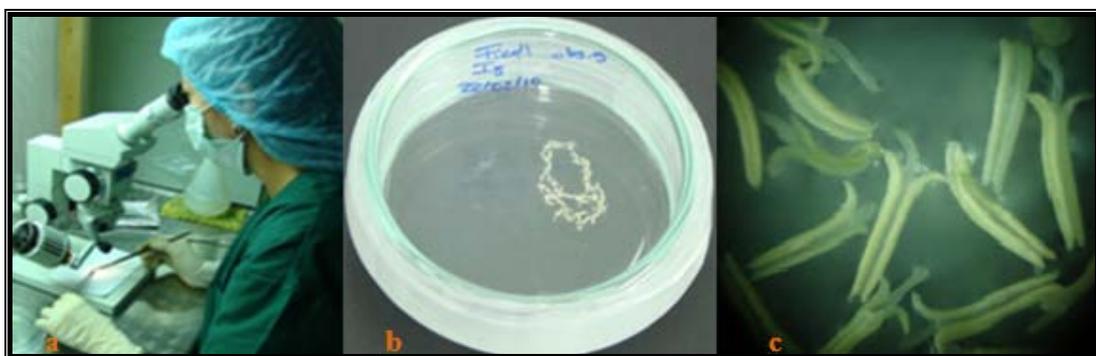


Figura.2.7 a. Aislamiento de anteras bajo estéreo microscopio. b. Anteras sembradas en medio de cultivo BAC3 c. Microfotografía de Anteras en el medio de cultivo BAC3.

2.6.10 Inducción de Androgénesis

Las anteras inoculadas en las cajas Petri con los medios de cultivo de inducción fueron selladas con cinta parafilm, envueltas con papel aluminio y finalmente colocadas en una incubadora donde permanecieron en la oscuridad y a una temperatura entre 24-25 °C en condiciones estériles.

Para evaluar la capacidad de inducción de androgénesis del medio de cultivo BAC3 suplementado con Ficoll, Polietilenglicol y Gelrite respectivamente para las cinco variedades de cebada, las espigas fueron recolectadas utilizando la correlación entre el estado vegetativo de la planta de cebada y el estado de desarrollo del polen (apartado 2.6.5), aplicando pre-tratamiento frío 4°C de las espigas durante 4 días (apartado 2.6.7) y verificación del estado uninucleado de las microsporas mediante tinción de anteras en acetocarmín 2% y observación al microscopio (apartado 2.6.6). Para entablar el ensayo se introdujo un total de 6000 anteras.



Figura. 2.8. Incubación de anteras en medio de cultivo BAC3 suplementados con Ficoll, Gelrite y PEG a 25°C en oscuridad.

2.7. Análisis de Datos

Para el análisis de los datos que se obtuvieron durante la investigación de utilizaron los paquetes estadísticos SPSS (versión 15.0) y SAS.

2.7.1. Variables y métodos de evaluación

2.7.1.1 Variables para la evaluación del tiempo de exposición máximo de las espigas al pre-tratamiento frío, en el cual el 90% de microsporas permanecen viables.

2.7.1.1.1 Análisis de Sobrevivencia

Para determinar el tiempo máximo de pre-tratamiento frío a 4°C que garantice el 90% de sobrevivencia de las microsporas presentes en las espigas seleccionadas se contabilizaron la sobrevivencia de microsporas a los 4, 7, 10, y 14 días después del pre-tratamiento frío 4°C, mediante tinción de anteras en solución de acetocarmín al 2% y observación microscópica. Se consideró a las microsporas no viables (muertas) aquellas que al ser observadas bajo el microscopio óptico no se tiñen (apariencia transparente).

Se realizó un análisis de probabilidades (análisis PROBIT), en el programa estadístico SAS, el mismo proporcionó el número máximo de días que las espigas deben ser sometidas bajo tratamiento frío para las variedades de estudio. Además se realizó un Diseño completamente al azar entre los días aplicados para observar si existía diferencia estadística entre los periodos.

2.7.1.2. Variables para la evaluación de la influencia del genotipo y de medios de inducción propuestos para el cultivo *in vitro*, sobre la capacidad androgénica.

2.7.1.2.1 Número total de respuestas androgénicas

A los 15 días de inducción se cuantificó el número total de anteras con respuesta androgénica (sobre la superficie de la antera), esto es debido a que teóricamente, las primeras respuestas androgénicas empiezan a surgir durante los primeros días de inducción (Figura 3.3.1).

A través del software SPSS y SAS se realizaron las pruebas de Tukey de los tratamientos evaluados que permitan determinar las diferencias significativas de la capacidad androgénica de cada una de las variedades en estudio. Finalmente se estableció el porcentaje del número de respuestas androgénicas con respecto al número de anteras inoculadas.

Las estructuras que se formaron en la superficie de las anteras y alrededor de ellas (respuestas androgénicas) se las dividió en dos tipos, formación de callos y formación de embriones de acuerdo a sus características morfológicas y proporción de crecimiento. Para determinar si existían diferencias tanto para el número de callos y como para el número de embriones formados en los diferentes tratamientos evaluados para la capacidad androgénica se aplicó un Diseño completamente al Azar (DCA) respectivamente.

2.7.1.2.2 Formación de callos

Para la evaluación, estructuras o aglomeraciones formadas de células no diferenciadas a manera de masa amorfa o de mórula, que se forman a los 30 días de inducción sobre la superficie de la antera o alrededor de ella, se denominaron callos (Figura 3.3.1.1).

Se contabilizó el número de callos formados en el medio de cultivo BAC3 durante el período de incubación de las anteras. El porcentaje se determinó en base al número de anteras en cultivo.

2.7.1.2.3 Formación de estructuras embrionarias

Para la evaluación, masas compactas de color blanco o beige y de gran tamaño en comparación a los callos, y se forman a los 50 días de inducción se denominaron embriones (Figura 3.3.2.1). Se contabilizó el número de embriones formados en el medio de cultivo BAC3 durante el período de incubación de las anteras. El porcentaje se determinó en base al número de anteras en cultivo.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Correlación entre el estado vegetativo de la planta y el estado de desarrollo de las microsporas.

Las espigas de las variedades de estudio deben ser recolectadas entre los estados Z4.0 y Z4.9 de la escala Zadocks (Cuadro 3.1.1, Gráfico 3.1.1 y Tabla 1.1), es decir, cuando la lígula de la hoja bandera este visible y la vaina esta engrosada, aproximadamente a una distancia de 5-6 cm entre la penúltima hoja y la hoja bandera, en estos, las microsporas muestran estado uninucleado medio y tardío.

Cuadro 3.1.1. Correlación entre el estado vegetativo de la planta y el estado de desarrollo de las microsporas para las variedades de estudio. Quito-Pichincha, 2010.

Variedad	Estado Vegetativo de Desarrollo (Escala Zadocks)	Distancia entre la penúltima hoja y la hoja bandera	Estado de desarrollo del Polen
INIAP-Cañicapa	Z4.0 y Z4.9	5 cm	Uninucleado medio y tardío
INIAP-Quilotoa	Z4.0 y Z4.9	5 cm	Uninucleado medio y tardío
Diferencial Emir	Z4.0 y Z4.9	6 cm	Uninucleado medio y tardío
Diferencial I5	Z4.0 y Z4.9	6 cm	Uninucleado medio y tardío
Clipper	Z4.0 y Z4.9	6 cm	Uninucleado medio y tardío

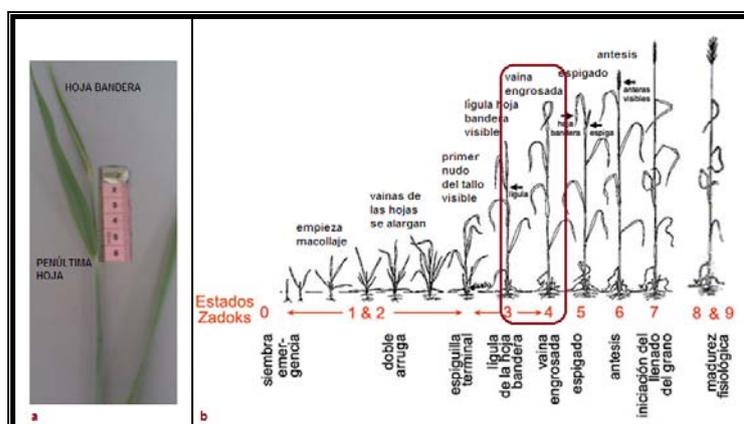


Gráfico 3.1.1 Estado de desarrollo adecuado de las espigas de cebada, a) Distancia entre la penúltima hoja y la hoja bandera. b) Estado Z3-Z4 de la Escala de Zadocks. Quito-Pichincha, 2010.

3.2 Evaluación del tiempo de exposición máximo de las espigas de cebada al pre-tratamiento frío.

Para este estudio de cultivo *in vitro* de anteras de cebada fue necesario manejar una sobrevivencia de microsporas del 90% al finalizar el pre-tratamiento frío, para obtener buenos resultados con respecto a las respuestas androgénicas, formación de callos y embriones.

3.2.1 Análisis de Sobrevivencia de las Microsporas

Con los datos de las variedades evaluadas en el laboratorio con respecto al número de microsporas vivas se realizó el análisis estadístico de probabilidades (PROBIT), el cual generó una serie de probables valores del número de días de pre-tratamiento frío que se debe aplicar a las espigas de cebada para obtener una sobrevivencia de microsporas desde el 1% al 99% con sus respectivos límites de confianza. Los Anexos VIII al XII muestran los resultados del análisis, en donde a medida que se incrementa el número de días de pre-tratamiento frío disminuye el porcentaje de sobrevivencia de las microsporas.

Cuadro 3.2.1 Número de Días de Pre-tratamiento Frío 4°C obtenidos del Análisis de Probabilidades (PROBIT) para la sobrevivencia del 90% de microsporas para las variedades de estudio. Quito-Pichincha, 2010.

ANÁLISIS PROBIT				
VARIEDAD	PROBABILIDAD	DÍAS (No.)	95 % Límites Fiduciales	
			MÍNIMO	MÁXIMO
Emir	0.90	4.29	4.15	4.43
I5	0.90	5.23	5.12	5.35
Quilotoa	0.90	5.34	5.17	5.51
Cañicapa	0.90	4.29	4.18	4.39
Clipper	0.90	4.76	4.62	4.89

En el cuadro 3.2.1 se muestra que el número de días más adecuado de pre-tratamiento frío para la Variedad Diferencial Emir es de 4 días, para la Variedad Diferencial I5 de 5 días, para la Variedad INIAP-Quilotoa de 5 días, para la Variedad

INIAP-Cañicapa 4 días, y para la Variedad Clipper de 5 días, período en el cual hay la probabilidad de manejar el 90% de sobrevivencia de microsporas. En este ensayo, de los períodos 4, 7, 10, y 14 días de pre-tratamiento frío propuestos y para fines de estandarizar el protocolo de cultivo *in-vitro* de anteras se eligió el período de 4 días para trabajar con todas las variedades.

Cuadro. 3.2.2 Análisis de efectos y estimador del parámetro, obtenidos para determinar la probabilidad de los días de pre-tratamiento frío 4°C entre 1% al 99% de sobrevivencia de microsporas para la Variedad INIAP-Cañicapa, Quito-Pichincha, 2010.

VARIEDAD INIAP-CAÑICAPA							
Análisis de Efecto							
Efecto	GL	Chi-cuadrado de Wald		Pr > Chi-Cuadrado			
Log10(DÍAS)	1	3997.6278		<.0001			
Análisis del Estimador del Parámetro							
Parámetro	GL	Estimador	Error Estándar	95% Límites de Confianza		Chi-Cuadrado	Pr>
Intercept	1	4.5982	0.0786	4.4442	4.7522	3425.17	<.0001
Log10(DÍAS)	1	-5.2451	0.0830	-5.4077	-5.0825	3997.63	<.0001

Cuadro. 3.2.3 Análisis de efectos y estimador del parámetro, obtenidos para determinar la probabilidad de los días de pre-tratamiento frío 4°C entre 1% al 99% de sobrevivencia de microsporas para la Variedad Clipper. Quito-Pichincha, 2010.

VARIEDAD CLIPPER							
Análisis de Efecto							
Efecto	GL	Chi-cuadrado de Wald		Pr > Chi-Cuadrado			
Log10(DÍAS)	1	2865.2002		<.0001			
Análisis del Estimador del Parámetro							
Parámetro	GL	Estimador	Error Estándar	95% Límites de Confianza		Chi-Cuadrado	Pr>
Intercept	1	4.4207	0.0839	4.2562	4.5852	2774.91	<.0001
Log10(DÍAS)	1	-4.6343	0.0866	-4.8040	-4.4646	2865.20	<.0001

Cuadro 3.2.4 Análisis de efectos y estimador del parámetro, obtenidos para determinar la probabilidad de los días de pre-tratamiento frío 4°C entre 1% al 99% de sobrevivencia de microsporas para la Variedad Diferencial Emir. Quito-Pichincha, 2010.

VARIEDAD DIFERENCIAL EMIR							
Análisis de Efecto							
Efecto	GL	Chi-cuadrado de Wald		Pr > Chi-Cuadrado			
Log10(DÍAS)	1	2645.7288		<.0001			
Análisis del Estimador del Parámetro							
Parámetro	GL	Estimador	Error Estándar	95% Límites de Confianza		Chi-Cuadrado	Pr>
Intercept	1	3.9506	0.0803	3.7931	4.1080	2419.49	<.0001
Log10(DÍAS)	1	-4.2174	0.0820	-4.3781	-4.0567	2645.73	<.0001

Cuadro. 3.2.5 Análisis de efectos y estimador del parámetro, obtenidos para determinar la probabilidad de los días de pre-tratamiento frío 4°C entre 1% al 99% de sobrevivencia de microsporas para la Variedad Diferencial I5. Quito-Pichincha, 2010.

VARIEDAD DIFERENCIAL I5							
Análisis de Efecto							
Efecto	GL	Chi-cuadrado de Wald		Pr > Chi-Cuadrado			
Log10(DÍAS)	1	3587.7049		<.0001			
Análisis del Estimador del Parámetro							
Parámetro	GL	Estimador	Error Estándar	95% Límites de Confianza		Chi-Cuadrado	Pr>
Intercept	1	5.3228	0.0918	5.1428	5.5028	3358.71	<.0001
Log10(DÍAS)	1	-5.6219	0.0939	-5.8058	-5.4379	3587.70	<.0001

Cuadro. 3.2.6 Análisis de efectos y estimador del parámetro, obtenidos para determinar la probabilidad de los días de pre-tratamiento frío 4°C entre 1% al 99% de sobrevivencia de microsporas para la Variedad INIAP-Quilotoa. Quito-Pichincha, 2010.

VARIEDAD INIAP-QUILOTOA							
Análisis de Efecto							
Efecto	GL	Chi-cuadrado de Wald		Pr > Chi-Cuadrado			
Log10(DÍAS)	1	2073.1080		<.0001			
Análisis del Estimador del Parámetro							
Parámetro	GL	Estimador	Error Estándar	95% Límites de Confianza		Chi-Cuadrado	Pr>
Intercept	1	4.4488	0.0975	4.2577	4.6399	2081.76	<.0001
Log10(DÍAS)	1	-4.3512	0.0956	-4.5385	-4.1639	2073.11	<.0001

Los datos del análisis PROBIT de sobrevivencia de microsporas para cada variedad fueron evaluados por medio de la prueba de Chi-Cuadrado las cuales muestran el análisis de efectos y el análisis del estimador del parámetro, indicando significancia estadística, es decir que en general, todas las curvas de probabilidad se ajustaron a una tendencia probalística, que permitió identificar los valores que constituyen buenas aproximaciones desde el 1% al 99% (Anexos VIII al XII). El valor $p < 0.001$ mostrado en los cuadros de prueba de Chi-Cuadrado para todas las variedades de estudio indica que existe relación dependiente entre los días de pre-tratamiento frío y la sobrevivencia de las microsporas (Cuadros 3.2.2 al 3.2.6).

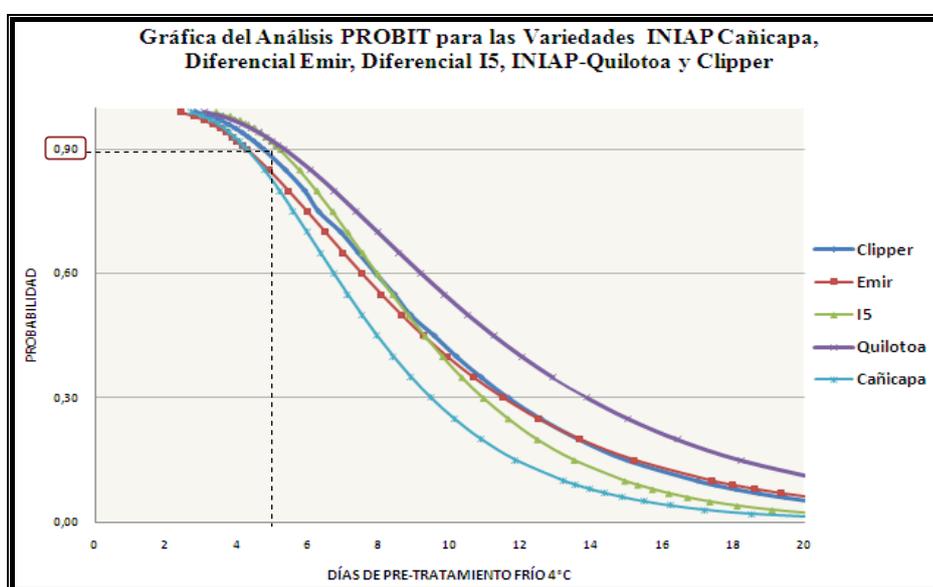


Gráfico 3.2.1. Curvas del Análisis PROBIT para las variedades INIAP-Cañicapa, Diferencial Emir, Diferencial I5, INIAP-Quilotoa y Clipper a los diferentes días de pre-tratamiento frío. Quito-Pichincha, 2010.

Las curvas del análisis PROBIT de la sobrevivencia de microsporas a los diferentes días de pre-tratamiento frío (4, 7, 10, y 14 días) para todas las variedades de estudio se muestran en el Gráfico 3.2.1 donde se aprecia un claro efecto pre-tratamiento-respuesta con un aumento en la mortalidad o un descenso en la probabilidad de sobrevivencia a medida que se incrementa el número de días de pre-tratamiento frío. Se observa que a los 4 días de pre-tratamiento frío existe la probabilidad de manejar del 90 % de sobrevivencia de microsporas, a los 7 días del 60 al 80%, a los 10 días del 30 al 50% y a los 14 días del 5 al 20%.

Cuadro 3.2.7 Análisis de Varianza para determinación de diferencias entre los días de pre-tratamiento frío 4,7,10,14 con respecto a la sobrevivencia de microsporas de las variedades de estudio. Quito-Pichincha, 2010.

DÍAS	Fuente de Variación	SC	GL	CM	F-Valor	Pr>F
4	Tratamientos	16.2268837	4	4.0567209	0.18	0.9473
	Error	900.7180477	40	22.5179512		
	Total	916.9449314	44			
	CV	5.23%				
7	Tratamientos	1782.643839	4	445.660960	7.35	0.0002
	Error	2425.779489	40	60.644487		
	Total	4208.423328	44			
	CV	9.65%				
10	Tratamientos	8145.59284	4	2036.39821	18.72	<.0001
	Error	4351.18628	40	108.77966		
	Total	12496.77912	44			
	CV	26.57%				
14	Tratamientos	2105.602793	4	526.400698	3.67	<0.0122
	Error	5733.940102	40	143.348503		
	Total	7839.542895	44			
	CV	63.11%				

El cuadro 3.2.7 muestra el análisis de varianza para los 4, 7, 10, y 14 días de pre-tratamiento frío de todas las variedades, los resultados no muestran significancia estadística cuando se aplica 4 días de pre-tratamiento frío a las espigas de cebada, pero sí alta significancia estadística al aplicar 7, 10 y 14 días, estos resultados coinciden con lo que se observa en el gráfico 3.2.1 y el análisis PROBIT que muestran un descenso en la probabilidad de sobrevivencia de las microsporas al aplicar más de 4 días de pre-tratamiento. Así, para obtener mayor homogeneidad CV 5.23% y mantener las mismas condiciones para todos los genotipos de estudio se aplicó 4 días de pre-tratamiento frío 4°C.

3.3. Respuestas androgénicas



Figura 3.3.1. Anteras con Respuesta Androgénica² a los 15 días de inducción **a)** Micrografía Antera - Variedad Clipper en el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll **b)** Microfotografía Antera- Variedad Cañicapa en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll y **c)** Micrografía Antera- Variedad Quilotoa medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll

Los resultados muestran que dos de los cinco genotipos examinados expresaron mayor capacidad androgénica INIAP-Quilotoa 2003, y Clipper bajo las condiciones experimentales de este estudio, pero la frecuencia de respuestas androgénicas por cada 40 anteras en inducción fue mayor para la variedad Clipper.

Cuadro 3.3.1 Análisis de Varianza para el número de respuestas androgénicas en 5 variedades de Cebada y el medio de inducción BAC3 con diferentes gelificantes aplicando un Diseño factorial 5x3. Quito-Pichincha, 2010.

Fuente de Variación	SC	GL	CM	F-Valor	Pr>F
Variedades de Cebada (A)	23,708	4	5,927	9,336	1,1208E ⁻¹⁰
Medio de inducción BAC3 (B)	34,829	2	17,415	27,430	1,1391E ⁻⁰⁶
Variedades de Cebada* Medio de Inducción BAC3 (A-B)	29,673	8	3,709	5,842	2,2177E ⁻⁰⁶
Error	83,168	131	,635		
CV	43.51%				

Al analizar la variable respuestas androgénicas, el análisis de varianza (Cuadro 3.3.1) presentó alta significancia estadística entre las variedades de estudio (A), y el

² En los Anexos I-V se muestran fotografías del cultivo *in vitro* de anteras de cebada para cada variedad de estudio con medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll, en éstas se puede observar anteras con respuesta androgénica a los 15 días de inducción de cada variedad.

Medio BAC3 (B) por lo que se puede suponer que los resultados son diferentes al utilizar una variedad en lugar de otra, o al suplementar con distintos agentes gelificantes al Medio BAC3. Al relacionar variedades por medio de inducción BAC3 (A-B), de manera similar se muestra alta significancia estadística, lo que sugiere que en general es estadísticamente diferente utilizar PEG, Gelrite o Ficoll en el Medio BAC3 sobre una variedad u otra para obtener respuestas androgénicas.

Tabla 3.3.1. Prueba de Tukey (α 0.05) para la determinación de diferencias en el efecto A (Variedades de Cebada) sobre la respuesta androgénica.

Variedades	Número de Observaciones	Media	Tukey Agrupamiento
Clipper	28	2.26	A
Quilotoa	29	1.73	B
Emir	30	1.30	B
I5	30	1.30	B
Cañicapa	29	1.18	B

Se realizó la prueba de Tukey donde se determinó las distintas categorías estadísticas del efecto A (Variedades de Cebada). En la tabla 3.3.1 se aprecia que la variedad Clipper alcanza el mayor resultado del número de respuestas androgénicas con una media de 2.26, y se ubica en la primera categoría estadística, los demás tratamientos con las variedades Quilotoa, Emir, I5, y Cañicapa se agrupan en una segunda categoría con un valores de media de 1.73, 1.30, 1.30, y 1.18 respectivamente.

Tabla 3.3.2 Prueba de Tukey (α 0.05) para la determinación de diferencias en el efecto B (Medio de Inducción BAC3 suplementado con Ficoll, Gelrite y PEG) sobre la respuesta androgénica.

Tratamiento	Número de Observaciones	Media	Tukey Agrupamiento
Ficoll	10	2.18	A
Gelrite	10	1.43	B
PEG	10	1.00	B

La prueba de Tukey para el efecto B (Medio de Inducción BAC3 suplementado con Ficoll, Gelrite y PEG) tabla 3.3.2 muestra que con el tratamiento Medio de Inducción BAC3 suplementado con Ficoll se alcanza el mayor resultado del número de respuestas androgénicas con una media de 2.18, que se ubica en la primera categoría

estadística, los demás tratamientos con los medios de inducción BAC3 suplementados con Gelrite y PEG se agrupan en una segunda categoría con un valor máximo de media de 1.43 y un mínimo de 1.00, sin presentar diferencias estadísticas entre ellos.

Los resultados mencionados se resumen en las siguientes gráficas de perfil, la figura 3.3.2 muestra las medias marginales estimadas de número de respuesta androgénicas de la interacción A-B (Variedades de Cebada vs Medio de Inducción BAC3 suplementado con diferentes gelificantes). En la gráfica se observa que el promedio de respuestas androgénicas en la variedad Clipper con medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll es mayor con respecto a las demás variedades y medios.

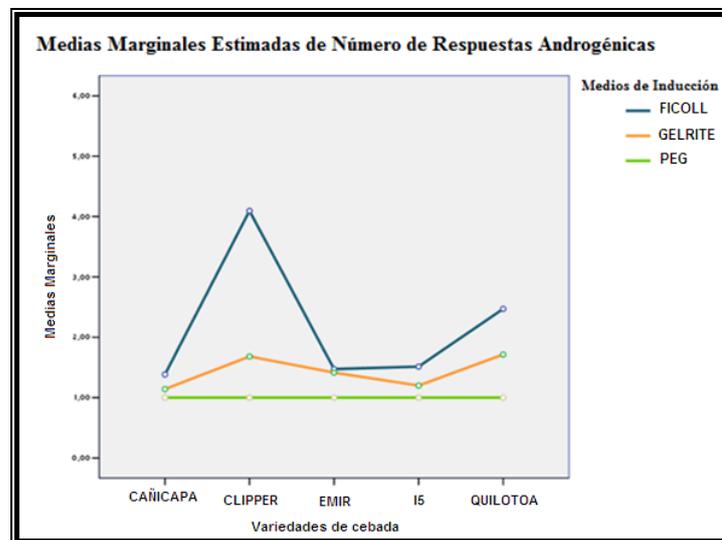


Figura 3.3.2. Gráfica de perfil mostrando la influencia de las interacciones Variedades de Cebada vs medio de Inducción BAC3 suplementado con Ficoll, Gelrite y PEG sobre la respuesta androgénica.

En la figura 3.3.3 se observa las comparaciones de las medias del efecto A (Variedades de Cebada) con los tres medios de inducción, se aprecia que existe mayor número de respuestas androgénicas en dos de las variedades Clipper y Quilotoa, pero existe una marcada diferencia estadística entre ambas variedades. Se determinó que por cada 40 anteras inoculadas para los tres medios de inducción, el promedio del número de respuestas androgénicas para Clipper (2.26) fue mayor que para Quilotoa (1.73), identificando a Clipper como mejor genotipo androgénico.

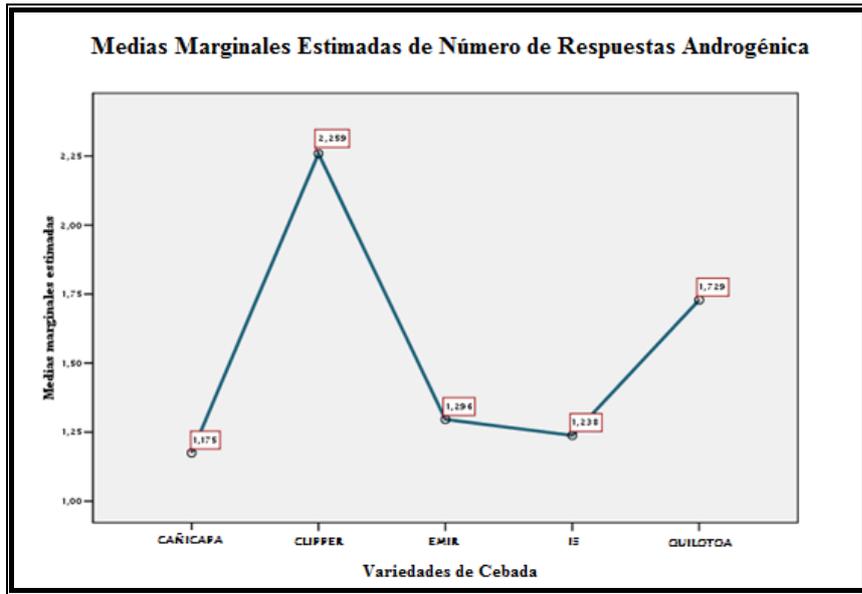


Figura 3.3.3. Gráfica de perfil mostrando la influencia del efecto A (Variedades de Cebada) sobre la repuesta androgénica.

En la figura 3.3.4 se observa las comparaciones de las medias del efecto B (medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll, Gelrite y PEG). La gráfica muestra un mayor número de respuestas androgénicas al utilizar el medio BAC3 suplementado con Ficoll con una media superior (2.18) en comparación con los medios de inducción BAC3 suplementados con Gelrite (1.43) y PEG (1.00).

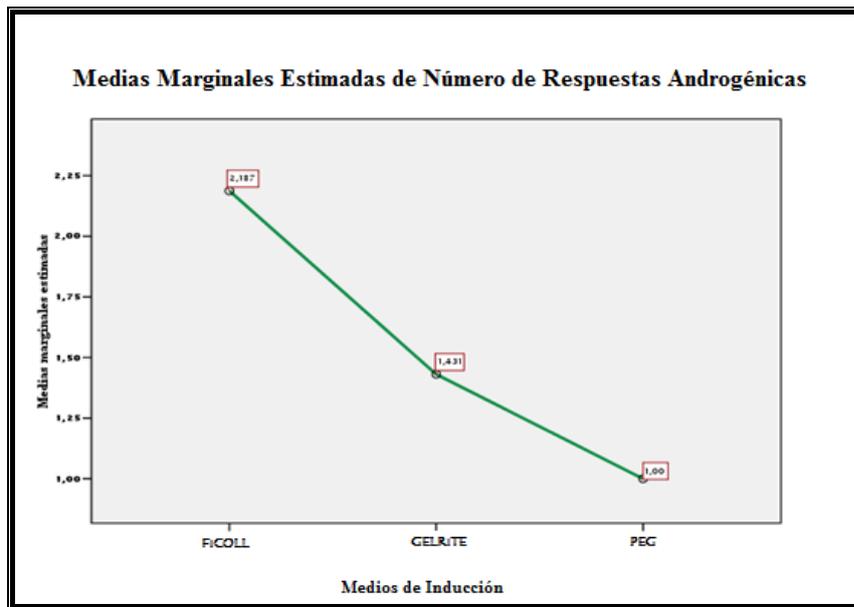


Figura 3.3.4. Gráfica de perfil mostrando la influencia del efecto B (Medio BAC3 suplementado con Ficoll, Gelrite y PEG) sobre la repuesta androgénica.

Al extrapolar el número total de respuestas androgénicas de las variedades de cebada con respecto al número total de anteras inoculadas se determinó mayores porcentajes de respuestas androgénicas en las variedades de estudio cuando se aplica Ficoll en el Medio de Inducción BAC3 que cuando se aplica Gelrite y PEG. El 36.76% de respuestas androgénicas muestra que genotipo con mejor capacidad androgénica es la variedad Clipper (Gráfico 3.3.1).

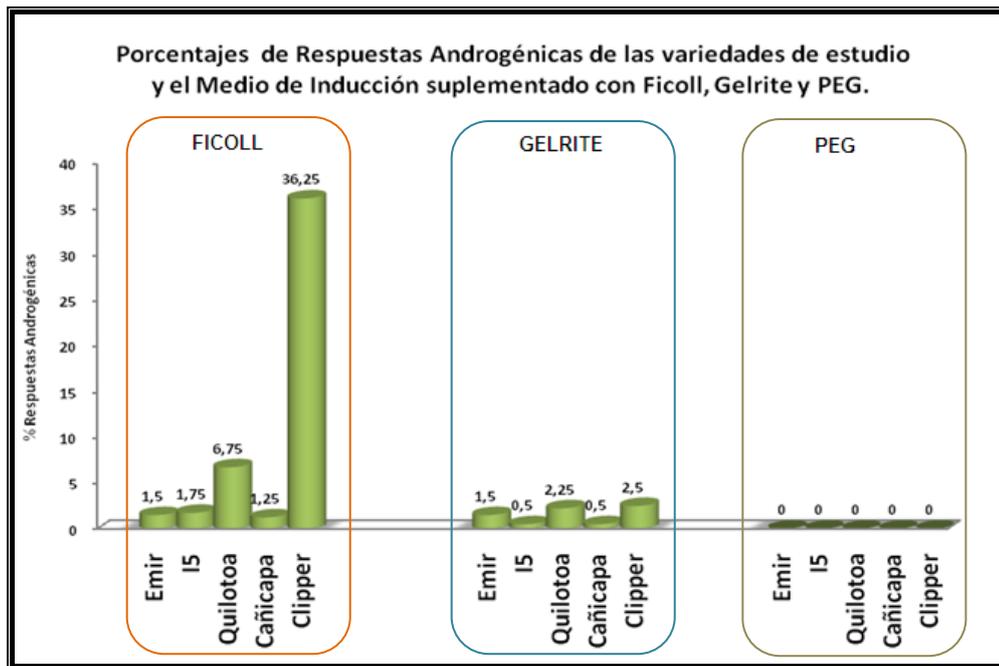


Gráfico 3.3.1 Porcentaje del número de respuestas androgénicas para las variedades de estudio en el Medio de Inducción BAC3 suplementado de Ficoll, Gelrite y PEG, con respecto al total de anteras inoculadas. Quito-Pichincha, 2010.

3.3.1. Formación de Callos

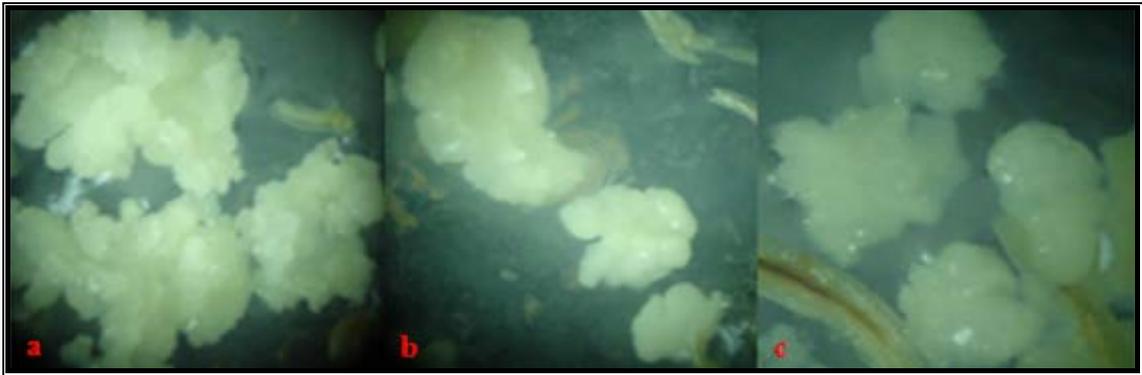


Figura 3.3.1.1. Formación de Callos³ a los 30 días de inducción **a)** Micrografía de Callos Variedad Clipper en el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll **b)** Microfotografía de Callos Variedad Cañicapa en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll y **c)** Micrografía de Callos Variedad Quilotoa medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll

Cuadro 3.3.1.1 Análisis de Varianza para el número de callos, en 15 tratamientos evaluados mediante un DCA.

Fuente de Variación	SC	GL	CM	F-Valor	Pr>F
Tratamientos (Inter-grupos)	56.4482467	14	4.0320176	12.13	<0.0001
Error (Intra-grupos)	44.8768923	135	0.3324214		
Total	101.3251389	149			
CV	43.48%				

Se aprecia que existe alta significancia estadística en los 15 tratamientos con respecto al número de callos formados (ANOVA 3.3.1.1). Además se puede observar que la variación total en los 150 datos fue de 101.325 y de esta cantidad 56.448 se debe a las diferencias entre los 15 tratamientos aplicados; y 44.876 corresponden a las diferencias entre observaciones del mismo tratamiento. Estos resultados indican que tanto las variedades como el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll, Gelrite, y PEG, influyen sobre la formación de callos.

³ En los Anexos I-V se muestran fotografías del cultivo *in vitro* de anteras de cebada para cada variedad de estudio con medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll, en éstas se puede observar callos formados a los 30 días de inducción de cada variedad

Tabla 3.3.1.1 Prueba de Tukey (α 0.05) determinando el número de callos formados por tratamiento evaluado.

Tratamiento	Número de Observaciones	Media	Tukey Agrupamiento
Ficoll, Clipper	10	3.48	A
Ficoll, Quilotoa	10	1.85	B
Gelrite, Clipper	10	1.35	B
Gelrite, Quilotoa	10	1.34	B
Ficoll, I5	10	1.26	B
Ficoll, Emir	10	1.22	B
Gelrite, Emir	10	1.21	B
Ficoll, Cañicapa	10	1.19	B
Gelrite, I5	10	1.08	B
Gelrite, Cañicapa	10	1.07	B
PEG, Cañicapa	10	1.00	B
PEG, Clipper	10	1.00	B
PEG, Emir	10	1.00	B
PEG, I5	10	1.00	B
PEG, Quilotoa	10	1.00	B

Los datos obtenidos de la prueba de Tukey (Tabla 3.3.1.1) muestran que el medio de inducción BAC3 al ser suplementado con tres distintos gelificantes favorece la proliferación de callos pero son diferentes estadísticamente.

El tratamiento Clipper-Ficoll alcanza el mayor resultado con una media de 3.48 para el número de callos formados, que se ubica en la primera categoría estadística; los demás tratamientos se agrupan en una segunda categoría sin presentar significancia estadística entre ellos. Estos resultados muestran que el número de callos formados varía con respecto al agente gelificante que se utilice y de acuerdo al genotipo.

En la gráfica de perfil de medias se observa que la variedad Clipper alcanza el mayor número de callos formados al utilizar el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll con respecto a los demás tratamientos (Figura 3.3.1.2).

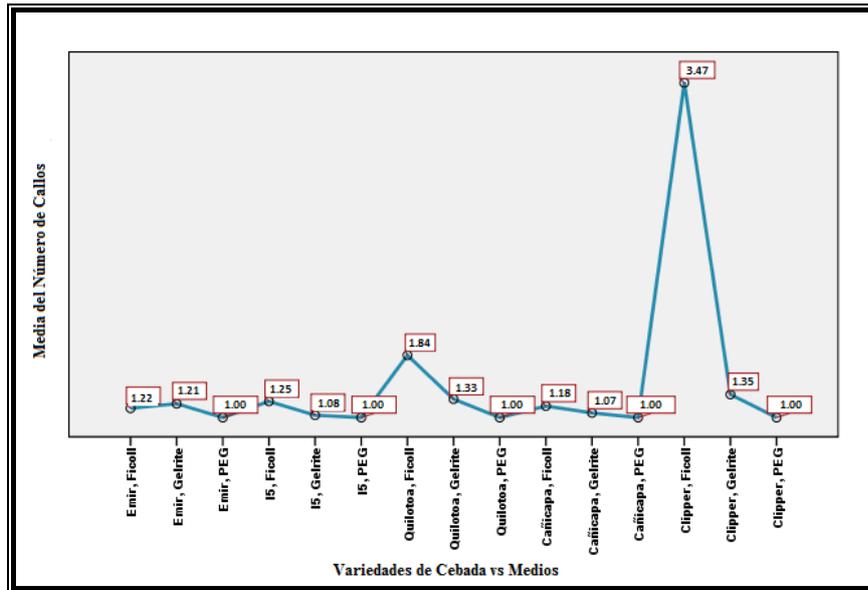


Figura 3.3.1.2. Gráfico de medias determinando el promedio de callos formados en los tratamientos para la respuesta androgénica.

Al extrapolar el número total de callos formados para las variedades de cebada con respecto al número total de anteras inoculadas (40) se determinó mayores porcentajes de callos formados cuando se aplica Ficoll en el Medio de Inducción BAC3 que cuando se aplica Gelrite y PEG, sin embargo el genotipo que presenta mayor porcentaje de formación de callos, es sin duda Clipper al utilizar Ficoll 36.25%, inclusive aplicando Gelrite 2.5% y PEG 0.75%. (Gráfico 3.3.1.1).

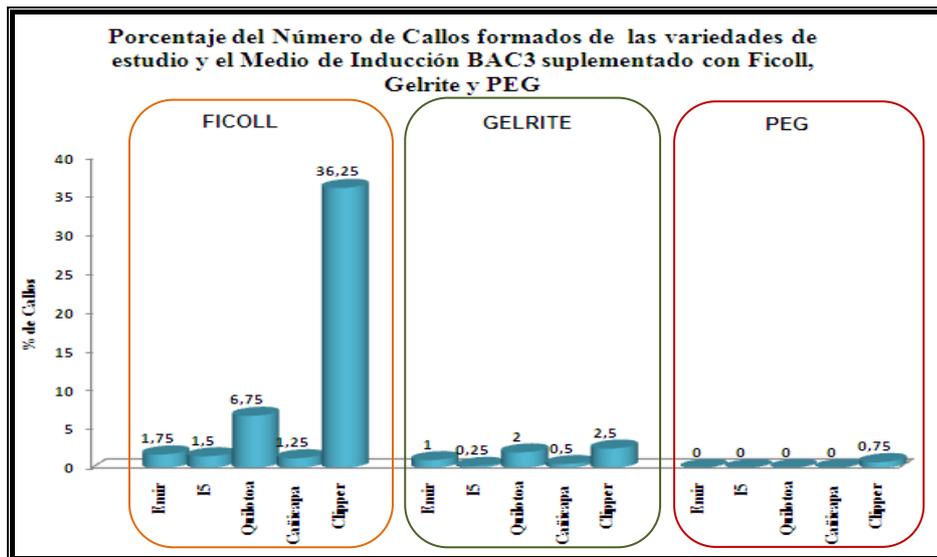


Gráfico 3.3.1.1. Porcentaje del número de callos formados para las variedades de estudio en el Medio de Inducción BAC3 suplementado de Ficoll, Gelrite y PEG, con respecto al total de anteras inoculadas. Quito-Pichincha, 2010.

3.3.2 Formación de Embriones



Figura 3.3.2.1 Formación de embriones⁴ a los 50 días de inducción **a) y b)** Micrografía de Embriones Variedad Clipper en el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll **c)** Microfotografía de Embriones Variedad Quilotoa en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll.

Cuadro 3.3.2.1. Análisis de Varianza para el número de embriones, en 15 tratamientos evaluados mediante un DCA. Quito-Pichincha, 2010.

Fuente de Variación	SC	GL	CM	F-Valor	Pr>F
Tratamientos (Inter-grupos)	54.585	14	3.899	9.027	<0.0001
Error (Intra-grupos)	56.147	135	0.432		
Total	110.731	149			
CV	43.48 %				

Se aprecia que existe alta significancia estadística en los 15 tratamientos para respuestas androgénicas con respecto al número de embriones formados. Además se puede observar que la variación total en los 150 datos fue de 110.73 y de esta cantidad 56.58 se debe a las diferencias entre los 15 tratamientos aplicados; y 56.14 corresponden a las diferencias entre observaciones del mismo tratamiento (Cuadro 3.3.2.1 de Anova).

⁴ En los Anexos I-V se muestran fotografías del cultivo *in vitro* de anteras de cebada para cada variedad de estudio con medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll, en éstas se puede observar embriones formados a los 50 días de inducción de cada variedad

Tabla 3.3.2.1 Prueba de Tukey (α 0.05) determinando el número de embriones por tratamiento evaluado.

Tratamiento	Número de Observaciones	Media	Tukey Agrupamiento
Ficoll, Clipper	10	3.44	A
Ficoll, Quilotoa	10	1.51	B
Gerite, Clipper	10	1.41	B
Gelrite, Quilotoa	10	1.40	B
Gelrite, Emir	10	1.20	B
Ficoll, Cañicapa	10	1.16	B
Ficoll, Emir	10	1.10	B
Gelrite, I5	10	1.10	B
PEG, Clipper	10	1.10	B
Gelrite, Cañicapa	10	1.00	B
Ficoll, I5	10	1.00	B
PEG, Cañicapa	10	1.00	B
PEG, Quilotoa	10	1.00	B
PEG, I5	10	1.00	B
PEG, Emir	10	1.00	B

La prueba de Tukey muestra que el tratamiento Clipper-Ficoll alcanza el mayor resultado con una media de 3.44 para el número de embriones, que se ubica en la primera categoría estadística; los demás tratamientos se agrupan en una segunda categoría sin presentar significancia estadística entre ellos pero el número de embriones es notablemente inferior en comparación con el número de embriones del tratamiento Clipper-Ficoll (Tabla 3.3.2.1.). En la figura 3.3.2.2 se muestra la gráfica de perfil de medias, donde se observa que la variedad Clipper alcanza el mayor número de embriones al utilizar el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll en comparación con los demás tratamientos.

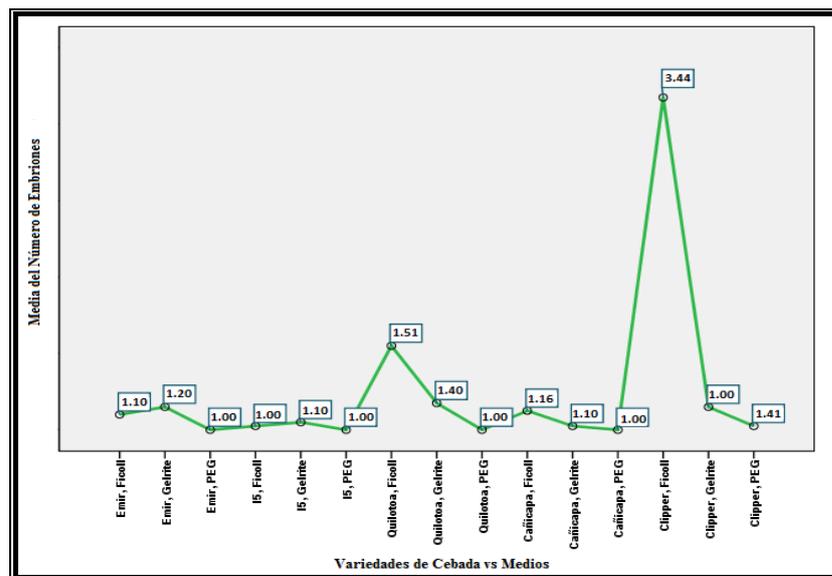


Figura 3.3.2.2. Gráfico de medias determinando el promedio de embriones formados en los tratamientos para la respuesta androgénica.

Al extrapolar el número total de embriones formados para las variedades de cebada con respecto al número total de anteras inoculadas (40) se determinó mayores porcentajes de embriones formados cuando se aplica Ficoll en el Medio de Inducción BAC3 que cuando se aplica Gelrite y PEG, pero se aprecia claramente que el genotipo que presenta mayor porcentaje de formación de callos, es Clipper al utilizar Ficoll 19.78%, inclusive aplicando Gelrite 1.5% y PEG 0.25%. (Gráfico 3.3.2.1).

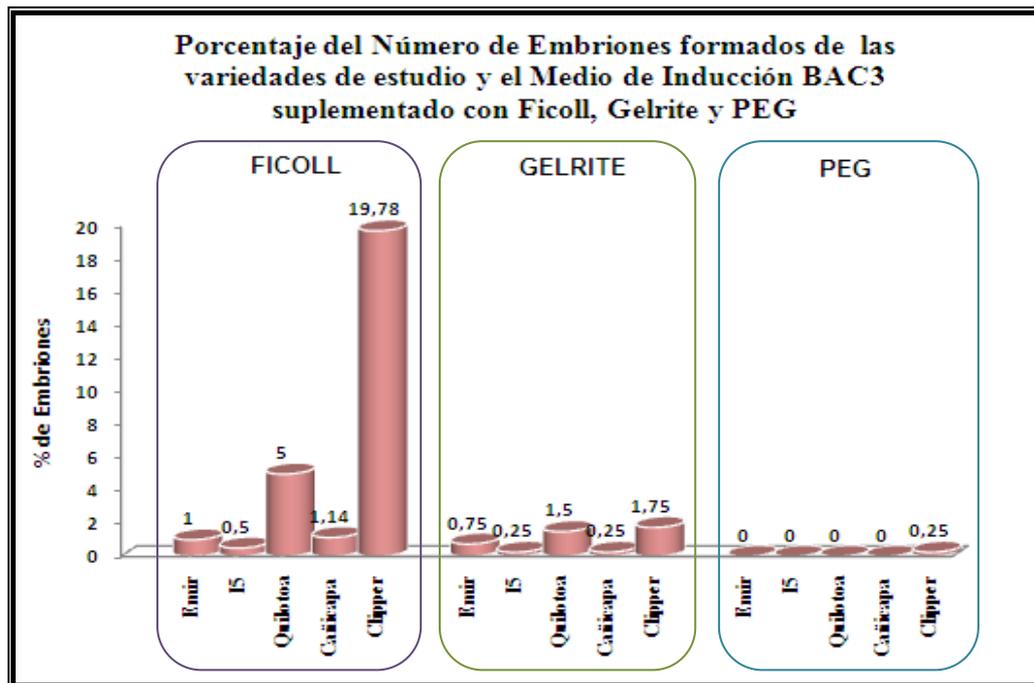


Gráfico 3.3.2.1. Porcentaje del número de embriones formados para las variedades de estudio en el Medio de Inducción BAC3 suplementado de Ficoll, Gelrite y PEG, con respecto al total de anteras inoculadas. Quito-Pichincha, 2010.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

4.1 Correlación entre el estado vegetativo de la planta y el estado de desarrollo de las microsporas.

Para el cultivo *in-vitro* de anteras de cebada, las microsporas deben estar en estado de desarrollo uninucleado en fase media y tardía, así se debe establecer para cada variedad una relación entre el estado de desarrollo del polen y estado vegetativo de la planta.

Muchos investigadores (Pace *et al.*, 1987; Coumans *et al.*, 1989; Büter, 1997; Nageli *et al.*, 1999; Obert *et al.*, 2000; Lui *et al.*, 2002; Obert y Barnabas, 2004; Obert *et al.*, 2005) establecen que las espigas deben ser cosechadas antes de que emerjan de la hoja bandera que corresponde al estado Z4.0 y Z4.9, es decir, cuando la lígula de la hoja bandera este visible y la vaina esta engrosada (embuchamiento), pero como se pudo comprobar este criterio no es tan buen referente ya que se pueden cosechar espigas con microsporas muy tiernas o muy maduras.

Es por esto que a su vez se tomo otro criterio, la distancia que existía entre la penúltima hoja y la hoja bandera de las espigas como menciona Szarejko (2003), que para la mayoría de genotipos de cebada las espigas deben ser recolectadas cuando la distancia entre la penúltima hoja y la hoja bandera es de 3-6 cm, en esta distancia se tiene un adecuado desarrollo de las microsporas para el cultivo *in vitro*. Como se pudo comprobar en este estudio todas las variedades se encontraban en el rango indica el autor pero indiscutiblemente cada una tenía una distancia específica (Cuadro 3.1.1) y se confirma que en estas distancias prevalecía el estado de desarrollo del polen uninucleado medio y tardío.

Utilizando estos criterios se optimiza el tiempo, especialmente cuando se realiza el cultivo *in vitro* de decenas de espigas.

4.2 Efecto del Estado de Desarrollo de las Microsporas

Numerosos estudios han demostrado que la respuesta del grano de polen a la formación de un callo haploide o embrión depende del estado de desarrollo de la antera (Barnabás *et al.*, 1987; Pretova *et al.*, 1993; Szarka *et al.*, 2001; Obert, *et al.*, 2005)

Esta generalmente aceptado que las anteras más productivas son aquellas que se encuentran en estado uninucleado, es decir, entre el estado de tétrada y justo antes de la primera mitosis polínica. Sin embargo, para cebada Szarejko (2003) y Hoekstra *et al.* (1992) indican que el estado más apropiado de desarrollo de la microspora es el uninucleado medio o tardío. En estos estados de desarrollo aún no ocurre la división mitótica, y es en este punto donde se debe aplicar las condiciones de cultivo *in vitro* para cambiar el desarrollo normal por un estado de desarrollo esporofítico. Si la inoculación de anteras se realiza en un estado anterior o posterior a los mencionados (uninucleado temprano o binucleado) la producción de callos y embriones decrece enormemente o simplemente no existe respuesta androgénica.

En base a estos antecedentes y como mencionan Afza *et al.* (1999) y Szarejko (2003) es indispensable realizar tinción de anteras en solución de acetocarmín al 2% para comprobar el estado de desarrollo de las microsporas tanto en el momento de la colecta de las espigas debido a que las microsporas podrían estar inmaduras (tétrada de microsporas o uninucleado temprano), y el inconveniente al finalizar el tiempo de pre-tratamiento frío (antes de la siembra de anteras) es que las microsporas podrían haber madurado hasta el estado binucleado.

Al seguir estos criterios se consiguió manejar un 90% de microsporas viables y que se encontraban en estado de desarrollo uninucleado medio y tardío, alcanzando porcentajes altos de respuestas androgénicas (Gráfico 3.3.1) y formación de callos y embriones pero hay grandes diferencias entre los genotipos (Figura 3.3.1.2, y 3.3.2.2 y Gráfico 3.3.1.1 y 3.3.2.1).

4.3 Efecto del Pre-tratamiento Frío

El pre-tratamiento en frío actúa como un estrés de temperatura que favorece al desarrollo de las microsporas en cultivo *in-vitro*. Su importancia prevalece en que no solo baja la frecuencia de albinismo, sino que a su vez, estimula la división mitótica de las microsporas, desviando su curso normal de desarrollo vegetativo (formación de uno generativo y otro vegetativo) hacia un desarrollo esporofítico (formación de dos núcleos idénticos) (Nuñez *et al.*, 1989).

En cebada distintos trabajos coinciden en el efecto beneficioso de un pre-tratamiento de 28 días a 4°C (Huang y Sunderland, 1982; Powell, 1988; Hou *et al.*, 1993). Sin embargo, los resultados son contradictorios en cuanto a la duración óptima del pre-tratamiento con frío (Kuhlmann y Foroughi-Wehr, 1989; Szarejko y Kasha, 1991). Estas contradicciones pueden deberse a diferencias entre genotipos y/o entre condiciones ambientales de las plantas donantes en los diversos trabajos.

Huang y Sunderland (1981) probaron temperaturas de 4, 7, 14 y 25°C en espigas de cebada previo a la inducción de anteras, y obtuvieron mayor rendimiento de callos y regeneración de plantas verdes cuando se aplica pre-tratamiento de 4°C durante 28 días. Trejo *et al.*, (2002) reportan que al manejar pre-tratamiento frío de 4°C durante 7 hasta 14 días, el (IC) índice de formación de callos se incrementa en más de tres veces, en comparación con espigas que no son sometidas a pre-tratamiento frío. Alcanzando valores de IC de 8.79% y 6.49% para cada genotipo respectivamente. Y al someter las espigas a 21 días de pre-tratamiento se obtuvo respuesta desfavorable, incluso se registró inhibición de esta.

Tsay y Chen (1984) también reportaron que no es conveniente extender el pre-tratamiento frío por más de 14 días ya que se reduce la capacidad de regeneración de plantas a partir de callos y se incrementa la producción de plantas albinas. Büter (1997) afirma también que al extender el pre-tratamiento frío, la viabilidad de las microsporas podría verse afectada. Finalmente, Xie *et al.* (1995) reportaron que el tiempo óptimo de

tratamiento de frío para espigas en cereales es función del genotipo; por tanto, es necesario adaptar, modificar o proponer dichas condiciones para genotipos diferentes.

En base a estos criterios y debido a que antes de iniciar esta investigación se realizaron pruebas preliminares en las que se apreció que al seguir la metodología de Szarejko (2003) que proponía pre-tratamiento frío de 4°C durante 21-28 días, las anteras no soportaron tiempo de exposición mayor a 14 días, mostrando oxidación y deterioro, fue necesario estandarizar la duración del pre-tratamiento frío 4°C sobre la viabilidad de las microsporas para las cinco variedades en estudio.

En esta investigación y de acuerdo a los resultados obtenidos según el análisis PROBIT (Cuadro 3.2.1 y Gráfico 3.2.1) para manejar una sobrevivencia de microsporas del 90% el tiempo máximo de pre-tratamiento frío para las cinco variedades de estudio debe ser no más de 4 a 5 días, y existe una relación directamente proporcional, es decir, a medida que se incrementa el número de días de pre-tratamiento frío aumenta el porcentaje de mortalidad de las microsporas. Los reportes en la literatura y los obtenidos en este trabajo muestran que el efecto del pre-tratamiento frío es una función del genotipo.

4.4 Efecto del Genotipo

En diversos estudios se ha demostrado que el genotipo es claramente el factor que ejerce una influencia mayor en el comportamiento *in vitro* de cebada (Hanzel *et al.*, 1985; Goldstein y Kronstad, 1986; Lührs y Lörz, 1987; Bregitzer, 1992; Ruiz *et al.*, 1992; Baillie *et al.*, 1993).

La frecuencia de inducción y la capacidad de regeneración del callo o de los embriones formados a partir de la antera varían dependiendo del genotipo de los parentales (Maheswhari *et al.*, 1980). Se ha demostrado que la capacidad androgénica está bajo control genético (Foroughi-Wehr *et al.*, 1982, Charmet y Bernadt, 1984). Tanto la formación de embriones como el porcentaje de plantas verdes se ven

fuertemente afectados por los efectos del genotipo, que se ha visto que alcanza hasta un 62% y un 76% de la variación total, respectivamente (Larsen *et al.*, 1991).

Aunque en cebada se han desarrollado protocolos muy eficientes que han llevado a la producción de dobles haploides a partir de la mayoría de genotipos todavía existen muchos cultivares de gran interés agronómico que no responden bien a este método. Foroughi-Wehr *et al.* (1976) reportaron que la variedad de cebada Dissa era más susceptible a androgénesis de diecinueve otros genotipos.

Knudsen *et al.* (1989) demostraron que Igri, un genotipo de cebada de invierno, mostró el mayor número de plántulas verdes. Kintzios y Fischbeck (1994) reportan que los cultivares de invierno de cebada produjeron un promedio de 4 plantas verdes por 100 anteras que se sembraron en su estudio. Szarejko *et al.* (1999) evaluaron la capacidad de producción de callos y regeneración de plantas en 4 genotipos de cebada de Turquía, los resultados mostraron que el genotipo Cumhuriyet-50 produjo mayor número de callos (70%) y plántulas regeneradas (27.7%) por cada 100 anteras sembradas.

Finnie *et al.* (1989), Hou *et al.* (1993), Knudsen *et al.* (1989), Logue *et al.* (1993), y Powell, (1988) mencionan que podría existir una interacción entre el genotipo y los tratamientos aplicados durante el proceso y que podrían actuar sobre la expresión de capacidades androgénicas. De esta manera se puede decir, que un método de cultivo desarrollado para cualquier genotipo, no necesariamente es aplicable y óptimo para otro. Así, los genotipos considerados recalcitrantes podrían responder de la manera deseada cuando el resto de factores que interviene se mejoran o se optimizan.

En el presente estudio la baja respuesta en el cultivo *in vitro* de anteras reflejado en la formación de callos y formación de embriones en algunas de las variedades de estudio se debe probablemente a la alta dependencia del genotipo y coinciden con los datos que se mencionan anteriormente.

Así, la variedad Clipper se muestra como genotipo androgénico presentando mejores respuestas androgénicas (Figura 3.3.2 y Gráfico 3.3.1), alto porcentaje de formación de callos y embriones en el medio de cultivo BAC3 suplementado por Ficoll (callos 36.25% y embriones 19.78%), Gelrite (callos 2.5% y embriones 1.75%) y PEG (callos 0.75% y embriones 0.25%) por cada 40 anteras sembradas, mientras que las variedades INIAP-Quilotoa, INIAP-Cañicapa, diferencial Emir y diferencial I5 se muestran como genotipos recalcitrantes (Figuras 3.3.1.2 y 3.3.2.2 y Gráficos 3.3.1.1 y 3.3.2.1), debido a los bajos porcentajes de respuestas androgénicas, producción de callos y embriones en comparación con Clipper.

4.5 Efecto del Medio de Inducción BAC3

La composición del medio de cultivo, en particular la fuente de carbono, el tipo y concentración de reguladores de crecimiento y los agentes gelificantes son determinantes para inducir androgénesis.

Los medios de cultivo empleados en cultivo de anteras de cereales son N6 (Chu *et al.*, 1975), MS modificado (Fouroughi-Wehr *et al.*, 1976), Kao (Kao, 1981), EDAM (Sorvari y Schieder, 1987), FHG (Hunter, 1988), P2 (Chuang *et al.*, 1978), BAC1 (Marsolais y Kasha, 1985), y BAC3 (Szarejko y Kasha, 1989) (Anexo XIII).

De los medios anteriormente mencionados, el medio líquido BAC3 se ha utilizado de forma rutinaria en el cultivo de anteras de cebada (Szarejko y Kasha, 1991; Cai *et al.*, 1992) (Anexo XIV). Este medio de inducción es mucho más completo que los medios como N6 y FHG utilizados para inducción de androgénesis en cebada (Anexo XIII). Dentro de los principales componentes y con los que se reportan mejores resultados se encuentra la utilización de maltosa (6%) como fuente de carbono, una elevada concentración de nitrógeno orgánico, la adición de algunos componentes inorgánicos (KHCO_3 y AgNO_3 estimulantes para la inducción y la regeneración de plantas verdes de a partir de callos embriogénicos), y cambios en la composición de los

reguladores de crecimiento, utilizando la combinación de la auxina NAA (2mg/L) y la citoquinina BAP (1mg/L).

Además este medio contiene vitaminas como la tiamina y el ácido nicotínico y según Genovesi y Yingling (1995) reportaron que son benéficos para inducir buenos niveles de respuesta androgénica, también está suplementado por caseína hidrolizada una mezcla de aminoácidos, que ha mostrado ser beneficiosa en la inducción de embriones y formación de plantas verdes a partir del cultivo de anteras de cebada (Zhu *et al.*, 1990). Y finalmente una de las mejoras más importantes ha sido la adición de Ficoll 400 al medio de cultivo como agente gelificante e inhibidor de anaerobiosis; con todos estos componentes se logra someter a las microsporas a un estrés osmótico necesario para inducir androgénesis.

Szarejko *et al.* (1999), en su estudio sobre la evaluación la capacidad de producción de callos y regeneración de plantas en genotipos de cebada de Turquía utilizando dos medios de inducción BAC3 y FHG reportaron en los genotipos Tokak 157/37 y Cumhuriyet-50 mayores respuestas androgénicas (97.6% y 75.3% respectivamente) y formación de callos (571.6% y 329.7% respectivamente) al utilizar el medio BAC3 que al utilizar el medio FHG.

En esta investigación con la utilización del medio BAC3 suplementado con Ficoll se reportan los mejores resultados, tanto con el genotipo androgénico Clipper (producción de callos 36.25% y embriones 19.78%), como para los genotipos INIAP-Quilotoa, INIAP-Cañicapa, Diferencial Emir, y Diferencial I5, que a pesar de producir porcentajes bajos de en comparación con Clipper (Figura 3.3.4, Gráfico 3.3.1, 3.3.1.1 y 3.3.2.1) muestran respuestas androgénicas en este medio.

4.5.1 Efecto de los reguladores de crecimiento

Se han publicado pocos trabajos destinados a determinar la composición óptima de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo de anteras. Algunos autores

recomiendan el uso exclusivo de auxinas (Marsolais y Kasha, 1985). Otros autores sugieren el uso de combinaciones de auxinas y citoquininas (Sorvari y Schieder, 1987; Kao, 1988; Kuhlmann y Foroughi-Wehr, 1989; Cai *et al.*, 1992) y otros solamente citoquininas (Olsen, 1987).

Algunos autores utilizan 2,4-D y otros emplean las citoquininas BAP o kinetina (Olsen, 1987). Otros aplican distintas combinaciones de auxinas y citoquininas AIA y BAP o AIA y kinetina (Szarejko y Kasha, 1991) o ANA y BAP (Devaux, 1987, Cai *et al.*, 1992). En cambio, otros han obtenido los mejores resultados en medio sin hormonas (Dunwell, 1985).

Para el cultivo de anteras de cebada se afirma que es necesario combinar correctamente las auxinas y citoquininas para el desarrollo de embriones a partir de microsporas (Cai *et al.*, 1992). Además se ha comprobado que la citoquinina BAP es indispensable para el desarrollo y la regeneración de plántulas dihaploides.

Konzak, C.F. y Zhou (1991) estudiaron varias combinaciones de reguladores de crecimiento para el medio de inducción BAC3. Ellos han demostrado que la combinación de la auxina ANA (2 mg / l) y el citoquinina BAP (1 mg / l) dio lugar a una frecuencia de formación de embriones mucho mayor que los medios que contienen 2,4-D, combinada ya sea con ribosida, zeatina, o la citocinina BAP.

En esta investigación se aplicó las mismas concentraciones que utilizaron Konzak C.F y Zhou, y los resultados muestran mayores porcentajes de formación de callos y embriones en el genotipo Clipper.

4.5.2 Efecto de la fuente de Carbono

La fuente de carbono es uno de los componentes esenciales en el medio de cultivo. Por un lado, actúa como fuente de energía y por otro, como agente de presión osmótica.

Cai. Q *et al.* (1992) compararon el efecto de los hidratos de carbono sacarosa, maltosa, celobiosa y melobiosa (6%) en el cultivo de anteras de cebada. El uso de maltosa y celobiosa produjo una respuesta en las anteras significativamente más alta, en producción de embriones y/o callos.

Finnie *et al.* (1989) sustituyeron la sacarosa del medio de inducción de anteras de cebada por otros carbohidratos: maltosa fructuosa, extracto de malta, galactosa y una mezcla de sacarosa y fructuosa. Observaron que con la maltosa la capacidad de inducir plántulas verdes era mayor. Además, la concentración más adecuada estaba en el rango de 6-12% para la maltosa.

Se argumenta que al utilizar sacarosa en el medio de inducción para anteras de cebada se producen porcentajes bajos de callos y embriones ya que las microsporas mueren debido a que metabolizan el azúcar rápidamente, causando hipoxia y dando como resultado acumulación de grandes cantidades de etanol en las células. El metabolismo de la maltosa es más lento y hay suficiente oxígeno disponible para permitir a las células sobrevivir en el medio y permitir mayores tasas de embriogénesis (Scott *et al.*, 1995).

4.5.3 Efecto de los Agentes Gelificantes

En los medios de cultivo de tejidos vegetales es necesario disponer de algún sistema de soporte que evite que los tejidos se hundan en el medio y se encuentren en condiciones de anaerobiosis.

Las condiciones anaerobias generan la producción de ácido láctico y etileno que dañan las estructuras internas de los tejidos y el ADN de los plastidios, inhibiendo el desarrollo de callos y embriones o dando lugar a la regeneración de plantas albinas (Kao *et al.*, 1991). Este problema en cebada se superó mediante la adición de Ficoll, un polímero de sacarosa de alto peso molecular que afecta la densidad, viscosidad y la osmolaridad del medio, estas propiedades permiten un mejor contacto entre anteras y el

medio, mantienen las condiciones aeróbicas, evitando que las anteras y callos se hundan sino que floten en la superficie generando mayores tasas de embriogénesis directa y alta frecuencia de plantas verdes.

El Ficoll 400 ha sido utilizado por muchos investigadores para mejorar la producción de embriones y regeneración de plantas verdes en el cultivo *in vitro* de anteras de cebada. Kao *et al.* (1991) reportaron mayor frecuencia de formación de callos y embriones y regeneración de plantas verdes que albinas a partir de anteras de cebada cuando el medio de inducción contenía Ficoll.

En algunos trabajos se señala que el Ficoll inhibe de alguna manera la inducción de callos a partir de las microsporas (Zhou *et al.*, 1992), sin embargo, en la mayoría de trabajos coinciden en que el uso de Ficoll incrementa la producción de callos y el porcentaje de regeneración de plantas verdes en trigo (Jones y Petolino, 1988; Zhou *et al.*, 1992; Trottier *et al.*, 1993) y cebada (Kao, 1981; Kasha, 1989).

Los resultados de este estudio coinciden con lo que mencionan los autores se obtienen diferencias estadísticas significativas y porcentajes respuestas androgénicas (Figura 3.3.2 y 3.3.4 y Gráfico 3.3.1), producción de callos (Cuadro 3.3.1.1, Figura 3.3.1.2 y Gráfico 3.3.1.1) y embriones (Cuadro 3.3.2.1, Figura 3.3.2.2 y Gráfico 3.3.2.1) mayores al utilizar Ficoll que PEG y Gelrite, inclusive en aquellas variedades que se identificaron como recalcitrantes, estos resultados son atribuidos a las ventajas reportadas en la literatura sobre el uso de Ficoll.

Sin embargo, el Ficoll tiene el gran inconveniente de ser muy caro, en este contexto, muchos investigadores han tratado de sustituirlo por otros agentes gelificantes de bajo costo. Randal *et al.* (1990) utilizó algunos tipos de gelificantes de bajo costo que podrían sustituir al Ficoll en medios de inducción para anteras de trigo.

Al igual que estos autores en este estudio se trato de sustituir el agente gelificante Ficoll con otros gelificantes de menor costo como Gelrite y PEG.

Se han reportado pocos estudios sobre la utilización de PEG un poliéter y Gelrite un heteropolisacárido, ambos con propiedades gelificantes en cultivo *in vitro* de anteras de cebada, sin embargo la literatura indica que podrían ser utilizados.

Liming *et al.* (1993) reportan que Gelrite resultó ser un reemplazo aceptable para Ficoll en el medio de inducción para reducir costos y mantener la producción de embriones. Sin embargo, Egaña (1995) menciona que en algunos trabajos de cultivo de anteras en algunos cereales el Gelrite si ha sustituido al Ficoll compensando el costo, pero se obtienen peores resultados en cuando a la producción callos y embriones.

Por lo que concierne a PEG, Pullman *et al.* (2003), en base a evidencias experimentales en distintas especies reportaron que para el desarrollo de embriones somáticos maduros se requiere de una fase de acumulación de reservas en las células proembriónicas y sugieren que esta fase se puede activar utilizando PEG y auxinas en el medio de cultivo *in vitro*.

Obert *et al.* (2005) mencionó que al utilizar PEG las microsporas de maíz aumentaban su tamaño siendo esta una señal de inducción de androgénesis pero no asegura que estas microsporas después desarrollen estructuras embrionarias.

Almeida (2009) reportó que el PEG en una concentración del 21% en el medio de inducción aumenta la osmolaridad en el medio ayudando a mantener un mayor porcentaje de viabilidad en las microsporas y dándoles mejores condiciones para inducir androgénesis en maíz.

Los resultados obtenidos de esta investigación muestran que podría utilizarse Gelrite para el cultivo *in vitro* de anteras de cebada como indica Liming *et al.*, obteniendo resultados en cuanto a la producción de callos (2.5%) y embriones (1.75%) para el genotipo androgénico Clipper, pero se afirma lo que indica Egaña que los resultados no son los mejores en comparación con el uso de Ficoll (callos 36.25% y embriones 19.78% variedad Clipper).

Los resultados para la variedad androgénica Clipper (callos 0.75% y embriones 0.25%) también indican que no se debe utilizar PEG como agente gelificante en el

cultivo de anteras de cebada, a pesar que las anteras muestran respuesta androgénica en los 15 primeros días terminan oxidándose en un índice elevado, esto confirma lo que indica Obert que a pesar que existe señal de androgénesis no logran desarrollar estructuras embrionarias.

Los porcentajes bajos de producción de callos y embriones reportados en este estudio al suplementar el medio BAC3 con Gelrite y PEG pueden ser atribuidos a la existencia de condiciones anaerobias en el medio que terminan en la acumulación de sustancias tóxicas como el etileno o ácido láctico que inhiben totalmente la formación de callos y de embriones; a pesar que se logra alcanzar la misma consistencia al manejar concentraciones de Gelrite (0.035%) y PEG (25%) que el Ficoll estos gelificantes no ofrecen las mismas condiciones.

4.6. Limitaciones de la técnica

4.6.1. Maduración de callos y embriones.

Lentini *et al.* (1997) y Szarejko (2003) indican que a los 25-30 días de inducción callos y embriones deben formarse y que a los 30 días deben transferirse al medio de regeneración para la fase de diferenciación.

En esta investigación, a los 30 días sobre la superficie de las anteras y sobre aquellas microsporas que se liberaron al medio se observa la formación de callos como indican los autores, sin embargo, los embriones se desarrollan a los 50 días y manteniéndolos hasta los 85 días en el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll se aprecia una posible diferenciación de tallos en las variedades INIAP-Quilotoa y Clipper (Anexos VIA-VIIA).

Al parecer la fase de inducción tarda más tiempo que el indicado por Lentini *et al.*, y Szarejko esto podría deberse a que la metodología aplicada en sus estudios puede variar de acuerdo a los genotipos que se utilizan y a las condiciones en que se desarrollan.

4.6.2. Regeneración de Plantas

Fuera de los objetivos de esta investigación se continuó con la metodología de regeneración utilizando los embriones que se lograron obtener de las variedades INIAP-Quilotoa y Clipper.

Según Lentini *et al.* (1997), para esta etapa una combinación de auxinas y citoquininas en una proporción de 1:4 ó 1:2 son adecuadas. Las auxinas estimulan el enraizamiento, mientras que las citoquininas favorecen el desarrollo de brotes, tallos y hojas.

Como indica Szarejko (2003) y Lentini., *et al* (1997), los embriones al alcanzar un tamaño de 2mm de diámetro fueron transferidos al medio de regeneración BAC3 (Anexo XV) pero no lograron diferenciarse. Sin embargo manteniendo los embriones por más tiempo en el medio de inducción, a los 85 días se observa diferenciación de tallos en las variedades INIAP-Quilotoa y Clipper posiblemente a causa de la proporción de auxinas–citoquininas 2:1 que favorecen no solamente a la proliferación de tejido calloso sino también a la diferenciación de las células hacia tallos (Hurtado y Merino, 1987).

En un segundo intento de regeneración y empleando los tejidos que se formaron a los 85 días de inducción, al ser transferidos al medio de Murashige y Skoog (MS) adicionado de una proporción 1:4 de auxinas y citoquininas, condiciones de luz para la producción de clorofila, y temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, a los 8 primeros días muestran desarrollo de plántulas verdes para la variedad androgénica Clipper, (Anexos VI y VII).

Estos resultados sugieren que la metodología que los autores Szarejko (2003) y Lentini *et al.*, (1997) aplicaron para los genotipos en su estudio puede variar para otros, como en este caso, que se aprecia que la fase de inducción tarda más tiempo sugiriendo que los embriones deberían permanecer más de 50 días en el medio BAC3 de inducción para su completo desarrollo y maduración y transferirse al medio de regeneración aproximadamente a los 70-75 días.

Es también necesario estandarizar la composición del medio de regeneración ya que tanto los componentes del medio BAC3 que indica Szarejko en su metodología son prácticamente los mismos que los del medio MS solo con algunas modificaciones pero evidentemente se muestran resultados diferentes, lo cual no indica que el medio aplicado en un primer intento de regeneración haya fallado por la composición, sino más bien porque se transfirieron embriones inmaduros.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó la presente investigación y con base en los resultados obtenidos, se pueden formular las siguientes conclusiones:

- Para manejar el 90% de sobrevivencia de microsporas el número máximo de días de pre-tratamiento frío 4°C para las variedades de estudio deben ser de 4 a 5 días.
- Los criterios que se deben manejar al momento de cosechar espigas de cebada en estado de desarrollo uninucleado medio y tardío son es el estado vegetativo de la planta Z4.0 y Z4.9 según la escala de Zadocks y la distancia de 5-6 cm entre la penúltima hoja y la hoja bandera según Szarejko (2003).
- De las cinco variedades evaluadas, la variedad Clipper muestra mejor capacidad androgénica con respecto a la formación de callos (36.25%) y embriones (19.78%), con 4 días de pre-tratamiento frío y al utilizar el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll 20%.
- Las variedades INIAP-Cañicapa, INIAP-Quilotoa 2003, Diferencial Emir y Diferencial I5 de acuerdo a los resultados estadísticos se muestran como variedades recalcitrantes.
- Los datos analizados estadísticamente en esta investigación muestran que el genotipo y los componentes del medio de inducción BAC3, especialmente el agente gelificante que se utilice influyen notablemente sobre la capacidad androgénica.

- El polisacárido de sacarosa Ficoll resultó ser más efectivo como agente gelificante en el medio de inducción BAC3 para el cultivo *in vitro* de anteras, que el Gelrite y Polietilenglicol.
- Se puede utilizar Gelrite como agente gelificante en el medio de inducción BAC3 sin embargo se obtienen porcentajes menores de formación de callos y embriones que al utilizar Ficoll.
- Para cultivo *in vitro* de anteras de cebada no se debe utilizar como agente gelificante al Polietilenglicol en el medio de inducción se presenta un elevado índice de oxidación en las anteras que conlleva a la inhibición de androgénesis.
- El medio de inducción BAC3 es el adecuado para la inducción de androgénesis favoreciendo la formación de callos y embriones en todos los genotipos.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

- En el presente investigación se observó que las variedades INIAP-Cañicapa, INIAP-Quilotoa 2003, Diferencial Emir, y Diferencial I5 no responden de la mejor manera a las condiciones planteadas, sin embargo probando una combinación de auxinas-citoquininas diferente, o auxinas solas, o la adición de carbón activado en el medio de inducción BAC3 se podrían obtener mejores respuestas androgénicas y un mayor número de callos y embriones.
- Identificado el genotipo androgénico Clipper y estandarizadas todas las condiciones para la fase de inducción es importante completar este trabajo estableciendo la composición adecuada del medio de regeneración para obtener plantas haploides y dobles haploides.
- Con las posibles plántulas haploides o dobles haploides obtenidas en la fase de regeneración realizar análisis ya sean citológicos para verificar el número cromosómico; o a nivel molecular para evaluar homocigocidad o heterocigocidad, o finalmente si han logrado duplicar espontáneamente su número cromosómico y llegan a formar granos o semillas evaluar características agronómicas en campo.
- Investigar otros tipos de gelificantes económicamente más rentables que el Ficoll que favorezcan la producción de callos y embriones.
- Realizar estudios genéticos de variedades de cebada que hayan sido identificadas como genotipos altamente androgénicos frente a variedades que se deseen utilizar para cultivo de anteras, de esta manera se podría predecir el nivel de respuesta de los genotipos y así optimizar los recursos para la producción de dobles haploides.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, V. (2009). Determinación de las condiciones adecuadas de pre-tratamiento frío y la dosis óptima de radiación Gamma Co60 , para realizar cultivo *in vitro* de microsporas aisladas de maíz de las variedades INIAP-101 e INIAP-601. Tesis Ing. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.
- Afza, R; Shen, M; Zapata, F; Xie, J; Khamis, H; Lee, K; Bobadilla, E; & Kodym , A. (1999). Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency. Plant Science. 153, 155-159.
- Ascanio, C.E. (1988). Inducción de plantas haploides a partir del cultivo *in vitro* de anteras de cafeto (*Coffea arabica* L. “Garnica”). Tesis Ph.D. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. (pp.89).
- Baenzinger, P; Kudirka, D; Schaeffer, G. W; & Lazar, M. (1984). The significance of doubled haploid variation. Gustafson, J. P. (Eds.). Gene manipulation in plant improvement. Memorias de un simposio, Universidad de Missouri. Plenum Press. (pp.385-414). New York.
- Baillie, A.M.R., Rossnagel, B.G., Kartha, K.K. (1993). Evaluation of 10 Canadian Barley *Hordeum vulgare* L.) Cultivars for tissue culture response. Can. J. Plant Science. 73, 171-174.
- Barnabás, B., Szyndy, T., Orosz, A., Obert, B., Kovács, G. (1998). Studies on recent problems of homozygote doubled haploid plant production from anther culture of maize (*Zea mays* L.). Acta agron.Hung. 46, 217-224
- Beck, F.X., Neuhofer, W., Muller, E., Am , J. (2000). Physiol Renal. Physiol. 279, 203–15.

- Blakeslee, A. F., Belling, J., Farnham, M. E., Begner, A. D. (1922): A haploid mutant in *Datura stramonium*. Plant Science. 55, 646-647.
- Bollon, H; Raquin, C. (1987). Haplomethods: A tool for crop improvement. Horisberg, M. (Eds.). Nestlé research news. (pp.81-91.). Lausanne, Suiza.
- Brar, D., y Khush, G.S. (1994). Mechanisms of Plant Growth and Improved Productivity. Modern Approaches. Basra, A.S , Marcel Dekker (Eds)., (pp.229-277). New York.
- Bregitzer, P. (1992). Plant regeneration and callus type in barley: effects of genotype and culture medium. Crop Science. 32, 1108-1112.
- Bright, S. W. J. (1985). Selection *in vitro*. Cereal tissue and cell culture. Bright, S. W. J., Jones, M. G. K. (Eds). Lancaster Nijhoff, W. Junk Publishers. (pp.231-260). Dordrecht, Boston.
- Büter, B. (1997). *In vitro* haploid production in maize. Jain, S., Sopory, S. and Veilleux,R. (Eds.) *In vitro* Haploid Production in Higher Plants. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. (pp.37-66).
- Cai, Q., Szarejko, I., Polok, K., & Maluszynski, M., (1992). The effect of sugars and growth regulators on embryo formation and plant regeneration from anther culture. Plant Breeding. 109, 218-226.
- Castillo, A.M., Vallés, M.P., & Cistué, L. (2000). Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. Euphytica. 113, 1–8.
- Chahal, G.S; Gosal, S.S. (2002). Principles and Procedures of Plant Breeding. Biotechnological and Conventional Approaches. Alpha Science International Ltd (Ed.). (pp.604). Harrow, U.K.

- Charmet, G., Bernard, S. (1984). Diallel analysis of androgenetic plant production in hexaploid triticale (*X. triticosecale*, Wittmack). Theoretical and Applied Genetics. 69, 55-61.
- Chávez, J.L. (1995). Mejoramiento de plantas 2. Métodos específicos de plantas alogamas. Trillas UAAAN (Ed.). (pp.143). México.
- Chen, C. (1977). Induction of maize plantlets from anther culture. Bot. Bull. Acad. Sin. 17, 18-24.
- Chicaiza, O; Rivadeneira, M; Coronel, J; Ponce, L; Paredes, F; Abad, S. (2003). Iniap-Cañari 2003 e Iniap Quilotoa 2003: Nuevas Variedades de Cebada para la Sierra Centro-Norte Ecuatoriana. INIAP. Quito, Ecuador.
- Choo, T.M., Reinbergs, E., Kasha, K. J. (1985). Use of haploids in breeding barley. Plant Breeding Reviews 3, 219-252.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y., Bi, F.Y. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. Sci. Sin.18, 659-668.
- Chuang, C.C., Ouyang, T.W., Chia, H., Chou, S.H., Ching, C.K. (1978). A set of potato media for wheat anther culture. Science Press. Proc. Symp. Plant cell Tissue and Organ Culture. 51-56. Beijing.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1984. Cultivo de anteras el camino más corto para obtener variedades mejoradas. Arroz en las Américas. Cali, Colombia. (pp.1-5).
- Cistué, L; Ramos, A; Castillo, AM; Romagosa, I. (1994). Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. Plant Cell Reports. 13, 709-712.

- Cistué, L; Ziauddin, A; Simion, E; Kasha, KJ. (1995). Effects of culture conditions on isolated microspore response of barley cultivar Igri. Plant Cell Tissue Org Culture. 42, 163-169.
- Cistué, L; Ramos, A; Castillo, AM. (1999). Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. Plant Cell Tissue Org Culture.55, 159-166.
- Cistué, L, Vallés, MP., Echávarri, B., Sanz, J.M., Castillo, A.M. (2003). Barley anther culture. En: Malupszynski M, Kasha K, Foster B (Eds). Doubled Haploid Production in Crop Plants. FAO/IAEA Division, Wien, A Manual. (pp.29-35).
- Coumans, M., Sohota, S., Swanson, E. (1989). Plant development from isolated microspores of *Zea mays* L. Plant cell Reports 7, 618-621.
- De Buyser, J., Henry, Y., Lonnet, P., Hertzog, R., Hespel, A. (1987). “Florin”: a doubled haploid wheat variety developed by anther culture method. Plant Breeding 98, 53-56.
- Devaux, P. (1987). Comparison of anther culture and *Hordeum bulbosum* method for the production of doubled haploid in winter barley. Production of green plants. Plant Breeding 98, 215-219.
- Devaux, P., Zivy, M., Kilian, A., y Kleinhofs. (1996). Scoles, G. & Rosnagel, B. (Eds.) Proc. V Int. Oat. Conf. And VII Int. Barley Genet. Symp., (pp.216-222).
- Dodds, J.H; Roberts, LW. 1985. Experiments in Plant Tissue Culture. 2ed. Cambridge University Press. (pp.157-171). London.
- Dunwell, J.M. (1985). Anther and ovary cultures. Cereal Tissue and Cell Culture. Bright, S.W.J., Jones. M.G.K. (Eds.). Lancaster: Martinus Nijhoff, Dr W. Junk Publishers. (pp.2-44). Dorerecht, Boston.

- Egaña, B. (1995) Obtención de suspensiones celulares regenerables a partir de variedades de cebada cultivadas en los secanos españoles. Tesis Ph.D. Facultad de Ciencias. Universidad de Navarra. Zaragoza.
- FAO 2000. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). (2000). Producción de cebada a nivel mundial. Extraído el 17 junio 2010 de, <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Finnie, S.J., Powell, W. & Dyer, A.F., (1989). The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.), Plant Breeding. 103, 110-118.
- Foroughi-Wehr, B., Mix, G., Gaul, H., Wilson, H.M. (1976). Plant production from cultured anthers of *Hordeum vulgare* L., Z.Pflanzenzüchtg, 77, 198-204.
- Foroughi-Wehr, B., Friedt, W., Wenzel, G. (1982). On the genetic improvement of androgenic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. Theoretical and Applied Genetics. 62, 233-239.
- Foroughi-Wehr, B., y Friedt, W. (1984). Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant *Hordeum vulgare* lines by anther culture. Theoretical and Applied Genetics. 67, 377-382.
- Forster, B.P, y Powell, W. (1997). Haploidy in barley. Jain SM, Sopory SK, Veilleux, R.E. (Eds.) *In vitro* haploid production in higher plants, Vol 4. (pp.90-115). Kluwer, Dordrecht.
- Galeon. (2003). Botánica: Informe sobre la cebada. Extraído el 07 de Noviembre, 2009, de: <http://infocebada.galeon.com/botanica.htm>.
- Genovesi, AD., & Yingling, R.A. (1995). Isolated microscore and anther culture of maize. US Patent Issued, No. 992637.

- George, E.F., Sherrington, P.D. (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories.* Edington, Westbury, England: Exegetics Ltd.
- Giménez, J.; y Tomaso, J. (2002). *Mejoramiento Genético: Producción de Haploides Duplicados. Cultivares Resistentes en Cebada Cervecera. Laboratorio de Tejidos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Bordenave, Buenos Aires, Argentina.*
- Goldstein, C.S., Kronstad, W. E. (1986). Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley (*Hordeum vulgare* L). *Theoretical and Applied Genetics.* 71, 631-636.
- Gresshoff, P.M., Doy, C.H. (1972). Development and differentiation of haploid *Lycopersicon scultentum* (Tomato). *Planta* 107, 161-170.
- Gupta, S., & Mandal, N. (1995) Effect of genotype and culture medium and an androgenic callus formation and green plant regeneration in indica rice. *Indian J. expt. Biol.* 33, 761-765.
- Hanzel, J., Miller, J., Brinkmann, M., Fendo, E. (1985). Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. *Crop Science.* 25, 27-31.
- Hoekstra, S., Zijderveld, MH., Louwerse J.D., Heidekamp, F., Mark, F. (1992). Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Plant Science.* 86, 89-96.
- Horlow C., Defrance M.C., Pollien J.M., Goujaud J., Delon R. et Pelletier G. (1996). Transfer of cytoplasmic male sterility by spontaneous androgenesis in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Euphytica* 66, 45-53

- Hou, L., Ullrich, S. E., Kleinhofs, A., Stiff, C.M. (1993). Improvement of anther culture methods for doubled haploid production in barley breeding. Plant Cell Reports. 12, 334-338.
- Hou, L., Ullrich, S.E., Kleinhofs, A. (1994). Inheritance of anther culture traits in barley. Crop Science. 34, 1243-1247.
- Hu, H., and H.Y. Yang. (1986). Haploids of higher plants *in vitro*. China. Academic Publishers, Beijing/Springer-Verlag. Berlin.
- Hu, H. (1986). Variability and gamete expression in pollen-derived plants in wheat. Hu, H. y Yang, H. (Eds.). Haploids of higher plants *in vitro*. China Acad. Publishing. (pp.67-78). Beijing.
- Huang, B., y Sunderland, H. (1981). Temperature-stress Pretreatment in Barley Anther Culture. John Innes Institute Colney Lane, Norwich.
- Huang, B., Sunderland, N., (1982). Temperature-stress pretreatment in barley anther culture, Ann. Bot., 49, 77-88.
- Hunter, C.P. (1987) Plant generation method. European patent application (No. 245-898 A2).
- Hunter, C.P. (1988). Plant regeneration from microspores of barley, *Hordeum vulgare* L. Ph. D., University of London.
- Hurtado, D; y Merino, M. (1987). Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas (Ed.). México.
- INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos). (2002). Encuesta Nacional de Superficie y Producción Agropecuaria. (pp.63).

- Jaramillo, J.G. y Summers. W.L. (1988). Tomato anther callus production: the effect of agar type and concentrations on the induction of callus. Ames (pp. 193-217). Estados Unidos.
- Jing-Li, P., Gong-Hong, G., y Hai, D. (1983). Initial types of wheat pollen cells and their development in anther culture. Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. The International Rice Research Institute (IRRI) (Ed.). (pp.117-129). Manila, Philippines.
- Jones, A, Petolino, J.F. (1988). Effects of support medium on embryo and plant production form cultured anthers of soft-red winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant cell Tissue and Organ Culture. 12, 253-261.
- Kao, K.N. (1981). Plant formation from barley anther cultures with Ficoll media, Z. Pflanzenphysiol. Bd. 103, 437-443.
- Kao, K.N. (1988). *In vitro* culture in barley breeding. Casaccia, Rome, Dec.
- Kao, K.N., Saleem, M., Abrams, S., Pedras, M., Horn, D., Mallard, C. (1991). Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. Plant Cell Reports. 9, 595-601.
- Kasha, K.J y Kao, K.N. (1970). High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature 225, 874-876.
- Kasha, K.J. (1989). Production of haploids in cereals. Current Options for Cereal Improvement. Maluszynsky, M. (Ed.). London: Kluwer Academic Publishers (pp.71-80).
- Kasha, K.J., Ziauddin, A., Cho, U.H. (1990). Haploids in cereal improvement: anther and microspore culture. Gene manipulation in plant improvement II. Gustafson, J.P. (Ed.). New York: Plenum Press. (pp.213-235).

- Kasha, K.J., Cho, U.H., Ziauddin, A. (1992). Application of micropore cultures. *Barley Genetics VI*. Munck, L. (Ed.). Copenhagen, Denmark: Munksgaard International Publishers Ltd. (pp.793-806).
- Kasha, K.J; Maluszynski, M. (2003). Doubled Haploid Production in Crop Plants: Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. Maluszynski, M. et al. (Eds.). Kluwer Academic Publishers. London. (pp. 1-4).
- Kasha, K.J. (2005). Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. Palmer CE, Keller WA, Kasha KJ (Eds.) *Haploids in crop improvement II*. Springer-Verlag, (pp. 123-151). Berlin.
- Kintzios, S., y Fischbeck, G., (1994). Anther culture response of *Hordeum spontaneum* - derived winter barley lines. Plant cell Tissue and Organ Culture. 37, 165-170.
- Klimaszewska, K., Bernier-Cardou, M., Cyr, D.R., y Sutton, B.C.S. (2000). Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobes* L. *In Vitro Cellular Developmental. Biology-Plant* 36, 279-286.
- Konzak,C.F. y Zhou, Z. (1991). Anther culture methods for doubled haploid production in wheat, *Proceedings of the Second FAO/IAEA Meeting on Use of Induced Mutations in Connection with Haploids and Heterosis in Cereals*. Malusynski, M; Barabas, Z. (Eds). Vol. 19, No 1-2, (pp.147-161).
- Knudsen, S., Due, I.K., Andersen, S.B. (1989). Component of response in barley anther culture. Plant Breeding. 103, 241-246.
- Kuhlmann, U., & Foroughi-Wehr, B. (1989). Production of doubled haploid lines in frequencies sufficient for barley breeding programs. Plant Cell Reports. 8, 78-81.

- Lacadena, J. (1970). Genética vegetal aplicada a la Mejora. AGESA (Ed.)
- Larsen, E.T., Tuveesson, I., Andersen, SB. (1991). Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. Theoretical and Applied Genetics. 82, 417-420.
- Lashermes, P., Engin, G., Ortiz Ferrara, G. (1991). Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) adapted to dry areas of West Asia and North Africa. J. Of Gen. Breed 45, 33-37.
- Last, D.I., Brettell, R.I.S. (1990). Embryo yield in wheat anther culture is influenced by choice of sugar in the culture medium. Plant Cell Reports. 9, 14-16.
- Lentini, Z; Martinez, C; Roca, R. (1997). Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. Ilus. (Publicación CIAT: 293). (pp.57).
- Liming, Hou; Steven, E; Ullrich; Andris, K; & Carol, M. (1993). Improvement of anther culture methods for doubled haploid production in barley breeding. Department of Crop and Soil Sciences, Washington State University, Pullman, WA 99164-6420, USA. Plant Cell. Reports. 12, 334-338.
- Linossier, L., Veisseire, P., Cailloux, F., & Coudret, A. (1997). Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. Plant Science 124, 183-191. Limerik
- Liu, W., Zheng M., Polle, E., Konzack, C. (2002). Highly Efficient Doubled-Haploid Production in Wheat (*Triticum aestivum* L.) via Induced Microspore Embryogenesis. Crop Science. 42, 686-692.

- Logue, S.J. Giles, L.C. and Sparrow, D.H.B. (1993). Genotype and environment strongly influence barley anther culture response using Australian genotypes. Aust. J. Bot. 41,227-236.
- Luckett, D.J., y Smithard, R.A. (1992). Doubled haploid production by anther culture for Australian barley breeding, J. Agri. Res. 43, 67-78. Australia.
- Lührs, R., Lörz, H. (1987). Plant regeneration *in vitro* from embryogenic cultures of spring and winter type barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. Theoretical and Applied Genetics. 75, 16-25.
- Maheshwari, S.C., Tyagi, A.K., Malhorta, K., Sopory, S.K. (1980). Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms the current status. Theoretical and Applied Genetics. 58, 193-206.
- Maluszynski, M. Kasha, K.J. Forster, B.P. & Szarejko, I. (2003). Doubled Haploid Production in Crop Plants. Kluwer Academic publishers. (pp.1-4). Dordrecht-Boston.
- Maraschin, S.F., Priester, W., Spaink., H.P., y Wang, M. (2005). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. Journal of Experimental Botany, vol. 56, no. 417, (pp.1711-1726).
- Marsolais, A.A., Kasha, K.J. (1985). Callus induction from barley microspores. The role of sucrose and auxin in barley anther culture medium. Can. J. Bot. 63, 2209-2212.
- Martínez. P., Lentini., Z., Reyes., P. (1996A). El cultivo de anteras, una herramienta útil en el mejoramiento de arroz. Resumen Revista. Arroceros moderno. (pp. 29 – 32).
- Martínez. P., Correa, C.F., Amezquita, M.C., Tulande, E., Lema, G., Zeigler., R.S.(1996B). Comparison of rice lines derived through anther culture and the

pedigree method in relation to blast (*Pyricularia grisea* Sacc.) resistance. Theoretical and Applied Genetics Vol 92. 5, 583 – 590.

- Mendez, H. (2004). Cultivo de Cereales. Extraído el 13 mayo 2009, de <http://www.sagpya.mecon.gov>.
- Mercy, S. T. (1990): Basic Studies in Rice Anther Culture. Daya Publishing House, New Delhi. (pp.49-64). India.
- Molina, J.L. (1989). La cebada. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Servicio de Extensión Agraria. (Ed.) Ediciones Mundi-Prensa.
- Muñoz- Amatriaín M. (2007). Control genético y variación transcripcional de la embriogénesis de la microspora en cebada. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Zaragoza. Departamento de Genética y Producción Vegetal
- Nageli, M., Schmid, J., Stamp, P., Büter, B. (1999). Improved formation of regenerable callus in isolated microspore culture of maize: impact of carbohydrates, plating density and time of transfer. Plant Cell Reports. 19, 177-184.
- Núñez; Roca; Martínez. (1989). Cultivo de Anteras en el mejoramiento del arroz. Colombia S.A. (Ed). Colombia. (pp. 33-39).
- Obert, B., Pretová, A., Büter, B., Schmid, J. (2000). Effect of different saccharides on variability of isolated maize microspores. In vitro cell, Dev. Biol.-Plant 41, 775-782.
- Obert, B., Barnabás, B. (2004). Colchicine induced embryogenesis in maize. Plant cell Tissue and Organ Culture. 77, 283-285.

- Obert, B., Szabó, L., Mityko, J., Pretová, A., Barnabás, B. (2005). Morphological events in cultures of mechanically isolated maize microspores. *In vitro cell. Dev. Biol.-Plant.* 41, 775-782.
- Olsen, L. (1987). Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare* L. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. *Calesberg Res. Commun.* 52, 393-404.
- Orshinsky, B.R., McGregor, L.J., Johnson, G. I.E., Hucl, P., Kartha, K.K. (1990). Improved embryoid induction and green shoot regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. *Plant cell Tissue and Organ Culture.* 9, 365-369.
- Pace, G., Reed, J., Ho, L., Fahey, J. (1987). Anther culture of maize and the visualization of embryogenic microspores by fluorescent microscopy. *Theoretical and Applied Genetics.* 73, 863-869.
- Palmer, C., Keller, W. (2005). Overview of Haploidy. Palmer CE, Keller WA, Kasha KJ (Eds.) Haploids in crop improvement II. Springer-Verlag. (pp.3-9). Berlin.
- PlantPro. 2006. Morfología de la Cebada. Extraído el 20 de Septiembre, 2009, de http://www.plantprotection.hu/.../barley/morf01_bar.htm.
- Polci, P; Conti, V; Miranda, Rubén. (2000). Métodos para acelerar programas de mejoramiento e identificación varietal. Extraído el 30 de junio, 2009, de <http://www.parte4cap1.pdf>.
- Powell, W. (1988). The influence of genotype and temperature pretreatment on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L). *Plant cell Tissue and Organ Culture.* 12, 291-297.

- Prehn, D., Serrano, C., Berrios, C.G., y Arce-Johnson, P. (2003). Micropropagación de Quillaja saponaria Mol. a partir de semilla. Bosque (Valdivia) 24, 3-12.
- Pretova, A., De Ruijter, N., Van Lammeren, A., Schel, J. (1993). Structural observations during androgenic microspore culture of the 4cl genotype of *Zea mays* L. Euphytica. 65,61-69
- Prontuario de Agricultura. (2005). Cultivos Agrícolas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Mundi-Prensa (Ed.). Madrid, Barcelona.
- Pullman, G.S., Johnson, G. Peter, J., Cairney, & Xu, N. (2003). Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. Plant Cell Reports 21,747-758.
- Pullman, G.S., Gupta, P.K., Timmis, R, Carpenter, C., Kreitinger, M., & Welty, E. (2005). Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. Plant Cell Reports 24, 271-279.
- Raina, S. K., Zapata, F. J. (1997). Enhanced anther culture efficiency of indica rice (*Oryza sativa* L.) Through modification of the culture media. Plant Breeding 116, 305-315.
- Randal, L., Simonson, P., Baenzinger, S. (1990). The Effect of Gelling Agents on Wheat Anther and Immature Embryo Culture. Department of Agronomy, University of Nebraska, Lincoln, NE 68583-0915, U.S.A.
- Rawson, H., Gómez, H. (2001). Trigo regado. Manejo de cultivo. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Extraído el 17 julio 2010, www.fao.org/DOCREP/006/X8234S/x8234s05

- Rivadeneira M., Ponce, L., Abad, S., Paredes, F. (2003). Guía práctica para los agricultores cebaderos de la sierra ecuatoriana. INIAP. Quito, Ecuador.
- Ruiz, M., Rueda, J., Peláez, M.I., Espino, F.J., Candela, M., Sendino, A.M., Vázquez, A.M. (1992). Somatic embryogenesis, plant regeneration and somaclonal variation in barley. Plant cell Tissue and Organ Culture. 28, 97-101.
- Rush M, C; Shao, Q .(1996). Rice improvement through cell and tissue culture. International Rice Research strategies for the further. Rush, M.C. & Shao, Q. (Eds.) International Rice Research Institute. (pp. 31-40). Los Banos, Phillipines.
- Sathish,P., Gamborg, O.L., Nabor, M.W. (1997). Establishment of stable NaCl – resistant rice plant lines from anther culture: Distribution pattern of K⁺/Na⁺ in callus and plant cell. Theoretical and Applied Genetics. Vol 95. 8, 1203 – 1209.
- Scott, P., Lyne, R.L. (1994). The effect of different carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. Plant cell Tissue and Organ Culture. 36, 129-133.
- Simarro, J; Nuez, F. (2002). Obtención de plantas doble haploides androgénicas mediante cultivo *in vitro* de anteras de maíz. Valencia, ES. COMAV. Extraído el 30 de junio, 2009, de www.ivia.es/mejora2006/apdf/Solanaceas/pdf
- Snape, J., Simpson, E., Parker, B. (1986). Criteria for the selection and use of doubled haploid systems in cereal breeding programmes. Horn W, Jensen CJ, Odenbach W, Schieder, O. (Eds). Genetic manipulation in plant breeding. Walter de Gruyter. (pp.217-229). Berlin.
- Sorvari, S., Schieder, O. (1987). Influence of sucrose and melobiose of barley anther cultures in starch media. Plant Breeding. 99, 164-171.

- Stasolla, C., L. Kong, E.C., Yeung, y Thorpe, T.A..(2002). Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cellular Developmental. Biology-Plant 38,93-105.*
- Stasolla, C., y Yeung, E.C. (2003). Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant cell Tissue and Organ Culture. 74,15-35.*
- Sun, Z. X., Si, H. M., Cheng, S. H., Zhan, X. Y. (1993): Effect of maltose on efficiency of anther culture of rice. *Chinese Journal of Rice Science. 7, 227-231.*
- Sunderland, N., Xu, Z.H., Huang, B. (1981). Recent advances in barley anther culture. *Barley Genetics IV. Proc. 4th. Int. Barley Genetics Symp. Edinburg Univ. Press. (Ed.) (pp.691-703). Edinburg.*
- Szarejko, I., Kasha, K.J. (1989). Introduction anther culture derived from haploids in barley. *Proc. FAO/IAEA Research Coord. Katowice, Poland.*
- Szarejko, I., Kasha, K.J. (1991). Induction of anther culture derived from doubled haploids in barley, Use of Induced Mutations in Connection with Haploids and Heterosis in Cereals, Malusynski, M., Barabas, Z., Vol 19, No 1-2, 219-237.
- Szarejko, I., Savafikan, C., Toker, M. (1999). Callus Production and Plant Regeneration from Anther Culture of Some Turkish Barley Cultivars. *Tr. J. of Botany 23, 359-365. Tübitak.*
- Szarejko, I. (2003). Anther culture for doubled haploid in barley (*Hordeum vulgare* L.) Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. Maluszynski, M. et al. (Eds.). Kluwer Academic Publishers. London.
- Szarka, B.; Devenyi, M.; Morreos, S. (2001). Fertile maize lines obtained from isolated microspores. *Euphytica. 122, 53-60.*

- Telmer, C.A, Newcomb, W., Simmonds, D.H. (1995). Cellular changes during heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv. *Topas*. Protoplasma. 185, 106-112.
- Touraev, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E. (1997). Initiation of microspore embryogenesis by stress. Plant Science. 2, 297-302.
- Touraev, A., Pfosser, M., Heberle-Bors, E. (2001). The microspore: a haploid multipurpose cell. Adv Bot Res. 35, 53-109.
- Thomas, W; Forster B.P; Gertsson, B. (2003). Doubled Haploid Production in Crop Plants: Double haploids in breeding. Maluszynski et al. (Eds). Kluwer Academic Publishers. London. (pp. 337-349).
- Trejo, G., Maldonado, U., Jiménez, A., Blanqueto, M., Salcedo, G., Martinez, B., De Jesús Sánchez, A. (2002). Efecto del tiempo de exposición a baja temperatura y de reguladores de crecimiento en la regeneración de plantas a partir de anteras de arroz *Oryza sativa* L. (Cultivar Japónica H2005). Agrocienia. Colegio de Postgrados. 004, 441-449. México.
- Trottier, M.C., Collin, J., Comeau, A. (1993). Comparison of media for their aptitude in wheat anther culture. Plant cell Tissue and Organ Culture. 35, 59-67.
- Tsay, H. S. y Chen, L. J. (1984). The effects of cold shock and liquid medium on callus formation in rice anther culture. Agric. Res. China 33,24-29
- Villacrés, E. (1996). La cebada un cereal nutritivo. INIAP. Quito, Ecuador.
- Wang M, van Bergen S, van Duijn B. (2000). Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. Plant Physiology 124, 523–530

- Wenzel, G. & Uhrig, H. (1981). Breeding for nematode and virus resistance in potato via anther cultura. Theoretical and Applied Genetics. 59, 333-340.
- Xie, J.H., Gao, Q., Cheng, X , Shen, Y., Liang, Z. (1995). Improved isolated microspore culture efficiency in medium with maltose and optimized regulator combination in japonica rice (*Oryza sativa*). Plant cell Tissue and Organ Culture. 42, 245-250.
- Zadocks, J.C., Chang T.T., Konzak, C.F. (1974). A Decimal Code for the Growth Stages of Cereals. Weed Research. 14, 415-421.
- Zohary D; Hopf, M. 1988. Domestication of plants in the old world. Clarendon,Oxford.
- Zhou, H., Zheng, Y., Konzak, C.F. (1991). Osmotic potential of media affecting green plant percentage in wheat anther culture. Plant Cell Reports. 2, 63-66.
- Zhou, H., Ball, S.T., Konzak, C.F. (1992). Functional properties of Ficoll and their influence on anther culture responses of wheat. Plant cell Tissue and Organ Culture. 30, 77-83.
- Zhu, M., Xu, A., Yuan, M., Huang, C.H., Yu, Z., Wang, L., Yu, J. (1990). Effects of amino acid on callus differentiation in barley anther culture. Plant cell Tissue and Organ Culture. 22, 201-204.

ANEXO I

Cultivo *in-vitro* de anteras de cebada de la variedad Clipper en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll

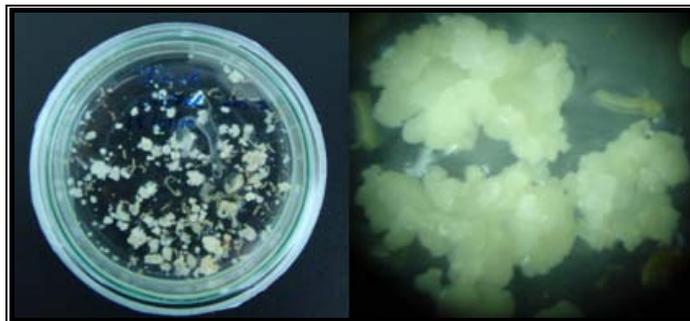
Anteras a los 5 Días de inducción



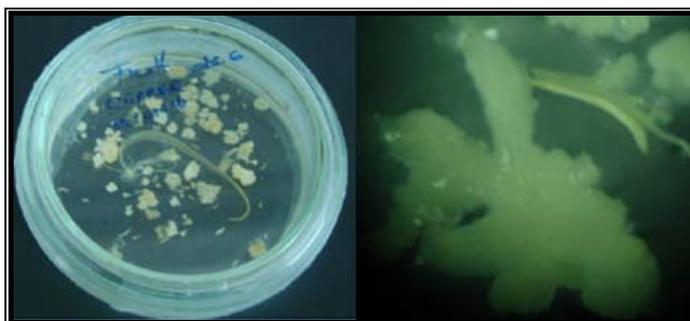
Respuestas Androgénicas a los 15 Días de Inducción



Formación de Callos a los 30 Días de Inducción



Formación de Embriones a los 50 Días de Inducción



ANEXO II

Cultivo *in-vitro* de anteras de cebada de la variedad INIAP-Quilotoa 2003 en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll

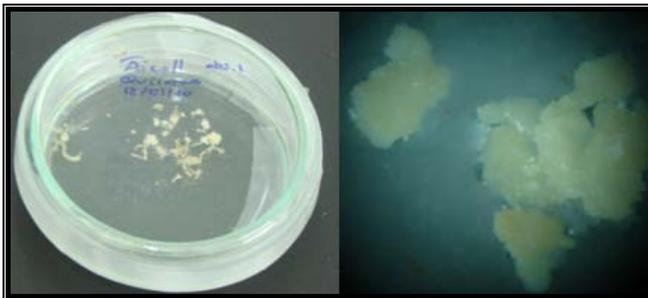
Anteras a los 5 Días de inducción



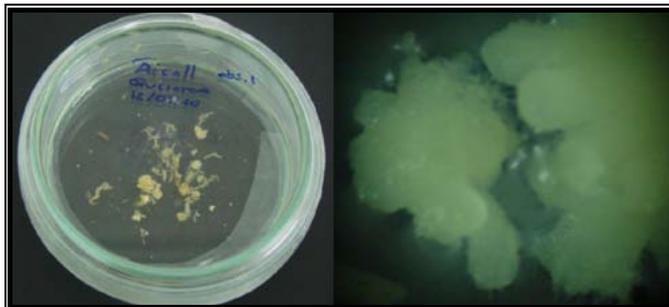
Respuestas Androgénicas a los 15 Días de Inducción



Formación de Callos a los 30 Días de Inducción



Formación de Embriones a los 50 Días de Inducción



ANEXO III

Cultivo *in-vitro* de anteras de cebada de la variedad INIAP-Cañicapa 2003 en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll

Anteras a los 5 Días de inducción



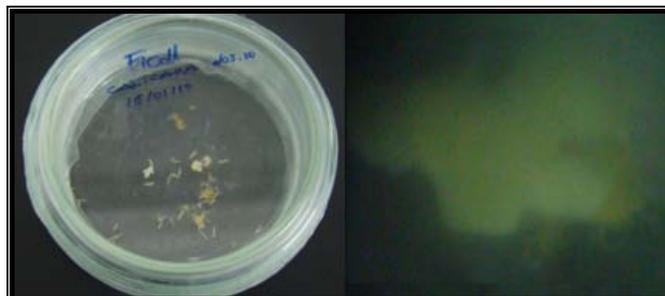
Respuestas Androgénicas a los 15 Días de Inducción



Formación de Callos a los 30 Días de Inducción



Formación de Embriones a los 50 Días de Inducción



ANEXO IV

Cultivo *in-vitro* de anteras de cebada de la variedad diferencial Emir en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll

Anteras a los 5 Días de inducción



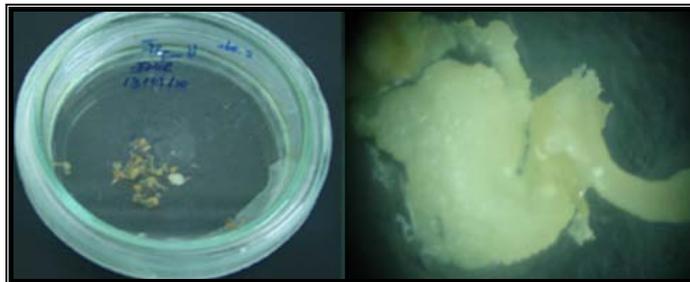
Respuestas Androgénicas a los 15 Días de Inducción



Formación de Callos a los 30 Días de Inducción



Formación de Embriones a los 50 Días de Inducción



ANEXO V

Cultivo *in-vitro* de anteras de cebada de la variedad diferencial I5 en medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll

Anteras a los 5 Días de inducción



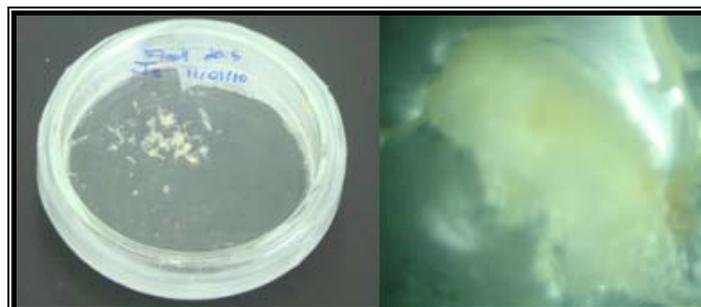
Respuestas Androgénicas a los 15 Días de Inducción



Formación de Callos a los 30 Días de Inducción



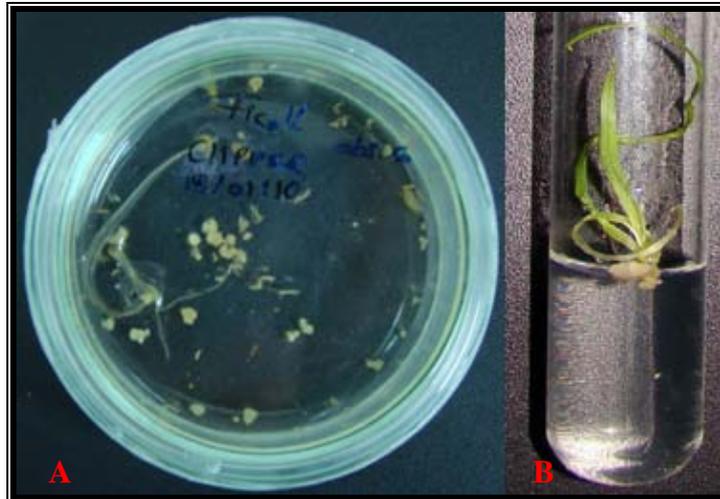
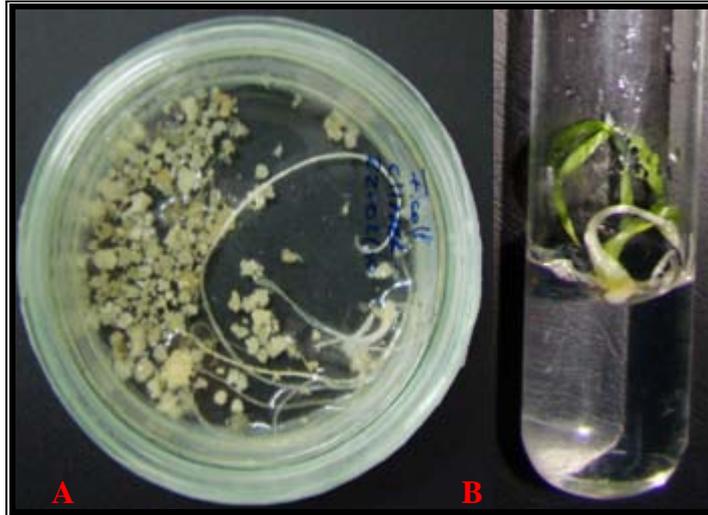
Formación de Embriones a los 50 Días de Inducción



ANEXO VI

Variedad Clipper

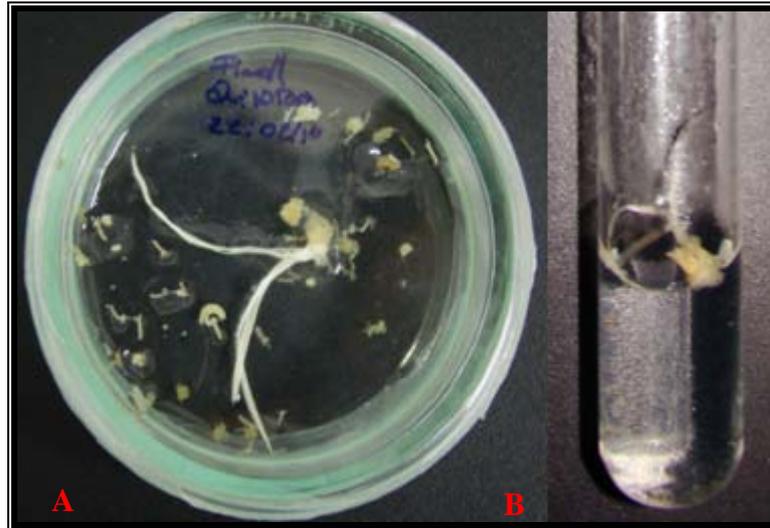
- A. Diferenciación de tallos a los 85 días en el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll. B. Plántula en el medio de Regeneración.



ANEXO VII

Variedad INIAP- Quilotoa 2003

A .Diferenciación de tallos a los 85 días en el medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll. B. Plántula en el medio de regeneración.



ANEXO VIII

Número de días de pre-tratamiento frío 4°C obtenidos del Análisis de Probabilidades (PROBIT) para la sobrevivencia de 1 al 99% de microsporas para la variedad diferencial Emir

ANÁLISIS PROBIT VARIEDAD DIFERENCIAL EMIR			
Probabilidad	DIAS (No.)	95% Límites Fiduciales	
		Mínimo	Máximo
0.01	30.78	29.39260	32.35714
0.02	26.52	25.45941	27.72665
0.03	24.13	23.24052	25.13971
0.04	22.48	21.69913	23.35465
0.05	21.22	20.52059	21.99703
0.06	20.20	19.56767	20.90422
0.07	19.34	18.76833	19.99113
0.08	18.61	18.08009	19.20774
0.09	17.97	17.47586	18.52222
0.10	17.40	16.93731	17.91308
0.15	15.22	14.87605	15.59969
0.20	13.68	13.41457	13.97999
0.25	12.49	12.27205	12.72896
0.30	11.51	11.32534	11.70519
0.35	10.66	10.50927	10.83441
0.40	9.92	9.78503	10.07255
0.45	9.25	9.12751	9.39094
0.50	8.64	8.51946	8.76940
0.55	8.07	7.94830	8.19274
0.60	7.52	7.40413	7.64872
0.65	7.00	6.87840	7.12687
0.70	6.49	6.36281	6.61737
0.75	5.98	5.84821	6.10986
0.80	5.45	5.32282	5.59163
0.85	4.90	4.76870	5.04383
0.90	4.29	4.15182	4.43110
0.91	4.15	4.01510	4.29474
0.92	4.01	3.87163	4.15139
0.93	3.86	3.71976	3.99932
0.94	3.69	3.55713	3.83611
0.95	3.52	3.38027	3.65813
0.96	3.32	3.18364	3.45959
0.97	3.09	2.95746	3.23027
0.98	2.81	2.68140	2.94888
0.99	2.42	2.29755	2.55441

ANEXO IX

Número de días de pre-tratamiento frío 4°C obtenidos del Análisis de Probabilidades (PROBIT) para la sobrevivencia de 1 al 99% de microsporas para la variedad diferencial I5

ANÁLISIS PROBIT VARIEDAD DIFERNCIAL I5			
Probabilidad	DIAS (No.)	95% Límites Fiduciales	
		Mínimo	Máximo
0.01	22.94	22.23357	23.71694
0.02	20.51	19.94904	21.13800
0.03	19.11	18.62209	19.64998
0.04	18.12	17.68189	18.60055
0.05	17.35	16.95188	17.78877
0.06	16.72	16.35405	17.12609
0.07	16.19	15.84700	16.56563
0.08	15.73	15.40615	16.07960
0.09	15.32	15.01569	15.65016
0.10	14.95	14.66485	15.26517
0.15	13.52	13.29558	13.77137
0.20	12.48	12.29650	12.69181
0.25	11.66	11.49705	11.83579
0.30	10.96	10.82123	11.11872
0.35	10.35	10.22826	10.49539
0.40	9.81	9.69346	9.93850
0.45	9.31	9.20054	9.43003
0.50	8.84	8.73789	8.95710
0.55	8.40	8.29663	8.50981
0.60	7.97	7.86939	8.07993
0.65	7.55	7.44939	7.65997
0.70	7.13	7.02969	7.24237
0.75	6.71	6.60207	6.81844
0.80	6.26	6.15538	6.37660
0.85	5.78	5.67172	5.89861
0.90	5.23	5.11580	5.34879
0.91	5.10	4.98979	5.22399
0.92	4.97	4.85637	5.09176
0.93	4.83	4.71373	4.95027
0.94	4.68	4.55932	4.79695
0.95	4.51	4.38933	4.62793
0.96	4.31	4.19762	4.43701
0.97	4.09	3.97330	4.21314
0.98	3.81	3.69346	3.93305
0.99	3.41	3.29168	3.52909

ANEXO X

Número de días de pre-tratamiento frío 4°C obtenidos del Análisis de Probabilidades (PROBIT) para la sobrevivencia de 1 al 99% de microsporas para la variedad INIAP-Quilotoa

ANÁLISIS PROBIT VARIEDAD INIAP- QUILOTOA			
Probabilidad	DIAS (No.)	95% Límites Fiduciales	
		Mínimo	Máximo
0.01	36.06	34.15582	38.25600
0.02	31.21	29.73618	32.91159
0.03	28.48	27.23250	29.91587
0.04	26.59	25.48840	27.84407
0.05	25.14	24.15200	26.26558
0.06	23.97	23.06951	24.99312
0.07	22.99	22.16008	23.92855
0.08	22.14	21.37601	23.01416
0.09	21.40	20.68682	22.21318
0.10	20.74	20.07187	21.50076
0.15	18.22	17.71207	18.78870
0.20	16.43	16.03277	16.88292
0.25	15.04	14.71632	15.40614
0.30	13.89	13.62310	14.19391
0.35	12.91	12.67897	13.15977
0.40	12.04	11.83953	12.25251
0.45	11.25	11.07571	11.43903
0.50	10.52	10.36721	10.69627
0.55	9.85	9.69901	10.00693
0.60	9.20	9.05934	9.35693
0.65	8.58	8.43820	8.73387
0.70	7.97	7.82602	8.12588
0.75	7.36	7.21214	7.52024
0.80	6.74	6.58266	6.90131
0.85	6.08	5.91595	6.24595
0.90	5.34	5.17042	5.51089
0.91	5.17	5.00472	5.34694
0.92	5.00	4.83065	5.17442
0.93	4.82	4.64616	4.99123
0.94	4.62	4.44836	4.79436
0.95	4.40	4.23295	4.57937
0.96	4.16	3.99307	4.33917
0.97	3.89	3.71662	4.06117
0.98	3.55	3.37841	3.71914
0.99	3.07	2.90653	3.23780

ANEXO XI

Número de días de pre-tratamiento frío 4°C obtenidos del Análisis de Probabilidades (PROBIT) para la sobrevivencia de 1 al 99% de microsporas para la variedad INIAP-Cañicapa

ANÁLISIS PROBIT VARIEDAD INIAP-CAÑICAPA			
PROBABILIDAD	DIAS (No.)	95 % Límites Fiduciales	
		MINIMO	MÁXIMO
0.01	20.90	20.30170	21.55681
0.02	18.54	18.07093	19.05865
0.03	17.18	16.78362	17.62684
0.04	16.23	15.87551	16.62163
0.05	15.49	15.17280	15.84681
0.06	14.89	14.59894	15.21616
0.07	14.38	14.11339	14.68416
0.08	13.94	13.11339	14.22387
0.09	13.56	13.31973	13.81800
0.10	13.21	12.98571	13.45484
0.15	11.86	11.68739	12.05234
0.20	10.89	10.74565	11.04590
0.25	10.12	9.9558	10.25264
0.30	9.47	9.6403	9.59171
0.35	8.91	8.81194	9.01994
0.40	8.41	8.31587	8.51132
0.45	7.95	7.86045	8.04864
0.50	7.52	7.43482	7.61969
0.55	7.12	7.03075	7.21514
0.60	6.73	6.64142	6.82733
0.65	6.35	6.26065	6.44944
0.70	5.97	5.88212	6.07468
0.75	5.59	5.49856	5.69537
0.80	5.20	5.10018	5.30148
0.85	4.77	4.67154	4.87717
0.90	4.28	4.18246	4.39178
0.91	4.17	4.07245	4.28205
0.92	4.06	3.95559	4.16597
0.93	3.93	3.83124	4.04200
0.94	3.80	3.69695	3.90792
0.95	3.65	3.54950	3.76047
0.96	3.49	3.38372	3.59435
0.97	3.29	3.19045	3.40020
0.98	3.05	2.95044	3.15832
0.99	2.71	2.60819	2.81164

ANEXO XII

Número de días de pre-tratamiento frío 4°C obtenidos del Análisis de Probabilidades (PROBIT) para la sobrevivencia de 1 al 99% de microsporas para la variedad Clipper

ANÁLISIS PROBIT VARIEDAD CLIPPER			
PROBABILIDAD	DIAS (No.)	95 % Límites Fiduciales	
		MINIMO	MÁXIMO
0.01	28.56	27.36146	29.92309
0.02	24.95	24.00302	26.00623
0.03	22.89	22.08840	23.79234
0.04	21.46	20.74890	22.25261
0.05	20.36	19.71906	21.07437
0.06	19.47	18.88257	20.12112
0.07	18.72	18.17812	19.32112
0.08	18.07	17.56947	18.63209
0.09	17.50	17.03344	18.02701
0.10	17.00	16.55431	17.48761
0.15	15.00	14.70777	15.42297
0.20	13.66	13.38535	13.96040
0.25	12.57	12.34326	12.81954
0.30	11.66	11.47400	11.87756
0.35	10.89	10.72037	11.06954
0.40	10.19	10.04806	10.35679
0.45	9.57	9.43466	9.71409
0.50	8.90	8.86445	9.12374
0.55	8.44	8.32568	8.57237
0.60	7.92	7.80899	8.04910
0.65	7.42	7.30614	7.54435
0.70	6.93	6.80908	7.04886
0.75	6.30	6.30873	6.55247
0.80	5.91	5.79316	6.04236
0.85	5.37	5.24378	5.49908
0.90	4.75	4.62467	4.88570
0.91	4.61	4.48629	4.74828
0.92	4.47	4.34060	4.60341
0.93	4.31	4.18580	4.44928
0.94	4.15	4.01938	4.28329
0.95	3.97	3.83757	4.10159
0.96	3.76	3.63437	3.89802
0.97	3.53	3.39917	3.66163
0.98	3.24	3.10980	3.36956
0.99	2.83	2.70273	2.95597

ANEXO XIII

Formulación básica de los medios de inducción BAC3, FHG y N6 para Cultivo *in vitro* de anteras de cebada.

Componentes del Medio	Medio de Inducción BAC3 (mg/L)	Componentes del Medio	Medio de Inducción FHG (mg/L)	Componentes del Medio	Medio de Inducción N6 (mg/L)
Macro elementos		Macro elementos		Macro elementos	
KNO ₃	2.600	KNO ₃	1.900	KNO ₃	2.830
NH ₄ NO ₃	200	NH ₄ NO ₃	165	NH ₄ NO ₃	--
(NH ₄) ₂ SO ₄	400	(NH ₄) ₂ SO ₄	--	(NH ₄) ₂ SO ₄	463
KH ₂ PO ₄	170	KH ₂ PO ₄	170	KH ₂ PO ₄	400
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	150	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	--	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	--
CaC ₁₂ x 2H ₂ O	600	CaC ₁₂ x 2H ₂ O	440	CaC ₁₂ x 2H ₂ O	125.33
MgSO ₄ x 7H ₂ O	300	MgSO ₄ x 7H ₂ O	370	MgSO ₄ x 7H ₂ O	90.37
Fuente de Hierro		Fuente de Hierro		Fuente de Hierro	
FeNa ₂ EDTA	40	FeNa ₂ EDTA	37.5	FeNa ₂ EDTA	37.3
Micro sales		Micro sales		Micro sales	
H ₃ B ₃	5	H ₃ B ₃	6.2	H ₃ B ₃	1.6
MnSO ₄ x4H ₂ O	5	MnSO ₄ x4H ₂ O	22.3	MnSO ₄ x4H ₂ O	3.3
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8.6	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	1.5
KI	0.8	KI	0.83	KI	0.8
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	--
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025	CuSO ₄ x 5H ₂ O	--
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025	CoCl ₂ x 6H ₂ O	--
Otros componentes Inorgánicos		Otros componentes Inorgánicos		Otros componentes Inorgánicos	
KHCO ₃	50	KHCO ₃	--	KHCO ₃	--
AgNO ₃	10	AgNO ₃	--	AgNO ₃	--
Vitaminas		Vitaminas		Vitaminas	
myo-Inositol	2.000	myo-Inositol	100	myo-Inositol	--
Piridoxina HCl	0.5	Piridoxina HCl	--	Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	1	Tiamina HCl	0.4	Tiamina HCl	1
Acido Nicotínico	0.5	Acido Nicotínico	--	Acido Nicotínico	0.5
Acido Ascórbico	1	Acido Ascórbico	--	Acido Ascórbico	--
Ácidos Orgánicos		Ácidos Orgánicos		Ácidos Orgánicos	
Ácido cítrico	10	Ácido cítrico	--	Ácido cítrico	--
Ácido Piruvico	10	Ácido Piruvico	--	Ácido Piruvico	--
Carbohidratos		Carbohidratos		Carbohidratos	
Maltosa	60.000	Maltosa	62.000	Sucrosa	90.000
Reguladores de Crecimiento		Reguladores de Crecimiento		Reguladores de Crecimiento	
NAA	2	BAP	1	TIBA	0.1
BAP	1				
Otros componentes Orgánicos		Otros componentes Orgánicos		Otros componentes Orgánicos	
Caseína Hidrolizada	300	Glutamina	730	Caseína Hidrolizada	500
Ficoll	300.000	Ficoll	200.000	Gelrite	2000
				Carbón Activado	5000
pH	6.2	Ph	5.8	pH	5.8

ANEXO XIV

Composición del medio de inducción BAC3 suplementado con Ficoll, Gelrite y Polietilenglicol

Componentes del Medio	Medio BAC3 suplementado con Ficoll (mg/L)	Medio BAC3 suplementado con Gelrite (mg/L)	Medio BAC3 suplementado con PEG (mg/L)
Macro elementos			
KNO ₃	2.600	2.600	2.600
NH ₄ NO ₃	200	200	200
(NH ₄) ₂ SO ₄	400	400	400
KH ₂ PO ₄	170	170	170
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	150	150	150
CaCl ₂ x 2H ₂ O	600	600	600
MgSO ₄ x 7H ₂ O	300	300	300
Fuente de Hierro			
FeNa ₂ EDTA	40	40	40
Micro sales			
HB ₃	5	5	5
MnSO ₄ x4H ₂ O	5	5	5
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2	2	2
KI	0.8	0.8	0.8
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025	0.025	0.025
Otros componentes Inorgánicos			
KHCO ₃	50	50	50
AgNO ₃	10	10	10
Vitaminas			
myo-Inositol	2.000	2.000	2.000
Piridoxina HCl	0.5	0.5	0.5
Tiamina HCl	1	1	1
Acido Nicotínico	0.5	0.5	0.5
Acido Ascórbico	1	1	1
Ácidos Orgánicos			
Ácido cítrico	10	10	10
Ácido Piruvico	10	10	10
Carbohidratos			
Maltosa	60.000	60.000	60.000
Reguladores de Crecimiento			
NAA	2	2	2
BAP	1	1	1
Otros componentes Orgánicos			
Caseína Hidrolizada	300	300	300
Agente Gelificante	Ficoll 200.000	Gelrite 350	PEG 250.000
pH	6.2	6.2	6.2

ANEXO XV

Composición del medio de regeneración BAC3

Componentes del Medio	Medio de Regeneración BAC3 (mg/L)
Macro elementos	
KNO ₃	2.600
NH ₄ NO ₃	200
(NH ₄) ₂ SO ₄	400
KH ₂ PO ₄	170
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	150
CaC ₁₂ x 2H ₂ O	600
MgSO ₄ x 7H ₂ O	300
Fuente de Hierro	
FeNa ₂ EDTA	40
Micro sales	
HB ₀₃	5
MnSO ₄ x4H ₂ O	5
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2
KI	0.8
Na,MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025
Otros componentes	
Inorgánicos	
KHCO ₃	50
AgNO ₃	10
Vitaminas	
myo-Inositol	100
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	1
Acido Nicotínico	0.5
Acido Ascórbico	1
Ácidos Orgánicos	
Ácido cítrico	10
Ácido Piruvico	10
Carbohidratos	
Sucrosa	30.000
Reguladores de Crecimiento	
IAA	0.5
Kinetina	0.5
Otros componentes Orgánicos	
Caseína Hidrolizada	300
Gelrite	3.000