

EFFECTO DEL GENOTIPO, AMBIENTE Y ÁCIDO HÚMICO EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE TRIGO

EFFECT OF GENOTYPE, ENVIRONMENT AND HUMIC ACID ON THE *IN VITRO* CULTURE OF WHEAT ANTERS

Rafael Ramírez Malagón^{1*}, Anatoli Borodanenko¹, Neftalí Ochoa Alejo², Luis Pérez Moreno¹, José Luis Barrera Guerra¹ y Héctor Gordon Núñez Palenius²

¹Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato. Ex hacienda El Copal s/n, Apdo. Postal 311. 36500, Irapuato, Gto., Tel. y Fax: 01 (462) 624-1889. ²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav)-Campus Guanajuato.

*Autor para correspondencia (ramirafa@dulcinea.ugto.mx)

RESUMEN

El cultivo *in vitro* de anteras de trigo (*Triticum aestivum* L.) es una herramienta útil en el mejoramiento genético de esta especie porque ahorra tiempo y costo para la generación de líneas isogénicas, porque permite aislar homocigotos recesivos de interés agronómico y fijar más rápido las características de cruza de interés agronómico que por las técnicas tradicionales de mejoramiento genético. Doce líneas de trigo de invierno de origen ruso que no respondían al cultivo *in vitro* de anteras, fueron cruzadas con dos variedades de trigo de primavera de respuesta positiva. Se encontró que la progenie resultante dio respuesta positiva, lo cual indica que la respuesta al cultivo de anteras *in vitro* está controlada genéticamente. Se probó el efecto del ambiente en el que se desarrollaron las plantas donadoras de anteras en las respuestas al cultivo *in vitro* (a cielo abierto con temperaturas de 5 a 25 °C, e invernadero entre 7 a 35 °C). La mayor formación de callos embriogénicos y plantas fértiles se duplicó en las anteras aisladas de plantas que fueron cultivadas a cielo abierto. Al evaluar el efecto de tres productos químicos (Q-2000®, Maxi-Grow® y Humigen®) aplicados a las espigas, sobre la regeneración de plantas a partir de anteras cultivadas *in vitro*, se encontró que el ácido húmico a 3.5 mL L⁻¹ incrementó entre tres y cinco veces la formación de callos embriogénicos, en comparación con las plantas testigo. Se encontró correlación positiva entre el ancho de las hojas de las plántulas regeneradas del cultivo *in vitro* y su fertilidad, por lo que dicha medida de las hojas podría ser un posible marcador morfológico de la haploidía o dihaploidía, en la mayoría de genotipos.

Palabras clave: *Triticum aestivum*, embriogénesis, efecto ambiental, ácido húmico.

SUMMARY

The *in vitro* anther culture is a useful tool for wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding. Using this methodology makes possible to generate isogenic lines in an inexpensive and faster way than by conventional breeding methods, since it allows the isolation of agronomic recessive homozygous plants and to fix traits in the progeny from hybrids exhibiting the advantageous traits. We investigated the em-

bryogenic responses of anthers derived from crosses among twelve russian Winter-wheat lines (non-responsive to *in vitro* anther culture), and two Spring-varieties that responded positively. Among the off-spring plants, lines with a positive response were found thus demonstrating that *in vitro* anther culture response is a genetically controlled trait. The effect of environmental conditions on donor plants affected the on *in vitro* anther responses. Anthers from open field-grown plants (5-25 °C) showed a better embryogenic calli formation (two fold increase) and better green plant regeneration than anthers from greenhouse-grown donor plants (7-35 °C). The applications of three chemicals (Q-2000™, Maxi-Grow™ and Humigen™) to donor-plant spikes revealed that the plants treated with humic acid at 3.5 mL L⁻¹, increased the embryogenic callus formation (three to five times) compared to the control. A positive correlation between leaf width vs. fertility of regenerated plants was found in seven out of the eight lines tested; thus, leaf width could be used as a morphological marker for haploidy or dihaploidy.

Index words: *Triticum aestivum*, embryogenesis, environmental effect, humic acid.

INTRODUCCIÓN

El cultivo *in vitro* de anteras de trigo (*Triticum aestivum* L.) es una herramienta útil para el mejoramiento genético de plantas dirigido a la obtención de resistencia a enfermedades o a condiciones adversas del ambiente (Szakacs *et al.*, 2002). Esta técnica constituye actualmente el método más efectivo para generar plantas dihaploides (Haliloglu y Baenziger, 2003). Adicionalmente, se pueden lograr beneficios como la obtención de líneas 100 % homocigotas en sólo seis meses, en comparación con los 5 a 10 años de ciclos de autofecundación necesarios para lograr la homocigosis por métodos convencionales. Por otra parte, esta metodología permite derivar homocigotos recesivos de utilidad en el fitomejoramiento, lo cual es difícil

de detectar y de obtener por los métodos convencionales (Jauhar *et al.*, 2000).

Para tener éxito en la regeneración de plantas a partir del cultivo de anteras, un factor importante es la aplicación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que es una auxina importante para la respuesta *in vitro* de anteras de trigo (Konieczny *et al.*, 2003); otro es el estadio de desarrollo y madurez de las microsporas para inducir la embriogénesis: un marcador externo, es cortar la espiga donadora cuando ésta ocupa aproximadamente dos tercios del espacio longitudinal de la hoja bandera, y otro es la observación microscópica de las microsporas para cultivar sólo anteras que estén en la etapa uninucleada tardía (Saidi *et al.*, 1997).

La influencia del genotipo es un factor importante para lograr la regeneración de plantas haploides o dobles haploides que puedan ser de utilidad en programas de mejoramiento de trigo. Según Orlov *et al.* (1993), para alcanzar al menos una respuesta en 4 % de las anteras de trigo cultivadas *in vitro* con fines de mejoramiento genético, es necesario encontrar los genotipos adecuados. Al respecto, Ghaemi *et al.* (1994) consideraron necesario tomar en cuenta las interacciones del genotipo con el ambiente.

La temperatura a la cual la planta madre crece influye sobre el porcentaje de microsporas que se dividen durante las primeras etapas del cultivo *in vitro* de anteras de trigo, y el genotipo determina la proporción de plantas que se regeneran (Orshinsky y Sadasivaiah 1997).

Algunas sustancias como los ácidos húmicos, se han empleado en la estimulación de diferentes plantas; así, Cannellas *et al.* (2002) señalaron que los ácidos húmicos poseen grupos auxínicos intercambiables que inducen la proliferación de sitios de emergencia de raíces laterales y estimulan la actividad de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática. Delfine *et al.* (2005) reportaron que la aplicación foliar de ácido húmico en trigo incrementó la producción de materia seca, rendimiento de grano, fertilidad de la espiga y el contenido proteico del grano, sin afectar la fotosíntesis ni la conductancia de los estomas. Los ácidos húmicos también pueden incrementar la tolerancia a estrés hídrico, la eficiencia fotoquímica y la actividad endógena de las enzimas antioxidantes (Zhang *et al.*, 2005).

Con los antecedentes descritos, se establecieron los siguientes objetivos: 1) Inducir la regeneración de plantas fértiles mediante el cultivo *in vitro* de anteras de plantas provenientes de cruza de trigos rusos de invierno con trigos mexicanos de primavera; 2) Determinar el efecto de dos condiciones ambientales en el cultivo de las plantas de trigo donadoras de anteras sobre la regeneración de plantas

in vitro; 3) Determinar el efecto de la aplicación de Q-2000®, Maxi-Grow® o Humigen®, sobre la formación de callos embriogénicos, plantas verdes y plantas fértiles *in vitro*; y 4) Determinar si el ancho de la hoja de las plantas regeneradas *in vitro* puede servir como marcador morfológico para predecir su fertilidad o esterilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Guanajuato (UGTO) de 1994 a 2005. En los dos primeros años se hicieron pruebas preliminares de respuesta al cultivo *in vitro* de anteras de 12 líneas rusas de trigo de invierno y de dos variedades mexicanas de trigo de primavera. Luego, de 1998 a 2005 se efectuaron los ensayos experimentales de laboratorio. El estudio de la transferencia de la capacidad de regeneración de plantas *in vitro* a partir de anteras de trigo, se hizo con las 12 líneas rusas que no respondían al cultivo *in vitro* de anteras (Sk01, Sk02, Sk03, Kr01, Kr02, Kr03, LAD01, LAD02, LAD03, LAD04, Obry01, Obry02), y dos variedades mexicanas de trigo de primavera ‘Glennson’ (GL) y ‘Salamanca’ (Sal) de respuesta positiva. Con ellas se hicieron las siguientes cruza: Sk01 x GL, Sk02 x GL, Sk03 x GL, Kr01 x GL, Kr02 x GL, Kr03 x GL, LAD01 x Sal, LAD02 x Sal, LAD03 x Sal, LAD04 x Sal, Obry01 x Sal, Obry02 x Sal, en las que las variedades rusas fungieron como progenitor paterno y las variedades mexicanas como progenitor materno.

Para el cultivo de anteras se cosecharon 15 espigas por tratamiento, previo palpado de la espiga y su corte cuando aún le faltaban unos 5 cm para salir de la bráctea, lo cual sucedía de 57 a 58 d del inicio del ciclo. Se corroboró que las microsporas estuvieran en la etapa uninucleada de media a tardía, mediante un marcador celular basado en la presencia de una gran vacuola que desplazaba a todos los organelos a la periferia (Saidi *et al.*, 1997). Se colocaron 45 anteras por caja Petri (60 x 15 mm), que contenía el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 12 % (p/v) de sacarosa, 10 % v/v de extracto de papa, de una preparación a 10 % (p/v), 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, y gelificado con 3 g L⁻¹ de Gelan Gum (Sigma Co.). Las plantas regeneradas y enraizadas fueron trasplantadas a suelo tipo “peat moss” en macetas de 250 mL y 30 d después se trasplantaron a macetas de 3 L. El estudio de la respuesta de los híbridos al cultivo *in vitro* de anteras se repitió durante 1998-2001; los resultados de cada año fueron tomados como una repetición para elaborar los análisis de varianza y las separaciones de medias se hicieron con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Los estudios del efecto del ambiente sobre las plantas madres y de la aplicación de productos químicos a las

espigas, se llevaron a cabo durante los años 1998-2000 y 2001-2003, respectivamente. Se establecieron plantas de trigo en campo a cielo abierto y bajo invernadero en túneles de plástico de 8 m de ancho, 30 m de largo y 3.5 m de alto. Durante tres años consecutivos se repitieron los experimentos de los estudios del efecto ambiental y de la aplicación de productos químicos a las espigas, y los resultados de cada año se tomaron como repeticiones, con cuyos promedios se llevaron a cabo los análisis de varianza y separación de medias utilizando la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Para estudiar el efecto del ambiente sobre la respuesta al cultivo *in vitro* de anteras se utilizaron las variedades 'Glennson', 'Salamanca', 'Temporalera', 'Verano' y 'Saturno', bajo dos ambientes: a cielo abierto, donde las plantas estuvieron expuestas a temperaturas de 5 a 25 °C; y bajo invernadero con rangos de temperatura de 7 a 35 °C. Los trabajos de los dos experimentos se desarrollaron durante los años 1998 a 2002.

En los pretratamientos químicos de las plantas madres se utilizaron las líneas experimentales 'Country 1' y 'Country 5'; los experimentos se llevaron a cabo de 2002 a 2004. Se utilizaron los productos siguientes: Q-2,000® (Quimcasa, S.A. de C.V., México, distribuido como activador fisiológico, sin información sobre su composición), Maxi-Grow® (Cosmocel S.A., de C.V., División Agrícola, México, que reporta una composición de auxinas 0.0014 %, giberelinas 0.0003 %, citocininas 0.0012 %, N 0.1 %, P₂O₅ 0.1 %, K 0.3 %, Ca 0.5 %, Mg 4 %, Fe 1 %, Zn 0.05 %, Mn 0.05 % y Cu 0.007 %), y Humigen Plus® (Thedal Internacional, S.A. de C. V., México, que reporta una composición de potasio-ácidos húmicos 12.5 %, N 9.66 %, P₂O₅ 4.18 %, K 11.03 %, Ca 0.8 % y S 0.8 %). Las dosis utilizadas fueron: Q-2000 5 mL L⁻¹, Maxi-Grow 3 mL L⁻¹, y Humigen Plus 3.5 mL L⁻¹. De cada solución se tomó 1 mL y con un aspersor fino se roció la bráctea de la espiga hasta cubrirla con la solución; cada línea de trigo fue establecida en campo en parcelas de 2 m², y las espigas de cada parcela fueron asperjadas con los productos químicos 3 d antes de la colecta de las espigas para el cultivo *in vitro* de sus anteras.

Para determinar la correlación entre el ancho de las hojas de las plántulas regeneradas *in vitro* y la fertilidad de las mismas, se utilizaron plantas de ocho líneas del programa institucional de mejoramiento genético de trigo, con datos tomados de 10 plantas de trigo regeneradas por cada cruce. A las plántulas se les midió el ancho de las hojas, se etiquetaron, se transfirieron a suelo y se evaluaron a la cosecha para determinar en fertilidad o esterilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra el proceso de regeneración de plantas en los cultivos *in vitro* de trigo y su transferencia al campo. En algunos casos las anteras formaron principalmente callo (Figura 1A), mientras que en otros la respuesta fue la generación de embriones en diferentes etapas de desarrollo (Figura 1B) de los cuales se regeneraron plantas completas *in vitro* (Figura 1C), que luego fueron aclimatadas y transferidas a suelo en donde mostraron diferencias en crecimiento y vigor (Figura 1D), y diferencias en fertilidad (Figura 1E). Las líneas regeneradas fueron transferidas a condiciones de campo para su posterior caracterización (Figura 1F).

Las líneas de trigo de invierno Sk cruzadas con la variedad 'Glennson' exhibieron los mayores porcentajes de formación de callos embriogénicos en un rango de 8.8 a 10 % (Cuadro 1); las líneas Kr cruzadas con 'Glennson' dieron lugar a resultados contrastantes, ya que Kr02 presentó 9 % de callos embriogénicos mientras que la línea Kr01 sólo mostró 1.5 %. Las líneas rusas cruzadas con la variedad 'Salamanca' mostraron porcentajes de callos embriogénicos que variaron de 2.5 a 7.3 %, lo que demostró nuevamente el efecto del genotipo sobre la respuesta embriogénica.

La proporción de plantas verdes regeneradas con relación al porcentaje de callos embriogénicos varió de 10 a 18 % en el híbrido Sk01 x Gl, que fue el de mayor respuesta, con una inducción de 4 % de plantas albinas; en el híbrido Kr01 x Gl, que fue el de menor respuesta, la variación fue de 1.5 a 3.5 % y no indujo plantas albinas; estas plantas se presentaron en el cultivo de anteras, tal vez debido a mutaciones recesivas nucleares o citoplásmicas cuyos alelos se manifiestan en condición haploide o doble haploide, o a cambios en el número y estructura de los cromosomas de las plantas regeneradas (Dogramaci-Altuntepe *et al.*, 2001). De acuerdo con Cistué *et al.* (2006), un problema que debe ser resuelto en el cultivo *in vitro* de anteras de trigo es la alta proporción de plantas albinas que frecuentemente se regeneran.

Para minimizar la aparición de plantas albinas se han modificado las temperaturas de incubación, y el tamaño y edad de las estructuras globulares que regeneran plantas de trigo; así, Haliloglu y Baenziger (2003) reportaron que la combinación de estructuras embrionarias de 3 mm de diámetro combinadas con una edad del embrión de 45 d indujo el mayor porcentaje de plantas verdes. La regeneración de plantas albinas o plantas verdes en el cultivo de anteras de trigo también depende del genotipo de trigo y de los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo (Dogramaci-Altuntepe *et al.*, 2001; Cistué *et al.*, 2006).

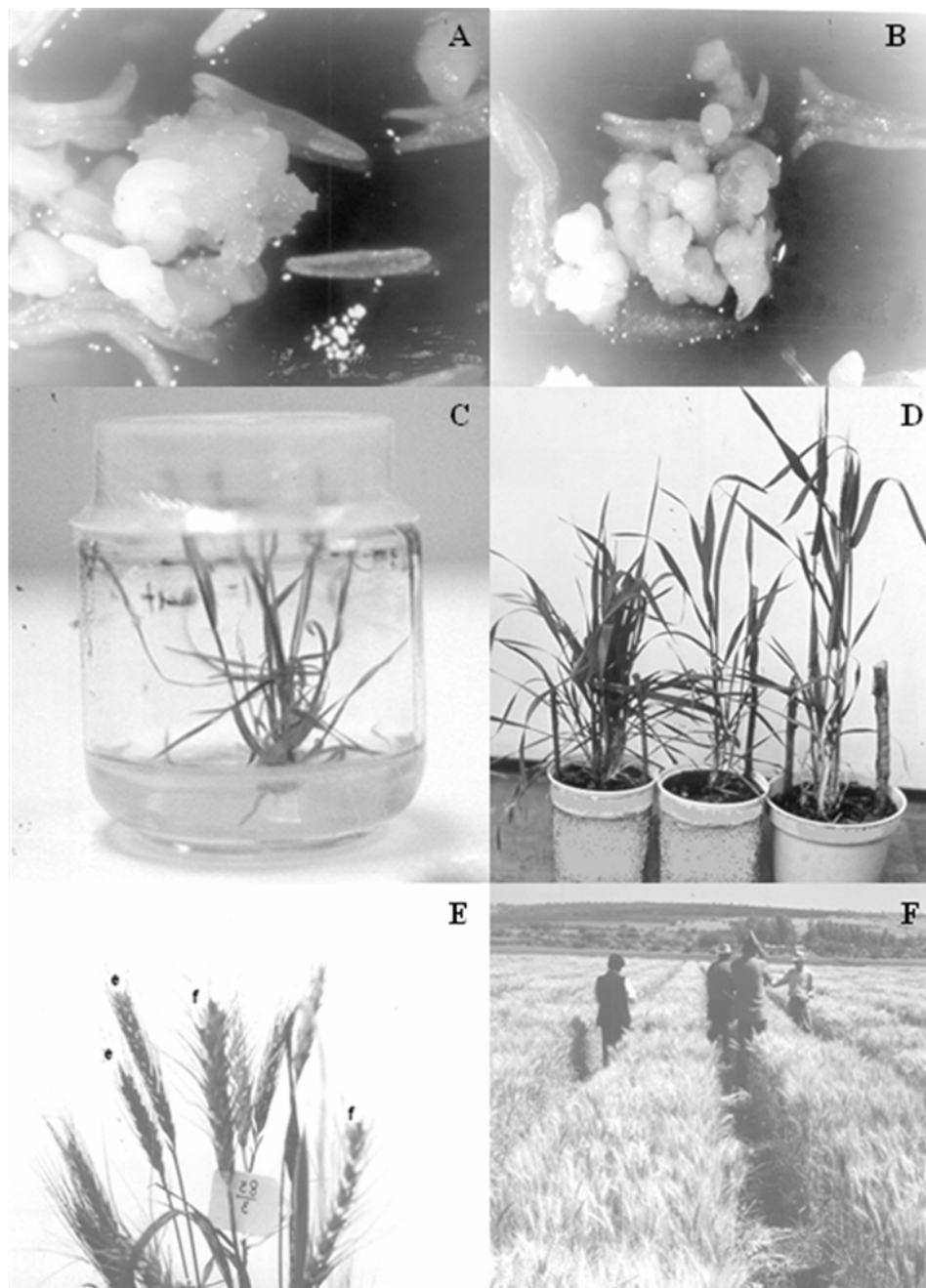


Figura 1. Cultivo *in vitro* de anteras de trigo. A) Anteras con producción mayoritaria de callo; B) Anteras con producción mayoritaria de estructuras globulares embriónicas; C) Desarrollo de plántulas a partir de estructuras globulares o callos embriónicos; D) Plantas derivadas del cultivo de anteras transferidas a suelo; E) Espigas de plantas estériles (e) y plantas fértiles (f); F) Líneas dihaploides de trigo en proceso de evaluación.

Los resultados más notables fueron publicados por Dogramaci-Altuntepe *et al.* (2001), quienes consiguieron regenerar 248 plantas verdes de 86 400 anteras de cultivares turcos de trigo.

La proporción de plantas fértiles que se obtuvo en el presente trabajo varió entre genotipos (Cuadro 1), con un

promedio máximo de 4.3 %. Considerando que cada planta regenerada representa una línea 100 % homocigota que porta genes de los progenitores involucrados; significa que se obtuvieron 121 líneas de trigo provenientes de sólo 180 plantas experimentales. Estos resultados demuestran la importancia del genotipo en el cultivo *in vitro* de anteras, tal como había sido reportado (Orshinsky y Sadasivaiah,

1997). Asimismo, se demostró que es posible por genética convencional incorporar características de respuesta positiva en variedades de trigo recalcitrantes.

La condición del ambiente de las plantas donadoras afectó la respuesta de las anteras de trigo cultivadas *in vitro* (Cuadro 2). Las tres variedades evaluadas tuvieron una respuesta positiva con diferencias atribuibles a las condiciones de campo y de invernadero, en concordancia con lo reportado por Ouyang *et al.* (1987). El porcentaje promedio de callos embriogénicos generados fue de 19.0, 4.6 y 4.3 % para las variedades ‘Glennson’, ‘Salamanca’ y ‘Temporalera’, respectivamente, cuando las plantas crecieron en campo a cielo abierto; en cambio, cuando las plantas crecieron bajo invernadero la proporción de callos embriogénicos fue de sólo 9.1, 2.3 y 2.2 %. Las diferencias entre ambientes fueron significativas ($P \leq 0.05$), lo que nuevamente muestra la influencia del genotipo y del ambiente de crecimiento de las plantas, pues la temperatura máxima a cielo abierto fue de 25 °C contra 35 °C en invernadero.

Las proporciones de plantas verdes y fértiles regeneradas *in vitro* también mostraron diferencias debidas al am-

biente en el que se cultivaron las plantas donadoras de anteras, pues con la variedad ‘Glennson’ se obtuvo un promedio de 24.6 % de plantas verdes a cielo abierto, mientras que bajo invernadero sólo se regeneró un promedio de 3 % de plantas (Cuadro 2). En cuanto a las plantas fértiles, el porcentaje fue de 8.6 % en la variedad ‘Glennson’ derivadas de plantas madres que crecieron a cielo abierto, en comparación con 1.3 % de las provenientes de plantas cultivadas en invernadero.

En la evaluación del efecto de los pretratamientos químicos de las plantas donadoras de anteras, se observó que Q-2000® y Maxi-Grow®, no mejoraron la formación de callos embriogénicos (Cuadro 3). En cambio, Humigen Plus® incrementó en cinco veces los porcentajes en comparación con el testigo (7.6/1.5) cuando se aplicó sobre plantas de la línea ‘Country 1’, y tres veces (13.3/4) cuando se aplicó a las plantas de la línea ‘Country 5’. El tratamiento con Humigen Plus® incrementó la regeneración de plantas verdes de 0.3 a 0.6 % en los tratamientos testigo a 5.3 % en las plantas tratadas; disminuyó el albinismo de 1.6-3.6 % en los tratamientos testigo a 0.6-0.1 % en las plantas tratadas; e incrementó la fertilidad de 0.1-0.2 % en los tratamientos testigo a 1.8-2.0 % en las plantas tratadas.

Cuadro 1. Respuesta androgénica *in vitro* de 12 líneas híbridas de trigo hexaploide de invierno.

Híbrido	NTA	CE (%)	P V (%)	PA (%)	PF (%)
Sk01 x Gl	367	10.0 a	18.0 a	4.0 cd	4.3 a
Sk02 x Gl	828	8.8 ab	2.7 ef	3.5 d	1.2 cde
Sk03 x Gl	510	8.8 ab	11.0 b	8.0 a	4.3 a
Kr01 x Gl	330	1.5 f	3.5 ef	0 g	2.7 b
Kr02 x Gl	311	9.0 a	2.0 gh	5.5 b	1.0 de
Kr03 x Gl	466	7.7 bc	4.0 e	1.5 e	2.5 bcd
LAD01 x Sal	472	5.7 ef	9.0 c	5.0 bc	2.7 b
LAD02 x Sal	302	6.2 de	5.0 d	1.5 e	2.2 bcd
LAD03 x Sal	890	2.5 f	1.2 h	0.2 g	1.0 de
LAD04 x Sal	712	4.6 e	3.5 ef	1.2 ef	2.0 bcde
Obry01 x Sal	920	5.6 ef	1.5 h	1.7 e	0.7 e
Obry02 x Sal	232	7.3 cd	5.7 d	2.2 e	2.0 bcde

Medias con letra diferente en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.01). NTA = Número total de anteras en estudio; CE = Porcentaje de callos embriogénicos; PV = Porcentaje de plantas verdes; PA = Porcentaje de plantas albinas; PF = Porcentaje de plantas fértiles.

Cuadro 2. Respuesta de las anteras cultivadas *in vitro* provenientes de cinco variedades de trigo crecidas en condiciones de campo o de invernadero.

Variedad	NTA	CE (%)	P V (%)	PA (%)	PF (%)
Plantas derivadas de anteras de plantas de trigo que crecieron en campo a cielo abierto					
‘Glennson’	470	19.0 a	24.6 a	5.6 a	8.6 a
‘Salamanca’	202	4.6 b	3.3 b	1.0 bc	1.6 d
‘Temporalera’	230	4.3 b	2.3 b	1.6 b	1.0 bc
‘Verano’	100	0 c	0 b	0 c	0 c
‘Saturno’	90	0 c	0 b	0 c	0 c
Plantas derivadas de anteras de plantas de trigo que crecieron en invernadero					
‘Glennson’	307	9.1 a	3.0 a	2.3 a	1.3 a
‘Salamanca’	253	2.3 a	1.3 b	0.3 b	0.6 b
‘Temporalera’	226	2.2 a	1.3 b	1.0 b	0.3 c
‘Verano’	97	0 b	0 c	0 b	0 c
‘Saturno’	80	0 b	0 c	0 b	0 c

Medias con letra diferente en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey 0.01). NTA = Número total de anteras en estudio; CE = Porcentaje de callos embriogénicos; PV = Porcentaje de plantas verdes; PA = Porcentaje de plantas albinas; PF = Porcentaje de plantas fértiles.

Estos resultados coinciden con los reportados por Picard *et al.* (1987) y por Hewstone *et al.* (1992), quienes con Hybrex®, un agente similar al Ethrel®, indujeron androesterilidad o dimorfismo en la androgénesis, y así lograron incrementar en 10 veces la formación de plantas verdes en comparación con el testigo. Tales resultados implican que con el uso del ácido húmico se lograron incrementos de 25 y de casi 9 veces en la regeneración de plantas verdes y fértiles a partir del cultivo *in vitro* de anteras de trigo, aunque debe tenerse en cuenta que la respuesta tiene un componente genético. Es decir, el ácido húmico constituye una alternativa prometedora para incrementar la respuesta de las anteras de trigo al cultivo *in vitro*. Este efecto del ácido húmico puede deberse al efecto auxínico reportado por otros autores (Canellas *et al.*, 2002). Su efecto promotor de la androgénesis podría deberse también a la estimulación del crecimiento de las plantas donadoras y a un mayor vigor de las mismas, como se ha reportado en varios cultivos (Atiyeh *et al.*, 2002; Arancon *et al.*, 2003), lo cual podría favorecer también un mejor desarrollo de las anteras y un consecuente incremento en la capacidad de regeneración de plantas.

En el estudio de la correlación entre el ancho de las hojas de las plantas de trigo derivadas del cultivo de anteras y su fertilidad en etapa adulta, se encontraron los siguientes valores: KrGI01, $r = 0.67^*$; KrGI01Cu, $r = 0.80^{**}$; KrGI02, $r = 0.77^{**}$; KrGI02Cu, $r = 0.73^{**}$; KrGI03, $r = 0.73^{**}$; KrGI03Cu, $r = 0.41^{NS}$; KrGI0, $r = 0.57^*$; KrGI04Cu, $r = 0.51^*$. En siete de los ocho genotipos, el coeficiente de correlación (r) fue mayor a 0.5, por lo que en la mayoría de los genotipos se podría utilizar al ancho de la hoja como una característica indicadora de la fertilidad de las plántulas procedentes del cultivo *in vitro* de anteras de trigo.

CONCLUSIONES

El cultivo *in vitro* de anteras de plantas provenientes de cruces entre trigos rusos de invierno recalcitrantes al cultivo *in vitro* de anteras, y trigos mexicanos de primavera con respuesta positiva al cultivo de anteras, fue eficiente y confirmó el control genético de las respuestas diferenciales de las anteras de trigo a la regeneración de plantas.

La condición ambiental a la cual se desarrollaron las plantas de trigo donadoras de anteras, fue un segundo factor importante de control de las respuestas de las anteras cultivadas *in vitro*. La aplicación de ácido húmico a las plantas de trigo 3 d antes de cortar las espigas para la obtención de anteras para el cultivo *in vitro*, promovió la inducción de callos embriogénicos hasta cinco veces más que lo obtenido en plantas no tratadas.

El ancho de las hojas de las plántulas de trigo derivadas del cultivo *in vitro* de anteras, mostró ser eficaz de 41 a 80 % para predecir si las plántulas recién regeneradas serían fértiles o estériles.

BIBLIOGRAFÍA

- Arancon N Q, S Lee, C A Edwards, R Atiyeh (2003) Effects of humic acids from cattle, food and paper-waste vermicomposts on growth of greenhouse plants. *Pedobiologia* 47:741-744.
- Atiyeh R M, S Lee, C A Edwards, N Q Arancon, J D Metzger (2002) The influence of humic acids derived from earth-worm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technol.* 84:7-14.
- Canellas L P, F L Olivares, A L Okorokova-Facanha, A R Facanha (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H^+ -ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol.* 130:1951-1957.
- Cistué L, M Soriano, A M Castillo, M P Vallés, J M Sanz, B Echávarri (2006) Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep.* 25:257-264.

Cuadro 3. Efecto del Q-2000®, Maxi-Grow® y Humigen Plus® sobre la formación *in vitro* de embriones procedentes de anteras de las líneas experimentales de trigo 'Country 1' (C1) y 'Country 5' (C5).

Tratamiento	NTA	CE (%)	PV (%)	PA (%)	PF (%)
C1 Testigo	1128	1.5 d	0.3 cd	1.6 b	0.1 c
C 1 + Q-2000®	470	1.3 d	4.6 b	0.1 d	0.4 c
C1 + Maxi-Grow®	282	0.6 e	0 d	1.6 b	1.1 b
C1 + Humigen Plus®	974	7.6 b	5.3 a	0.6 c	1.8 a
C5 Testigo	744	4.0 c	0.6 c	3.6 a	0.2 c
C5 + Q-2000®	465	1.3 d	0 d	0.3 cd	0 c
C5 + Maxi-Grow®	558	0.3 e	0 d	0 d	0 c
C5 + Humigen Plus®	744	13.3 a	5.3 a	0.1 d	2.0 a

Medias con letra diferente en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey 0.01). NTA= Número total de anteras en estudio; CE = Porcentaje de callos embriogénicos; PV = Porcentaje de plantas verdes; PA = Porcentaje de plantas albinas; PF = Porcentaje de plantas fértiles.

- Delfine S, R Tognetti, E Desiderio, A Alvino (2005)** Effect of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. *Agron. Sustain. Dev.* 25:183-191.
- Dogramaci-Altuntepe M, T S Peterson, P P Jauhar (2001)** Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization. *J. Hered.* 92:56-64.
- Ghaemi M, A Sarrafi, G Alibert (1994)** The effects of silver nitrate, colchicine, cupric sulfate and genotype on the production of embryoids from anthers of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36:355-359.
- Haliloglu K, P S Baenziger (2003)** The effects of age and size of wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture-derived embryos on regeneration of green and albino plantlets. *Israel J. Plant Sci.* 51:207-212.
- Hewstone O N, C Nich, M C Hewstone, S C Muñoz (1992)** Uso del gametocida hybex para aumentar la androgénesis en trigo. *Agric. Téc. (Chile)* 52:101-104.
- Jauhar P P, M Dogramaci-Altuntepe, T S Peterson, A B Almouslem (2000)** Seedset on synthetic haploids of durum wheat: cytological and molecular investigations. *Crop Sci.* 40:1742-1749.
- Konieczny R, A Z Czaplicki, H Golczyk, L Przywara (2003)** Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 73:177-187.
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Orlov P A, E B Mavrishcheva, A N Palilova (1993)** Estimation of the response to anther culturing in 60 genotypes of different wheat species. *Plant Breed.* 111:339-342.
- Orshinsky B R, R S Sadasivaiah (1997)** Effect of plant growth conditions, plating density, and genotype on anther culture response of soft white spring wheat hybrids. *Plant Cell Rep.* 16:758-762.
- Ouyang J W, D G He, G H Feng, S E Jia (1987)** The response of anther culture temperature varies with growth conditions of anther-donor plants. *Plant Sci.* 49:145-148.
- Picard E, C Hours, S Gregoire, T H Phan, J P Meunier (1987)** Significant improvement of androgenetic haploid and doubled haploid induction from wheat plants treated with a chemical hybridization agent. *Theor. Appl. Gen.* 74:289-297.
- Saidi N, S Cherkaoui, A Chlyah, H Chlyah (1997)** Embryo formation and regeneration in *Triticum turgidum* ssp. Durum anther culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51:27-33.
- Szakacs E, I Karsai, Z Bedo, B Barnabas (2002)** *In vitro* androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.): theory and practice. *No-venytermeles* 51:603-612.
- Zhang X, E Ervin, G Evanylo, C Sherony, C Peot (2005)** Biosolids impact on tall fescue drought resistance. *J. Resid. Sci. Technol.* 2:173-180.