

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RESCATE DE
EMBRIONES EN *ALSTROEMERIA***

PAULINA ANDRADE

**Tesis de grado presentada para la obtención del título de Bachelor en Ciencias con
Major en Biotecnología**

Quito

Agosto de 2007

©Derechos de Autor
Paulina Andrade Proaño
2007

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad San Francisco de Quito por haberme nutrido de conocimientos y herramientas para el desarrollo de mi vida profesional y mi formación personal. Un especial agradecimiento a mis profesores por el apoyo, las enseñanzas y las vivencias enriquecedoras que obtuve junto a ustedes durante mis cuatro años de estudio. A María de Lourdes Torres y Venancio Arana por guiarme en este proyecto.

A Hilsea Investments, agradezco por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio “Esmeralda Breeding & Biotechnology”. Un especial agradecimiento a Ana María Quiñones por darme la apertura y confianza suficiente como para que yo desarrolle mi trabajo en su totalidad. A Diandra Jurado y Tatiana Jaramillo por su guía y apoyo incondicional y a todos los biólogos que conforman el laboratorio.

Por último quiero agradecer y dedicar este trabajo a mi familia. A mis padres por su amor y enseñanzas que me han convertido en la persona que ahora soy. A mis hermanos porque siempre me han hecho sonreír y querer seguir caminando para adelante.

Resumen

En esta investigación se intentó realizar la estandarización del protocolo de rescate de embriones, en el cultivo de *Alstroemeria*. Se realizó dos cruces diferentes, utilizando variedades de *Alstroemeria* de Esmeralda Breeding & Biotechnology (EB&B). El primero sirvió de cruce control ya que tiene un alto porcentaje de germinación in vivo y el segundo, es un cruce con barreras de incompatibilidad post cigótica ya que no ha dado semillas y ha tenido menos del 2% de germinación in vitro. Se utilizaron diferentes técnicas de cultivo y diferentes tratamientos con el fin de determinar el medio y la técnica más óptima. En las técnicas de cultivo in vitro, se realizó el cultivo de óvulos y el cultivo de óvulos cortados, donde el primero obtuvo los mejores resultados para los dos cruces. En cuanto a los tratamientos, se utilizó diferentes concentraciones de sucrosa, caseína hidrolizada, glutamina, fase sólida y fase líquida. Los resultados difieren por cruce y técnica utilizada. Para el cruce control con el cultivo de óvulos, los mejores resultados se encontraron en fase sólida en el medio S6 (medio básico + 3% de sucrosa). Para el segundo cruce, los mejores resultados también se obtienen en fase sólida, en S2 (6% sucrosa + caseína), sin embargo esto representó un 1% de diferencia con el medio básico + 3% de sucrosa. En cuanto, al cultivo de óvulos cortados, el mejor tratamiento también fue S6, sin embargo, para el segundo cruce fue S7 (3% sucrosa+caseína). En los dos cruces se encontró sólo formación de callo y estos regeneraron retoños enseguida de la formación de callo o si no lo hacían fue necesario inducir su regeneración con hormonas. Se encontró alta mortalidad de los óvulos cultivados y malformaciones de los embriones. En el cruce control, hubo mayor porcentaje de formación de callo (35%) que en el segundo cruce (17%), sin embargo, en este último hubo mayor porcentaje de regeneración de plantas. Por lo tanto, se pudo ver divergencias en cuanto a los requerimientos del cultivo in vitro, según la proveniencia genética del híbrido, lo cual da mayor complejidad a la estandarización del protocolo de rescate de embriones de *Alstroemeria*. Este protocolo no llegó a ser estandarizado y se recomienda continuar con la investigación.

Abstract

In this research the standardization of *Alstroemeria*'s embryo rescue technique was performed. Two crossings were made with different varieties of *Alstroemeria*, from Esmeralda Breeding & Biotechnology (EB&B). The first one was the control crossing which had high germination percentages in vivo. The second one was a crossing with post cigotics barriers that had never given seedlings and in vitro had had less than 2% of germination. Ovule culture and half ovule culture were applied and within the first one the best results in both crossings were achieved. Also, diverse treatments were tried as different sucrose percentages, casein hydrolyzed, glutamine, liquid and solid phase. The solid phase was the best for both crossings; nevertheless, the results for the treatments were different according to the crossing and the technique that was used. For the control crossing the best treatment was found in solid phase with the ovule culture technique using the S6 treatment (basal media + 3% sucrose). The second crossing had the same results but in S2 (6% sucrose + casein), however the difference from the basal media + 3% sucrose was of 1%. In the case of half ovule culture, the control crossing got the same results as in ovule culture. But in the second crossing the results were different, the best treatment was S7 (3% sucrose + casein). In both crossings only callus development was found, some of them regenerate shoots soon and some needed a media with hormones to induce regeneration or just died without any regeneration. High mortality was also found in both crossings and malformed embryos. The control crossing had the highest callus formation (35%), however the second crossing had the highest shoot regeneration (13%). Even though, the results obtained in this research were successful in comparison with previous studies, it is clear that the different requirements according to the genetic origin of the hybrid made this standardization more complex. Consequently further research is needed to standardize this protocol.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
1. Introducción	2
2. Justificación	9
3. Objetivos	10
4. Área de estudio	10
5. Materiales y Métodos	11
6. Resultados	18
7. Discusión	24
8. Conclusiones	36
9. Recomendaciones	38
10. Bibliografía	39

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Variedades de <i>Alstroemeria</i> utilizadas en la investigación: a. 96-15-1; b. 98-104-1, c. BV1.	42
Figura 2: a. Toma de anteras de 98-104-1 con pinzas esterilizadas, b. 96-15-1 polinizada con polen de 98-101-1, c. BV1 cubierta con zarán para evitar la polinización cruzada.	42
Figura 3: Placa de viabilidad de polen de un cultivar de <i>Alstroemeria</i> utilizando la técnica de acetocarmín, vista en un aumento 20X.	43
Figura 4: a y b. Granos de polen germinando en el estigma de 96-15-1; c. Tubos polínicos avanzando por el estilo hacia el ovario de 96-15-1. Fotos tomadas en aumento 10X con luz UV.	43
Figura 5: a. Fruto del cruce #30 (ovario hinchado), b. óvulos fertilizados sembrados en medio de cultivo, c. Esquema del “cultivo de óvulos cortados”.	44
Fig.6: a. Embrión que forma un pequeño callo y regenera planta inmediatamente b. Callo empezando a regenerar planta a los cinco meses de subcultivo c. Callo que está empezando a morir y no regenera.	44
Fig. 7: a. Óvulos a las 8 semanas de subcultivo, están ennegrecidos y no germinan, b. Embrión deforme con muchos tallos, c. Planta sin rizoma, d. Embrión que sólo formó raíz.	45
Figura 8: Resultados generales del cultivo de óvulos en el cruce control (201).	45
Figura 9: Resultados en formación de callo y regeneración de retoños con el cultivo de óvulos, en el cruce 201.	46

Figura 10: Resultados totales del cultivo de óvulos partidos en el cruce 201.	46
Figura 11: Resultados en formación de callo y regeneración de retoños con el cultivo de óvulos, en el cruce 201.	47
Figura 12: Cruce 201, comparación del cultivo de óvulos vs. el cultivo de óvulos cortados, en porcentajes de formación de callo.	47
Figura 13: Cruce 201, comparación del cultivo de óvulos vs. el cultivo de óvulos cortados, en porcentajes de regeneración de retoño.	48
Figura 14: Resultados totales del cultivo de óvulos en el cruce 30.	48
Figura 15: Resultados en formación de callo y regeneración de retoños con el cultivo de óvulos, en el cruce 30.	49
Figura 16: Resultados en totales con el cultivo de óvulos partidos, en el cruce 30.	49
Figura 17: Resultados en formación de callo y regeneración de retoños con el cultivo de óvulos partidos, en el cruce 30.	50
Figura 18: Cruce 30, comparación del cultivo de óvulos vs. el cultivo de óvulos partidos, en porcentaje de formación de callo.	50
Figura 19: Cruce 30, comparación del cultivo de óvulos vs. el cultivo de óvulos partidos, en porcentaje regeneración de retoños.	51
Figura 20: Comparación de las técnicas y fases utilizadas, en los dos cruces, en los porcentajes totales de formación de callo.	51

Figura 21: Comparación de las técnicas y fases utilizadas, en los dos cruces, en los porcentajes totales de regeneración de retoños. 52

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Cruces	53
Tabla 2: Medios de cultivo, en fase líquida y sólida.	53
Tabla 3: Viabilidad polen de la variedad BV1	54
Tabla 4: Viabilidad polen de la variedad 98-104-1	54
Tabla 5: Resultados del muestreo del tubo polínico en el cruce 30 y 201.	54
Tabla 6: Cultivo de Óvulos: datos de mortalidad, formación de callo, regeneración de retoños, contaminación y estado general de los óvulos para el cruce 30.	55
Tabla 7: Cultivo de Óvulos Partidos: datos de mortalidad, formación de callo, regeneración de retoños, contaminación y estado general de los óvulos para el cruce 30.	56

Tabla 8: Cultivo de Óvulos: datos de mortalidad, formación de callo, regeneración de retoños, contaminación y estado general de los óvulos para el cruce control.	57
Tabla 9: Cultivo de Óvulos Partidos: datos de mortalidad, formación de callo, regeneración de retoños, contaminación y estado general de los óvulos para el cruce control.	58

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de flores ornamentales en la historia humana data desde hace 2000 años; en Asia Confucio (551-479- AC) ya describía el cultivo de orquídeas y el de *Dianthus* era muy común en Grecia en el año 300 AC (“Plant Breeding”). Sin embargo, fue sólo hasta el apareamiento de la industrialización y la urbanización que la gente se vio en la necesidad de producir un mercado de flores ornamentales (“Plant Breeding”). Hoy en día, el mercado florícola es extenso y su cultivo necesita de una propagación masiva para poder asistir sus demandas; factor que ha obligado a desarrollar técnicas como el mejoramiento genético y el cultivo in vitro de plantas, como herramientas claves en su crecimiento y sustentabilidad.

El breeding o mejoramiento genético en vegetales, se lo ha realizado desde hace miles de años, sin embargo, el breeding de ornamentales existe desde hace aproximadamente 200 años (Sharma, 1997) y lo que busca es obtener variedades novedosas, atractivas -para los requerimientos del mercado-, de mayor vigor y resistentes a ciertas enfermedades.

Uno de los cultivos que tiene gran importancia en el mercado florícola y un breeding extenso es el cultivo de *Alstroemeria*, conocida también como la “Peruana” o “Inca Lily”. Esta es una planta rizomatosa, ornamental, herbácea y perenne; perteneciente a la familia

Alstroemeriaceae, del Orden Liliales, Super Order Liliiflorae, Clase Monocotiledónea (Buitendijk & Ramana, 1992).

El género de *Alstroemeria* tiene alrededor de 60 especies, las cuales son endémicas de América del Sur (Ishikawa, 2001). La mayoría de estas especies son nativas de Chile y de Brasil y se las agrupa a todas con la denominación del grupo Chile y del grupo Brasil, respectivamente. Sin embargo, también podemos encontrar ciertas especies en Perú, Argentina, Paraguay, Bolivia (las cuales se encuentran en el grupo de Chile) y Venezuela (la cual se encuentra en el Grupo de Brasil) (Buitendijk, 1996).

Por lo tanto, su hábitat es muy diverso, cubre un rango desde zonas tropicales semidesérticas hasta las montañas de los Andes, entre la latitud 23 E a 55 E (Burchi & Mercuri, 1999) y puede crecer en un rango de temperatura de 8 a 21°C (“*Alstroemeria* Cultivation”).

Una de las principales cualidades de este cultivo son sus características comerciales, agronómicas y ornamentales ya que es un cultivo que requiere de poca energía para su metabolismo, tiene una vida de florero larga, sus colores son muy variados, la forma de su inflorescencia es bastante atractiva y carece de enfermedades graves- a pesar de que este cultivo es afectado por el virus del Mosaico de *Alstroemeria*, el cual es relativamente fácil de manejar (Buitendijk, 1996).

Esto ha hecho que *Alstroemeria* sea un cultivo atractivo y, por ende, que haya ganado gran popularidad en el mercado de flores. Desde 1980 esta flor se la cultiva, principalmente, para la producción de flor de corte, “pot plants” y para plantas de jardín. Como plantas de jardín son muy apetecidas en Inglaterra, Estados Unidos, Canadá y Australia; como “pot plants” lo son en Japón, Estados Unidos, Canadá y Finlandia; y como

flor de corte es apetecida en muchos países del mundo (Han, 2001). Esto hace que *Alstroemeria* sea cultivada en varios países, entre los cuales los más importante están: Holanda, donde ocupa el puesto número 9 entre las flores de corte mayormente producidas, Inglaterra, Alemania, Francia, Italia, España, Colombia, Japón, Ecuador, Estados Unidos y Australia (Buitendijk, 1996).

1.1. Breeding o Mejoramiento Genético en Alstroemeria:

Desde el año 1948, se ha realizado la hibridación o programas de breeding del género de *Alstroemeria*. En un principio, la mayoría de los híbridos resultaban estériles; sin embargo, a pesar de las fuertes barreras de incompatibilidad, durante el año de 1960 se crea el híbrido “Water Flemming”, el cual fue un éxito comercial y fue resultado de cruces entre especies del grupo Chile (Buitendijk, 1996). A pesar de que este híbrido también resultó estéril, en su propagación vegetativa se pudo ver duplicación cromosómica espontánea o la presencia de gametos no reducidos ($2n$ gametos) (de Jeu, 1992). Este alotetraploidismo ($2n=4x$), fue aprovechado para realizar cruces con especies diploides de *Alstroemeria* y así se llegó a obtener cultivares triploides ($2n=3x$) del “Tipo Orquídea” (Han, 2001).

Al ver estos buenos resultados, inmediatamente, se comenzó el breeding entre especies del grupo Chile con especies del grupo Brasil y de estos cruces nacieron cultivares con flores en forma de mariposas los cuales fueron denominados el “Tipo Mariposa” (Buitendijk, 1996). Hoy en día, se pone mucho énfasis en este programa y se busca

híbridos con buenas características, que se adapten mejor a las condiciones de cultivo en Europa y que tengan nuevos colores y nuevas formas de inflorescencias (Burchi, 1999).

Sin embargo, el breeding de *Alstroemeria* no es sencillo, la variabilidad presente entre las especies de cada grupo es significativa pero la variabilidad presente entre los dos grupos es enorme; la altura de la planta, el vigor, la morfología de los rizomas, las características de sus flores y la resistencia al virus difieren mucho (Buitendijk & Ramana, 1992). Estas diferencias crean fuertes barreras de incompatibilidad intra e interespecíficas y esto resulta en cruces fallidos, con una improbable obtención de frutos. A todo esto se puede sumar que las especies del grupo Brasil aún no han sido estudiadas con profundidad por lo que, el poco conocimiento que se tiene sobre estas, hace que se incremente la dificultad del programa de hibridación (Buitendijk & Ramana, 1992).

Hasta el momento, se tiene conocimiento de 130 cultivares de *Alstroemeria*, estos son híbridos que contienen genomas de varias de sus especies, tanto del grupo Chile como del grupo Brasil, y que en su mayoría suelen ser triploides estériles y fértiles; estos últimos producen gametos $2n$ (Ramanna & Buitendijk, 1995); sin embargo, existen también aneuploides, diploides y, ocasionalmente, tetraploides.

1.2. Cultivo in Vitro de Alstroemeria:

Este cultivo es, tradicionalmente, propagado de forma asexual por medio de sus rizomas. La naturaleza triploide de sus cultivares de interés comercial y la heterocigocidad natural que presenta este cultivo hacen que este tipo de propagación sea indispensable ya que la propagación por semillas, seguramente, produciría líneas inconsistentes. Sin

embargo, este proceso a parte de tomar mucho tiempo y resultar tedioso para muchos propagadores, incrementa enormemente el precio de las plántulas (Bridgen, 1994).

Por lo tanto, desde los años setentas, se está desarrollando el cultivo in vitro de este cultivo; sus objetivos han sido, principalmente, propagar sus rizomas rápidamente, abaratar el precio alto de las plántulas, eliminar el virus del mosaico de *Alstroemeria*, producir nuevos híbridos y realizar transformaciones genéticas (Gabryszeweska, 1996).

No obstante, al igual que su cultivo in vivo, el cultivo in vitro de esta especie presenta varias complicaciones ya que su propagación es compleja por los distintos requerimientos que existen entre los cultivares, con respecto a temperatura, medio de cultivo y forma de propagación; además de presentar un bajo índice de propagación. Esto ha hecho difícil la estandarización de su cultivo in vitro y muchas veces no es posible obtener una vitroplanta de buena calidad o ésta muere durante su cultivo (Burchi, 2000). Es más, debido a su alta sensibilidad a cualquier cambio en las condiciones del cultivo in vitro, no sólo las plantas llegan a morir sino que las que sobreviven pueden terminar teniendo anormalidades fenotípicas (Han, 2001).

Sin embargo, a pesar de estos problemas, el cultivo in vitro de *Alstroemeria* ha sido imprescindible para el éxito de su breeding, no sólo con el fin de obtener líneas consistentes en menor tiempo, sino de tener la posibilidad de rescatar sus híbridos, como se describe a continuación.

1.3. Barreras de Hibridación y Rescate de Embriones:

Como mencionamos anteriormente, la variabilidad intra e interespecífica entre el género de *Alstroemeria* resulta en barreras de hibridación, las cuales comprenden barreras pre-cigóticas y post-cigóticas.

Las barreras pre-cigóticas son aquellas que se dan previo a la fertilización del óvulo; o sea, puede existir problemas de viabilidad de polen en el padre o un no reconocimiento entre el polen y el estigma de la madre. Este mecanismo de reconocimiento se da en el momento que el polen es depositado en el estigma; si son compatibles, el polen genera un tubo polínico capaz de crecer hasta el ovario, donde transfiere el gameto masculino al óvulo para que este pueda ser fecundado (Tuyl, 1998). Si no son compatibles, el polen es incapaz de generar el tubo polínico y por ende de fecundar al óvulo. Este mecanismo de reconocimiento puede ser específico dentro de cada especie.

Una vez demostrado que no existen barreras pre-cigóticas en un cruce, podemos pensar que si este es incapaz de formar frutos es porque existen barreras post-cigóticas, las cuales, se dan después que la fecundación ha ocurrido. Tanto el embrión como el endospermo tienen que desarrollar un equilibrio para compartir los nutrientes en el desarrollo del embrión. Cuando este equilibrio se rompe puede ocurrir el aborto del embrión joven o la desintegración del endospermo. Por lo tanto, las barreras post-cigóticas, tienen gran importancia en el breeding ya que darán como resultado poca semilla, retardamiento o su no desarrollo y/o esterilidad del híbrido (Sharma, 1997). Según, Kamstra (1999), en la hibridación interespecífica de *Alstroemeria*, es bastante común el aborto de las semillas.

Estos problemas de hibridación han obligado al desarrollo de técnicas de cultivo in vitro. Una de ellas es el rescate de embriones, el cual consiste en cultivar el óvulo fertilizado a los pocos días después de haber sido polinizado. Dependiendo del cultivo y el

tamaño del embrión, el rescate se lo puede realizar de cuatro diferentes maneras: 1) cultivo de ovarios, 2) cultivo de óvulos 3) cultivo de embriones o 4) la combinación de éstas (Sharma, 1997).

En aquellos cultivos donde el fruto es abortado antes de que se pueda realizar el cultivo de embriones, o sea el aborto se da en un estado muy temprano, se debe realizar el cultivo de óvulo. Esta técnica es, especialmente, aplicada en *Alstroemeria* (Bridgen *et al.* 1989), *Cyclamen* (Ishizaka and Uematsu 1992), *Lycopersicon* (Neal and Topoleski 1985), *Nicotiana* (Iwai *et al.* 1986) and *Vitis* (Gray *et al.* 1990). Así mismo, un estudio reciente realizado por Buitendijk y Pinsonneaux (1995) demostraron que en *Alstroemeria* se puede realizar con éxito el half ovule culture, el cual consiste en tomar los óvulos fertilizados, cortarlos por la mitad y sembrar la mitad que lleva el embrión.

Según la investigación realizada en el rescate de embriones de *Alstroemeria*, se ha visto que la variabilidad de los requerimientos, presente entre sus especies y cultivares, también se presenta en el rescate de embriones y esto ha hecho que las técnicas y los tratamientos utilizados tengan éxito según la proveniencia genética de los híbridos. (Hann, 2001). Por lo tanto, *Alstroemeria* es un cultivo de alta complejidad para su crecimiento in vitro, tanto para su propagación como para aplicar técnicas de rescate de embriones y es por esto que hasta el día de hoy, la estandarización de estos procedimientos se lo continúa realizando.

El propósito de este proyecto fue profundizar en la estandarización del protocolo de rescate de embriones de *Alstroemeria* para la empresa “Esmeralda Breeding & Biotechnology”. Se espera incrementar el porcentaje de germinación in vitro de los cruces con potencial para la obtención de nuevos híbridos de *Alstroemeria*.

2. JUSTIFICACIÓN

Hasta 1960, *Alstroemeria* era un cultivo con poca importancia y, principalmente, era utilizado como planta de jardín; sin embargo, la creación de nuevos cultivares que podrían ser utilizados como flor de corte hizo que este cultivo gane popularidad. Hoy en día, el género *Alstroemeria* es de gran importancia comercial y es cultivada a gran escala en Holanda, Japón y Colombia y en una escala menor en Inglaterra, Alemania, España, Polonia, Bolivia, Ecuador, Estados Unidos, etc (Buitendijk, 1996).

Por lo tanto, este proyecto tuvo dos principales intereses, el primero fue científico y el segundo fue comercial. En el ámbito científico ha aportado a los conocimientos del cultivo in-vitro del género de *Alstroemeria* ya que se utilizó diferentes técnicas de rescate de embriones, distintas fases del medio de cultivo y variaciones en los componentes del medio de cultivo que son importantes para el desarrollo de las plántulas; como lo fueron: la concentración de sucrosa, la utilización de agar o phytigel, el empleo de caseína hidrolizada y de glutamina. Con todos estos factores, se pudo definir cuáles tienen mayor o menor incidencia en la regeneración de plántulas y, a partir de estos datos se pudo concretar si la estandarización del protocolo fue compendiada o si era necesario continuar realizando nuevas investigaciones para su estandarización.

Así mismo, se utilizó un cruce control y un cruce híbrido, con los cuales se constató si existe diferencia de requerimientos, determinados por la genética del cultivo, como ya lo habían mencionado autores como Bridgen (1996), Buitendijk & Pinsonneaux (1995), entre otros.

En cuanto al ámbito comercial, como ya se mencionó anteriormente, el breeding de este cultivo es bastante popular y va ganando fuerza con el transcurso del tiempo. Ecuador es un claro ejemplo de esto ya que las condiciones son adecuadas para cultivarlo con éxito. Por lo tanto, la realización de este estudio aportará al desarrollo de nuevas variedades de interés comercial que podrán entrar al extenso mercado florícola, lo cual a su vez continuará generando puestos de trabajo para los ecuatorianos.

Por último, para Esmeralda Breeding & Biotechnology *Alstroemeria* es un cultivo de mucha importancia y a través del rescate de embriones se espera obtener nuevos híbridos con potencial comercial.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

3.1.1. Estandarización de la técnica de rescate de embriones en *Alstroemeria*.

3.2. Objetivo Específico

3.2.1. Evaluar la eficiencia de varios medios de cultivo sólidos y líquidos.

3.2.2. Determinar la mejor técnica de cultivo: cultivo de óvulo (ovule culture) y cultivo de óvulo cortado (half ovule culture).

4. ÁREA DE ESTUDIO

La investigación se efectuó en el laboratorio de Esmeralda Breeding & Biotechnology (EB&B), parte de HILSEA INVESTMENTS LTD, el cual se encuentra en San Miguel de Atalpamba- El Quinche.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

A continuación se listará los materiales usados en esta investigación.

5.1.1. Estudio de Compatibilidad:

- Polen de los padres utilizados (Tabla 1).
- Flores polinizadas de los cruces realizados (Tabla 1).
- Pinzas de polinizar.
- Glicerina.
- Ácido acético.
- Solución de acetocarmín.
- Solución de azul de anilina.
- Microscopio (Leica).
- Luz fluorescente para el microscopio (Leica).

5.1.2. Rescate de Embriones

- Óvulos fertilizados de los cruces de *Alstroemeria* realizados (Tabla 1).

- Medio de cultivo MS: macronutrientes, micronutrientes y vitaminas (George, 199).
- Otros componentes para el medio de cultivo: agar, phytigel, caseína hidrolizada y glutamina.

5.2. MÉTODOS:

5.2.1. Cruces

Se trabajó con los cultivares de *Alstroemeria* BV1, 98-104-1 y 96-15-1, las cuales se encuentran en la finca “La Mora”, parte del grupo Hilsea (Figura 1). Con estas variedades se realizó dos cruces (Tabla 1); el primero que se utilizó como cruce control ya que ha tenido un alto porcentaje de obtención de semillas y germinación in-vivo y el segundo fue un cruce del cual no se ha logrado obtener semilla in vivo y que sólo ha tenido un bajo porcentaje de germinación in vitro en ensayos realizados anteriormente en EB&B. Este cruce tiene interés comercial para la empresa ya que se espera obtener híbridos con la combinación de colores de sus padres.

5.2.2. Polinización

Primeramente, se cubrió las variedades de *Alstroemeria* utilizadas como madres para evitar polinizaciones cruzadas y autopolinizaciones (Figura 2a). Una vez cubiertas, se las emasculó cuando se encontraban en la fase previa de la antesis; esto se lo realizó manualmente. Después se esperó de 2 a 3 días hasta que la madre estuvo receptiva. Un estigma inmaduro tiene los lóbulos estigmáticos pseudo-fusionados y erectos pero cuando

empieza su maduración, éstos se abren, curvándose y mostrando los pelos papilas estigmáticos.

En el momento que el estigma estuvo receptivo, se tomó con pinzas, previamente desinfectadas en alcohol al 96%, los estambres del padre con polen de uno o dos días de abiertas las anteras y se cubrió totalmente el estigma de la madre con este polen (Figura 2b,c). En *Alstroemeria* se poliniza doblemente, por lo tanto, 24 horas después de la primera polinización se realizó la segunda, siguiendo el mismo procedimiento descrito.

La polinización se realizó en horas de la mañana y cada flor polinizada se la etiquetó con la fecha de su primera polinización.

5.2.3. Estudio de Compatibilidad

5.2.3.1. Viabilidad de polen:

La viabilidad de polen es una herramienta de gran importancia para el breeding de flores ya que con ésta se va a determinar cuáles de las variedades con las que se quiere trabajar tienen su polen viable y en qué porcentaje. Esto ayuda a determinar los mejores padres para los programas de cruces.

Para este proyecto se utilizó la técnica de aceto-carmín la cual consistió en poner una muestra de polen en una solución de aceto-carmín y glicerina 1:1 con el objetivo de teñir las células (granos de polen) que son viables ya que sólo la membrana de una célula viable es capaz de absorber el aceto-carmín al citoplasma. Esta técnica indica un porcentaje estimado de viabilidad existente en las variedades analizadas y, además, ayuda a efectuar cualquier observación del polen, sean estas anomalías,

presencia de gametos $2n$, etc (Figura 3). Para este estudio se realizó un muestreo de 10 flores por cruce.

5.2.3.2. Crecimiento del Tubo polínico en el Estilo:

El protocolo de De Jeu (1996) fue replicado para realizar la observación del crecimiento del tubo polínico en los cruces estudiados en este trabajo (Tabla 1). Este consistió en coleccionar las flores después de haber sido polinizadas. Después se dejó el estigma, estilo y parte del ovario durante 12 horas o más en etanol ácido acético (3:1) a una temperatura de 4°C . El ácido acético se utiliza como fijador para conservar los tejidos en el estado que fueron coleccionados. Después, se realizó 3 lavados con agua destilada para eliminar el ácido acético y se puso las flores en hidróxido de sodio (NaOH) 8M por tres horas, el cual va a desintegrar los tejidos del estilo y ovario para transparentarlos. Finalmente, se puso las flores en una solución de azul de anilina por media hora, esta teñirá la calosa que se encuentra en el tubo polínico. Con estas flores se realizó placas que fueron observadas al microscopio bajo luz UV (Figura. 4).

El muestreo realizado fue de 20 flores polinizadas en dos repeticiones, en tiempos diferentes. Todas las flores fueron coleccionadas tres horas después de la segunda polinización, o sea, 27 horas después de polinizar (DDP) y los datos registrados tomaron en cuenta la presencia cualitativa y cuantitativa del tubo polínico. Como control negativo se realizó el mismo tratamiento a flores de la madre emasculadas y no polinizadas, para comprobar que las emasculaciones se realizaron correctamente y que no existieron autopolinizaciones o polinizaciones cruzadas.

5.2.4. Rescate de embriones

5.2.4.1. Cruces:

Una vez realizados los análisis de compatibilidad de los cruces utilizados para este estudio (Tabla 1), se procedió a polinizar las flores para el rescate de embriones, de la manera descrita en el punto 5.1. El muestreo fue de 10 flores por tratamiento.

5.2.4.2 Técnica y tiempo de Rescate:

Los frutos fueron colectados en un intervalo de 12 a 16 días después de la polinización, con el fin de extraer sólo los óvulos fecundados para su cultivo in vitro ya que en óvulos de menor cantidad de días no se pueden distinguir su fertilización. Un óvulo fertilizado es de mayor tamaño y se encuentra hinchado, por lo tanto, es fácil distinguirlo; *Alstroemeria* puede llegar a tener hasta 35 óvulos de donde, regularmente entre 5 a 12 óvulos se fecundarán tanto en cruces compatibles como en incompatibles (Jaramillo 2005).

5.2.4.3. Tratamiento de los ovarios y óvulos:

Los ovarios colectados fueron desinfectados fuera y dentro de la cámara de flujo laminar. Fuera de la cámara, se desinfectó a los ovarios con Timsen al 2% por 20 minutos y después se los enjuagó con agua corriente. Posteriormente, se los introdujo en la cámara de flujo laminar, donde se utilizó cloro al 50% por 20 minutos y después se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril.

Seguidamente, los ovarios fueron disectados: para el cultivo de óvulo (OC) se tomó los óvulos fertilizados y se los sembró directamente en el medio de cultivo (Figura 5a, b), como se describe en el punto 5.2.4.4. En el cultivo de óvulos cortados (HOC) se tomó los óvulos fertilizados y con un bisturí se los cortó por la mitad, sembrando sólo la mitad que contenía el embrión, la cual se la puede reconocer porque lleva el micrópilo (Figura 5c). Para reconocer el micrópilo fue necesario hacer ensayos previos, disectando óvulos fertilizados bajo el estereomicroscopio, con la guía del estudio de Buitendijk y Pinsonneaux (1995).

El cultivo se realizó a una temperatura entre 17-26 °C, con un período de 16 horas de luz tanto en medio sólido como en medio líquido. Para este último se utilizó un agitador a una velocidad de 50 r.p.m (Buitendijk, 1995).

Se decidió, cultivar los óvulos con luz ya que según ensayos realizados, previamente en EB&B, se tuvo mejores resultados cultivando los óvulos de *Alstroemeria* en luz que en oscuridad; con esta última los óvulos se oxidaban y morían.

5.2.4.4. Medio de cultivo:

Los mismos tratamientos se aplicaron tanto a los óvulos enteros como a los cortados. Se utilizó dos fases de cultivo: sólida y líquida. Lo que se analizó fue la adición o no de caseína hidrolizada, diferentes concentraciones de sucrosa, el uso de glutamina y el uso de agar o phytigel en el caso del medio sólido (Tabla 2).

Como recipiente se utilizó cajas petri, donde se dispensó 20 ml de medio.

5.2.5.5. Mantenimiento:

Cada cinco semanas se renovó el medio de inicio, cambiándolo por un medio con la misma composición pero fresco; el cual se lo siguió utilizando hasta la germinación del embrión. Los callos que se formaron y desarrollaron retoños se los cultivó en un medio básico (medio S1, Tabla 2) y los que aún no desarrollaban plantas fueron pasados a un medio con hormona recomendado por Bridgen (2006) para regeneración: sales y vitaminas MS 1X, 3% sucrosa, 0.2% phytigel, 2 ppm BAP.

5.2.4.6. Datos a evaluar:

Después de cada mantenimiento, descrito en el punto anterior, los óvulos fueron evaluados hasta su muerte o germinación. Se registró datos de mortalidad, tamaño, germinación, estado general de los óvulos y observaciones adicionales.

6. RESULTADOS

6.1. Estudio de compatibilidad

6.1.1. Viabilidad de polen

Los porcentajes de viabilidad de polen encontrados en los padres utilizados, para la realización de los cruces (Tabla 1), se pueden apreciar en las Tablas 3 y 4. Estos están por encima del 90%, por lo que se descartó una de las barreras pre-cigóticas y con seguridad se podían utilizar estas variedades como padres ya que una variedad con una viabilidad mayor al 50% puede ser un buen padre (Jaramillo 2005).

6.1.2. Estudio del tubo polínico

Las observaciones tomadas están descritas en la Tabla 5, donde se describe el avance del tubo polínico de cada una de las flores muestreadas para este análisis. En esta Tabla se especifica si el tubo polínico se quedó en el estigma, avanzó hasta la mitad del estilo, llegó al ovario o si no existió germinación en lo absoluto.

Como se ve en la Tabla 5, en los dos cruces realizados (Tabla 1), tanto en la repetición 1 como en la repetición 2 se observa que en la mayoría de flores muestreadas los tubos polínicos llegaron al ovario. Por lo tanto, aquí se descartó la segunda barrera pre-cigótica de falla en el mecanismo de reconocimiento entre el polen del padre y el estigma de la madre, descrito ya en el punto 1.3.

6.2. Rescate de embriones

El proceso de rescate de embriones de *Alstroemeria* fue bastante largo. Los óvulos comenzaron a germinar desde la octava semana hasta la catorceava, lo cual quiere decir que un óvulo se podía tardar hasta tres meses y medio en germinar. Después, se obtuvo formación de callo en los dos cruces (Tabla 1) y éstos regeneraron retoños en algunos casos y en otros no (Figura 6a). Por lo tanto, los callos podían formar plantas inmediatamente o demorarse hasta 8 meses en formarlas, mientras se los subcultivaba (Figura 6b y c). Los callos que no regeneraban retoños inmediatamente, se los puso en el medio de Bridgen (2006), como se describió anteriormente.

Así mismo, se observó que ciertos óvulos con el tiempo se tornaban cafés y morían por razones desconocidas, a pesar de que en un comienzo se veían bastante saludables (Figura 7a). Igualmente, pasó con muchos callos, éstos llegaban a ennegrecerse y morían.

Fue muy común encontrar embriones deformes que formaban tallos blancos de donde podían regenerar nuevos tallos, otros sólo formaron tallo y no rizoma, otros formaban muchos tallos pegados entre sí, otros sólo formaban una gran raíz y no formaban tallos (Figura 7b,c,d).

Los datos de mortalidad, formación de callo, regeneración de retoños, contaminación y estado general de los óvulos se encuentran detallados para el cruce 30 y 201 en las Tablas 6, 7, 8 y 9.

6.2.1. Cruce # 201 “Control”

6.2.1.1. Cultivo de Óvulos:

En la Figura 8 se puede observar la alta mortalidad que existió en los óvulos cultivados del cruce control. Todos los porcentajes de mortalidad estuvieron por sobre el 60% y llegan hasta un 90%, independiente de la fase utilizada. Si embargo, en los datos de contaminación si se puede apreciar una diferencia entre la fase sólida y la líquida ya que en esta última, los porcentajes llegan hasta un 33.91%; a comparación de la sólida, donde el porcentaje más alto es del 18.98%.

En la Figura 9 se puede ver con más detalle los porcentajes de formación de callo y regeneración de retoños. El cruce control llega hasta un 35.16% de formación de callo, y un 9.89% de regeneración de retoños, éstos dos resultados se obtuvieron en el medio de cultivo sólido S6 (3% sucrosa). Así mismo, se observa que la fase líquida alcanzó su porcentaje de formación de callo más alto, en el medio L1 (3% sucrosa) con 6.05%. En cuanto a la regeneración de retoños, en general, no se dio en fase líquida y en varios de los medios tratados como L2, L4, L5, L8 y L10 (Tabla 2) ni siquiera existió formación de callo.

6.2.1.2. Half Ovule Culture:

Con esta técnica también se constató altos porcentajes de mortalidad de los óvulos como con el cultivo de óvulos (Figura 10). Igualmente, estos porcentajes estuvieron por sobre el 60% y llegaron hasta un 90% de mortalidad. En cuanto a la contaminación, se ve que en las dos fases de medio, estuvo por encima del 30%.

En la Figura 11, se observó formación de callo sólo en medio sólido. El porcentaje más alto de formación de callo fue del 10.10% en el medio S6, al igual que en el cultivo de óvulos. En cuanto a la regeneración de retoños, los callos formados en el medio S5(12% sucrosa) regeneraron en mayor porcentaje (2.25%).

En fase líquida, como ya se mencionó, no existió formación de callo; los óvulos murieron por razones desconocidas y por contaminación como se observa en la Figura 10.

6.2.1.3. Cultivo de Óvulo vs. Cultivo de Óvulos Partidos

En la Figura 12 se realizó una comparación entre las dos técnicas de rescate utilizadas y los porcentajes de formación de callo, existentes en los distintos medios de cultivo. El éxito del cultivo de óvulos fue evidente ya que mientras éste llega a tener un 35.16% en formación de callo, el cultivo de óvulos partidos sólo llegó a un 10.10%. Estos dos resultados se encontraron en fase sólida, en el medio S6 (3% sucrosa).

En cuanto a los porcentajes de regeneración de retoños, en la Figura 13 se observó que el cultivo de óvulos tuvo el mayor éxito con un 9.89% de regeneración. El cultivo de óvulos partidos, en cambio, llegó a un 2.25% de éxito. Los dos resultados se dieron

en medio sólido. En fase líquida, con las dos técnicas mencionadas anteriormente, se obtuvo 0% de regeneración de retoños.

6.2.2. Cruce # 30:

6.2.2.1. Cultivo de Óvulo

En la Figura 14, se advierte que en el cruce 30 también se repiten los altos porcentajes de mortandad encontrados en el cruce control. Sin embargo, no llegan hasta el 90% sino hasta el 80% y todos son mayores al 50%. En cuanto a la contaminación, igualmente, se encuentran porcentajes de hasta el 30%.

En la Figura 15, se observa que en fase sólida existieron dos medios de cultivo con resultados exitosos; el primero es el S2 (6% sucrosa+caseína) con el que se obtuvo el porcentaje más alto de formación de callo, que fue del 17.53%. El segundo medio fue S1 (3% sucrosa+agar) con 16.53% de éxito. En fase líquida el mayor porcentaje de formación de callo encontrado fue del 10.67% en L6 (3% sucrosa+caseína).

Con respecto a la regeneración de retoños (Figura 15), se obtuvo hasta un 13.54% de éxito en los callos que se formaron en el medio sólido S6 (3% sucrosa+phytagel). En medio líquido sólo se obtuvo un 2% de regeneración de retoños en L3 (12% sucrosa + caseína). Los demás callos murieron sin regenerar retoños.

6.2.2.2. Cultivo de Óvulos Partidos:

En los resultados generales del cultivo de óvulos partidos (Figura 16) se ve, una vez más, altos porcentajes de mortandad pero en estos se encontró porcentajes mayores a los encontrados con la técnica del cultivo de óvulos. Estos porcentajes estuvieron por

encima del 90%. Los porcentajes de contaminación son similares en las dos fases y alcanzaron hasta un 30%.

En la Figura 17, el porcentaje más alto de formación de callo se obtuvo en el medio sólido S7(3% sucrosa+caseína) con un 5.17%. En cuanto al medio líquido, L3(12% sucrosa+caseína) logró resultados similares que S7 con un 4.47% de formación de callo. En los resultados de regeneración de retoños, tanto el medio S7 como el medio L1(3% sucrosa) alcanzaron resultados similares, sin embargo, éstos fueron bastante bajos; del 1.72% y 1.69% , respectivamente.

6.2.2.3. Cultivo de Óvulos vs. Half Ovule Culture

Al igual que el cruce control, el cultivo de óvulos presentó mejores resultados que el cultivo de óvulos partidos, en cuanto a formación de callo y regeneración de retoños. En las Figuras 18 y 19 se indican estos resultados, respectivamente. Es importante observar que con el cultivo de óvulos partidos, no se encontró formación de callo en la mayoría de medios líquidos y los mejores resultados se hallaron en medio sólido. Así mismo, se constató que los porcentajes de regeneración de retoños, fueron menores al 2% en medio líquido y con las dos técnicas de rescate. Los porcentajes más altos de regeneración de retoños se alcanzaron en medio sólido.

6.2.3. Comparación entre el cruce 30 y el cruce control:

En las Figuras 20 y 21 se realizó una comparación entre el éxito de las técnicas y fases utilizadas en el cruce 30 y en el cruce control; estas Figuras indican el promedio total de formación de callo y de regeneración de retoños que se presentó en los dos cruces.

En cuanto a las técnicas aplicadas, el cultivo de óvulos tuvo los mejores resultados en los dos cruces. En formación de callo, el cruce control obtuvo en fase sólida un promedio del 14.75%, a comparación del cultivo de óvulos partidos que obtuvo un 3.75%. En el cruce 30 estos mismos resultados fueron del 10.40% y 1.46%, respectivamente.

Así mismo, en regeneración de retoños el cruce control presentó porcentajes del 5.12% y 0.77% en el cultivo de óvulos y cultivo de óvulos partidos, respectivamente. En cambio, en el cruce 30 estos resultados fueron del 7.66% y 0.33%, respectivamente.

Con respecto a las dos fases utilizadas, es muy claro que la fase sólida fue la más apropiada para los óvulos cultivados ya que los porcentajes más altos de formación de callo y de regeneración de retoños, se lograron en estas condiciones. Estos mismos porcentajes en fase líquida están por debajo del 3% de éxito y no se obtuvo regeneración de retoños en el cruce control. La mayoría de óvulos que formaron callo, en los dos cruces realizados (Tabla 1), no llegaron a regenerar, sino que murieron.

En el cruce 201 la concentración de sucrosa del 3% en medio sólido, fue la que obtuvo los mejores resultados tanto en el cultivo de óvulos como en el cultivo de óvulos partidos, en formación de callo. En cuanto a la regeneración de retoños, se ve que ésta se da sólo en medio sólido y coincide que los callos que se formaron en el medio con 3% de sucrosa, fueron los que regeneraron en mayor cantidad en el cultivo de óvulos; sin embargo, en el cultivo de óvulos partidos fueron los callos formados en S5 (12% sucrosa + caseína).

En el cruce 30, el cultivo de óvulos con el medio sólido más 3% de sucrosa no presentó el resultado más alto en germinación; sin embargo, sólo tuvo una diferencia del 1% menor con el mejor medio (S2). Los callos que regeneraron en mayor cantidad fueron aquellos que se formaron en el medio con 3% de sucrosa. Con el cultivo de

óvulos partidos, ocurrió lo mismo que con el cultivo de óvulos; la concentración de 3% de sucrosa tuvo 1.51% menos de diferencia con el mejor medio (S7), en cuanto a formación de callo. En el caso de la regeneración, ésta obtuvo el mismo resultado que la formación de callo pero la diferencia fue del 0.81% (Figura 21).

Cabe mencionar que los medios que contenían 12% de sucrosa, obtuvieron los resultados más bajos de formación de callo, tanto en el cruce 30 como en el cruce control.

7. DISCUSIÓN:

Los resultados obtenidos en este estudio fueron bastante similares a los resultados obtenidos por algunos autores citados en este trabajo, como Bridgen(1996), Buitjendijk & Pinsonneaux(1995), De Jeu(1992), Kamstra(1997), Buitjendijk & Rammana(1992), Maldonado (2005) y Van Dorp (2005). Todos ellos concordaron que el cultivo in vitro de *Alstroemeria* puede tener muchas variantes de un cruce a otro y que las inconsistencias genéticas que tiene este cultivo son, en gran parte, la razón de estas variantes.

Por ejemplo, Bridgen (1996) en su trabajo de rescate de embriones en *Alstroemeria* obtuvo diferentes respuestas de los óvulos cultivados, en cuanto a porcentaje de germinación, desarrollo de callo, formación de tallos, rizoma y presencia de anomalías, dadas según la proveniencia genética del cruce. Su porcentaje de germinación fue del 21.3%, donde el 60% de embriones formó sólo callo, el 12% desarrolló sólo tallos y el 38% formó callo y regeneró plantas. La mitad de los cruces utilizados para este estudio, presentaron formación de callo pero no regeneración de

retoños; en cambio, en la otra mitad se obtuvo altos porcentajes germinación y poca formación de callo. Así mismo, Bridgen (1996) observó anomalías; tallos blancos, tallos múltiples de donde tallos normales podían regenerarse después de varios subcultivos, dato que también se presentó en este trabajo.

Igualmente Kristiansen (1995), obtuvo similares resultados en su trabajo. Muchos de los óvulos que germinaron, del rescate de embriones, se desarrollaron anormalmente y no produjeron tallo. En estos embriones, Kristiansen (1995) tuvo que inducir formación de callo con hormonas para luego obtener regeneración de retoños, sin embargo los porcentajes de regeneración fueron bajos.

Kamstra (1999), vuelve a constatar los problemas de compatibilidad en el cultivo de *Alstroemeria*, él indica que el apareamiento de los cromosomas homólogos en los híbridos de este cultivo se encuentra reducido. También realizó rescate de embriones y vio formación de callo, donde la mayoría no regeneraron plantas y murieron. En uno de sus cruces híbridos observó una translocación de cromosomas que no estaba presente en los padres, esto quiere decir que ocurrió espontáneamente durante el largo proceso del cultivo in vitro del rescate. Por lo tanto, el autor piensa que los óvulos que forman callo y mueren o no regeneran plantas pueden darse porque existen gametos que sobreviven hasta el cultivo in vitro y después mueren, durante éste, por razones inexplicables. Además, en una misma progenie observó diferentes ploidías como triploides y aneuploides y sobretodo en estos últimos, encontró más anomalías.

Buitjendijk & Pinsonneaux (1995), trabajaron con especies chilenas y brasileñas y constataron que los resultados varían según las especies que se utilice como madres. Por ejemplo, en cruces recíprocos, vieron que en algunas madres, sus óvulos tardaban más tiempo en formar el rizoma o que el embrión se ennegrecía y moría en porcentajes mayores. Además, constataron que la supervivencia de los embriones, en general,

estaba determinada por el cruce y, a pesar, de que se obtuvo porcentajes de germinación de hasta el 60%, ellos encontraron que el 50% podía llegar a morir durante el cultivo in vitro.

Según Van Dorp (2006), quien ha sido breeder de *Alstroemeria* durante años y trabaja con rescate de embriones para la obtención de nuevos híbridos, dice que en un 99% de los óvulos cultivados, obtuvo formación de callo y después regeneración de retoños; así mismo, que es muy común que existan embriones que no formen rizoma y sólo tallo o que sean deformes. El porcentaje de éxito de germinación que tiene Van Dorp es del 5%. Al parecer, estos porcentajes bajos podrían ser normales en *Alstroemeria*; por ejemplo en EB&B, ensayos previos indican que muchos óvulos murieron sin razón aparente y el porcentaje de germinación más alto obtenido fue del 2%. Igualmente en campo, se puede ver que las semillas sembradas tienen aproximadamente 5% de éxito de germinación (Jaramillo 2005). O sea que todos los óvulos fertilizados, no necesariamente llegan a ser viables y esa podría ser una de las razones por las que mueren algunos de los óvulos.

De la misma forma que los porcentajes de germinación están, principalmente, influenciados por la genética de los cruces, también van a estarlo por las condiciones en las que se cultivan los óvulos. En esta investigación, se puede mencionar que un factor muy importante, el de temperatura, no se mantuvo estable ya que las condiciones del laboratorio no lo permitían. Esta fluctuaba durante todo el tiempo y podía variar de 17°C a 27°C en un solo día. Lo cual pudo haber afectado, crucialmente, al éxito del rescate ya que los autores Bridgen(1996), Buitjendijk & Pinsonneaux (1995), De Jeu (1992), Kamstra(1997), Buitjendijk & Rammana (1992) y Van Dorp (2006) indican como rango óptimo de 18 a 21°C. Además, según la experiencia de Maldonado (2006),

las altas temperaturas sí pueden incrementar el desarrollo de tejido de callo en este cultivo.

En cuanto a los días de rescate, autores como Bridgen (1995), Buitendijk(1996), De Jeu (1992) y otros, realizan el rescate en un rango entre 2 DDP hasta 18 DDP, con buenos porcentajes de germinación. Sus rangos son variados ya que dependiendo del cruce híbrido que se esté realizando, el aborto puede darse en distintos DDP's. Según, estudios histológicos realizados en 1995 por Buitendijk y Pinsonneaux, a óvulos fertilizados de *Alstroemeria* de cruces híbridos, el rescate se puede realizar sólo hasta los 18 DDP ya que ahí comienza la declinación del endospermo. En EB&B, según ensayos realizados previamente, el rescate de *Alstroemeria* tuvo éxito en un rango de 8 a 14 DDP. Por lo tanto, el rango utilizado en este trabajo pareció ser el adecuado.

7.1. Distintas composiciones de los medios de cultivo

En los medios de cultivo se utilizó sales MS, diferentes concentraciones de sucrosa, caseína hidrolizada, glutamina, agar y phytigel.

7.1.1 Diferentes concentraciones de sucrosa:

Se analizó concentraciones de sucrosa del 3%, 6% y 12%. En rescate de embriones autores como Buitejendijk y Pinsonneaux (1995), De Jeu (1992), entre otros, aconsejan la utilización de altas concentraciones de sucrosa ya que esta ayuda a tener una presión osmótica similar a la que tiene el embrión en el ovario de

la madre y, además es una fuente rica de carbono para las distintas necesidades del metabolismo del embrión (Van Tuyl 2006).

Sin embargo, según los resultados obtenidos en esta investigación se constató que en el cultivo de *Alstroemeria* puede no siempre ser necesario utilizar medios básicos con concentraciones altas de sucrosa como lo indican Buitendijk & Rammana (1992). Otros autores como Bridgen (1996), Ishikawa (2001) y según los ensayos realizados por EB&B, concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio; los medios con mayor éxito fueron medios básicos con 3% de sucrosa.

Una observación importante encontrada en los medios de cultivo con altas concentraciones de sucrosa, fueron óvulos que llegaron a endurecerse de manera anormal. Las altas concentraciones de sucrosa generan una presión osmótica negativa mayor que en los medios de cultivo que contienen menos sucrosa; tal vez por esto los óvulos llegaron a endurecerse de esa forma.

7.1.2. Uso de caseína hidrolizada

La caseína hidrolizada es utilizada comúnmente en rescate de embriones ya que ésta provee aminoácidos útiles para el metabolismo del embrión; los cuales, en muchos casos, ayudan a que este se desarrolle de mejor forma y se convierta en una planta fuerte y con buenas características. Muchos científicos que trabajan en rescate de embriones de *Alstroemeria*, aseguran el beneficio que la caseína puede tener en el rescate de embriones, tal es el caso de de Jeu (1992), van Dorp (2006), Van Tuyl (2005), Buitendijk y Pinsonneaux(1995), etc.

En este análisis, se encontraron los medios de cultivo que contenían sales MS 1X, diferentes concentraciones de sucrosa y caseína hidrolizada. Para fase sólida y líquida son: S2 y L2 (6% sucrosa+caseína), S3 y L3 (12% sucrosa+caseína), S7 y L6 (3% sucrosa+caseína).

En esta investigación fue claro que según la procedencia genética del embrión, éste reacciona de diferente manera, como se observó en los resultados. En el cruce 201 no fue imprescindible el uso de caseína, es más los mejores resultados se obtuvieron en un medio con baja concentración de azúcar y sin caseína. En cambio, en el cruce 30, sí se vio buenos resultados en los medios que contenían caseína.

Por lo tanto, la utilización de caseína hidrolizada no necesariamente incrementa los porcentajes de germinación en *Alstroemeria*. Por esta razón existen autores, como los citados en el primer párrafo del punto 7.1.2, que apoyan a la utilización de la caseína hidrolizada para el cultivo de óvulos de *Alstroemeria*; no obstante, de igual forma, existen autores que no la recomiendan, como Bridgen (1996) e Ishikawa (2001).

7.1.3. Sales MS

Buitendijk & Pinsonneaux (1995), recomiendan la utilización de fase líquida con una composición de sales MS 0.25X para macronutrientes y 1X para micronutrientes y vitaminas, más la utilización de altas concentraciones de sucrosa y caseína hidrolizada; con estos tratamientos llegaron a tener hasta un 60% de germinación en el cultivo de óvulos de cruces híbridos. En este trabajo se realizó una variación de los medios con y sin caseína hidrolizada y se utilizó 6 y 12% de sucrosa. Esto se realizó sólo en fase líquida, tal cual como lo hicieron estos autores.

Los medios analizados son L7 (6% sucrosa+caseína), L8 (12% sucrosa+caseína), L9 (12% sucrosa) y L10 (6% sucrosa).

Los resultados encontrados con estos medios fueron los de menor éxito en formación de callo y regeneración de retoños. En OC, estos resultados están por debajo de 6% para el cruce 30 y por debajo del 2% para el cruce 201 y no existió regeneración en ninguno de los cruces. En HOC se obtuvo 0% de formación de callo en los dos cruces. Consecuentemente, en este trabajo no se pudo reproducir los mismos resultados que en el trabajo de Buitendijk & Pinsonneaux. Esto puede ser consecuencia de la variación genética que existe en este cultivo ya que es posible que los híbridos rescatados por estos autores tuvieran requerimientos completamente diferentes a los que tuvieron los cruces utilizados en este trabajo (Tabla 1).

7.1.4. Uso de Glutamina

La glutamina es uno de los 20 aminoácidos más comunes de la tierra. Es muy utilizada en cultivo in vitro ya que es el aminoácido que aporta la mayor fuente de nitrógeno en forma de amonio, y al ser incorporado directamente al medio de cultivo permite reducir el gasto energético de las plántulas para la síntesis de aminoácidos y, posiblemente, aumentar la división celular (“Glycosides”).

Sin embargo, a pesar de estas cualidades, en este estudio los óvulos cultivados con glutamina no alcanzaron resultados, de formación de callo y de regeneración de retoños, mayores a los obtenidos con los medios analizados anteriormente.

Por lo tanto, según estos resultados puede ser que para *Alstroemeria*, la glutamina no sea esencial para el buen desarrollo de los embriones y plántulas.

7.1.5. Agar vs. Phytigel

Se utilizaron dos medios de cultivo con 3% de sucrosa y sales MS 1X pero con la diferencia que el uno llevaba 0.7% de agar (S1) y 0.2% de phytigel (S6). El phytigel es muy recomendado para el cultivo de embriones ya que tiene menos impurezas que el agar y, además, su concentración de elementos como el Fe, Mg, Zn, Ca, N y Cu es mayor que en el agar normal (Puchooa & Purseramen, 1999). Por lo tanto, en ciertos cultivos si existe diferencias en cuanto al cultivo con agar y con phytigel. Muchos autores como Buitendijk & Rammana (1992), Burchi (1994), Bridgen (1996), Ishikawa (2001), Van Tuyl (2006), etc, utilizan phytigel para el rescate de embriones de *Alstroemeria*.

Por estas razones, se decidió hacer una variante con 0.2% de phytigel, al medio que en ensayos previos obtuvo los mejores resultados en EB&B (3% sucrosa + 0.7% agar). En el cruce 201, se vio que el medio con phytigel tuvo mejores resultados que el con agar. Sin embargo, en el cruce 30 los resultados son diferentes, ya que el medio con agar obtuvo los mejores resultados.

En este punto cabe mencionar que todos los autores citados anteriormente que han realizado cultivo de óvulos de *Alstroemeria*, exitosamente, utilizan phytigel y no mencionan diferencias entre el uso de éste y de agar. De todas formas, se podría pensar que podría tener una influencia el uso del uno o del otro, según la proveniencia genética el cruce por los resultados que se han obtenido en esta investigación.

7.2. Distintas fases de cultivo del cultivo (Medio sólido vs. Medio líquido)

En los dos cruces se obtuvieron los mejores resultados en medio sólido que en medio líquido, con una diferencia bastante significativa.

7.2.1. Medio Sólido

Los medios con agente geltrificante, empleados en esta investigación (Tabla 1), alcanzaron los porcentajes más altos de formación de callo, tanto en el cruce 201 como en el cruce 30 y con la técnica del cultivo de óvulos y del cultivo de óvulos partidos. Además, la formación de callo se encontró en la mayoría de medios sólidos utilizados. De igual forma, la regeneración de retoños de estos callos obtuvo los porcentajes más altos en estas condiciones.

7.2.2. Medio Líquido:

En medio líquido se puede generalizar que no se llegaron a tener buenos resultados. En el cruce 201 con OC, hubo resultados sólo de formación de callo y no de regeneración de retoños; éstos tuvieron porcentajes menores al 2% en L2, L3, L7, L8, L9 y en el resto de tratamientos fueron del 0%. En cambio con la técnica del HOC no hubo formación de callo en esta fase.

En el cruce 30, se pudo observar porcentajes más altos que en el cruce control en cuanto a formación de callo pero la mayoría de callos no llegaron a regenerar retoños y murieron.

Por lo tanto, las diferencias fueron bastante claras y aunque, en general, muchos óvulos fertilizados y en buen estado morían sin razón en medio sólido, en medio líquido esto fue aún más evidente. A pesar de que se copió el modelo de Buitendijk y Pinsonneaux (1995), quienes obtuvieron buenos resultados con el cultivo de óvulos partidos en medio líquido; los óvulos partidos como enteros que se cultivaron en este medio durante esta investigación, se tornaron de color café oscuro y se pusieron blandos. En el caso de los óvulos partidos, estos resultados se presentaban al poco tiempo de cultivados y solían morir antes que los óvulos enteros.

El medio líquido también era susceptible a contaminarse más, esto se debió tal vez al aire del laboratorio que no siempre era aséptico, por lo tanto, las cajas a pesar de estar selladas, al parecer estaban más expuestas a esta contaminación.

Es muy importante, recalcar que los óvulos que formaron callo en medio líquido, en su mayoría no llegaron a regenerar plantas. La mayor parte de estos callos se oxidaron y murieron o se mantuvieron como callos por mucho tiempo pero sin regenerar.

7.3. Cultivo de Óvulos vs. Cultivo de Óvulos Partidos

Con los resultados ya mencionados vemos que en los dos cruces el cultivo de óvulos tuvo resultados, considerablemente, mejores que con la técnica del cultivo de óvulos partidos.

Buitendijk & Pinsonneaux (1995), cortaban los óvulos por la mitad con un bisturí y Van Tuyl (2005) también recomendó hacerlo de esa manera. Sin embargo, el bisturí pudo llegar a lastimar mucho los tejidos ya que los óvulos cortados se oxidaban más rápido que los óvulos normales. Por ende, se puede suponer que el corte lograba una alta producción de fenoles que podían haber matado a los embriones, rápidamente. Además, seguramente, el momento que se cortaban los óvulos éstos no eran capaces de mantener al embrión ya que la mayoría de óvulos cortados, después de algunas semanas del cultivo, se les veía vacíos por dentro. Esto pudo darse porque se llegaba a romper el saco embrionario y se perdía la conformación de celular del embrión o, tal vez, la presión osmótica pudo no haber sido la necesaria para mantener este conjunto de células unidas.

7.4. Cruce 30 vs. Cruce Control

En este trabajo se constató la clara diferencia entre los distintos requerimientos, para el cultivo in vitro, que tienen las diferentes especies y variedades de *Alstroemeria*. Las variedades utilizadas en este trabajo, son híbridos, de los cuales no se sabe muy bien su proveniencia. En EB&B se ha constatado que su breeding y cultivo in vitro son bastante complicados; lo mismo asegura Maldonado (2006), en cuanto a su cultivo in vitro, ya que trabaja con esta misma genética y con la de otros obtentores. Según Maldonado (2006), la genética de EB&B es más compleja y dificultosa de cultivar in vitro, tiene bajos índices de propagación y poco vigor. En cambio, en la genética de otros obtentores ha podido observar mayor vigor y por ende índices de propagación más altos.

En esta investigación, se encontró que con el cruce control, el cual es una autopolinización, se lograron los porcentajes más altos de formación de callo (35%), pero los más bajos de regeneración de planta (el más alto fue de 9.8%). En cambio en el cruce 30, vemos que la formación de callo no llega tan alto como la del cruce control, sin embargo, los callos regeneran retoños en mayor cantidad. En resumen el cruce control tuvo un promedio de germinación indirecta en OC de 7.28% y de regeneración de planta del 2.28%, en cambio, el cruce 30 tuvo 5.85% y 3.29%, respectivamente.

En cuanto a los tratamientos, ya se vio que en el cruce control, un medio sólido con 3% de sucrosa es suficiente para obtener buenos resultados de formación de callo y regeneración de plantas. En cambio en el cruce 30, la caseína hidrolizada sí influyó positivamente en el cultivo de sus óvulos.

En cuanto a la técnica y fase utilizadas, en los dos cruces se tuvo los mejores resultados en fase sólida y con la técnica del cultivo de óvulos.

8. CONCLUSIONES:

En esta investigación, se observó que los resultados obtenidos, en cuanto a formación de callo, mal formación de embriones y plantas, poca regeneración de retoños y alta mortalidad de los óvulos fecundados, son fenómenos comunes de este cultivo ya que autores como Bridgen (1996), Buitjendijk & Pinsonneaux

(1995), De Jeu (1992), Kamstra (1997), Buitjendijk & Rammana (1992) y Van Dorp (2006), también los mencionan en sus trabajos.

La mejor técnica de cultivo, indudablemente, fue la de cultivo de óvulo y en cuanto a la fase, lo fue la sólida.

Además, se vio claramente que cada cruce podía tener diferentes requerimientos en cuanto al tratamiento utilizado, esto quiere decir a las distintas concentraciones de sucrosa y al uso de caseína. Igualmente, cada cruce expresó diferentes porcentajes en formación de callo y regeneración de retoños.

No se pudo asegurar que existió una influencia en la regeneración de retoños según el tratamiento utilizado ya que si los callos no llegaban a regenerar al poco tiempo de formados, se le ponía en un medio con hormona de regeneración.

En general, el medio básico, sin caseína, ni glutamina y con 3% de sucrosa puede ser utilizado para el cultivo de óvulos de *Alstroemeria*, con buenos resultados.

La duración del cultivo in vitro de este género puede llegar a traer problemas, los embriones pueden tardar hasta 3 meses en germinar y si formaron callo se puede esperar que regeneren hasta un año después del rescate, lo cual puede causar anomalías y mortalidad de las plantas.

Así mismo, fue muy común encontrar altos porcentajes de mortalidad de los óvulos fertilizados que se veían muy vigorosos en un inicio.

La estandarización de un protocolo de rescate de embriones para *Alstroemeria* no es fácil de obtener por la alta variabilidad genética, existente en este cultivo. Con el trabajo realizado en esta tesis, los resultados del rescate de embriones de *Alstroemeria* mejoraron enormemente, en comparación con los ensayos hechos previamente. Anteriormente, el porcentaje de éxito que tenía el

laboratorio era del 2% de germinación. Sin embargo, no se puede decir que este protocolo se encuentra estandarizado porque no se trabajó con condiciones controladas de temperatura. Al parecer esta variante es crucial para desarrollar un protocolo de estandarización de rescates de *Alstroemeria*.

9. RECOMENDACIONES:

Se debe continuar con la estandarización del protocolo de rescate de embriones de *Alstroemeria*, con condiciones controladas en cuanto a temperatura y asepsia del ambiente. La temperatura sugerida para este cultivo es de 18°C.

Así mismo, hay que continuar con la utilización de la técnica de cultivo de óvulos. En cuanto a la fase, a pesar de tener el medio sólido los mejores resultados, se debería continuar con los ensayos de medio líquido en condiciones controladas ya que es muy recomendada por varios autores como Bridgen (2006).

Además, se debe validar los medios que obtuvieron los resultados más altos, con respecto a formación de callo; estos son S2 (6% sucrosa+caseína) y S6 (3% sucrosa + phytigel) que varían, considerablemente, en su composición.

Por último, es necesario tener mucho cuidado con la contaminación ya que este cultivo es bastante sensible y una vez que se contamina una planta, es casi segura su muerte.

10. BIBLIOGRAFÍA:

“Alstroemeria Cultivation Guide”. Roskam Young Plants Pty Ltd. 26 Mar. 2006
http://www.roskam-youngplants.com/Alstroemeria_Cultivation_Guide.doc

“Barreras de incompatibilidad en plantas”. Universidad de Argentina. 18 Jun. 2006
<http://www.biologia.edu.ar/plantas/flores.htm#Table%20of%20Contents>.

Bridgen Mark. Comunicación Personal. Técnicas del Rescate de embriones de *Alstroemeria*. 2006.

Bridgen M., King J., Pederson C. & Winski. 1992. Micropropagation of *Alstroemeria* hybrids. Department of plant science. The University of Connecticut. 1994

Bridgen M., Lu Ch. Effects of genotype, culture medium and embryo developmental stage on the in vitro responses from ovule cultures of interspecific hybrids of *Alstroemeria*. Plant Science 116. 205-212, 1996.

Buitendijk J. A cytological characterization of genomes of *Alstroemeria*, the production of interspecific hybrid, and their performance during micropropagation. CID-DATA KONINKLIJK BIBLIOTHEEK, DEEN HAAL. 1996.

Buitendijk J., N. Pinsonneaux, A.C. van Donk, M.S. Ramanna & A.A.M. van Lamieren. Embryo rescue by half-ovule culture for the production of interspecific hybrids in *Alstroemeria*. Scientia Horticulturae: 65-75. 1995.

Buitendijk J., Ramana M., Jacobsen E. Micropropagation Ability: Towards a selection criterion in *Alstroemeria* breeding. Acta Horticulturae 325, 1992.

Burchi G., Mercuri A., Bianchini C., Bregliano R. Schiva T. New interspecific hybrids of *Alstroemeria* obtained through in vitro embryo rescue. Acta Hort. 508, ISHS 2000.

Burchi G., Mercuri, Schiva T. Breeding of *Alstroemeria* through interspecific crosses and embryo rescue. Acta Horticulturae. 486, 1999.

De Jeu M., Calderé F. & Van Went J. Sporogenesis, gametogenesis, and programiz phase in *Alstroemeria*. Canadian Journal of Botany. Vol 66. 1996.

De Jeu M., Calderé F. & Van Went J. Sporogenesis, gametogenesis, and programiz phase in *Alstroemeria*. Canadian Journal of Botany. Vol 66. 1996.

De Jeu M., Calderé F. & Van Went J. Sporogenesis, gametogenesis, and programiz phase in *Alstroemeria*. Canadian Journal of Botany. Vol 66. 1996.

Gabryszewska, E. The influence of temperature, daylength and sucrose concentration on the growth and developmental of Alstroemeria "Zebra" in vitro. Acta Agrobotanica 49 (1-2). 131-140.1996.

“Glycosides”. 12 Agosto 2006

<http://www.friedli.com/herbs/phytochem/glycosides.html>

George E. Plant propagation by Tissue Culture. Part1-2. The Technology. Exegetics. 1993.

Ishikawa, Tkayuki, Tomoko Takayama, Hiroshi Ishizaka, Keiko Ishikawa. Production of interspecific hybrids between Alstroemeria pelegrina L. var. rosea and A. magenta Bayer by ovule culture. Euphytica 118: 19-27, 2001.

Kristiansen, Kell. Interspecific Hybridization of Alstroemeria. Acta Horticulturae. Ornamental Plant Improvement. 420, 1995.

Maldonado, Roberto. Cultivo in Vitro de Alstroemeria. Comunicación Personal. Empresa Colombiana Meristemas. 2006.

“Plant Breeding”. 12 Mar. 2006

<http://www.dpw.wau.nl/pv/archive/97theme1.htm>.

Puchooa D., Purseramen P. & Rujbaly B. Effects of medium support and gelling agent in the tissue culture of Tobacco. Science & Technology- Research Journal- Vol. 3, 1999.
Sharma, Hari. Embryo Rescue Following Wide Crosses. Methods in Molecular Biology, Vol 111: Plant cell culture protocols. Edited by: R.D. Hall. Totowa, NJ. 1997.

“The Seed Plants – Reproduction”. Universidad de Manitoba. 13 Oct. 2005

http://www.umanitoba.ca/Biology/lab8/biolab8_5.html#Ovule.%20Mecanismo%20de%20a%20polinización.%20

Tae-Ho Han. Use on genetic markers in Alstroemeria. CIP-Data koninklijke Bibliotheek,Den haag. WageningenUniversity and Research Centre.2001.

Van Dorp Wim. Rescate de Embriones en Alstroemeria. Comunicación Personal. 2006

Van Creij M., Kerckhoffs J., Brujin M. The effect of medium composition on ovary-slice culture and ovule culture in intraspecific *Tulipa gesneriana* L. crosses. Plant international, Droevendaalsesteeg. Wageningen, The Netherlands.

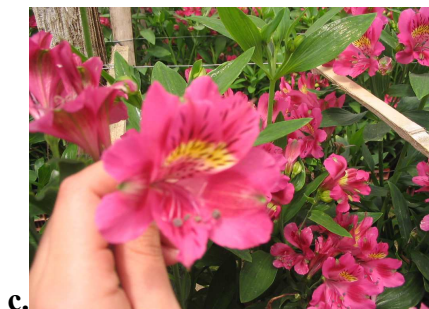
Van Tuyl Jaap. Embryo Rescue in Alstroemeria. Comunicación Personal. 2005-2006

Van Tuyl J., de Jeu M. Methods for overcoming interspecific crossing barriers. Chapter 13 In: Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement. Department of Plant Breeding, Wageningen Agricultural University.1998

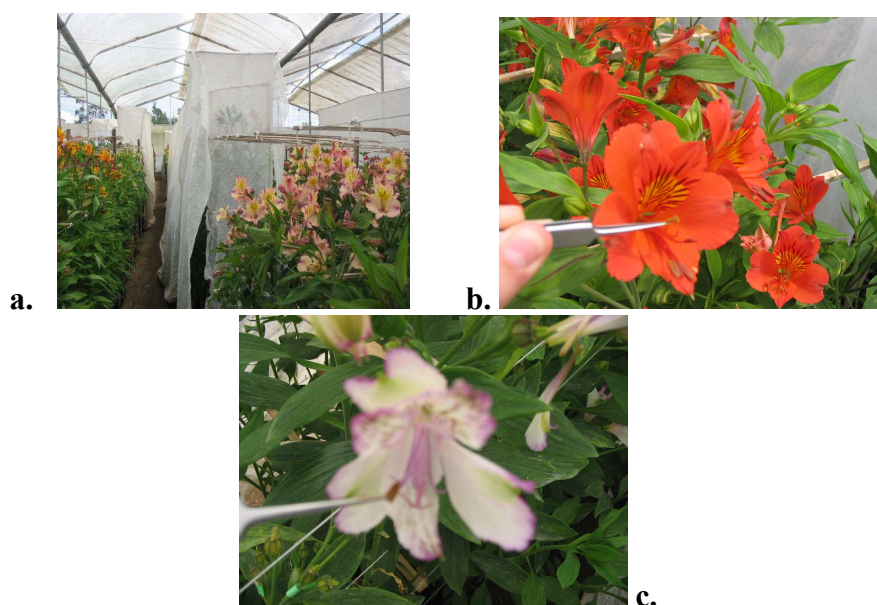
LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1:** Variedades de *Alstroemeria* utilizadas en la investigación: a. 96-15-1; b. 98-104-1, c. BV1.

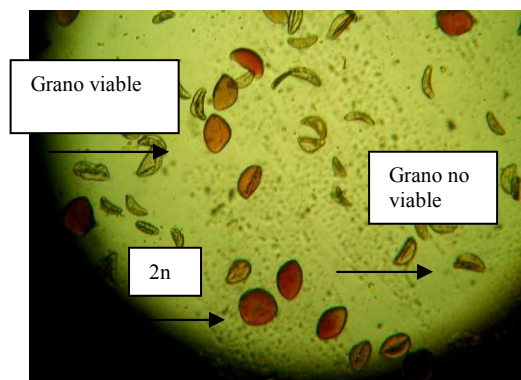




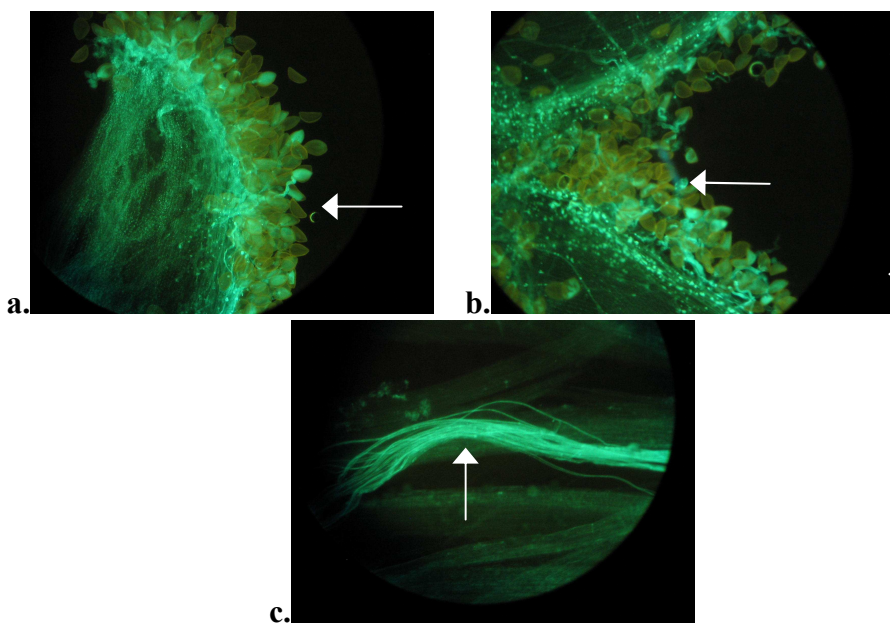
- **Figura 2:** a. BV1 cubierta con zarán para evitar la polinización cruzada, b. 96-15-1 polinizada con polen de 98-101-1, c. Toma de anteras de 98-104-1 con pinzas esterilizadas.



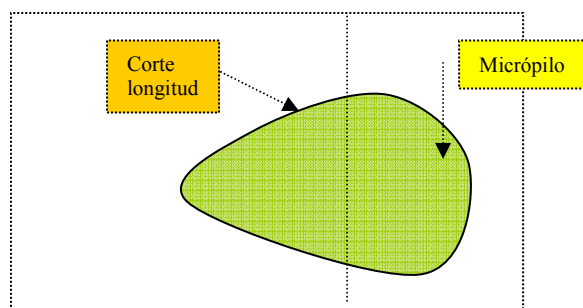
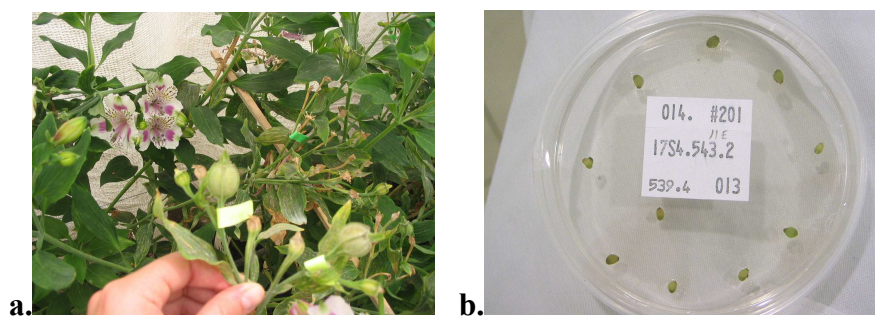
- **Figura 3:** Placa de viabilidad de polen de un cultivar de *Alstroemeria* utilizando la técnica de acetocarmín, vista en un aumento 20X.



- **Figura 4:** a y b. Granos de polen germinando en el estigma de 96-15-1; c. Tubos polínicos avanzando por el estilo hacia el ovario de 96-15-1. Fotos tomadas en aumento 10X con luz UV.

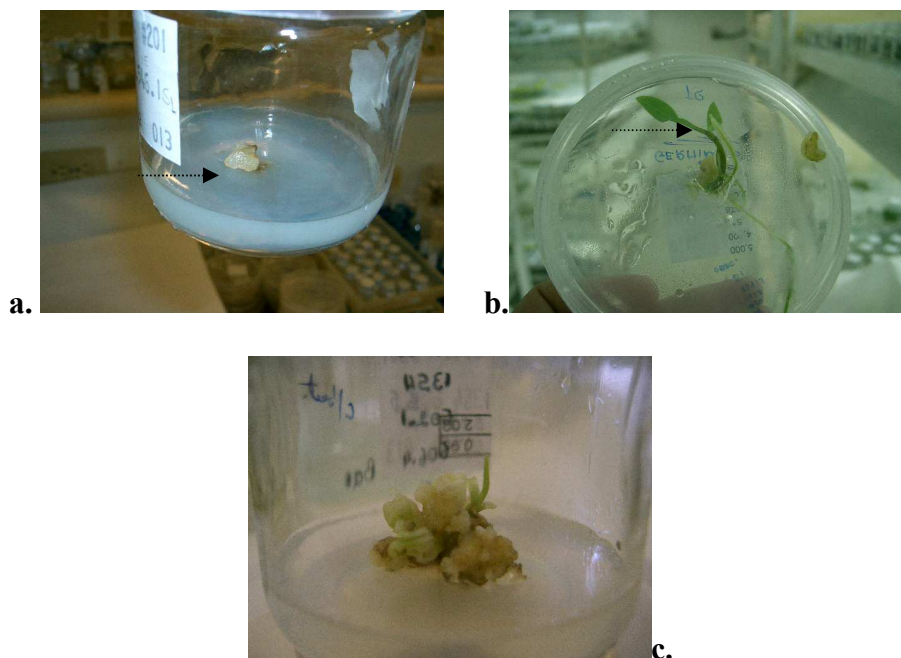


- **Figura 5:** a. Fruto del cruce #30 (ovario hinchado), b. óvulos fertilizados sembrados en medio de cultivo, c. Esquema del “cultivo de óvulos cortados”.

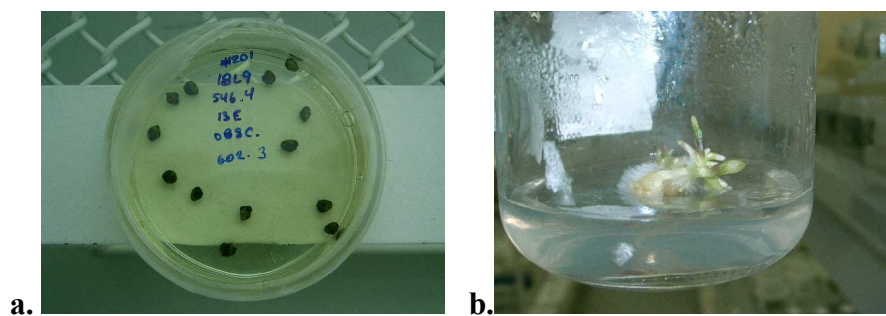


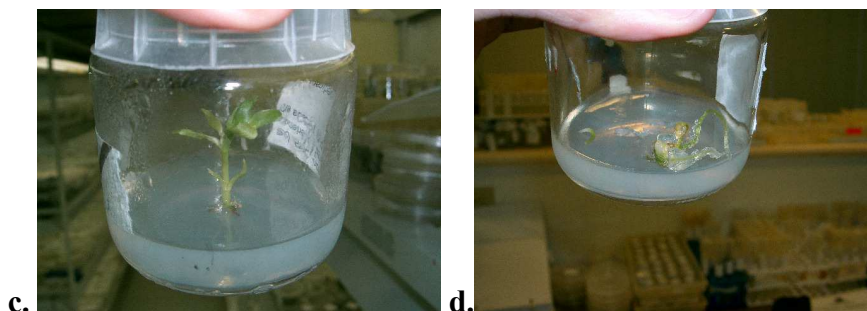
c. Esquema de un óvulo fertilizado de Alstroemeria

- **Fig.6:** a. Embrión del cruce 30 que forma un pequeño callo y regenera planta inmediatamente b. Callo del cruce 201 empezando a regenerar planta a los cinco meses de subcultivo c. Callo del cruce 201 que está empezando a morir y no regenera.

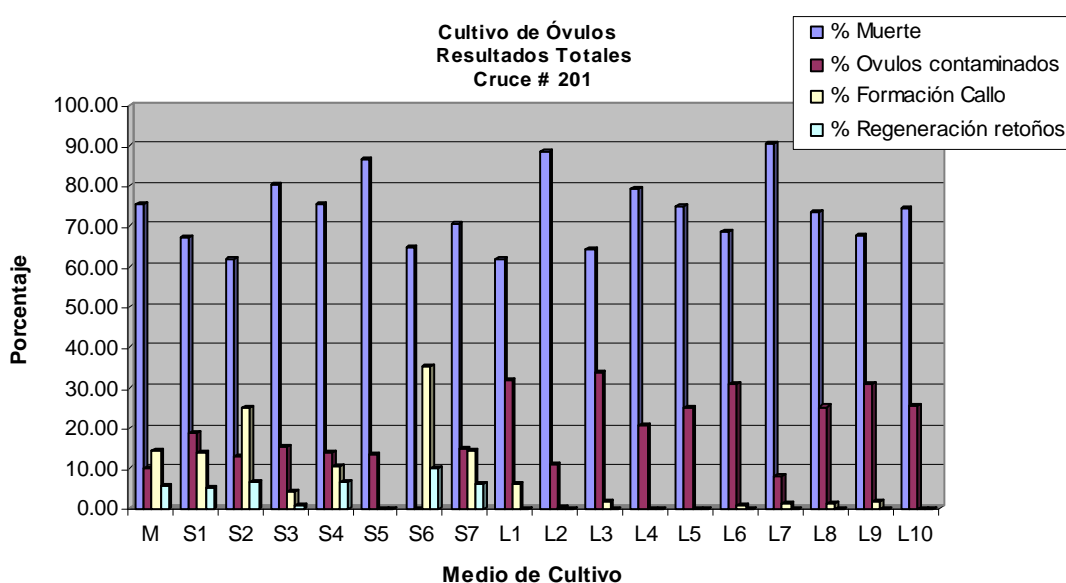


- **Fig. 7:** a. Óvulos del cruce 201 a las 8 semanas de subcultivo, están ennegrecidos y no germinan, b. Embrión del cruce 201, deforme con muchos tallos, c. Planta sin rizoma, del cruce 30 d. Embrión del cruce 30 que sólo formó raíz.

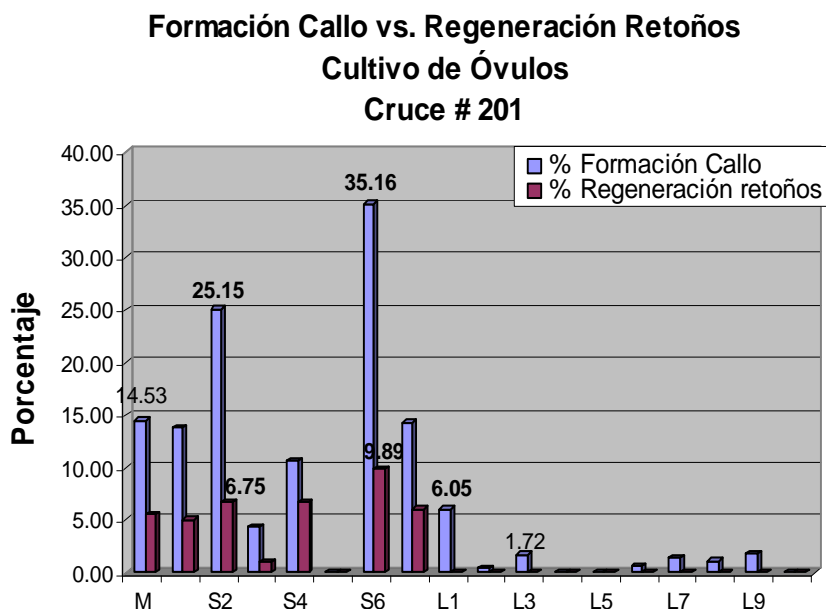




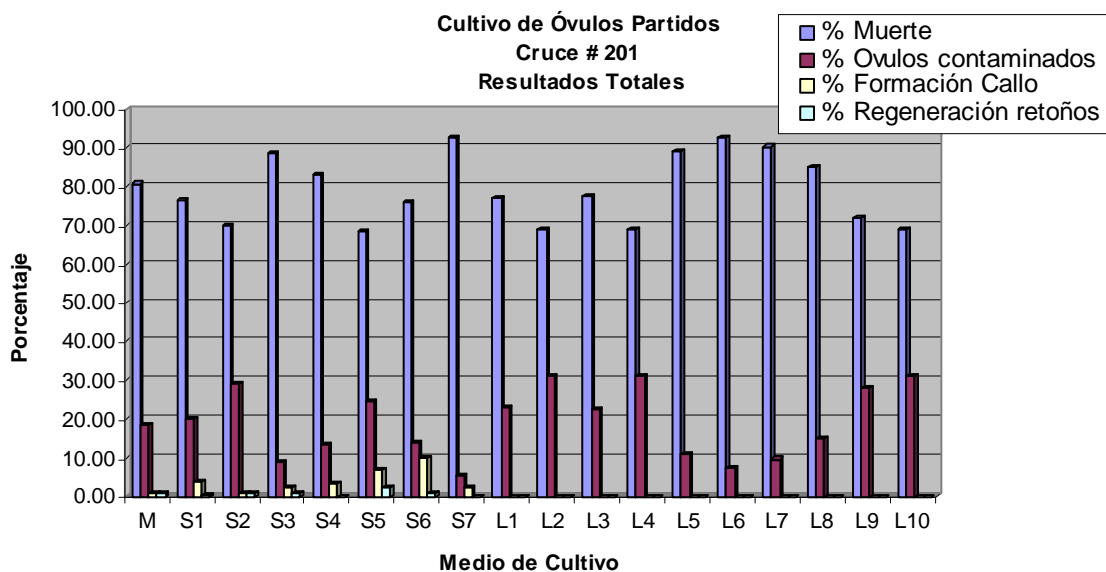
▪ **Figura 8:** Resultados generales del cultivo de óvulos en el cruce control (201).



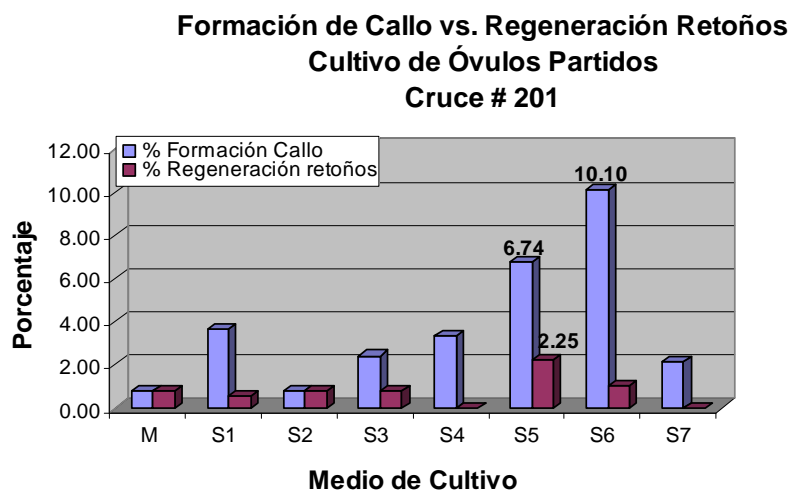
▪ **Figura 9:** Resultados en formación de callo y regeneración de retoños con el cultivo de óvulos, en el cruce 201.



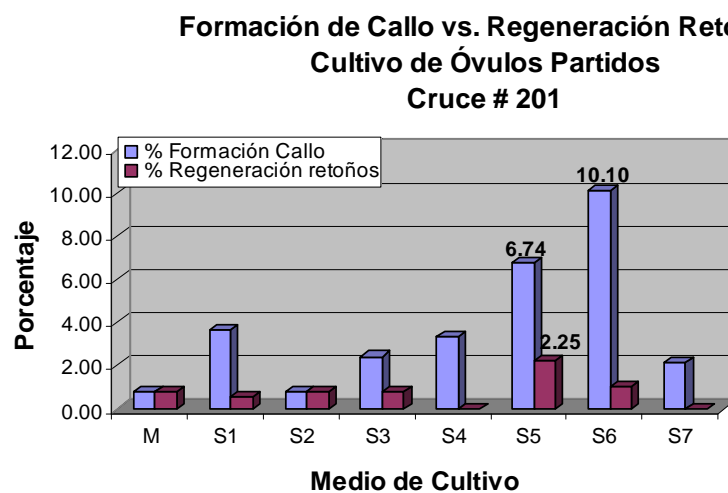
▪ **Figura 10:** Resultados totales del cultivo de óvulos partidos en el cruce 201.



▪ **Figura 11:** Resultados en formación de callo y regeneración de retoños con el cultivo de óvulos, en el cruce 201.

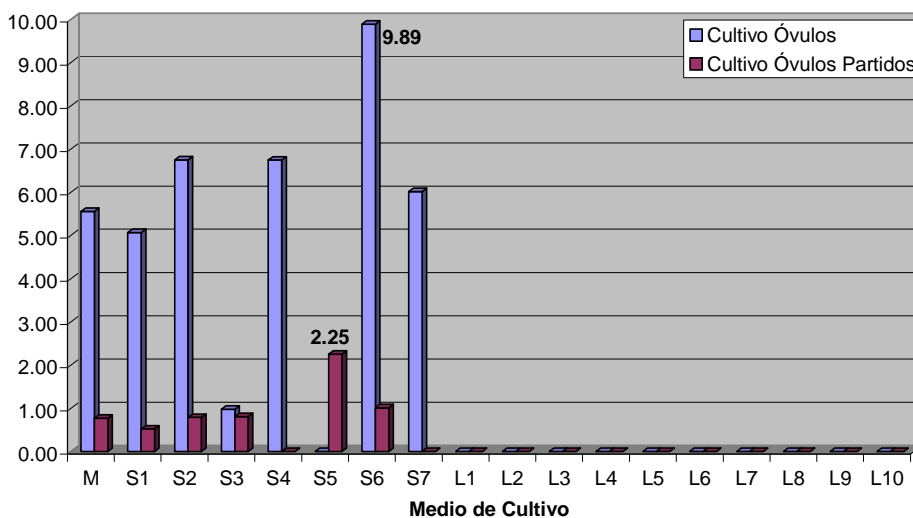


- **Figura 12:** Cruce 201, comparación del cultivo de óvulos vs. el cultivo de óvulos cortados, en porcentajes de formación de callo.



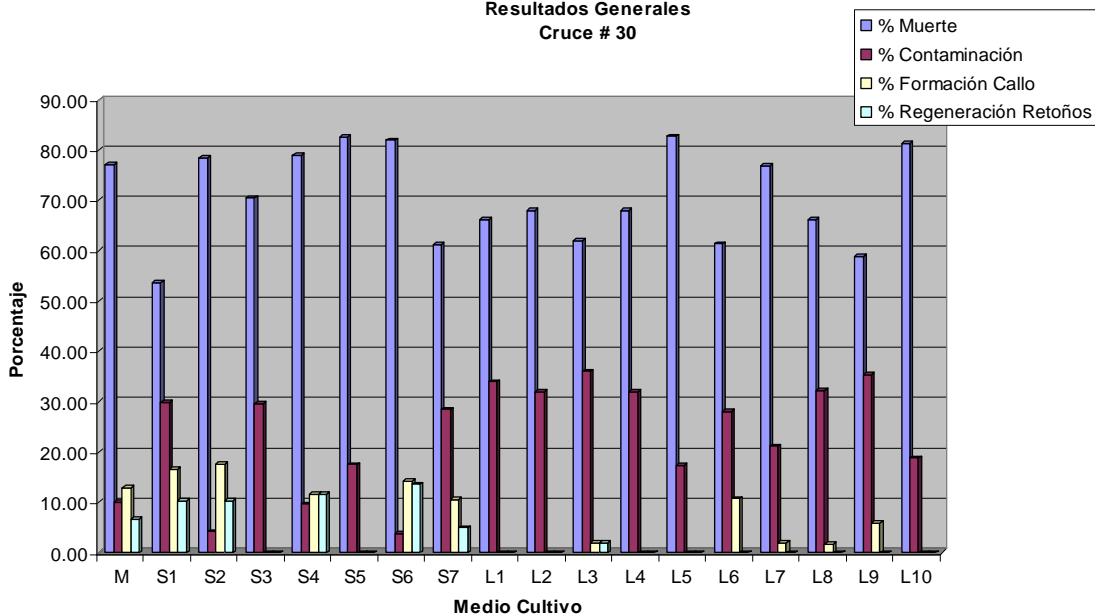
- **Figura 13:** Cruce 201, comparación del cultivo de óvulos vs. el cultivo de óvulos cortados, en porcentajes de regeneración de retoño.

Cultivo Óvulos vs. Cultivo Óvulos Cortados
% Regeneración de planta
Cruce # 201



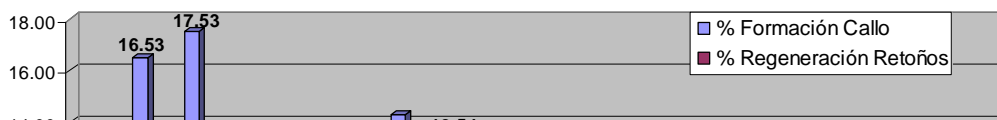
▪ **Figura 14:** Resultados totales del cultivo de óvulos en el cruce 30.

Cultivo Óvulos
Resultados Generales
Cruce # 30

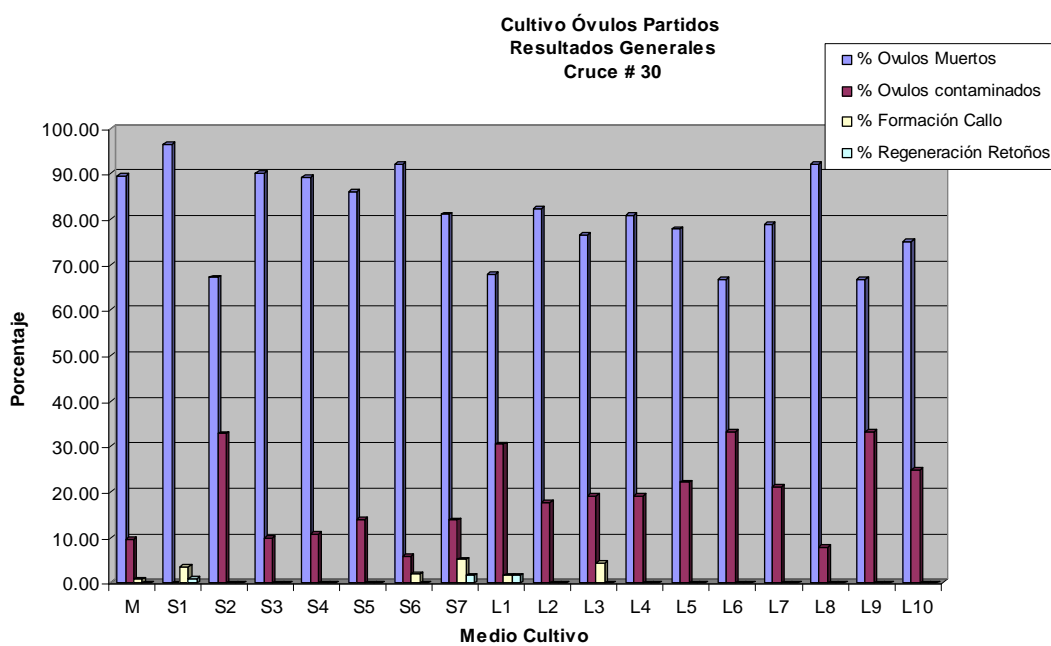


▪ **Figura 15:** Resultados en formación de callo y regeneración de retoños con el cultivo de óvulos, en el cruce 30.

Cultivo de Óvulo
% Formación Callo y Regeneración Retoños
Cruce # 30

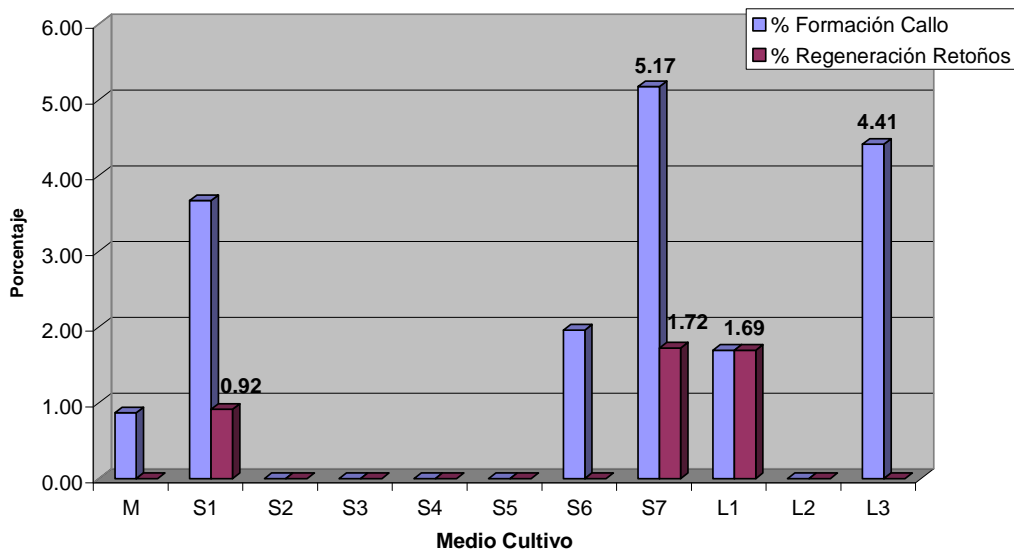


- **Figura 16:** Resultados en totales con el cultivo de óvulos partidos, en el cruce 30.



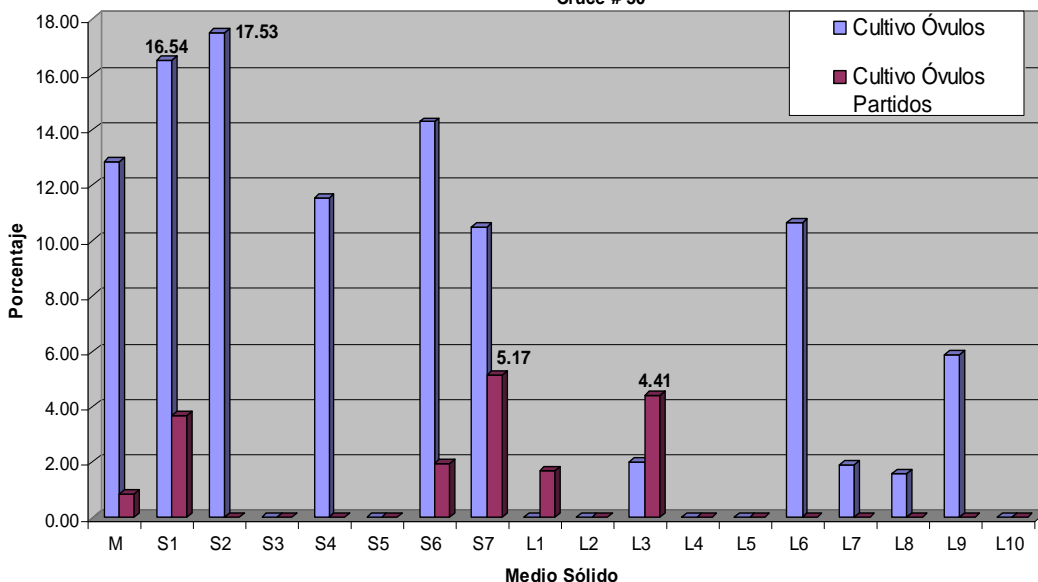
- **Figura 17:** Resultados en formación de callo y regeneración de retoños con el cultivo de óvulos partidos, en el cruce 30.

Cultivo de Óvulos Partidos
% Germinación y Regeneración vs. Medio
Cruce # 30

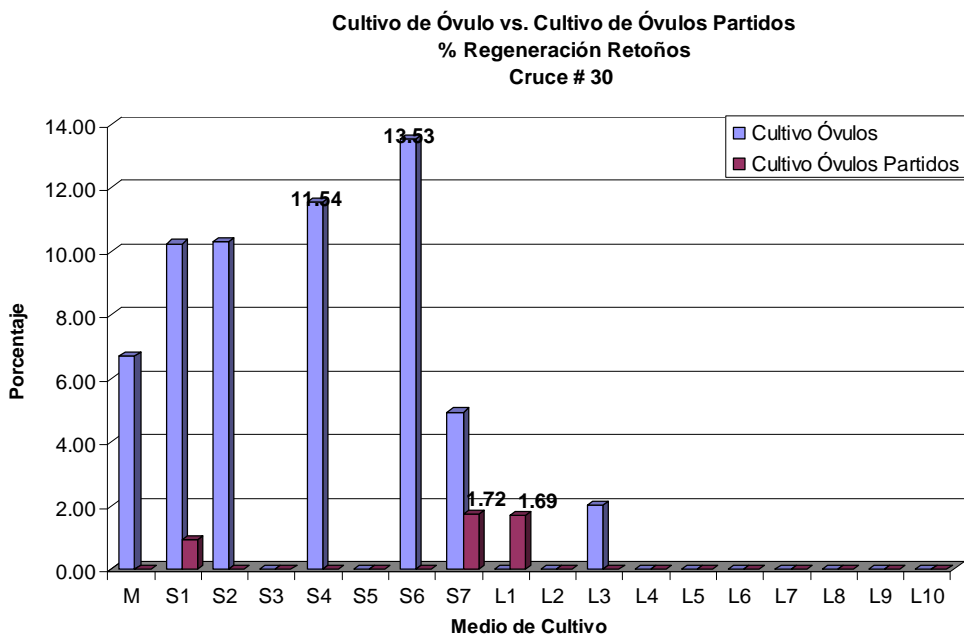


▪ **Figura 18:** Cruce 30, comparación del cultivo de óvulos vs. el cultivo de óvulos partidos, en porcentaje de formación de callo.

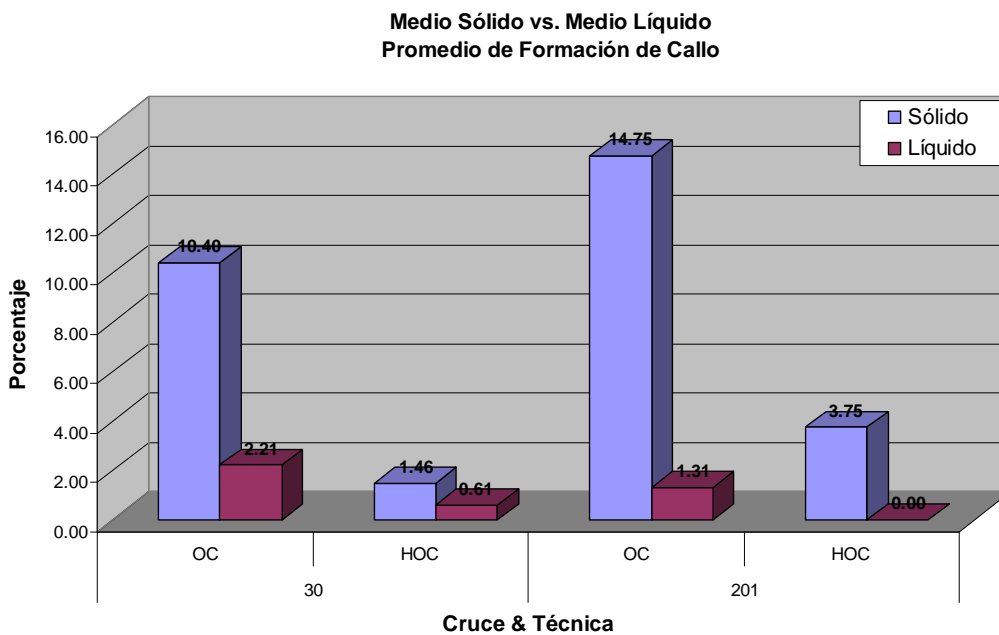
Cultivo de Óvulos vs. Cultivo Óvulos Partidos
% Formación Callo
Cruce # 30



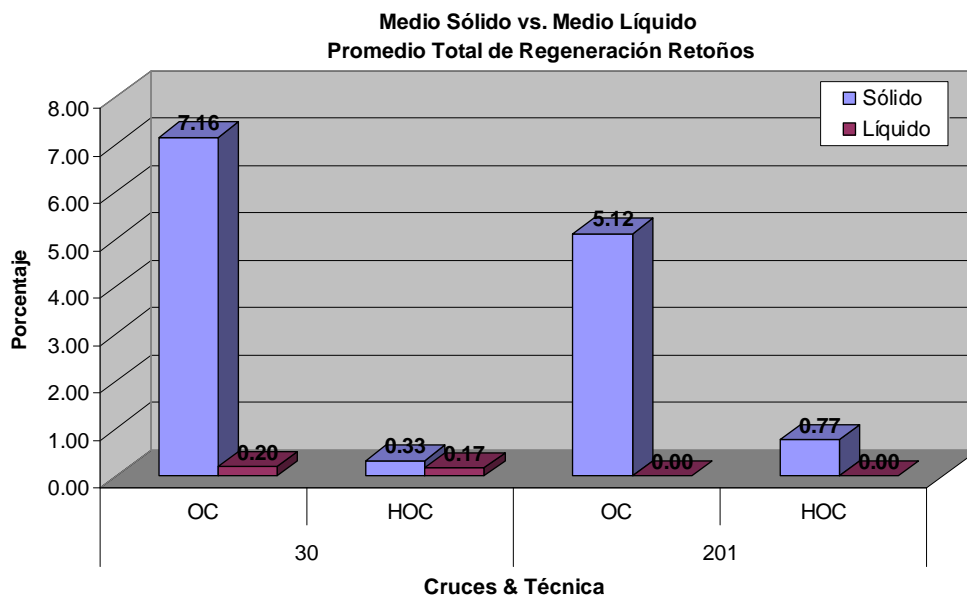
▪ **Figura 19:** Cruce 30, comparación del cultivo de óvulos vs. el cultivo de óvulos partidos, en porcentaje regeneración de retoños.



▪ **Figura 20:** Comparación de las técnicas y fases utilizadas, en los dos cruces, en los porcentajes totales de formación de callo.



▪ **Figura 21:** Comparación de las técnicas y fases utilizadas, en los dos cruces, en los porcentajes totales de regeneración de retoños.



LISTA DE TABLAS

▪ **Tabla 1:** Cruces

# Cruce	Madre	Padre	Observaciones
30	96-15-1	98-104-1	Cruce con baja germinación in-vitro y ninguna in-vivo.
201 Control	BV1	BV1	Cruce compatible, alta germinación in-vivo.

▪ **Tabla 2:** Medios de cultivo, en fase líquida y sólida.

CULTIVO DE ÓVULOS Y HALF OVULE CULTURE			
Fase	Cultivo (Nombre)	Descripción	Bibliografía
SÓLIDA	M	sales y vitaminas MS 1X, 3% sucrosa, 0.7% agar,, 146 mg/L glutamina.	EB&B
	S1	sales y vitaminas MS 1X, 3% sucrosa, 0.7% agar	EB&B
	S2	sales y vitaminas MS 1X, 6% sucrosa, 0.2% phytigel, 400 mg/L caseína hidrolizada	Buitendijk & Ramana (1992)
	S3	sales y vitaminas MS 1X, 12% sucrosa, 0.2% phytigel, 400 mg/L caseína hidrolizada	Buitendijk & Ramana (1992)
	S4	sales y vitaminas MS 1X, 6% sucrosa, 0.2% phytigel.	Buitendijk & Ramana (1992)
	S5	sales y vitaminas MS 1X, 12% sucrosa, 0.2% phytigel.	Buitendijk & Ramana (1992)
	S6	sales y vitaminas MS 1X, 3% sucrosa, 0.2% phytigel	Paulina Andrade
	S7	sales y vitaminas MS 1X, 3% sucrosa, 0.2% phytigel, 400 mg/L caseína hidrolizada	Paulina Andrade
LÍQUIDA	L1	sales y vitaminas MS 1X, 3% sucrosa	Paulina Andrade
	L2	sales y vitaminas MS 1X, 6% sucrosa, 400 mg/L caseína hidrolizada.	Paulina Andrade
	L3	sales y vitaminas MS 1X, 12% sucrosa, 400 mg/L caseína hidrolizada.	Paulina Andrade
	L4	sales y vitaminas MS 1X, 12% sucrosa	Paulina Andrade
	L5	sales y vitaminas MS 1X, 6% sucrosa	Paulina Andrade
	L6	sales y vitaminas MS 1X, 3% sucrosa, 400 mg/L caseína hidrolizada.	Paulina Andrade
	L7	<i>Macronutrientes MS 0.25X, micronutrientes y vitaminas MS 1X, 6% sucrosa, 400 mg/L caseína hidrolizada</i>	Buitendijk & Pinsonneaux (1995)
	L8	<i>Macronutrientes MS 0.25X, micronutrientes y vitaminas MS 1X, 12% sucrosa, 400 mg/L caseína hidrolizada</i>	Buitendijk & Pinsonneaux (1995)
	L9	<i>Macronutrientes MS 0.25X, micronutrientes y vitaminas MS 1X, 12% sucrosa</i>	Buitendijk & Pinsonneaux (1995)
	L10	<i>Macronutrientes MS 0.25X, micronutrientes y vitaminas MS 1X, 6% sucrosa.</i>	Buitendijk & Pinsonneaux (1995)

▪ **Tabla 3:** Viabilidad polen de la variedad BV1

# Muestra	% Viabilidad
1	100
2	95
3	97
4	97
5	100
6	100
7	97
8	100
9	95
10	100
Promedio	98.1

- **Tabla 4:** Viabilidad polen de la variedad 98-104-1

# Muestra	% Viabilidad
1	95
2	90
3	97
4	95
5	95
6	90
7	90
8	95
9	97
10	95
Promedio	93.9

- **Tabla 5:** Resultados del muestreo del tubo polínico en el cruce 30 y 201.

Repetición	Cruce	# Flores	Observaciones del Crecimiento del Tubo Polínico en el Pistilo			Comentarios
			Estigma	Mitad Estilo	Ovario	
1	30	10	-	1	9	Se ve abundante germinación y avance de los tubos polínicos al ovario.
	201	10	-	-	10	Se ve abundante germinación y avance de los tubos polínicos al ovario.
2	30	10	-	2	8	Se ve abundante germinación y avance de los tubos polínicos al ovario.
	201	10	-	-	10	Se ve abundante germinación y avance de los tubos polínicos al ovario.

- **Tabla 6:** Cultivo de Óvulos: datos de mortalidad, formación de callo, regeneración de retoños, contaminación y estado general de los óvulos para el cruce 30.

Cruce # 30 Técnica: <i>Cultivo de óvulos</i>					
Medio	% Muerte	% Óvulos contaminados	% Formación Callo	% Regeneración Retoños	Observaciones
M	77.09	10.06	12.85	6.70	
S1	53.54	29.92	16.54	10.24	
S2	78.35	4.12	17.53	10.31	
S3	70.42	29.58	0.00	0.00	Nada germinó, los óvulos se tornaban duros (como piedras)
S4	78.85	9.62	11.54	11.54	
S5	82.54	17.46	0.00	0.00	
S6	81.95	3.76	14.29	13.53	
S7	61.11	28.40	10.49	4.94	Algunos callos murieron y otros regeneraron retoños
L1	66.07	33.93	0.00	0.00	Los óvulos se tornaron cafés y morían
L2	68.00	32.00	0.00	0.00	
L3	62.00	36.00	2.00	2.00	
L4	68.00	32.00	0.00	0.00	Los óvulos se tornaron cafés y morían
L5	82.69	17.31	0.00	0.00	Todos los callos formados se

L6	61.33	28.00	10.67	0.00	ennegrecieron y murieron
L7	76.92	21.15	1.92	0.00	
L8	66.13	32.26	1.61	0.00	
L9	58.82	35.29	5.88	0.00	
L10	81.25	18.75	0.00	0.00	

- **Tabla 7:** Cultivo de Óvulos Partidos: datos de mortalidad, formación de callo, regeneración de retoños, contaminación y estado general de los óvulos para el cruce 30.

Cruce # 30					
Técnica: <i>Half Ovule Culture</i>					
Medio	% Muerte	% Óvulos contaminados	% Formación Callo	% Regeneración Retoños	Observaciones
M	89.57	9.57	0.87	0.00	Callo murió
S1	96.33	0.00	3.67	0.92	Los óvulos se tornaban duros y morían
S2	67.19	32.81	0.00	0.00	
S3	90.00	10.00	0.00	0.00	
S4	89.29	10.71	0.00	0.00	
S5	85.96	14.04	0.00	0.00	
S6	92.16	5.88	1.96	0.00	Callo murió
S7	81.03	13.79	5.17	1.72	
L1	67.80	30.51	1.69	1.69	
L2	82.26	17.74	0.00	0.00	
L3	76.47	19.12	4.41	0.00	Callos se ennegrecieron y murieron
L4	80.82	19.18	0.00	0.00	Los óvulos se tornaron cafés y

L5	77.78	22.22	0.00	0.00	murieron
L6	66.67	33.33	0.00	0.00	
L7	78.87	21.13	0.00	0.00	
L8	92.06	7.94	0.00	0.00	
L9	66.67	33.33	0.00	0.00	
L10	75.00	25.00	0.00	0.00	

- **Tabla 8:** Cultivo de Óvulos: datos de mortalidad, formación de callo, regeneración de retoños, contaminación y estado general de los óvulos para el cruce control.

Cruce # 201					
Técnica: <i>Cultivo de óvulos</i>					
Medio	% Muerte	% Óvulos contaminados	% Formación Callo	% Regeneración Retoños	Observaciones
M	75.64	9.83	14.53	5.56	Algunos callos murieron y otros regeneraron retoños.
S1	67.28	18.89	13.82	5.07	
S2	61.96	12.88	25.15	6.75	
S3	80.49	15.12	4.39	0.98	

S4	75.28	14.04	10.67	6.74	
S5	86.72	13.28	0.00	0.00	No germinó nada, los óvulos se endurecían (como piedras)
S6	64.84	0.00	35.16	9.89	Algunos callos murieron y otros regeneraron retoños.
S7	70.68	15.04	14.29	6.02	Algunos callos murieron y otros regeneraron retoños.
L1	62.10	31.85	6.05	0.00	
L2	88.63	10.90	0.47	0.00	
L3	64.37	33.91	1.72	0.00	
L4	79.47	20.53	0.00	0.00	Todos los óvulos se tornaron cafés.
L5	75.00	25.00	0.00	0.00	
L6	68.60	30.81	0.58	0.00	Callo se ennegreció y murió
L7	90.41	8.22	1.37	0.00	Algunos callos murieron y otros regeneraron retoños.
L8	73.56	25.29	1.15	0.00	Callo se ennegreció y murió
L9	67.54	30.70	1.75	0.00	Callo se ennegreció y murió
L10	74.49	25.51	0.00	0.00	No germinó nada, los óvulos se tornaron cafés.

- **Tabla 9:** Cultivo de Óvulos Partidos: datos de mortalidad, formación de callo, regeneración de retoños, contaminación y estado general de los óvulos para el cruce control.

Cruce # 201					
Técnica: <i>Half Ovule Culture</i>					
Medio	% Muerte	% Óvulos contaminados	% Formación Callo	% Regeneración Retoños	Observaciones
M	80.77	18.46	0.77	0.77	
S1	76.44	19.90	3.66	0.52	
S2	70.08	29.13	0.79	0.79	
S3	88.71	8.87	2.42	0.81	

S4	83.22	13.42	3.36	0.00	Los callos formados se eliminan por muerte
S5	68.54	24.72	6.74	2.25	
S6	75.76	14.14	10.10	1.01	
S7	92.47	5.38	2.15	0.00	Los callos formados se eliminan por muerte
L1	77.12	22.88	0.00	0.00	Los óvulos se tornaron cafés y morían
L2	68.99	31.01	0.00	0.00	
L3	77.48	22.52	0.00	0.00	
L4	69.03	30.97	0.00	0.00	
L5	88.89	11.11	0.00	0.00	
L6	92.63	7.37	0.00	0.00	
L7	90.36	9.64	0.00	0.00	
L8	84.88	15.12	0.00	0.00	
L9	72.00	28.00	0.00	0.00	
L10	68.97	31.03	0.00	0.00	