

CULTIVO DE ANTERAS EN TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa* Brot.)

L. Ortuño-Olea; A. Manzo-González; A. Peña-Lomelí

Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. C.P. 56230, Chapingo, Edo. de México.

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el fin de explorar la posibilidad de obtener plantas haploides, las cuales, después de ser duplicado su número cromosómico puedan ser utilizadas en el mejoramiento genético, para lo cual se estableció una metodología básica para el cultivo *in vitro* de anteras de tomate de cáscara. Se probaron tres medios de cultivo sólidos: Murashige y Skoog (1962) (MS), Chu (1981) (N6) y Nitsch y Nitsch (1969) (NN); 2 tipos de agar: (agar-agar de "Merck" y Gelgro de "ICN"); sacarosa a 1, 3, 6, 12 y 15%; así como diferentes concentraciones de auxinas: ácido indolacético (AIA), ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4- D) y citocininas: benziladenina (BA), kinetina (Ki). La formación de plantas fue posible después de seis semanas en el medio N6 suplementado con vitaminas, myo-inositol 100 mg·litro⁻¹, sacarosa 3, Gelgro 0.4% y AIA 0.06 mg·litro⁻¹. La tasa de respuesta de las anteras fue del 7.6% y las plantas obtenidas fueron diploides (2n=24) y mixoploides (n=12, 2n=24, 3n=36 y 4n=48).

PALABRAS CLAVE: Haploides, medios de cultivo, reguladores del crecimiento, cultivo de tejidos, *in vitro*.

ANTHER CULTURE IN HUSK TOMATO (*Physalis ixocarpa* Brot.)

SUMMARY

In order to explore the success in obtaining haploid plants, which once duplicated the chromosome number they can be used in plant breeding, a basic methodology was established for *in vitro* anther culture of husk tomato. Murashige and Skoog (1962) (MS), Chu (1981) (N6) and Nitsch and Nitsch (1969) (NN) solid media; two kinds of agar (agar-agar "Merck" and Gelgro "ICN"); 1, 3, 6, 12 and 15% sucrose and different cytokinin (kinetin and benziladenine) and auxin (indolacetic acid and 2,4- dichlorofenoxiacetic acid) combinations were tested. Plantlets were obtained within six weeks of culture on N6 medium supplemented by vitamins, 100 mg·litro⁻¹ myo-inositol, 3% of sucrose, 0.4% of Gelgro and 0.06 mg·litro⁻¹ of indolacetic acid. The anthers gave rise to plantlets in 7.6% and they were diploid (2n=24) and mixoploid (n=12, 2n=24, 3n=36 and 4n=48).

KEY WORDS: Haploids, culture medium, growth regulators, tissue culture, *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de anteras es una de las técnicas más sencillas para obtener callo, embriones y plantas haploides derivadas de las microsporas en un tiempo relativamente corto. La duplicación de cromosomas de las plantas haploides mediante la aplicación de colchicina en las etapas tempranas del desarrollo permite obtener diploides, los cuales pueden ser utilizados para producir líneas isogenéticas en una o dos generaciones, mientras que a través de los métodos convencionales de mejoramiento se requieren numerosos ciclos de autofecundación para obtenerlas.

En 1964, Guha y Maheshwari descubrieron que el polen de *Datura innoxia* podría ser modificado en su crecimiento normal hacia la formación de embriones, por el

simple hecho de cultivarlo intacto dentro de la antera. Desde entonces, la formación de plantas se ha logrado directamente vía androgénesis (formación de embriones a partir de las microsporas) o indirectamente vía callo, en cerca de 200 especies, principalmente de las familias Solanaceae, Gramineae y Cruciferae (Bajaj, 1983.)

El proceso de androgénesis está afectado por numerosos factores, entre los que destacan el genotipo y estado fisiológico de la planta donadora, la etapa de desarrollo de las microsporas, el pretratamiento de las anteras, la composición del medio de cultivo y el ambiente de incubación. Como consecuencia de lo anterior, la principal dificultad en el cultivo de anteras y polen en la mayoría de las especies estudiadas, es la baja frecuencia de plantas producidas (Chu, 1982; Bajaj, 1983). Según Sunderland y Dunwell (1977), algunas Solanáceas presentan

androgénesis en un medio basal simple con vitaminas y concentraciones bajas de sacarosa (2-5 %), la adición de reguladores de crecimiento puede inhibir la respuesta *in vitro* u originar la formación de callo. Asimismo, la etapa de desarrollo de las microsporas más adecuadas para el cultivo de anteras es la de microspora uninucleada, obteniéndose también buenos resultados con microsporas justo antes, durante o justo después de la primera mitosis.

En poblaciones de plantas regeneradas a partir de anteras cultivadas, no sólo llegan a obtener haploides, también es común la formación de no haploides (incluyendo diploides, poliploides y aneuploides). Tanto en especies que muestran embriogénesis directa, como en aquellas que producen callo (Chu, 1982; Bajaj, 1983).

George y Rao (1979), al cultivar anteras de *Physalis minima*, obtuvieron solamente plantas triploides ($3n=72$). La respuesta de las anteras (16.7%) se logró en el medio MS suplementado con agua de coco 15% y ácido naftalenacético (ANA) $0.1 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$, después de seis semanas en cultivo.

El tomate de cáscara es una planta alógama obligada, característica que dificulta su mejoramiento por métodos tradicionales, encontrándose una gran variedad en cuanto a hábito de crecimiento, color, tamaño, forma y firmeza del fruto, precocidad y rendimiento (Peña y Márquez, 1990). El cultivo de anteras de esta especie podría permitir el uso de diploides homocigotos, con objeto de iniciar un programa de mejoramiento por hibridación. Partiendo de lo anterior, los objetivos del presente trabajo fueron el generar una metodología para el cultivo de anteras en tomate de cáscara, así como analizar el estado de ploidía de las plantas obtenidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los medios de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS), Chu (1981) (N6) y Nitsch y Nitsch (1969) (NN) se prepararon mezclando los componentes inorgánicos, vitaminas (glicina $2.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$, tiamina-HCl $0.5 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$, piridoxina-HCl $0.5 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$, ácido nicotínico $0.5 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$, ácido fólico $0.5 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$), myo-inositol $100 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ y sacarosa $30 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$. El pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 . Se utilizaron botones florales de plantas de tomate cultivadas en invernadero. El tomate utilizado fue el cultivar Rendidora.

Se determinó la etapa de desarrollo de las anteras mediante el método de tinción con acetocarmín, el cual en su forma básica consistió en el aplastado de las anteras teñidas con una solución de acetocarmín sobre un portaobjetos y se observó al microscopio óptico a 400x seleccionando los botones de 3 y hasta 5 mm de longitud que presentaran anteras con microsporas en etapa uninucleada. Los botones de estos tamaños se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 15 minutos.

El material se mantuvo todo el tiempo en una solución antioxidante para disminuir el efecto de oscurecimiento u oxidación de las anteras, la cual estuvo formada por ácido cítrico $150 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$, ácido ascórbico $100 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ y L-cisteína $25 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$. Se establecieron 10 anteras por frasco de cultivo, manteniéndose bajo un fotoperíodo de 16 horas y una intensidad lumínica de $135 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y a $25\pm 2^\circ\text{C}$.

Los factores en estudio fueron:

- Medios de cultivo: MS, NN y N6.
- Tipos de agar: agar-agar "Merck" 0.8% y Gelgro "ICN" 0.4 %.
- Sacarosa: 1, 3, 6, 12 y 15%.
- Reguladores de crecimiento: Ácido indolacético (AIA); benciladenina (BA); kinetina (K); ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D).

AIA	(testigo, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$)
AIA	(0, 0.1 y $1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$)+BA (0, 0.1 y $1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$)
AIA	(0, 0.1 y $1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$)+Ki (0, 0.1, 1· y $3.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$)
ANA	(0, 0.001 y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$)+BA (0, 0.1 y $1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$)
ANA	(0, 0.001 y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$)+Ki (0, 0.1, 1· y $3.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$)
2,4-D	(0, 0.1 y $1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$)+Ki (0, 0.1, 1· y $3.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$)
K	(0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y $1.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$)

En los experimentos se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones (sólo 5 en los medios con reguladores de crecimiento), en un arreglo factorial de tratamientos.

Para determinar el nivel de ploidía de las plantas obtenidas *in vitro* se utilizó la metodología señalada por Curtis (1981).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Oxidación de anteras

Un gran porcentaje de las anteras en cultivo presentó oscurecimiento con gran facilidad, designándose como oxidación a la aparición de un color marrón en el tejido de las anteras. Las anteras con oscurecimiento perdieron su turgencia y su color verde en los primeros días en cultivo, adquiriendo finalmente una coloración pardusca. Según Bidwell (1979), los cambios de coloración en el tejido son típicos de una respuesta "al daño", en esta reacción está involucrada la enzima polifenol oxidasa, la cual oxida a los fenoles, produciendo quinonas, compuestos tóxicos e insolubles de color marrón. Esta reacción es importante en la respiración pero también puede estar activa en la senescencia. Partiendo de lo anterior y del

hecho de que en ninguno de los experimentos realizados se observó algún tipo de respuesta en las anteras con oscurecimiento, se consideró a este tejido como dañado. Las anteras que no sufrieron el fenómeno anterior adquirieron una coloración blanca, aumentando de tres a cinco veces su tamaño inicial.

Medios de cultivo

Ninguno de los tres medios probados, MS, NN y N6 en su forma basal (sales inorgánicas), fue capaz de promover algún tipo de respuesta en las anteras. En relación al oscurecimiento de las anteras, se encontraron diferencias significativas dependiendo del medio de cultivo utilizado. El medio N6 fue el que presentó menor número de anteras oxidadas (Cuadro 1). Esta diferencia puede deberse a que el medio N6 (Chu, 1981) contiene menos nitrógeno en forma de amonio ($463 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ de sulfato de amonio), que los medios MS ($1650 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ de nitrato de amonio) y NN ($720 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ de nitrato de amonio), lo cual puede indicar toxicidad del amonio para las anteras de tomate de cáscara.

CUADRO 1. Número de anteras de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) oxidadas en tres medios de cultivo.

Medios de Cultivo	Media
Murashige y Skoog (1962)	5.05 a ^z
Nitsch y Nitsch (1969)	5.40 a
Chu (1981)	3.05 b

^z Medias con la misma letra dentro de columnas no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P=0.05$).

Tipos de agar

No se detectaron diferencias significativas en el uso de agar "Merck" o de agar "Gelgro" para un mismo medio de cultivo, respecto al número de anteras oxidadas. No obstante, la interacción entre medios de cultivo y tipo de agar si fue estadísticamente diferente (Cuadro 2). En los medios con agar "Gelgro", la respuesta en la oxidación de las anteras fue mas notoria ya que resultó ser el que produjo menos anteras con oscurecimiento en promedio, para el medio N6 y no siendo así para MS, siendo el más recomendable para el cultivo de anteras de la especie en estudio usando el medio N6.

CUADRO 2. Número de anteras de *Physalis ixocarpa* Brot. con oxidación en los medios de cultivo MS, N6 y NN, para cada marca de agar.

Marca de Agar	MEDIO DE CULTIVO		
	Murashige y Skoog (1962)	Chu (1981)	Nitsch y Nitsch (1969)
Agar "Merck"	4.4 b ^z	3.7 a	5.3 a
Agar "Gelgro"	5.7 a	2.4 b	5.5 a

^z Medias con la misma letra dentro de columnas no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P=0.05$). Diferencia mínima significativa=1.1.

Sacarosa

La diferentes concentraciones de sacarosa empleadas, no tuvieron efecto alguno sobre la inducción de respuestas en las anteras, en ninguno de los medios de cultivo probados. El análisis de varianza para la oxidación u oscurecimiento de las anteras, mostró diferencias significativas entre las concentraciones de sacarosa probadas en los diferentes medios de cultivo (Cuadro 3). El medio N6 fue el que produjo menos anteras con oscurecimiento en promedio, en comparación con los medios MS y NN (Cuadro 3). Por otro lado, el oscurecimiento en los medios con sacarosa al 1, 3 y 6% fue significativamente menor que en los medios con sacarosa al 12 y 15% (Cuadro 4). Este último podría explicarse considerando que durante la esterilización del medio de cultivo se produce la degradación de la sacarosa, formándose un compuesto tóxico, que puede inhibir la embriogénesis (Sunderland y Dunwell, 1977; Margara, 1988). Por lo tanto, en los medios con concentraciones altas de sacarosa podría acumularse dicho compuesto, promoviendo un daño a las anteras, lo cual se traduciría en un mayor oscurecimiento del tejido.

CUADRO 3. Número de anteras de *Physalis ixocarpa* Brot. con oxidación en tres medios de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa.

Medios de Cultivo	Sacarosa (%)	Oxidación (%)
Murashige y Skoog (1962)	1	80.5
	3	83.3
	6	91.5
	12	94.3
	15	93.5
Nitsch y Nitsch (1969)	1	56.9
	3	66.6
	6	65.2
	12	85.7
	15	88.6
Chu (1981)	1	84.6
	3	80.5
	6	76.2
	12	95.1
	15	97.9

CUADRO 4. Número de anteras de *Physalis ixocarpa* Brot. con oxidación en diferentes concentraciones de sacarosa *in vitro*.

Sacarosa (%)	Medias
15	6.73 a ^z
12	6.60 a
6	5.60 b
3	5.53 b
1	5.33 b

^z Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P=0.05$); Diferencia mínima significativa=0.75.

Reguladores de crecimiento

Los únicos tratamientos que promovieron la respuesta *in vitro* de las anteras fueron los tratamientos con reguladores de crecimiento. La principal respuesta obtenida fue la formación de callo, y en menor medida la androgénesis de las anteras; en ambos casos, debido a la poca respuesta del tejido, no fue posible realizar un tratamiento estadístico de la información. Los Cuadros 5 y 6 muestran la respuesta de las anteras de tomate de cáscara en el medio N6 con diferentes concentraciones de auxinas y citocininas. Puede verse que la formación de callo fue muy variable en los diferentes tratamientos, excepto en el caso del medio con ANA 0.1 mg·litro⁻¹ + BA 1.0 mg·litro⁻¹, el cual parece ser el más adecuado para inducir la formación de callo en las anteras (Cuadro 6). En general, el callo obtenido fue de color verde o color crema, presentando un crecimiento rápido y una consistencia principal friable, aunque también se obtuvieron callos compactos.

En el medio con AIA 1.0 mg·litro⁻¹ se presentó formación de raíces mientras que en el medio con 2,4-D 1.0 mg·litro⁻¹ + BA 0.1 mg·litro⁻¹ se presentaron raíces sin formación de callo; estas respuestas fueron claramente inducidas por la concentración de auxina. En el caso de las combinaciones con BA 1.0 mg·litro⁻¹ se presentó callo con formación de brotes, independientemente de la concentración de auxinas empleadas; indicando lo anterior que el BA es un regulador de crecimiento importante para inducir la diferenciación del callo. Cabe mencionar que en ninguno de los casos se observó el crecimiento de los brotes, solamente su formación.

La androgénesis de las anteras se logró inducir en el medio N6 con bajas concentraciones de AIA (0.02 ó 0.06 mg·litro⁻¹), así como en el medio con Ki 0.6 mg·litro⁻¹. Las plantas formadas fueron normales, con sus dos cotiledones y raíz principal, detectándose a simple vista, después de 6 semanas. La tasa de respuesta fue muy baja, de 7.6% en el medio con AIA 0.06 mg·litro⁻¹ (dos plantas por antera) y alrededor del 4.5% en otros dos casos (una planta por antera). Con el fin de obtener más material para analizar, se repitió la siembra de anteras utilizando las concentraciones de reguladores de crecimiento que promovieron la androgénesis, encontrándose que sólo la respuesta en el medio N6 con AIA 0.06 mg·litro⁻¹ fue reproducible. En este segundo establecimiento, las plantas contenidas, fueron anormales, con un solo cotiledón en forma de corola y un hábito de crecimiento múltiple.

En base a los resultados obtenidos, se concluyó que AIA es necesario a bajas concentraciones, (0.06 mg·litro⁻¹), para inducir la androgénesis de las anteras de tomate de cáscara. Asimismo, puede señalarse que al igual que en otras especies de Solanáceas (Sunderlan y Dunwell, 1977), se logró inducir la androgénesis en un medio basal simple (N6), con vitaminas y una concentración baja de sacarosa (3%).

CUADRO 5. Respuesta de las anteras de *Physalis ixocarpa* Brot. en el medio N6 con diferentes concentraciones de AIA + Ki y AIA + BA.

AIA (mg·litro ⁻¹)	Citocinina (mg·litro ⁻¹)	Anteras sembradas	Anteras con callo ^z	Otro tipo de respuesta ^y
-	-	21	1 (4.7)	
0.02	-	19	3 (15.8)	Planta completa
0.04	-	22	4 (18.2)	
0.06	-	26	5 (19.2)	Planta completa
0.08	-	21	4 (19)	
-	0.1	23	0	
-	0.2	21	1 (4.7)	
-	0.4	21	0	
-	0.6	23	1 (4.3)	Planta completa
-	0.8	21	0	
-	1.0	24	4 (16.6)	
-	3.0	26	2 (7.7)	
0.1	-	16	0	
0.1	0.1	21	1 (4.7)	
0.1	0.1	21	1	
0.1	3.0	22	0	
1.0	-	24	1 (4.2)	Callo con raíces
1.0	0.1	18	1 (5.5)	
1.0	1.0	20	4 (20)	
1.0	3.0	18	2 (11.1)	
-	0.1	18	3 (16.6)	
-	1.0	27	4 (14.8)	Callo con yemas
0.1	0.1	24	2 (8.3)	
0.1	1.0	19	0	
1.0	0.1	23	8 (34.8)	
1.0	1.0	13	6 (46.1)	Callo con yemas

^z Los números enteros entre paréntesis son porcentajes de formación de callo.

^y La respuesta se evaluó seis semanas después de la siembra

CUADRO 6. Respuesta de las anteras de *Physalis ixocarpa* Brot. en el medio N6 con diferentes concentraciones de ANA+Ki, ANA+BA y 2,4-D+ BA.

Auxina (mg·litro ⁻¹)	Citocinina (mg·litro ⁻¹)	Anteras sembradas	Anteras con callo ^z	Otro tipo de respuesta ^y
0.001	-	23	3 (13)	
0.001	0.1	27	1 (3.7)	
0.001	1.0	27	2 (7.4)	
0.001	3.0	24	1 (4.1)	
0.1	-	25	0	
0.1	0.1	25	0	
0.1	1.0	22	1 (4.5)	
0.1	3.0	30	0	
0.001	-	19	3 (15.8)	
0.001	0.1	21	3 (14.3)	
0.001	1.0	24	2 (8.3)	Callo con yemas
0.1	-	21	5 (23.8)	
0.1	0.1	20	5 (25)	
0.1	1.0	22	15 (68.2)	Callo con yemas
0.1	-	24	2 (8.3)	
0.1	0.1	21	2 (9.5)	
0.1	1.0	24	3 (12.5)	
0.1	3.0	26	0	
1.0	-	24	1 (4.16)	
1.0	0.1	26	0	Raíces
1.0	1.0	25	0	
1.0	3.0	24	0	

^z Los números entre paréntesis son porcentajes de formación de callo.

^y La respuesta se evaluó seis semanas después de la siembra

Análisis citológico de las plantas obtenidas

El análisis de la ploidía de las plantas obtenidas, demostró que en el caso de las plantas normales, estas fueron diploides, con 24 cromosomas. La explicación a lo anterior puede darse considerando dos opciones: (1) Que las plantas se formaron a partir de algún tejido diploide de la antera como puede ser el tejido conectivo, medio, filamento, epidermis, endotecio o tapete, ó (2) Que provienen del tejido haploide de las microsporas y doblaron su número cromosómico en forma espontánea, durante algún momento de su desarrollo.

Los haploides doblados en forma espontánea, se han detectado en especies como cebada (Islam *et al.*, 1992) y arroz (Guiderdoni *et al.*, 1992).

Las plantas anormales, obtenidas en la segunda siembra con AIA $0.06 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$, fueron mixoploides, con 12, 24, 36 y 48 cromosomas en sus células. En base a este resultado podemos apoyar la idea del origen haploide de las plantas obtenidas *in vitro* y su posterior doblamiento de cromosomas, en forma espontánea.

CONCLUSIONES

Se logró establecer una metodología preliminar para el cultivo *in vitro* de anteras de tomate de cáscara, obteniéndose plantas diploides ($2n=24$) y mixoploides ($n=12$, $2n=24$, $3n=36$ y $4n=48$) después de seis semanas en cultivo. El medio de cultivo más adecuado fue el N6 con vitaminas completas (Glicina $2.0 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$, tiamina-HCl $0.5 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$, ácido nicotínico $0.5 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$, ácido fólico $0.5 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ y biotina $0.05 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$, myo-inositol $100 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$, sacarosa 3%, "Gelgro" 0.4% y AIA $0.06 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$).

LITERATURA CITADA

- BAJAJ, Y.P.S. 1983. *In vitro* production of haploids, pp. 228-287. *In: Handbook of Plant Cell Culture*. Vol. I. D.A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato y Y. Yamada (eds.). McMillan Pub. Co. New York. USA.
- BIDWELL, R.G.S. 1979. *Plant Physiology*. McMillan Pub. Co., Inc. New York. USA. pp. 128-129.
- CURTIS, J. 1981. Manual para la elaboración de preparaciones cromosómicas en plantas. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Méx. pp. 32-33.
- CHU, C.C. 1981. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. pp. 35-42. *In: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture, 1978*. Pitman Pub. Ltd. and The Science Press. Peking, China.
- CHU, C.C. 1982. Haploids in plant improvement. pp. 12-158. *In: Plant Improvement and Somatic Cell Genetics*. I.K.Vasil, W.R. Scowcroft y K.J. Frey (eds.). Academic Press Inc., Florida, USA.
- GEORGE, L.; RAO, P.S. 1979. Experimental induction of triploid plants of *Physalis* through anther culture. *Protoplasma* 100:13-19.
- GUHA, S.C.; MAHESHWARI, S.C. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204:497.
- GUIDERDONI, E.; GALINATO, E.; LUISTRO, J.; VERGARA, G. 1992. Anther culture of tropical japonica times indica hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 62(3):219-224.
- ISLAM, M.R.; KINTZIOS, S.; FISCHBECK, G. 1992. Anther culture responsiveness of *Hordeum spontaneum* derived spring barley lines and a genetic analysis of plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29(3):235-239.
- MARGARA, J. 1988. *Multiplicación Vegetal y Cultivo in vitro*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 171-197.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- NITSCH, J.P.; NITSCH, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85-87.
- PEÑA, L. A.; MARQUEZ S., F. 1990. Mejoramiento genético de tomate de cáscara. *Revista Chapingo* 71-72:84-88.
- SUNDERLAND, N.; DUNWELL, J.M. 1977. Anther and pollen culture. pp. 223-265. *In: Plant Tissue and Cell Culture*. H.E. Street (ed.). University of California Press, California, USA.