

**RESCATE DE EMBRIONES *IN VITRO* EN ZACATE BÚFALO  
[*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.] Y EVALUACIÓN DE  
HÍBRIDOS INTERPLOIDALES**

**SIGIFREDO ARMENDÁRIZ ERIVES**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN  
FITOMEJORAMIENTO**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”**



**PROGRAMA DE GRADUADOS**

**Buenavista Saltillo, Coahuila,  
México.**

**Febrero 3 del 2011.**

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

## DIRECCIÓN DE POSTGRADO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS EN FITOMEJORAMIENTO

Tesis

### RESCATE DE EMBRIONES *IN VITRO* EN ZACATE BÚFALO [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.] Y EVALUACIÓN DE HÍBRIDOS INTERPLOIDALES

Por:

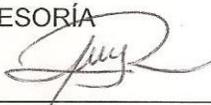
**SIGIFREDO ARMENDÁRIZ ERIVES**

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y Aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

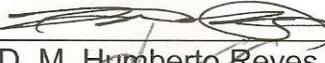
DOCTOR EN CIENCIAS EN FITOMEJORAMIENTO

COMITÉ PARTICULAR DE ASESORÍA

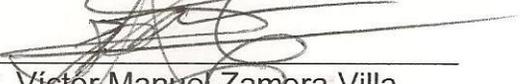
Asesor Principal

  
Ph.D. Juan Manuel Martínez Reyna

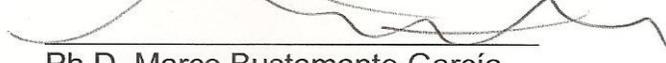
Asesor

  
Ph.D. M. Humberto Reyes Valdés

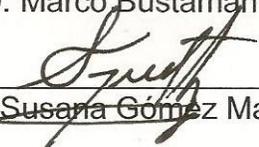
Asesor

  
Dr. Víctor Manuel Zamora Villa

Asesor

  
Ph.D. Marco Bustamante García

Asesor

  
Dra. Susana Gómez Martínez

  
Dr. Fernando Ruíz Zárate  
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Febrero 3 del 2011.

## DEDICATORIA

A mis seres queridos, que siempre han sido estímulo para seguir adelante, a ellos con todo el amor que se merecen, y un sincero reconocimiento:

### **A MI ESPOSA:** *Blanca Estela Cisneros Díaz*

Porque juntos hemos labrado el futuro de nuestra familia, porque gracias a su apoyo y confianza se han vencido obstáculos que han permitido alcanzar nuestras metas. No hay palabras para expresar el amor de pareja como esposos.

### **A MIS HIJOS:** *Blanca Nereida*

*Anay*

*Sigifredo*

Gracias por ser el tesoro divino que dios me ha dado, por darme la oportunidad de formarlos y por ese gran amor que siempre han mostrado.

### **A MIS PADRES:** *Jesús Manuel*

*Eva Eugenia †*

A quienes agradezco su amor, por ser siempre el estímulo para seguir adelante y no dejarme solo en los momentos difíciles desde mi infancia, ayudando a vencer obstáculos para seguir por el camino del bien con el fin de lograr mi superación personal.

### **A MIS HERMANOS:** *Jesús Manuel*

*Alma Leticia*

*Ramón*

*Horacio*

*Erasmo*

*Nancy*

*Refugio Hugo (†)*

*Mayte*

Con todo el cariño, porque juntos hemos disfrutado de muchos momentos inolvidables desde nuestra niñez. Por confiar en ellos mis problemas y tenderme la mano de manera desinteresada.

## AGRADECIMIENTOS

A la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma Chapingo, por todo su apoyo en los diferentes aspectos para desarrollar mis estudios de Doctorado en Ciencias.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), por brindarme sus espacios y todo el apoyo requerido en mi formación profesional para lograr los estudios de Doctorado en Fitomejoramiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico durante mis estudios.

Al Ph.D. Juan Manuel Martínez Reyna, gracias por su apoyo en la conducción y acertadas correcciones en el trabajo de esta investigación, gracias por sus enseñanzas como maestro y por encontrar en usted una gran amistad.

Ph.D. M. Humberto Reyes Valdés, gracias por todo el apoyo en enseñanzas y sugerencias para la realización de este trabajo, por generar una disciplina al mostrar un carácter firme y recio para cumplir con compromisos y obligaciones como maestro.

Dr. Víctor Manuel Zamora Villa, por ser un gran maestro, gracias por sus sugerencias para la culminación del escrito final de la tesis.

Ph.D. Marco Bustamante García, gracias por sus acertadas correcciones y conducción de la tesis.

Dra. Susana Gómez Martínez, por ser una gran amiga gracias por brindarme su amistad y hacer más amena mi estancia durante mis estudios. Además de sus sugerencias y acertadas correcciones en la revisión de la tesis.

M.C. Leticia Escobedo Bocado, por dar las facilidades para el trabajo de cultivo *in vitro* en el laboratorio de biotecnología.

Al Sr. Pedro por su apoyo en el trabajo de campo e invernadero.

Armando, Mezquitic y Cárdenas compañeros de doctorado, con quienes se compartieron momentos de intenso trabajo pero también momentos de relax.

# ÍNDICE DEL CONTENIDO

Pág.

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>I INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Objetivos.....	3
Hipótesis.....	4
<b>II REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
Descripción Morfológica.....	5
Importancia Como Césped.....	7
Niveles de Ploidía.....	8
Mejoramiento Genético en plantas.....	10
Mejoramiento Genético del Zacate Búfalo.....	11
La respuesta al Desarrollo <i>In Vitro</i> .....	12
Rescate de Embriones.....	14
Desarrollo del Embrión y Balance en el Número del Endospermo (EBN) .....	17
Aspectos Ecológicos que Determinan Expresión de Sexo en Zacate Búfalo.....	20
<b>III MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	22
Localización del experimento.....	22
Material vegetal.....	22
Desarrollo del embrión en cruza interploidales.....	23
Etapas del Cultivo <i>In Vitro</i> de Embriones.....	24
Etapa I. Establecimiento del cultivo aséptico. ....	24

Etapa II. Multiplicación. ....	25
Etapa III. Enraizamiento.....	26
Incremento del Material Vegetativo.....	27
Caracterización morfológica.....	28
Análisis estadístico.....	29
Análisis de Componentes Principales (ACP).....	30
<b>IV RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	<b>32</b>
Análisis de varianza.....	32
Análisis de componentes principales (ACP).....	33
Desarrollo del embrión.....	36
Cultivo <i>in vitro</i> .....	40
Etapa I. Establecimiento del cultivo aséptico. ....	41
Etapa II. Multiplicación. ....	44
Etapa III. Enraizamiento.....	46
Análisis de componentes principales (ACP).....	47
Agrupación de los materiales.....	53
<b>V CONCLUSIONES</b> .....	<b>56</b>
<b>VI RESUMEN</b> .....	<b>58</b>
<b>VII LITERATURA CITADA</b> .....	<b>60</b>
<b>VIII APÉNDICE</b> .....	<b>65</b>

## INDICE DE CUADROS

No.	TITULO	Pág.
3.1	Nivel de ploidía (NP) y características de ubicación cada colecta en 33 materiales evaluados de zacate búfalo ( <i>Buchloe dactyloides</i> ).....	23
3.2	Tratamientos y concentración de reguladores de crecimiento utilizados en la etapa de multiplicación.....	26
3.3	Tratamientos y concentración de reguladores de crecimiento utilizados en la etapa de enraizamiento .....	27
3.4	Identificación de las variables utilizadas, unidad de medición y su forma de evaluarse.....	29
4.1	Coeficiente de correlación de las variables morfológicas y de calidad de césped con tres componentes.....	34
4.2	Tipos de semillas que se obtuvieron en algunas cruzas de materiales de zacate búfalo, así como su posible nivel de ploidía....	39
4.3	Materiales evaluados como progenitores y los híbridos F1 resultantes.....	40
4.4	Resultados de la comparación de medias en el número de brotes (NB) y longitud de brotes (LB), en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de zacate búfalo.....	45
4.5	Resultados de la comparación de medias en número de raíz (NR), longitud de raíz (LR) y porcentaje de plantas enraizadas (%PE) en la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> de zacate búfalo.....	47
4.6	Coeficientes de correlación de las variables morfológicas y calidad de césped de los primeros tres componentes principales en zacate búfalo ( <i>Buchloe dactyloides</i> ) .....	48
4.7	Agrupación de 17 materiales usando las variables morfológicas de calidad de césped.....	54

8.1	Valores que definen la caracterización morfológica de 33 materiales en los primeros tres componentes.....	66
8.2	Cuadrados medios del ANVA de las variables morfológicas de calidad de césped en progenitores e híbridos F1 de zacate búfalo.....	67
8.3	Comparación en algunas de las variables morfológicas de calidad de césped entre progenitores y los híbridos F1 resultantes de las cruzas.....	68
8.4	Coeficientes de correlación en los tres primeros componentes, al evaluar materiales diploides, triploides, tetraploides, pentaploides y hexaploides de zacate búfalo ( <i>Buchloe dactyloides</i> ).....	71

## INDICE DE FIGURAS

No.	TITULO	Pág.
4.1	Distribución de las variables morfológicas en los primeros dos componentes principales.....	35
4.2	Distribución de genotipos en base a las variables morfológicas en los primeros dos componentes principales.....	36
4.3	Tipos de cariósides producidos en cruzamientos de <i>Buchloe dactyloides</i> : a) con embrión abortivo, b) rugosos y c) normales.....	37
4.4	Desarrollo del cariósido en una cruce interploidal en <i>Buchloe dactyloides</i> , donde el embrión es abortivo: a) 5, b) 15, c) 20, d) 25, e) 30 y c) 35 días después de la polinización.....	38
4.5	Desarrollo de embriones y germinación <i>in vitro</i> de zacate búfalo, donde solo la cruce 2X-RC10 x 4X-B56 proviene de semilla normal y las otras cruces de embriones abortivos y rugosos.....	41
4.6	Respuesta a la germinación (G) y el porcentaje de germinación acumulado (%GA) durante el establecimiento <i>in vitro</i> de embriones de zacate búfalo en 15, 20, 25 y 30 días después de la polinización, en la cruce 2XRC10 x 4XB56.....	44
4.7	Distribución espacial de variables morfológicas y de calidad de césped conforme a los dos primeros componentes principales.....	50
4.8	Distribución espacial de los materiales de zacate búfalo, conforme a los dos primeros componentes principales.....	53
4.9	Grupos generados mediante el análisis de conglomerados usando variables morfológicas de calidad de césped.....	55

## I INTRODUCCIÓN

El género *Buchloe* incluye una sola especie, [*Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm.] conocida como zacate búfalo, es de porte bajo, nativa de las praderas de Norte América, comprende una franja que va desde la parte central de México, se extiende por Estados Unidos en la región conocida como las Grandes Planicies de Norteamérica hasta la parte sur de Canadá.

La investigación sobre los céspedes se ha dado principalmente en Estados Unidos y Europa (Roberts *et al.*, 1992). El césped genera un ambiente confortable y consideran que deben ser protegidos y preservados, ya que además ayudan a la infiltración del agua, amortiguan la temperatura, reducen la erosión provocada por agua y viento y son albergues de la fauna (Watson *et al.*, 1992). Sin embargo, la mayoría de los céspedes requieren de un consumo constante de agua para su mantenimiento, por lo que se enfrentan a un problema mundial que es la disponibilidad de agua.

Ante esta situación, existen recursos nativos de zonas áridas y semiáridas que son una alternativa de solución a dicha problemática. Tal es el caso del zacate búfalo [*Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm.] que es una especie prometedora para césped de bajo mantenimiento y ecológicamente amigable

debido a sus características de resistente a la sequía, a temperaturas extremas, con bajos requerimientos de fertilización nitrogenada y de porte bajo, esto lo hace ser un césped con características apropiadas para las regiones áridas y semiáridas del país y áreas donde el recurso agua empieza a ser una limitante.

*Buchloe dactyloides* posee un número cromosómico básico  $x = 10$ . Los niveles de ploidía más comunes son: diploide, tetraploide y hexaploide. La poliploidía produce una amplia diversidad genética útil para el mejoramiento genético de la especie.

El cruzamiento interploidal es una buena opción para generar híbridos con características favorables. Al combinar los niveles de ploidía, se pueden obtener, triploides, tetraploides y pentaploides. Sin embargo, el mejoramiento tradicional sólo puede ser efectivo en algunas de estas cruzas. En condiciones naturales es casi imposible encontrar algunos de estos niveles de ploidía debido a la malformación del endospermo lo que ocasiona la abortición prematura del embrión y con ello la incapacidad de formar una semilla y por lo tanto un nuevo individuo. Cuando existen cruzas interploidales con la incapacidad del desarrollo del embrión, se tomará como alternativa el rescate de embriones a través del cultivo de tejidos vegetales.

Los materiales híbridos interploidales que se obtengan así como sus progenitores en investigaciones posteriores serán evaluados como césped en diferentes condiciones ambientales, con el fin de poder evaluar si los híbridos

realmente logran superar sus progenitores en adaptación y en calidad para césped.

De esta manera, se ha planteado en esta investigación abordar algunos aspectos que se considera necesario estudiar:

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

- a) Generar híbridos en cruzas interploidales de la especie *Buchloe dactyloides*, mediante cruzamiento convencional y rescate de cariósides inmaduros *in vitro*, y evaluar la calidad de césped de progenitores y de los híbridos obtenidos.

### **Objetivos Particulares**

- a) Caracterizar morfológicamente un grupo de materiales de zacate búfalo (*Buchloe dactyloides*), con el fin de identificar progenitores con características de calidad para césped.
- b) Evaluar el desarrollo del cariósido de cruzas híbridas interploidales de zacate búfalo (*Buchloe dactyloides*), para determinar el tipo de embrión que desarrollan y en caso de embriones abortivos lograr su recuperación *in vitro*.

- c) Determinar las condiciones óptimas del medio de cultivo para el establecimiento y desarrollo de cariósides inmaduros *in vitro* para la obtención de plántulas.
- d) Caracterizar morfológicamente híbridos interploidales y sus progenitores para evaluar su calidad de césped.

### **Hipótesis**

- a) Mediante el rescate de los cariósides inmaduros se pueden obtener materiales híbridos de cruzas interploidales de *Buchloe dactyloides*.
- b) Mediante hibridación se puede reunir en un híbrido interploidal las características de calidad de césped complementarias de cada nivel de ploidía con mayor calidad de césped.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### Descripción Morfológica

La especie *Buchloe dactyloides* también conocida como zacate búfalo o pasto chino, es una planta perenne de estación cálida, dioica y ocasionalmente monoica, de porte bajo y estolonífera (Hernández, 1987). Su altura oscila de 5 a 13 cm y puede llegar a los 30 cm como máximo (Hopper y Nesbitt, 1930). Cantú (1989) establece que la longitud de sus limbos varía en un rango de 2-10 cm y de 1-3 mm de ancho.

La inflorescencia estaminada tiene una panícula elevada de 1-4 ramificaciones espigadas insertadas en forma unilateral, las ramificaciones son erectas de 6 a 14 mm de longitud, cada ramificación contiene dos hileras de espiguillas que varía de 6-12 dispuestas en un raquis, miden de 4 a 5.5 mm de longitud con dos flósculos.

La inflorescencia pistilada consiste de pequeñas espiguillas agrupadas en involucros y están anidadas en la parte hojosa de la planta (Gould y Shaw, 1992). Los involucros son pequeñas estructuras rígidas y duras que contienen

florechillas y están coronados por ápices dentados de color verde que constituyen las glumas.

Las espiguillas pistiladas generalmente con una florecilla encerradas entre las glumas y lemas con tres nervaduras de un color amarillento (Stubbenieck *et al.*, 2003).

Martínez y Armendáriz (2010) describen los cambios morfológicos que pudieron haberse presentado en una inflorescencia hermafrodita de un presunto ancestro, para luego dar origen al dimorfismo sexual que hoy presenta *B. dactyloides*. Para transformarse en la inflorescencia femenina actual, la inflorescencia hermafrodita ancestral tuvo que sufrir los siguientes cambios: reducción del número de espiguillas por ramificación espigada; reducción del espacio entre dichas ramificaciones; alargamiento de las segundas glumas para cubrir totalmente las florecillas; prolongación de las nervaduras central y de las dos laterales para formar los tres ápices dentados que coronan el involucre y aparición de pubescencia en estas glumas; reducción de las primeras glumas; ensanchamiento de las segundas glumas para envolver la florecilla en su totalidad; esterilización masculina de la florecilla hermafrodita; y endurecimiento de las glumas. En cambio, la inflorescencia masculina no debió pasar por grandes transformaciones, ya que morfológicamente es muy similar a las inflorescencias de especies hermafroditas del género *Bouteloua* con las que esta especie está emparentada.

## Importancia Como Césped y Adaptación

Debido a su gran distribución desde la parte centro norte de México y hasta el sur de Canadá es una clara muestra de su gran adaptación a diferentes tipos de suelo aunque se sabe que prefiere suelos arcillo-limosos que se identifican por su gran retención de humedad (Hernández *et al.*, 2007). Además menciona que puede desarrollarse adecuadamente en regiones con precipitaciones de 300 a 600 mm, pero no sucede lo mismo cuando son suelos sombreados

Soporta temperaturas desde muy cálidas y con deficiencia de humedad hasta muy bajas (-22°C), con humedad suficiente (Brede, 2000).

El zacate búfalo es de gran importancia como césped ya que soporta climas con temperaturas extremas, es altamente resistente a la sequía, su requerimiento en fertilización nitrogenada es muy bajo, su porte bajo reduce las podas y consecuentemente los gastos para su mantenimiento disminuyen (Johnson *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2001). Tiene una gran adaptación a muchos tipos de suelo, desde ligeramente ácidos hasta moderadamente alcalinos, prefiere texturas arcillosas, compactadas y profundas (Brede, 2000). Johnson *et al.* (2000) mencionan que el zacate búfalo presenta una gran habilidad para tolerar cortes bajos. Qian *et al.* (2001) realizaron un estudio en zacate búfalo con seis ecotipos para evaluar la resistencia a las heladas, tomando como variables la sobrevivencia de estolones, así como el crecimiento de la raíz y encontraron que los ecotipos 91-118 y Tatanka toleraron hasta -22

°C. Un estudio realizado por Huff *et al.* (1993) indicó que los materiales hexaploides de zacate búfalo toleran más las heladas que los diploides y tetraploides.

Cuando existen deficiencias hídricas en el año o inicia la época de frío esta especie entra en latencia, y reanuda su crecimiento cuando las condiciones hídricas del ciclo la favorecen o bien hasta la temporada de lluvias del siguiente año. Estas características adaptativas y de calidad de césped la hacen ser una especie apropiada para las regiones áridas y semiáridas del país (Hernández *et al.*, 2007).

### **Niveles de Ploidía**

Dentro de la especie *Buchloe dactyloides* se conocen comúnmente tres niveles de ploidía; diploides, tetraploides y hexaploides. Sin embargo, Johnson *et al.* (1998) mencionan que encontraron plantas pentaploides colectadas en la región de Hebron, Nebraska y se consideran los primeros en reportar plantas pentaploides en condición natural. Mientras que en Real de Catorce, San Luis Potosí, se colectó el primer triploide natural, en un área donde coexisten materiales diploides y tetraploides (Martínez, 2008).

El número básico de cromosomas es  $X = 10$ , el contenido de ADN para *Buchloe dactyloides* de acuerdo a los niveles de ploidía varía en diploides, tetraploides, pentaploides y hexaploides con valores de 0.92 a 0.93; 1.66 a 1.82; 2.17 a 2.26 y 2.44 a 2.77 pg respectivamente (Johnson *et al.*, 2001).

Algunas de las ventajas que ofrece zacate búfalo es la gran diversidad genética al presentar materiales diploides, triploides, tetraploides, pentaploides y hexaploides, de tal manera que esta disponibilidad facilita realizar hibridación con el fin de combinar aquellas características que más adapten a una necesidad del mejorador, sea esta para fines de; adaptación a diferente condición de estrés, calidad como césped, calidad como forraje, entre otras que se pueden lograr al disponer de esa diversidad genética que muchos otros pastos no tienen. Además de facilitar al mejorador realizar cruzas de una manera más dirigida ya que son plantas dioicas y al presentar órganos sexuales separados ayuda a una mejor polinización y mayor posibilidad hacia el producto final que se pretende como ideotipo. Ya que los diferentes niveles de ploidía pueden expresarse en el vigor y tamaño de la semilla, tolerancia al frío, establecimiento de la planta y competencia con otras especies (Barker *et al.*, 1998). Hoopes y Plaisted (1987) consideran la adaptación a determinados ambientes como un elemento importante a considerar en un programa de mejoramiento vegetal. Al respecto Nelson (2000) menciona que la condición poliploide proporciona a los clones mejorados una amplia adaptación.

Probablemente en condiciones naturales no implique una desventaja encontrar materiales con diferentes niveles de ploidía, cuando se sabe que son mecanismos de adaptación a las diferentes condiciones de ambiente. Sin embargo, en condiciones *in vitro* las células pueden mostrar diferentes niveles de ploidía dependiendo de los reguladores de crecimiento que se utilicen, como es el caso de cebolla donde se evaluaron células mediante estudios

citogenéticos y bioquímicos (isoenzimas peroxidases), y se encontraron variaciones en los niveles de ploidía y diferencias morfológicas respecto al material original (Capote, *et al.*, 2000). Asimismo, en plantas de orégano desarrolladas *in vitro* en presencia de auxinas y colchicina presentaron marcadas diferencias morfológicas atribuidas a variación somaclonal (Armendáriz *et al.*, 2000). Esto es considerado una desventaja cuando la intención es propagar material con características uniformes y por causas de estabilidad genética de la especie esta varía respecto al material parental.

### **Mejoramiento Genético en Plantas**

El mejoramiento genético se define como el conjunto de actividades que se realizan partiendo de un grupo de individuos en los cuales las características deseadas no se encuentran en la condición de interés, pero que permite obtener otro grupo llamado cultivar con las características que satisfacen al mejorador hasta lograr lo deseado con el fin de satisfacer una necesidad (Rives, 1983).

Así el mejoramiento genético de los cultivos, contribuye a aumentar la productividad agrícola mediante métodos convencionales o por técnicas de ingeniería genética. Las técnicas de ingeniería genética y el uso de nuevos conocimientos científicos permiten modificar los organismos mediante intervenciones precisas, rápidas y predictivas. Además, con las técnicas de cultivo de tejidos y de la ingeniería genética se evitan las barreras de disponibilidad de genes impuestos por la incompatibilidad sexual en el

mejoramiento convencional de plantas. Es decir que mediante ingeniería genética es posible transferir a las plantas información genética de organismos no emparentados, práctica que actualmente se aplica con el objetivo de optimizar la técnica para aplicarla a diferentes especies vegetales (Pierik, 1997).

Actualmente la gran mayoría de los cultivos que utiliza el agricultor han sido generados por los métodos convencionales, como los cruzamientos selectivos, en centros dedicados a la producción de nuevas variedades. Pero, también hoy en día, la ingeniería genética se suma a las prácticas convencionales como una herramienta más para mejorar o modificar los cultivos vegetales que el hombre considera deben ser modificados con el fin de generar un producto de bienestar para la sociedad. De esta manera la transformación genética es una herramienta importante para introducir características agronómicas importantes en las plantas, pero un protocolo de regeneración *in vitro* eficiente y reproducible es un requisito previo para la transformación genética exitosa (Li *et al.*, 2009).

La ventaja para el hombre en la obtención de híbridos, radica en que estos pueden ser más vigorosos y productivos, entre otras características importantes (por la combinación de cualidades ofrecidas de sus progenitores) y, por tanto, pueden ser más idóneos en los programas de mejoramiento.

### **Mejoramiento Genético del Zacate Búfalo**

El mejoramiento genético en zacate búfalo es una buena opción para combinar características de diferentes niveles de ploidía en híbridos

interploidales, para obtener, triploides, tetraploides y pentaploides, sin embargo el mejoramiento tradicional sólo puede ser efectivo en algunas de estas cruzas y de manera natural sería aún más complicado encontrar estas ploidías por la aborción prematura del embrión, que ocasiona la incapacidad de formar una semilla viable y por lo tanto lograr desarrollar un nuevo individuo.

Los esfuerzos actuales de investigación en zacate búfalo se enfocan a mejorar plantas de sexo femenino. La planta femenina es de mayor calidad para césped ya que es estéticamente más agradable que la planta macho, porque sus inflorescencias pistiladas se anidan dentro de las hojas, mientras que la masculina (estambres) inflorescencias se extienden por encima de las hojas reduciendo su calidad estética (Moore, 1991).

Si la aborción de embriones es una barrera para la hibridización interploidal de *Buchloe dactyloides*, el rescate de embriones *in vitro* es la única forma de lograr el desarrollo del embrión con el fin de evitar la aborción prematura en cruzas que presentan un nivel de incompatibilidad; en cruzas intergenéricas, interespecíficas y cruzas interploidales, donde existen algunas barreras de incompatibilidad precigótica o postcigótica (Pierik, 1997).

### **La respuesta al desarrollo *in vitro***

Cuando existe aborción del embrión se induce una caída prematura de frutos. La alternativa es el cultivo de ovarios técnica desarrollada por Nitsch (1951) en *Cucumis* y *Lycopersycon* en flores polinizadas *in vitro* para el

desarrollo del fruto. Estos frutos desarrollaron más semilla viable que los desarrollados en condiciones normales.

El medio de cultivo juega un papel importante en el desarrollo normal del óvulo y ovario hasta la formación de la semilla y se recomienda en los casos de abortión prematura del embrión (Razdan, 2003).

Se han propagado plantas de zacate búfalo *Buchloe dactyloides* 'Texoka' en condiciones *in vitro* a través de embriogénesis somática y organogénesis mediante el cultivo de las inflorescencias masculinas inmaduras obtenidas de plantas silvestres. El medio utilizado fue con 2,4-D en concentraciones de 2.25, 4.5 o 2.4  $\mu\text{M}$ , en los niveles altos produjo mayor formación de callos embriogénicos y menor porcentaje en niveles bajos pero, favorece la formación de brotes. Además se combinó con benciladenina (BA) en concentraciones de 0.44  $\mu\text{M}$  o 1.32  $\mu\text{M}$  para la formación de brotes vía organogénesis. El medio se solidificó con 7 g L<sup>-1</sup> de agar ó con 3 g L<sup>-1</sup> de Gelrite para la formación de embriones somáticos, y los resultados fueron favorecidos al utilizar el Gelrite como soporte (Fei *et al.*, 2002). Asimismo, se generó una metodología en la propagación de plantas de zacate búfalo enfocada principalmente a la propagación de plantas del mismo sexo y principalmente del sexo femenino a través de la inducción de callos con nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) para favorecer la brotación y la posterior regeneración de plantas de zacate búfalo (Fei *et al.*, 2000).

## Rescate de embriones

El cultivo de embriones es uno de los primeros éxitos que se tuvo con las técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Desde 1904, Hannig cultivó embriones maduros de *Raphanus* y *Cochleria* usando técnicas asépticas. La función principal del cultivo de embriones es el rescate de embriones que se tienen de cruza interespecíficas donde el desarrollo del embrión fracasa en la obtención de semilla viable. En estas cruza los mecanismos de incompatibilidad precigótica normalmente causan la aborción del embrión. Estas barreras que limitan el desarrollo del embrión pueden resolverse haciendo una remoción de embriones inmaduros para que se logre el desarrollo de la semilla y lograr producir las plantas híbridas. Cruza simples y rescate de embriones son herramientas importantes para transferir características deseables, como resistencia a enfermedades, tolerancia a los diferentes tipos de estrés en plantas cultivadas, así como recuperar plantas de semillas que pierden rápido su viabilidad, o de semilla con un prolongado periodo de dormancia y que representan una importante fuente de germoplasma. Los embriones híbridos que se forman por unión de gametos entre diferentes especies frecuentemente abortan como consecuencia de que el endospermo no es compatible con el embrión, pero su desarrollo normal se puede obtener por rescate de embriones *in vitro* (Yadav y Tyagi, 2008).

Sathyanarayana y Varghese (2007) hacen mención de otras ventajas que tiene el rescate de embriones y de ellas destacan; supera las barreras de aborción de semillas por incompatibilidad, dormancia y auto-esterilidad de

semillas, favorece cruza intergenéricas donde el desarrollo del embrión es pobre, producción de monoploides y acorta los ciclos de mejoramiento de plantas.

El rescate de embriones *in vitro* es la única forma de lograr el desarrollo del embrión con el fin de evitar la abortición prematura en cruza que presentan algún grado de incompatibilidad; intergenéricas, interespecíficas y cruza interploidales donde existen algunas barreras de incompatibilidad precigótica o postcigótica (Pierik, 1997).

En los programas de mejoramiento de plantas se ha hecho común el rescate de embriones *in vitro* en fases tempranas de su desarrollo debido a la abortición prematura o a un débil desarrollo del embrión y deficiente desarrollo del endospermo que difícilmente se lograría traducir en una planta normal y vigorosa. Algunos de estos trabajos se han realizado en diferentes especies con cruza intergenéricas en girasol (Luévanos *et al.*, 2010); en cruza interespecíficas en trébol (Ferguson *et al.*, 1990) y en pasto mulato (Rodrigues *et al.*, 2000); y en cruza interploidales en uva (Yamashita *et al.*, 1998; Jaskani *et al.*, 2005).

El rescate de embriones es una técnica *in vitro* que se utiliza para recobrar los embriones donde el desarrollo del endospermo fracasa como resultado de incompatibilidad entre cruza híbridas durante el mejoramiento genético. En este momento dentro de las opciones que tiene el fitomejorador para resolver una serie de eventos que evitan el desarrollo del embrión es el

cultivo *in vitro* de embriones. Cuando se habla de rescate de embriones esto es referido de manera convencional a los embriones cigóticos (Razdan, 2003; Pierik, 1990).

Matzk (1996) menciona que el rescate de embriones ofrece algunas ventajas para el fitomejorador como son: supera las barreras de incompatibilidad, favorece la germinación de semillas, elimina latencia en semillas, producción de monoploides, prevención del aborto del embrión, propagación vegetativa y en embriogénesis experimental.

El rescate de embriones ha sido utilizado en especies herbáceas, arbustivas y arbóreas con gran éxito. Ya que después de la fertilización se presentan una serie de eventos que dan como resultado la muerte del embrión y por lo tanto el colapso de la semilla. La principal causa de abortión del embrión es el desarrollo anormal del endospermo y es aquí donde juega un papel importante el rescate de embriones de híbridos interespecíficos, intergenéricos e interploidales antes de que aborte el embrión.

Cuanto más joven es el embrión (inmaduro) mayores son las exigencias del medio de cultivo para su desarrollo, ya que requiere de condiciones muy específicas para obtener una respuesta en condiciones *in vitro* (Pierik, 1990). Asimismo Monnier (1980) menciona que los embriones muy pequeños e indiferenciados es difícil desarrollarlos *in vitro*, debido a esto hay la necesidad de desarrollar el embrión unido al endospermo o parte de su contenido en contacto con el embrión. También en otros casos se ha optado por sembrar el

embrión con todo y el ovario, a lo que algunos investigadores han denominado como cultivo de embriones en óvulos (Perik, 1990). Al respecto Baran y Ghosh (2005) mencionan que varios embriones híbridos pueden ser rescatados por cultivo de óvulos y ovarios, y que esto es un aspecto importante en los programas de mejoramiento genético de de cultivos frutícolas como los cítricos.

### **Desarrollo del Embrión y Balance en el Número del Endospermo (EBN)**

El endospermo es el resultado de la fertilización de dos núcleos polares por un núcleo espermático. La función del endospermo es de proveer de nutrientes para el desarrollo después de la germinación de la semilla. En pastos el endospermo es una estructura persistente almidonada y seca en su madurez. Se han encontrado especies con endospermo líquido o suave en la madurez, y el estado viscoso (sólido) del endospermo puede retenerse durante varias décadas, o aquellos que tienen un endospermo semisólido (Terrell, 1971).

En el desarrollo del endospermo participan cuatro tipos de células: de transferencia, de aleurona, del almidón en el endospermo y las circundantes al embrión. El almidón esta formado por polímeros de glucano (amilasa y amilopectina), gránulos semicristalinos y amiloplastos. Sin embargo, se sabe que éste esta principalmente constituido por lípidos, amilodextrina, proteínas y azúcares.

Las fases del desarrollo del endospermo incluyen mecanismos genéticos, moleculares y de regulación celular. Sin embargo, muchas veces estos se ven

modificados como causa de aislamiento reproductivo, originando que en especies con diferente nivel de ploidía y aun cuando correspondan al mismo nivel haya abortión de semilla, a esto se le ha llamado como EBN (Balance en el Número del Endospermo).

El fracaso en la formación del endospermo es causa de la abortión de semilla en cruzas híbridas inter e intraespecíficas. El desarrollo de la semilla en algunas especies depende de la relación del genoma materno y paterno en el endospermo. El EBN de la especie no necesariamente corresponde al nivel de ploidía cromosómico (Hanneman, 1994).

El endospermo típico de origen sexual es triploide con dos gametos de origen materno y uno paterno; cuando existe alguna desviación a la proporción 2m:1p son embriones abortivos (Richards, 2003). Debido a esto muchas cruzas interploidales desarrollan embriones pero estos abortan en su madurez (Ortiz y EhlInfeldt, 1992).

Durante el desarrollo del endospermo se observa: un desarrollo temprano, doble fertilización y celularización (se da de tres a cuatro días después de la polinización) y la diferenciación que forman los principales tipos de células.

La falla en el desarrollo del endospermo puede ser una causa del aborto de la semilla en híbridos intraespecíficos e interespecíficos (Ortiz y EhlInfeldt, 1992). El éxito del desarrollo de la semilla en algunas especies depende de la proporción particular de los genomas materno y paterno en el endospermo. En

el maíz y la papa esta proporción es dos genomas maternos a un paterno (2m:1p). Las desviaciones de la dosis genómica 2m:1p típicamente conlleva al aborto del endospermo y a la falla del desarrollo de la semilla. El aborto de la semilla ha sido interpretado como resultado del desbalance en la dosis génica de la impronta genómica (Khachatourians *et al.*, 2002).

Un exceso de la dosis genómica materna en el endospermo a menudo conlleva a una lenta división nuclear en el endospermo, una temprana celularización, formación de semillas pequeñas, pero con buena germinación. Por el contrario, el exceso de una dosis genómica paterna en el endospermo esta asociado con semillas de tamaño normal pero seco, pobre germinación, retraso en la celularización y una rápida división nuclear. Tales efectos son a menudo vistos en semillas resultantes de cruzas recíprocas incompatibles, especialmente en especies con endospermo nuclear.

El balance en el número del endospermo (EBN) es un número hipotético asignado a cada planta con base a su comportamiento a una especie estándar (Johnston *et al.*, 1980). El endospermo viable es esencial para el desarrollo del embrión.

Esta establecido que el endospermo se desarrolla normalmente sólo cuando la proporción de genoma materno:paterno en el endospermo es de 2:1. Esto es siempre en el caso cuando las plantas parentales tienen el mismo nivel de ploidía. Sin embargo, esta proporción se desvía de 2:1 en cruzas tetraploide-

diploides: el endospermo entonces se degenera y por lo tanto el embrión aborta.

En cruzas interespecíficas esta proporción genómica 2:1 conduce a un endospermo viable sólo si los genomas de las especies tienen el mismo EBN. Si las especies tienen diferente peso genómico, la ploidía efectiva, el cual difiere de la ploidía real, debería ser usado en la determinación de la proporción materno:paterno en el endospermo. La ploidía efectiva es expresado en unidades EBN y una crusa interespecífica produce endospermo viable, y por consiguiente es exitoso sólo si la proporción EBN materno:paterno es 2:1 en el endospermo. Consecuentemente las cruzas interespecíficas son exitosas sólo si ambas especies parentales tienen el mismo EBN. La hipótesis del EBN puede ser útil en la predicción de los sucesos de cruzas interespecíficas, pero sólo si los EBNs son conocidos (Ehlenfeldt y Hanneman, 1984).

### **Aspectos Ecológicos que Determinan la Expresión del Sexo en Zacate**

#### **Búfalo**

En zacate búfalo el sexo juega un papel importante en la elección de materiales, ya que el sexo determina la elección de plantas hembras o macho debido a su variación morfológica (dimorfismo sexual).

Se sabe que el zacate búfalo principalmente es dioico, sin embargo también existen plantas monoicas en condición silvestre, y es menos común que estas sean utilizadas en áreas para césped. Se encontraron algunas

referencias respecto a las condiciones que definen el sexo en zacate búfalo y se encontró que:

Huff y Wu (1987) mencionan que la expresión del sexo es considerada muy compleja y no siempre es predecible en campo. Sin embargo, concluyen que las condiciones de clima caliente, luz intensa y bajas concentraciones de nitrógeno favorecieron la expresión del sexo femenino en plantas. Por el contrario temperaturas frías, baja intensidad lumínica y altos niveles de nitrógeno favorecen la expresión del sexo masculino.

En zacate búfalo la densidad de una población puede afectar la asignación de sexo en plantas monoicas, y la frecuencia de las formas del sexo dentro de poblaciones naturales. Ciertas plantas monoicas producen principalmente inflorescencia masculina después de clonarse y transferirse a suelo. Se puede deber a un incremento de luz y otros recursos obvia problemas de limitación de polen en bajas densidades (Cheplick, 1998).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Localización del Experimento**

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, en campo, invernaderos y laboratorio de Citogenética de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), con sede en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Ubicada a una latitud de 25° 22' N y una longitud de 101° 00' W, con una altitud de 1742 msnm y una temperatura promedio anual de 19.8° C.

#### **Material Vegetal**

Se utilizaron 33 materiales de zacate búfalo (Cuadro 3.1), que se evaluaron en condiciones de campo para determinar calidad de césped. Posteriormente de estos 33 materiales, se seleccionaron seis materiales considerando algunos aspectos morfológicos de calidad de césped y el nivel de ploidía, los cuales fueron utilizados como progenitores para la obtención de híbridos interploidales. Posteriormente los híbridos obtenidos mediante técnicas de mejoramiento tradicional y mediante el rescate de embriones *in vitro* fueron evaluados con sus progenitores en condiciones de campo.

Cuadro 3.1. Nivel de ploidía (NP) y características de ubicación de cada colecta en 33 materiales evaluados de zacate búfalo (*Buchloe dactyloides*).

GENOTIPO	ORIGEN	N P	LATITUD N	LONG W	ALTITUD (msnm)
B62-H	SLP	2x*	23.68	100.88	2650
B-106-M	SLP	2x**	22.46	101.15	1928
RC-3	SLP	2x**	23.7	100.89	2662
RC-10	SLP	2x**	23.7	100.85	2512
RC-7	SLP	2x**	23.7	100.89	2662
RC-1-M	SLP	3x**	23.7	100.89	2676
RC-2	SLP	4x**	23.7	100.89	2674
B-14-4x	Coah	4x	25.3	100.76	1844
GPS-153-4x	Coah	4x*	25.4	102.04	1756
B-9-H	Coah	4x*	25.31	101.35	1704
B-9-M	Coah	4x*	25.31	101.35	1704
B-12	Coah	4x*	25.37	101.54	1535
B-13-H	Coah	4x*	25.32	101.67	1707
B-15	Coah	4x*	25.39	101.96	1706
B-22	Coah	4x*	25.39	100.64	2195
B-56-H	Zac	4x*	24.6	101.36	1837
GPS-228	Zac	4x*	24.67	100.15	1756
ZAC-26	Zac		21.64		
NE-86-120	NE				
B-12xB-14	Coah	5x*			
B-74	NL		24.71	100.05	1771
B-99-H	Coah	6x*	28.04	100.07	245
TAM-86	Tam	6x			
B-87	NL	6x*	25.65	100.63	1187
B-87 color	NL	6x*	25.65	100.63	1187
B14-6x	Coah	6x*	25.32	101.78	1844
GPS-133		6x*	24.51	99.65	2413
GPS-153-6x	Coah	6X*	25.4	102.04	1756
GPS-233	NL	6x*	25.66	100.63	1463
TECO	TX CO	6x*	41.27	95.95	335
TECO-sel	TX CO	6x*	41.27	95.95	335
GPS-152	Coah	6x*	25.4	102.05	1726
GPS- 155	Coah	6x*	25.3	101.76	1924

NP= nivel de ploidía, \*Nivel de ploidía por Citometría de Flujo, \*\*Nivel de ploidía por análisis citogenético.

### Desarrollo del embrión en cruas interploidaes

De los 33 materiales (Cuadro 3.1) se seleccionaron aquellos con diferentes niveles de ploidía, con la finalidad de determinar aquellas cruas que presentaron incompatibilidad y que originan malformación de los cariósides,

entre ellos se buscó que estuvieran representados los niveles de ploidía más comunes, además se consideraron las características morfológicas y de calidad de césped.

En estas cruzas se determinó aquellas que presentaron aborción prematura del embrión y puedan llevarse a completar su ciclo *in vitro* y aquellas con desarrollo normal y utilizar sus cariósides en la propagación de plantas.

### **Etapas del Cultivo *In Vitro* de Embriones**

El desarrollo de esta técnica se realizó en tres etapas.

#### **Etapas del Cultivo *In Vitro* de Embriones**

Comprendió la asepsia del material utilizado como explante hasta el desarrollo *in vitro* libre de agentes contaminantes. Para ello se aislaron los cariósides en estado inmaduro de las cruzas interploidales de zacate búfalo, en diferentes fases de desarrollo 15, 20, 25 y 30 días después de la polinización. Los cariósides fueron extraídos y desinfectados con hipoclorito de sodio diluido en agua 1:9 v/v y enjuagados tres veces con agua destilada estéril en la campana de flujo laminar. En esta etapa se evaluó el efecto del medio de Murashige y Skoog (1962) (MS-62) complementado con citocinina; benciladenina (BA) a concentraciones de 1 mgL<sup>-1</sup>, auxinas; ácido naftalenacético (ANA) en 0.1 y 0.5 mgL<sup>-1</sup> y ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) en 0.01 mgL<sup>-1</sup> y una concentración de sacarosa del 9%. El medio de cultivo en

las tres etapas se ajustó a un pH de  $5.7 \pm 0.1$ , y se esterilizó en autoclave a una presión de 15 libras, con una temperatura de  $121^{\circ}\text{C}$ , durante 20 minutos.

Los cariósides se sembraron en frascos gerber que contenían 20 ml de medio de cultivo, siendo la unidad experimental un frasco con un cariósido inmaduro.

### **Etapa II. Multiplicación**

En esta etapa se incrementó el material vegetal mediante subcultivos en medio fresco y esto se repitió tres veces (30, 60 y 100 días) para determinar la tasa de multiplicación que se pueda obtener a partir del cultivo de embriones. Las plántulas que se obtuvieron en la primera etapa se transfirieron al medio de MS-62 al 100% complementado con citocinina; BA en concentraciones de  $1 \text{ mgL}^{-1}$ , auxina; ANA en concentraciones de 0.0, 0.1, 0.3 y  $1 \text{ mgL}^{-1}$  y 2,4-D a  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  con una concentración de sacarosa al 3%.

Se evaluaron cinco tratamientos (Cuadro 3.2) con diez repeticiones bajo un diseño completamente al azar. A los datos se realizó un Análisis de Varianza con el programa SAS 1999, y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey.

Cuadro 3.2. Tratamientos y concentración de reguladores de crecimiento utilizados en la etapa de multiplicación.

Tratamiento	BA	ANA	2, 4-D
1 MS-62 (100%)	1 mgL	-	-
2 MS-62 (100%)	1 mgL	0.1 mgL <sup>-1</sup>	-
3 MS-62 (100%)	1 mgL	0.3 mgL <sup>-1</sup>	-
4 MS-62 (100%)	1 mgL	1 mgL <sup>-1</sup>	-
5 MS-62 (100%)	1 mgL	-	0.1 mgL <sup>-1</sup>

### **Etapa III. Enraizamiento**

En esta etapa una vez que se tuvo el material indispensable y de tamaño deseado en la etapa de multiplicación, este se preparó para el enraizamiento y acondicionamiento para el trasplante. El medio consistió en las sales de MS-62 al 100% complementado con auxinas: AIA, AIB y ANA en concentraciones de 0, 0.1, 0.3 y 1.0 mgL<sup>-1</sup>, utilizando como testigo el medio de MS-62 al 100%.

Los diez tratamientos (Cuadro 3.3) se evaluaron en un diseño experimental completamente al azar con catorce repeticiones, y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey.

Cuadro 3.3. Tratamientos y concentración de reguladores de crecimiento utilizados en la etapa de enraizamiento.

	Tratamiento	AIB	AIA	ANA
1	MS-62 (100%)	-	-	-
2	MS-62 (100%)	0.1 mgL <sup>-1</sup>	-	-
3	MS-62 (100%)	0.3 mgL <sup>-1</sup>	-	-
4	MS-62 (100%)	1.0 mgL <sup>-1</sup>	-	-
5	MS-62 (100%)	-	0.1 mgL <sup>-1</sup>	-
6	MS-62 (100%)	-	0.3 mgL <sup>-1</sup>	-
7	MS-62 (100%)	-	1.0 mgL <sup>-1</sup>	-
8	MS-62 (100%)	-	-	0.1 mgL <sup>-1</sup>
9	MS-62 (100%)	-	-	0.3 mgL <sup>-1</sup>
10	MS-62 (100%)	-	-	1.0 mgL <sup>-1</sup>

### Incremento del Material Vegetativo

Para incrementar el material vegetativo que se evaluó en campo se utilizaron secciones de guía (estolón) con dos nudos, las cuales se acomodaron en conos de plástico con siete repeticiones para garantizar poder establecer en el experimento de evaluación tres repeticiones. El sustrato de los conos utilizados para la propagación del material vegetal fue Pro Mix<sup>®</sup>, cada genotipo fue identificado con abatelenguas. Posteriormente se colocaron en el invernadero donde permanecieron 45 días para favorecer el enraizamiento y desarrollo de la planta. En este tiempo se aplicaron tres riegos con Raizal 400<sup>®</sup> (9-45-11, azufre 0.8%, magnesio 0.6% y complejo auxínico 400 ppm) y se regaron cada tercer día o según las necesidades de las plantas.

Tres plantas previamente enraizadas, tanto de los 33 materiales utilizados para seleccionar los progenitores, como los progenitores y sus híbridos interploides, cada uno fue trasplantado en macetas de 4 L (25 cm de diámetro y 30 cm de altura), con una área a cubrir fue de 380.13 cm<sup>2</sup>. El sustrato consistió en una mezcla de Pro Mix<sup>®</sup> y tierra en una proporción de 3:1. Las macetas fueron puestas a campo abierto en tres repeticiones orientadas de este a oeste. Los primeros 12 días sólo se aplicaba riego normal cada tercer día o según sus necesidades, posteriormente cada semana (viernes) se les aplicó fertilizante en una dosis de 3 gL<sup>-1</sup> con la fórmula 20-30-10 (Grofol<sup>®</sup>).

### **Caracterización Morfológica**

Para denominar las variables se asignaron dos letras, dos mayúsculas se refieren a variables con dos nombres; LG = longitud de guía, mientras que si la primera es mayúscula y la segunda es minúscula sólo hace referencia a un nombre; Co = cobertura, en esta variable se realizaron dos mediciones la primera cuando las primeras plantas cubrieron el 100% del área de la maceta, y la segunda al momento de finalizar la medición de variables (60 días). Para las variables cualitativas se utilizaron escalas y para las cuantitativas los muestreos.

La forma de evaluación así como las variables consideradas en esta investigación se describen a continuación:

Cuadro 3.4. Identificación de las variables utilizadas, unidad de medición y su forma de evaluarse.

No.	Variabes	Med.	Forma de evaluar
1	Co = Cobertura, primera (1) y segunda (2) medición	%	Medición realizada sobre una superficie (380.13 cm <sup>2</sup> ) cubierta por zacate en macetas de plástico de 4L expuestas al aire libre (en campo)
2	NG = Número de guías		Cantidad total a los 15 días
3	LG = Longitud de guías	cm	El promedio de 5 guías, al último nudo
4	NN = Número de nudos		Se contaron aquellos factibles de enraizar a los 15 días
5	LE = Longitud de entrenudos.	mm	Se utilizó el promedio de 5 guías, medición tomada en el segundo entrenudo
6	LH = Longitud de hoja	mm	De la lígula al ápice (hoja bandera)
7	AP = Altura de planta	1 a 3	Medido como el césped (colchón) que forma según la altura. 1=baja, 2=media, 3=alta
8	DE = Diámetro de entrenudos	mm	Realizada en el segundo entrenudo
9	AH = Ancho de hoja	mm	Medición a un tercio de hoja a partir de la lígula
10	Pu = Pubescencia	1 a 4	Medida realizada hasta a un cuarto a partir de la lígula. 1=baja, 2=poca, 3=media, 4=alta
11	CP = Color de pasto	1 a 4	1= verde amarillento, 2= verde claro, 3= verde oscuro, 4= verde grisáceo
12	De = Densidad	1 a 3	Tomada en función de lo espeso o ralo del follaje 1=baja, 2=media, 3=alta

### Análisis Estadístico

Para la caracterización morfológica de los 33 materiales y progenitores seleccionados y sus híbridos F1, se utilizó un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. También se realizó un análisis de varianza a los datos de las

variables cuantitativas utilizando el programa estadístico SAS 1999 y para identificar materiales con características morfológicas sobresalientes se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey.

### **Análisis de Componentes Principales (ACP)**

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) con 33 materiales, para asociar los materiales con características morfológicas similares a partir de la cual se puedan definir sus similitudes de acuerdo a las características morfológicas de calidad de césped, y seleccionar los progenitores más adecuados, para obtención de híbridos F<sub>1</sub>.

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es un procedimiento multivariado que permite transformar un conjunto de variables en otro nuevo conjunto de variables (componentes principales) que son funciones lineales de las variables originales; son ortogonales, es decir, independientes unas de otras. La variación total entre componentes principales es igual a la variación total de las variables originales de manera que las diferencias entre las variables observadas no se pierden en la transformación; y la varianza asociada con cada variable se ordena en forma decreciente (Isebrands y Crow, 1975). Estas nuevas variables artificiales se construyen al tomar todas las variables originales simultáneamente, por lo que cada componente principal mide ciertas características comunes subyacentes (Vargas, 1984).

Ye *et al.* (2001) mencionan que el análisis multivariado ofrece ventajas sobre el análisis univariado convencional porque permite la caracterización y

agrupamiento de genotipos, así como la identificación de las relaciones entre las variables. De esta manera se justifica utilizar un ACP, debido a que se utilizaron diferentes unidades de medida en la evaluación de las variables. En el Análisis de Componentes Principales (ACP) se empleó la rutina de componentes principales del programa Statistics 6.0. Con la rutina se obtuvieron los eigenvalores y la varianza explicada.

El ACP permite que sean consideradas todas las variables importantes cuantitativas, así como las variables de tipo ordinal o cualitativas como; vigor, amacollamiento, y estimación del rendimiento pero haciendo la medición en escala numérica (Farías *et al.*, 1983). Se recomienda para la interpretación de resultados usar los componentes cuyo valor “eigen” sea mayor a uno y que aporte mas del 5% de la varianza total (Vargas, 1984).

En el análisis se consideraron las variables morfológicas y de calidad. Los materiales considerados en un primer análisis fueron 33 materiales y en el segundo grupo de 17 materiales formado por 6 progenitores y 11 híbridos F<sub>1</sub> obtenidos por mejoramiento convencional y a través de técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **Análisis de Varianza**

Para el análisis de varianza se consideraron sólo las variables cuantitativas; para todas las variables se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos. Esto significa que las características entre los materiales son muy heterogéneas para el tiempo de evaluación de 60 días. Sin embargo, no fue el mismo caso en las variables que se evaluaron en 15 días y que indica que en este tiempo no existen diferencias significativas para algunas variables y conforme avanza el tiempo se marcan las diferencias entre materiales, como se muestra en el Cuadro 8.2 del Apéndice.

Es mediante la comparación de medias como se pueden relacionar o explicarse la similitud en alguna característica morfológica entre progenitores y los híbridos resultantes de las cruzas, como se describen en el Cuadro 8.3, 8.3A y 8.3B del Apéndice.

## Análisis de Componentes Principales

En el Análisis de Componentes Principales se determinó que los primeros tres componentes explicaron el 60.48 por ciento de la varianza total (VT) (Cuadro 4.1). Donde el primer componente explicó el 36.17 por ciento de la varianza total, las variables que presentaron una alta relación positiva fueron Co1, Co2, NG, LG, De y NN, variables que están relacionadas con los materiales 2X-B106M, 2X-RC7, 2X-RC10 y 4X-B12, pero estas variables mantienen una relación altamente negativa con DE, AH, Pu y CP, características asociadas a los materiales 6X-B99-H, 6X-TECO y 6X-GPS133 que de acuerdo a lo que se observaría en estos materiales es que son plantas más ásperas respecto a los materiales anteriormente mencionados.

El segundo componente explicó el 13.14 por ciento de la varianza total, las variables de mayor relación fueron LG, LE, NN y Pu (Figura 4.1), características asociadas a los materiales 6X-TAM86, 2X-B106, 4X-B12 x 4X-B14 y 4X-NE86-120 como se puede observar en la Figura 4.1, pero estas variables mantienen una relación altamente negativa con respecto a las variables Co1, CP, NG y LH, que están asociadas a materiales 6X-B74, 4X-GPS228 y 4X-B12. En este componente se determina que a medida que se tiene mayor LG el NG es menor.

El tercer componente explicó el 11.16 por ciento de la varianza total, las variables con alta relación positiva fueron NN, AP y AH. Que se relacionan negativamente con LE, NG y Co1 pero estos mantienen una relación positiva.

Cuadro 4.1. Coeficiente de correlación de las variables morfológicas y de calidad de césped con tres componentes.

<b>VARIABLES</b>	<b>CP1</b>	<b>CP2</b>	<b>CP3</b>
Co1	0.14991 *	-0.26786 *	-0.082614
Co2	0.15776 *	-0.175353	0.040517
NG	0.104417	-0.23382 *	-0.041717
LG	0.108537	0.43204 *	0.133459
NN	0.13919 *	0.16302 *	0.393053
LE	-0.061922	0.29368 *	-0.348499
LH	-0.074695	-0.23890 *	0.139601
AP	0.047874	-0.024279	0.368212
DE	-0.16412 *	0.012634	0.181218
AH	-0.14948 *	-0.006013	0.314551
De	0.14769 *	-0.008181	0.206603
Pu	-0.134986	0.08253 *	0.223466
CP	-0.148997	-0.25289 *	0.075239
Eigenvalor	4.702656	1.708353	1.451182
% Varianza total	36.17428	13.14117	11.16294
Eigenvalor acumulado	4.702656	6.411009	7.86219
% Varianza total acumulada	36.17428	49.31545	60.47839

\*Coeficientes de correlación de mayor importancia. Cobertura (Co), número de guías (NG), longitud de guías (LG), número de nudos (NN), longitud de entrenudo (LE), longitud de hoja (LH), altura de planta (AP), diámetro de entrenudo (DE), ancho de hoja (AH), densidad (De), pubescencia (Pu), color de pasto (CP),

De acuerdo a la distribución de las variables en la Figura 4.1, se observa que pubescencia (Pu), densidad (De) y ancho de hoja (AH) son características que hacen ver a la planta más áspera y estas características están ampliamente relacionadas con materiales hexaploides, además de mostrar una característica de color verde grisáceo, mientras que el color más vistoso y de mayor calidad en plantas para césped fue verde claro que se encuentra principalmente en

materiales diploides, entre los materiales más estables están 2X-RC7 y 2X-RC10, esta distribución de materiales coincide con lo realizado por Hernández *et al.* (2007).

Las variables Co1, Co2, De y NN se asocian positivamente, pero a su vez estas se asocian negativamente con las variables DE, AH Pu y CP aunque entre estas haya una relación positiva. Lo que indica que materiales que presentan alta cobertura (Co) como son los materiales diploides estos a su vez presentan un diámetro de entrenudo (DE) menor, característica de algunos materiales hexaploides.

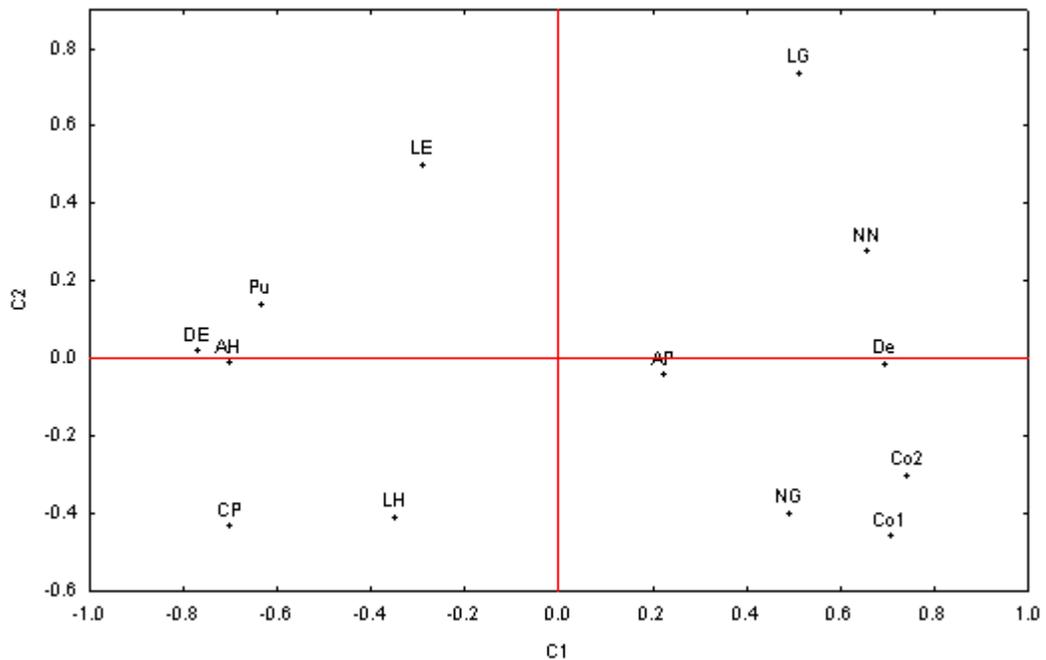


Figura 4.1. Distribución de las variables morfológicas en los primeros dos componentes principales.

Existe una transición dada por el nivel de ploidía y esta se concentra principalmente en la parte central o en la intercepción de cuadrantes, si se

observa de izquierda a derecha se tienen materiales hexaploides, luego una combinación marcada entre estos y tetraploides, posteriormente se tienen combinaciones de tetraploides y diploides para finalizar hacia la derecha con los materiales diploides como se observa en la Figura 4.2.

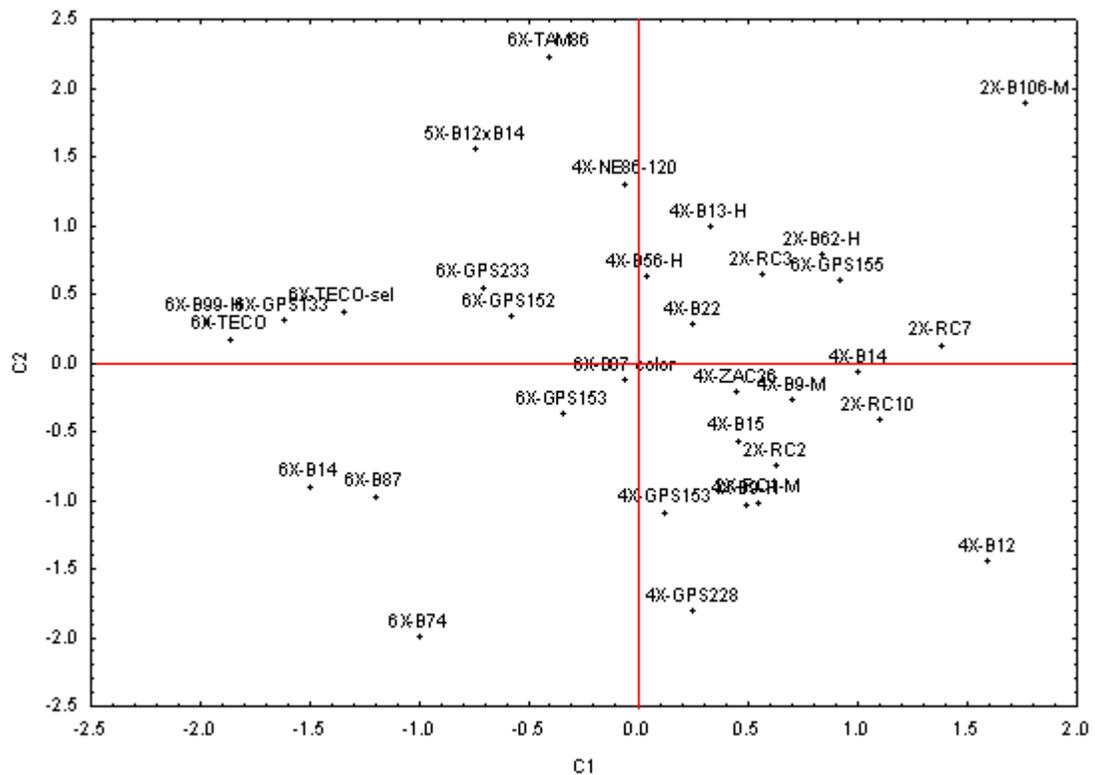


Figura 4.2. Distribución de materiales en base a las variables morfológicas en los primeros dos componentes principales.

### Desarrollo del Embrión

La morfología del cariósido del zacate Búfalo facilitó observar el desarrollo de la semilla. Esto permitió determinar el momento en que se consolidaba el endospermo y se formaba una semilla normal, así como el

proceso de desarrollo anormal del endospermo hasta llegar a formar un cariósipide normal o un cariósipide con embrión abortivo.

También se optó por sembrar el embrión con todo y el ovario a lo que algunos investigadores han denominado como cultivo de embriones en óvulos (Perik, 1990). Baran y Ghosh (2005) mencionan que es buena opción lograr el rescate de embriones por medio del cultivo de óvulos o por cultivo de ovarios.

La Figura 4.3, muestra los tres tipos de semillas que se obtuvieron en los cruzamientos interploidales e intraploidales de zacate búfalo. La semilla abortiva se desarrolla en un cariósipide que se observa chupado donde el endospermo se absorbe dejando exclusivamente un embrión abortado. La semilla rugosa se presenta en un cariósipide anormal donde el desarrollo del endospermo es reducido y el embrión es normal. La semilla normal se presentó en un cariósipide con desarrollo normal del endospermo y embrión.



Figura 4.3. Tipos de cariósipides producidos en cruzamientos de *Buchloe dactyloides*: a) con embrión abortivo, b) rugosos y c) normales.

En la Figura 4.4, se presenta el desarrollo secuencial de la semilla de un cruzamiento tetraploide por diploide, cuyo resultado final es una semilla abortiva. Se observó que después de los 15 días (Figura 4.4c) el endospermo se empieza a absorber, quedando al final sólo el embrión (Figura 4.4e) que se deshidrata y muere (Figura 4.4f). Como consecuencia este de tipo semillas son inviables. Con base en estas observaciones se logró determinar que el tiempo adecuado para aislar el ovario fecundado, ser rescatado y completar su ciclo bajo condiciones *in vitro* es alrededor de los 15 días después de la polinización.

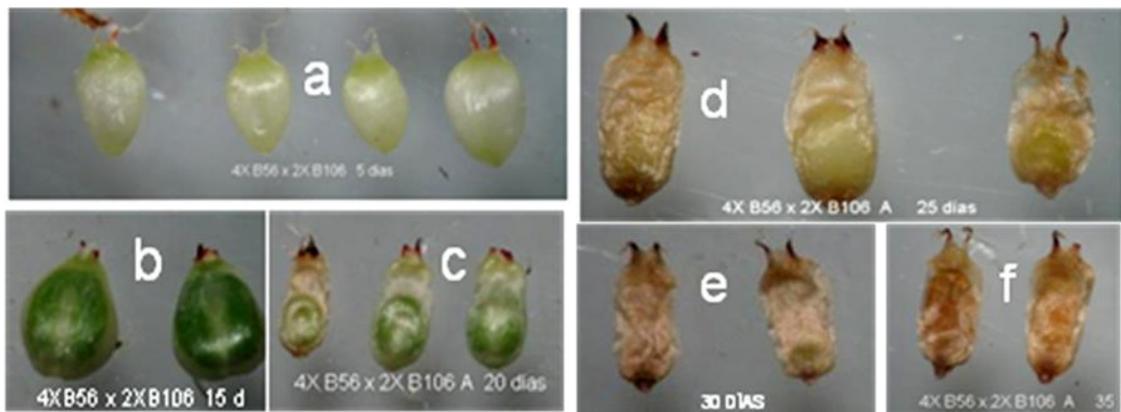


Figura 4.4. Desarrollo del cariósido en una cruce interploidal en *Buchloe dactyloides*, donde el embrión es abortivo: a) 5, b) 15, c) 20, d) 25, e) 30 y c) 35 días después de la polinización.

Los resultados obtenidos de las diferente cruza de zacate búfalo (Cuadro 4.2), son una clara muestra de que existe incompatibilidad entre materiales con igual o diferente nivel de ploidía.

Las diferencias en el EBN son una de las causas de incompatibilidad en algunas especies y que limita su utilización en los programas de mejoramiento. Esto se atribuye al resultado de algunas cruzas que se presentaron en zacate búfalo ya que dieron origen a embriones abortivos y rugosos.

Los progenitores y los híbridos  $F_1$  que se lograron obtener fueron identificados de la siguiente manera: el primero y segundo número representan el nivel de ploidía correspondiente a la hembra y al macho respectivamente. Los siguientes dos o un dígito representan el genotipo hembra es sólo un valor para su identificación, el punto separa a la identificación asignada a hembra y macho donde los siguientes dos y últimos dígitos identifican al genotipo progenitor macho.

Cuadro 4.2. Tipos de semillas que se obtuvieron en algunas cruzas de materiales de zacate búfalo, así como su posible nivel de ploidía.

Cruzas	Identificación	Semilla	Ploidía posible
2X-RC3 x 2X-B106	223.106	Abortiva	2X
2X-RC3 x 4X-B56	243.56	Abortiva	3X
2X-RC5 x 4X-B56	245.56	Abortiva	3X
2X-RC10 x 4X-B56	2410.56	Normal	3X
2X-RC10 x 6X-B14	2610.14	Rugosa	4X
4X-B56 x 2X-B106	4256.106	Abortiva	3X
4X-B56 x 4X-B56	4456.56	Normal	4X
4X-B56 x 6X-B14	4656.14	Rugosa	5X
6X-B99 x 2X-B106	6299.106	Abortiva	4X
6X-B99 x 4X-B9	6499.9	Rugosa	5X
6X-B99 x 4X-B56	6499.56	Normal	5X
6X-B99 x 6-XB14	6699.14	Rugosa	6X

En el Cuadro 4.3 se presentan los progenitores que fueron seleccionados, así como los híbridos que se obtuvieron para realizar una caracterización morfológica de calidad de césped.

Cuadro 4.3. Materiales evaluados como progenitores y los híbridos F1 resultantes.

	Progenitores	Ploidía	Híbridos	Ploidía (posible)
1	RC10 ♀	2X	2410.56-1 ♀♂	3X
2	B9 ♂	4X	2410.56-2	3X
3	B56 ♂	4X	2410.56-3 ♀♂	3X
4	B56 ♀	4X	2410.56-4 ♀	3X
5	B14 ♂	6X	2410.56-5	3X
6	B99 ♀	6X	2610.14	4X
7			4656.14-1 ♂	5X
8			4656.14-2	5X
9			6499.56-1 ♂	5X
10			6499.56-2 ♀	5X
11			6499.9	5X

♀♂ plantas con dos sexos (femenino y masculino), ♀ plantas con sexo femenino, ♂ plantas con sexo masculino, X=nivel de ploidía.

### Cultivo *In Vitro*

Una vez definido el tipo de cariósides que se formó en las diferentes cruzas, el cultivo *in vitro* se utilizó para el rescate de embriones principalmente en aquellas cruzas con formación de cariósides con embrión abortivo (abortivas). Aún cuando en todas estas cruzas se lograron obtener plantas *in vitro*, no todas se llevaron a la fase de campo para su evaluación.

## Etapa I. Establecimiento del Cultivo Aséptico

Una vez que se realizaron las diferentes cruzas con los diferentes tipos de cariósipide que forman, se seleccionaron algunas de las cruzas para evaluar esta etapa; abortivas (4X-B56 x 2X-B106), rugosas (4X-B56 x 2X-B14 y 6X-B99 x 4X-B9) y normales (6X-B99 x 4X-B56 y 2X-RC10 x 4X-B56). De las cruzas que se presentan en la Figura 4.5, sólo la craza 2X-RC10 x 4X-B56 desarrolló semillas normales, las demás cruzas dieron origen a semillas abortivas. Sin embargo, la mayoría de las cruzas que se desarrollaron bajo condiciones *in vitro* dieron origen a plántulas con un desarrollo normal aunque en el transcurso de los días el desarrollo morfológico de las plántulas fue diferente entre niveles de ploidías.

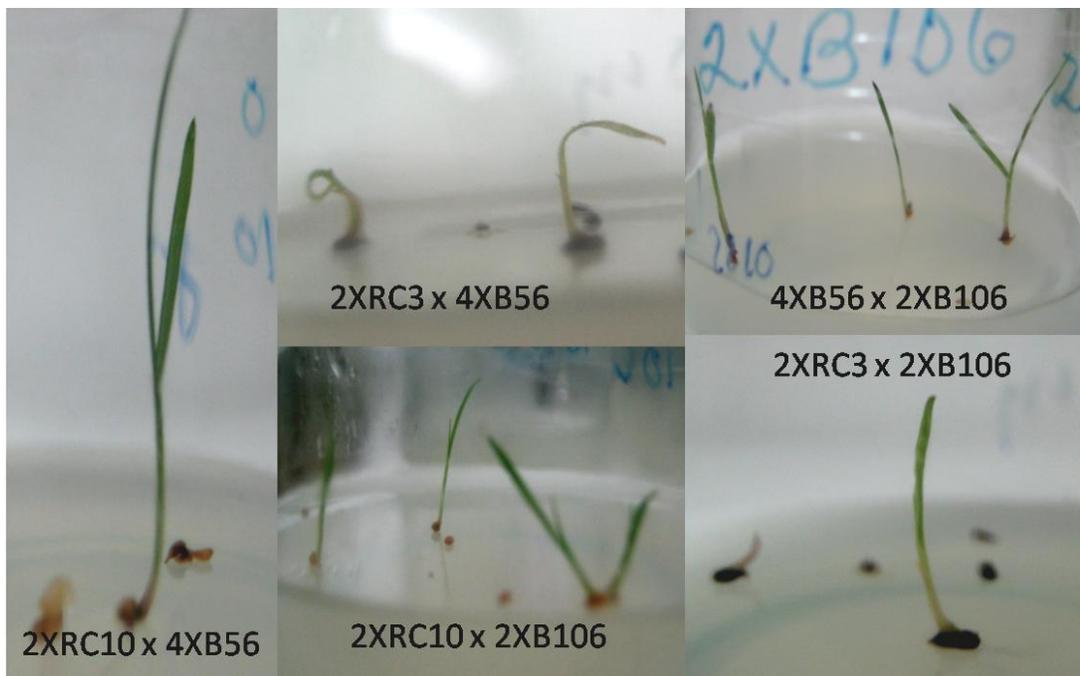


Figura 4.5. Desarrollo de embriones y germinación *in vitro* de zacate búfalo, donde solo la craza 2X-RC10 x 4X-B56 proviene de semilla normal y las otras cruza de embriones abortivos y rugosos.

En esta etapa el método de desinfección utilizado fue efectivo (hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos) ya que no se presentó contaminación en los explantes que se establecieron en condiciones *in vitro*.

Los tratamientos que se aplicaron con adición de auxina (ácido naftalenacético (ANA) en 0.1 y 0.5 mgL<sup>-1</sup> y ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) en 0.01 mgL<sup>-1</sup>) no presentaron ninguna respuesta ya que todos se oxidaron. Razdan (2003) menciona que combinar auxina-citocinina no es recomendado ya que induce la formación de callo y como consecuencia se incrementa la oxidación. En esta fase únicamente con el tratamiento de BA con 1 mgL<sup>-1</sup> se obtuvo una respuesta favorable a la germinación de embriones con un contenido de sacarosa del 9%. Estos resultados concuerdan con lo mencionado por Monnier (1980) que señala que los embriones maduros germinan bien en concentraciones de 2 a 3% de sacarosa, mientras que los embriones inmaduros tienen mejor respuesta en concentraciones más elevadas de 8 a 12%.

En esta etapa se observó que cuanto menor es el tiempo de desarrollo del cariósido, menor es el porcentaje de germinación (30%), asimismo mayor es el tiempo para iniciar la germinación (14 días). Esto se debe a que en condiciones *in vitro* los cariósidos inmaduros completan su desarrollo algunos germinan y otros solo completan su ciclo. Cuanto más se acerque la semilla a madurez fisiológica menor es el tiempo requerido para la germinación y mayor es el porcentaje de germinación (Figura 4.6), esto es como respuesta a que los

requerimientos de reguladores de crecimiento son menores para germinación de semillas *in vitro*.

A 15 días después de la polinización los embriones normales y viables aumentan su germinación, es a partir de este momento que se presenta una relación directamente proporcional, conforme aumenta la maduración de la semilla se incrementa la germinación *in vitro* como se muestra en la Figura 4.6, la misma respuesta encontraron Chikhale *et al.* (2006) al trabajar con rescate de embriones híbridos en algodón. Esto es atribuible a las exigencias específicas del medio de cultivo que presentan los embriones inmaduros principalmente en fases tempranas de desarrollo (Perik, 1990). Los cariósides formados 30 días después de la polinización iniciaron su germinación a los 4 días, aquí es importante mencionar que esto se evaluó solamente en cariósides con desarrollo normal.

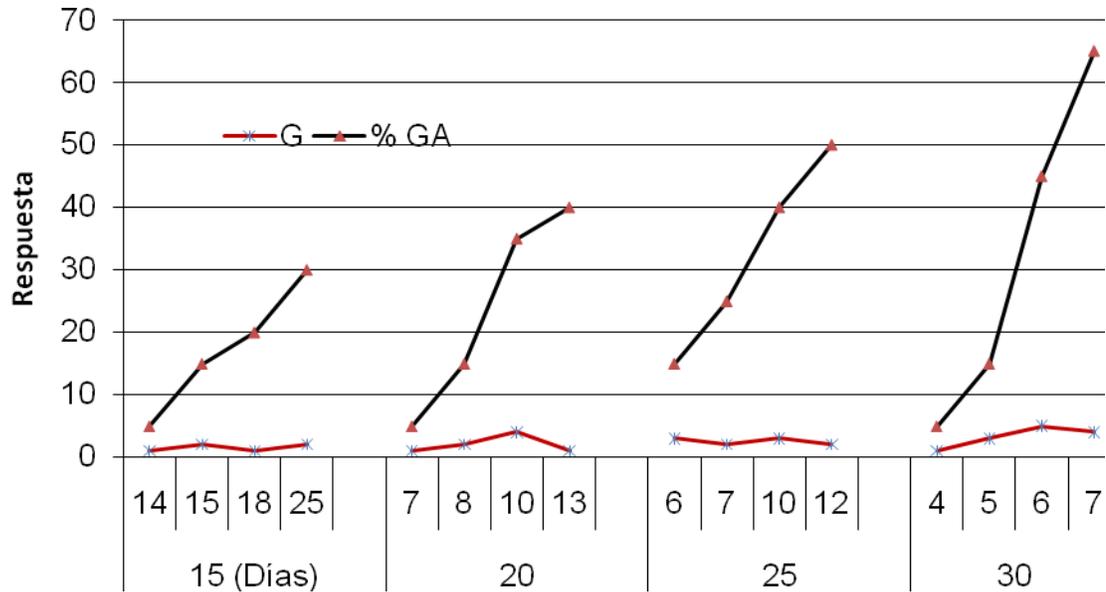


Figura 4.6. Respuesta a la germinación (G) y el porcentaje de germinación acumulado (%GA) durante el establecimiento *in vitro* de carióspsides de zacate búfalo en 15, 20, 25 y 30 días después de la polinización, en la cruz 2XRC10 x 4XB56.

## **Etapa II. Multiplicación**

En esta etapa y en la siguiente (multiplicación) sólo se utilizó en la evaluación el híbrido 2410.56 producto de la cruz 2X-RC10 x 4X-B56, debido a que en la etapa de establecimiento se observó que existe diferente respuesta morfológica *in vitro* entre niveles de ploidía de zacate búfalo.

Los resultados indican que hubo diferencias altamente significativas entre tratamientos (Cuadro 8.3 del Apéndice), donde el tratamiento tres (BA 1 mgL<sup>-1</sup> + ANA 0.3 mgL<sup>-1</sup>) que contenía citocinina y auxina respectivamente presentó el mayor número de brotes (23.13) (Cuadro 4.4), que es uno de los objetivos importantes en esta fase ya que es la que define la tasa de multiplicación, sin embargo la longitud de brote debe ser considerada para que sean brotes con

potencial para formar una nueva planta. Al respecto Navarro (2000) menciona que algunas plantas responden favorablemente a la brotación únicamente con la adición de benciladenina. Sin embargo, esta especie establece una sinergia entre citocinina y auxina para una mayor brotación, lo que coincide con Pierik (1987) que menciona que algunas plantas existen diferentes requerimientos hormonales, principalmente de auxina/citocinina para responder a las condiciones del medio. Asimismo Dhar *et al.* (1989) obtuvieron en guayule una mayor brotación cuando adicionaron al medio BA y ANA.

Al principio el número de brotes por explante era de 4 a 5 en los tratamientos de mejor respuesta. Sin embargo, esto se incrementó gradualmente en los siguientes subcultivos hasta obtener en el tercer subcultivo los resultados que se presentan en el Cuadro 4.4. Esto permite definir una tasa de multiplicación una vez que se estabiliza la multiplicación de propágulos donde se vuelve exponencial en cada subcultivo posterior. De esta manera un embrión que ha germinado potencialmente nos puede dar en un lapso de 135 días cerca de 1000 plantas enraizadas.

Cuadro 4.4. Resultados de la comparación de medias en el número de brotes (NB) y longitud de brotes (LB), en la etapa de multiplicación *in vitro* de zacate búfalo.

TRATAMIENTO	NB	LB (mm)
1 BA 1 mgL <sup>-1</sup>	11.07 b	19.14 bc
2 BA 1+ ANA 0.1 mgL <sup>-1</sup>	10.00 b	22.79 a
3 BA 1+ ANA 0.3 mgL <sup>-1</sup>	23.13 a	19.43 ab
4 BA 1+ ANA 1 mgL <sup>-1</sup>	5.07 c	17.43 bc
5 BA 1+ 2, 4-D 0.01 mgL <sup>-1</sup>	1.64 d	15.53 c

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales, según la prueba de Tukey (0.05).

### **Etapa III. Enraizamiento**

De acuerdo a los resultados en el análisis estadístico SAS (1999) se encontraron diferencias altamente significativas entre tratamientos (Cuadro 8.3 del Apéndice), se observa que no hubo respuesta al enraizamiento en ausencia de auxinas, lo que confirma que estas son promotoras del enraizamiento como lo mencionan algunos autores; en papaya (*Carica papaya L.*) Rajeevan y Pandey, (1986); en candelilla (*Euphorbia antisyphilitica Zucc.*) Santillán *et al.* (2001); en guayule (*Parthenium argentatum*) Dhar *et al.* (1989) entre muchos otros autores. El citar estos autores está justificado debido a que la dificultad de enraizamiento de la especie depende de la auxina utilizada para obtener los resultados adecuados, en especies como el guayule debido a la dificultad de enraizamiento se utilizaron auxinas más potentes como el 2, 4-D.

En esta etapa los mejores resultados se lograron con el tratamiento MS-62 + AIB  $1.0 \text{ mgL}^{-1}$ , que obtuvo 1.71 raíces por planta con un 92.86 % de enraizamiento. Esto contrasta con el tratamiento que se le adicionó ANA  $1.0 \text{ mgL}^{-1}$ , donde sólo hubo un 21.43 % de enraizamiento como se puede observar en el Cuadro 4.5. Respecto a longitud de raíz este tratamiento logró un desarrollo 10.43 mm que estadísticamente solo es diferente al tratamiento 1 (que no desarrollo raíz) y al 10 con un desarrollo de 0.54 mm, sin embargo en esta etapa lo más importante es el número de raíces que pueden formar.

Cuadro 4.5. Resultados de la comparación de medias en número de raíz (NR), longitud de raíz (LR) y porcentaje de plantas enraizadas (%PE) en la etapa de enraizamiento *in vitro* de zacate búfalo.

Tratamiento	NR	LR (mm)	% PE
1 MS-62 (100%)	0.0 c	0.0 b	0.0 c
2 AIB 0.1 mgL <sup>-1</sup>	1.21 ab	7.21 ab	78.57 ab
3 AIB 0.3 mgL <sup>-1</sup>	0.57 bc	6.0 ab	71.42 ab
4 AIB 1.0 mgL <sup>-1</sup>	1.71 a	10.43 a	92.86 a
5 AIA 0.1 mgL <sup>-1</sup>	1.36 ab	9.86 a	71.43 ab
6 AIA 0.3 mgL <sup>-1</sup>	1.07 abc	12.57 a	85.71 ab
7 AIA 1.0 mgL <sup>-1</sup>	1.57 ab	12.43 a	85.71 ab
8 ANA 0.1 mgL <sup>-1</sup>	0.50 bc	4.11 ab	35.71 b
9 ANA 0.3 mgL <sup>-1</sup>	0.64 abc	3.93 ab	50.00 b
10 ANA 1.0 mgL <sup>-1</sup>	0.71 abc	0.54 b	21.43 b

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales, según la prueba de Tukey (0.05).

Las plantas enraizadas *in vitro* no fueron llevadas a campo solo se evaluaron para determinar el porcentaje de prendimiento mediante aclimatación en charolas de germinación, en esta condición sobrevivió el 88 por ciento.

### Análisis de componentes principales (ACP)

Para el grupo de 17 materiales formado por 6 progenitores y 11 híbridos obtenidos por mejoramiento convencional y a través de técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Los tres componentes principales explicaron el 80.26 % de la varianza total (VT) (Cuadro 4.6). El primer componente (CP1) explica el 49.16 % de la VT y muestra que las variables que presentaron alta relación y mayor contribución fueron; número de guías (NG), número de nudos (NN), la primera y segunda

medición de cobertura (Co) y longitud de guías (LG) y que están asociadas positivamente entre sí, estas características están determinadas principalmente por los materiales 2X-RC10 H, 2410.56-3, 2410.56-5 y 6499.56-2 se puede decir que el mayor desarrollo vegetativo se va a manifestar por el NG y del NN donde los materiales mencionados influyen más para el primer componente. Sin embargo, estas variables mantienen una asociación altamente negativa con el color de pasto (CP), pubescencia (Pu) y ancho de hoja (AH), pero entre estas existe una alta correlación positiva, características que están dadas principalmente por los materiales 6X-B14 M, 6499.56-1, 6X-B99 H y 6499.9, que permite identificar estos materiales con menor NG y NN y van a presentar mayor pubescencia, hojas más anchas y ser de un color verde grisáceo.

Cuadro 4.6. Coeficientes de correlación de las variables morfológicas y calidad de césped de los primeros tres componentes principales en zacate búfalo (*Buchloe dactyloides*).

<b>VARIABLES</b>	<b>CP1</b>	<b>CP2</b>	<b>CP3</b>
<b>Co1</b>	<b>0.874*</b>	-0.243	0.223
<b>Co2</b>	<b>0.832*</b>	-0.222	0.159
<b>NG</b>	<b>0.920*</b>	-0.079	0.259
<b>LG</b>	<b>0.809*</b>	-0.363	-0.346
<b>NN</b>	<b>0.917*</b>	-0.269	0.139
<b>LE</b>	0.306	-0.400	-0.611
<b>LH</b>	-0.110	<b>-0.750*</b>	-0.484
<b>AP</b>	0.477	-0.272	-0.265
<b>DE</b>	-0.503	<b>-0.764*</b>	0.168
<b>AH</b>	-0.699	-0.617	0.219
<b>De</b>	0.576	-0.386	0.606
<b>Pu</b>	<b>-0.733*</b>	-0.483	0.303
<b>CP</b>	<b>-0.804*</b>	-0.290	0.052
<b>Valor "eigen"</b>	6.392	2.546	1.497
<b>% de Varianza total</b>	49.166	19.584	11.514
<b>Valor "eigen" acumulado</b>	6.392	8.937	10.434

<b>% Varianza total acumulada</b>	<b>49.166</b>	<b>68.75</b>	<b>80.264</b>
---------------------------------------	---------------	--------------	---------------

\*Coeficientes de correlación de mayor importancia. Cobertura (Co), número de guías (NG), longitud de guías (LG), número de nudos (NN), longitud de entrenudo (LE), longitud de hoja (LH), altura de planta (AP), diámetro de entrenudo (DE), ancho de hoja (AH), densidad (De), pubescencia (Pu), color de pasto (CP).

El segundo componente que explica el 19.58 % de la varianza total, está principalmente influenciado por las variables diámetro de entrenudo (DE) y longitud de hoja (LH) que mantienen una asociación positiva entre ellas y negativo con el CP2, los híbridos que están más asociados con estas variables son los híbridos; 4656.14-1, 2410.56-3 y 2610.14. Las variables que se han descrito en este componente mantienen una asociación positiva entre si. Los materiales con menor valor en DE y LH, en este componente los encontramos en los materiales; 6499.9, 4X-B56 M, 4X-B56 H.

El tercer componente explicó el 11.51 % de la varianza total, donde hubo una alta relación positiva entre las variables De y Pu donde los materiales con mayor participación fueron; 4X-B56H, 2610.14 y 2X-RC10 H, las variables De y Pu se correlacionan negativamente con LE y LH mientras que estos mantienen una relación positiva, influenciada por los materiales 6X-B99H, 6499.56-2, 2410.56-3 y 6499.9.

Para determinar la relación que mantienen las variables con los materiales híbridos y con los progenitores, se utilizaron las características que se obtuvieron por el método estadístico del programa Statistica 6 y que se describen en las Figuras 4.7 y 4.8.

En la Figura 4.7 se observa la distribución espacial de las variables utilizadas para materiales híbridos y sus progenitores, la asociación de estas variables determina las características morfológicas de los materiales que definen la calidad de césped. El NG, Co1, Co2, NN y LG presentan una relación positiva entre ellos pero, se asocian negativamente con el CP, Pu y AH, lo que indica que conforme aumente el NG y NN lo ancho de la hoja es menor.

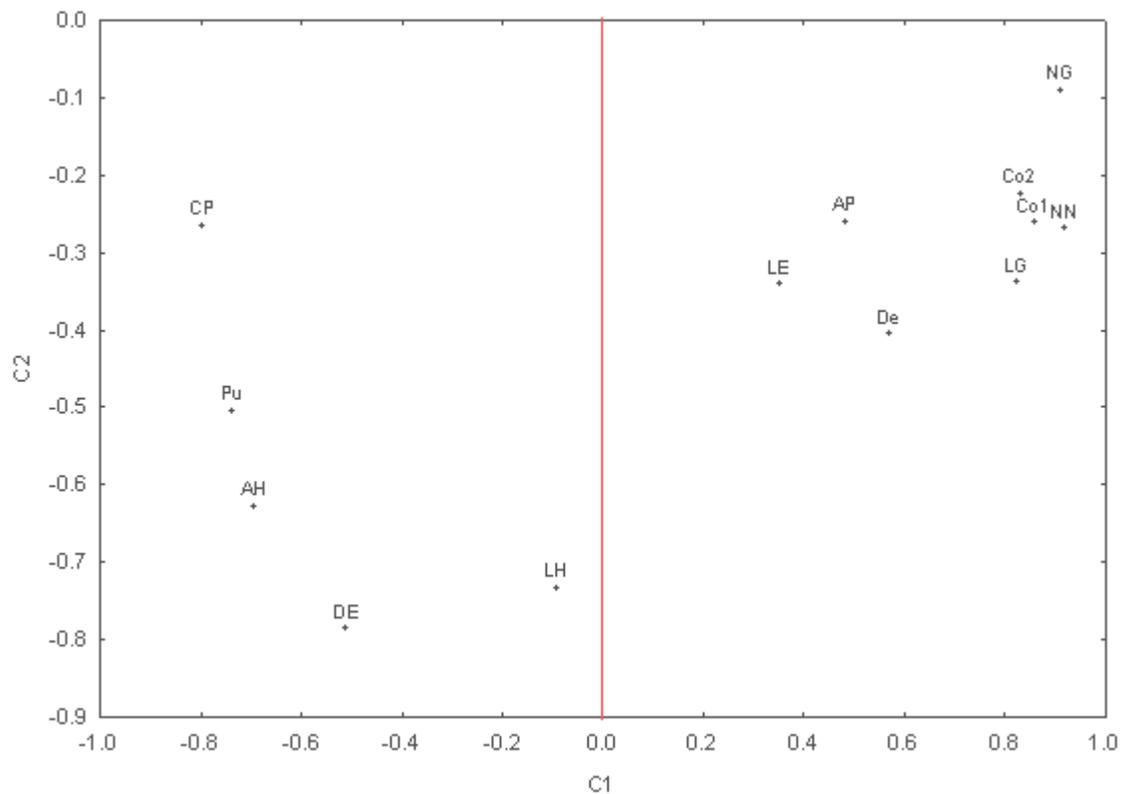


Figura 4.7. Distribución espacial de variables morfológicas y de calidad de césped conforme a los dos primeros componentes principales.

La distribución espacial de materiales se muestra en la Figura 4.8, y se pueden observar como se formaron algunos grupos subjetivos que se asocian cuando mantienen una relación morfológica entre progenitores e híbridos que se obtuvieron en cruza simples. Al observar de izquierda a derecha, el primero

esta determinado por materiales hexaploides y pentaploides, aún cuando estos se cruzaron con materiales tetraploides estos presentan características más parecidas al progenitor materno por lo tanto con mayor afinidad entre si de acuerdo a su morfología, estos materiales presentan un color verde grisáceo, con alta pubescencia y hojas anchas, que si se asocian a características de calidad de césped estos serían los materiales menos idóneos como césped, aunque, esto también depende del gusto de las personas. Sin embargo, existe un material 6499.56-2 H que de acuerdo a los progenitores debería estar en el grupo uno de la izquierda como lo manifiesta su hermano completo 6499.56-1 M que asocia más sus características morfológicas a progenitores hexaploides y tetraploides. Sin embargo, el híbrido 6499.56-2 H presenta una mayor afinidad con progenitores tetraploides y diploides expresando las características morfológicas del progenitor tetraploide, esto también puede estar asociado al sexo de la planta.

La asociación de materiales en el grupo dos difiere del grupo uno en que estos están asociados a las características del progenitor hexaploide macho, formando un grupo de tetraploides y pentaploides. Estos materiales presentan el mayor diámetro de entrenudo y longitud de hoja se expresa en estos materiales.

El grupo tres asocia materiales tetraploides y triploides que presentan características intermedias a materiales del grupo uno y cuatro, las características morfológicas se parecen más a las de progenitor tetraploide macho, aquí se presentó un caso donde el híbrido 2410.56-3 se dispersa del

grupo presentando características más parecidas al progenitor diploide hembra. Mientras que el grupo cuatro aún cuando asocia materiales diploides, triploides y pentaploides son características que se presentan en materiales con adecuadas características como materiales para césped de rápida cobertura, con mayor número y longitud de guías y número de nudos, asimismo poseen el color más atractivo como césped un color verde claro. Estas características morfológicas se asocian más a materiales diploides como lo señala Hernández *et al.* (2007)

De esta manera el color de pasto en 2X-RC10 es verde amarillento mientras que para 6B14 es de color verde grisáceo característica considerada como la más opuesta entre estos materiales.

El lograr definir esta serie de grupos de manera subjetiva pero clara, hace que no sea necesario realizar un Análisis Clúster para agruparlos, sino en la misma distribución poder formar grupos asociados a sus variables morfológicas. Se consideró más apropiado cuando los materiales que se usan en la dispersión no quedan lo suficientemente visibles y es suficiente el ACP donde quedan definidas características morfológicas que asocian a los materiales.

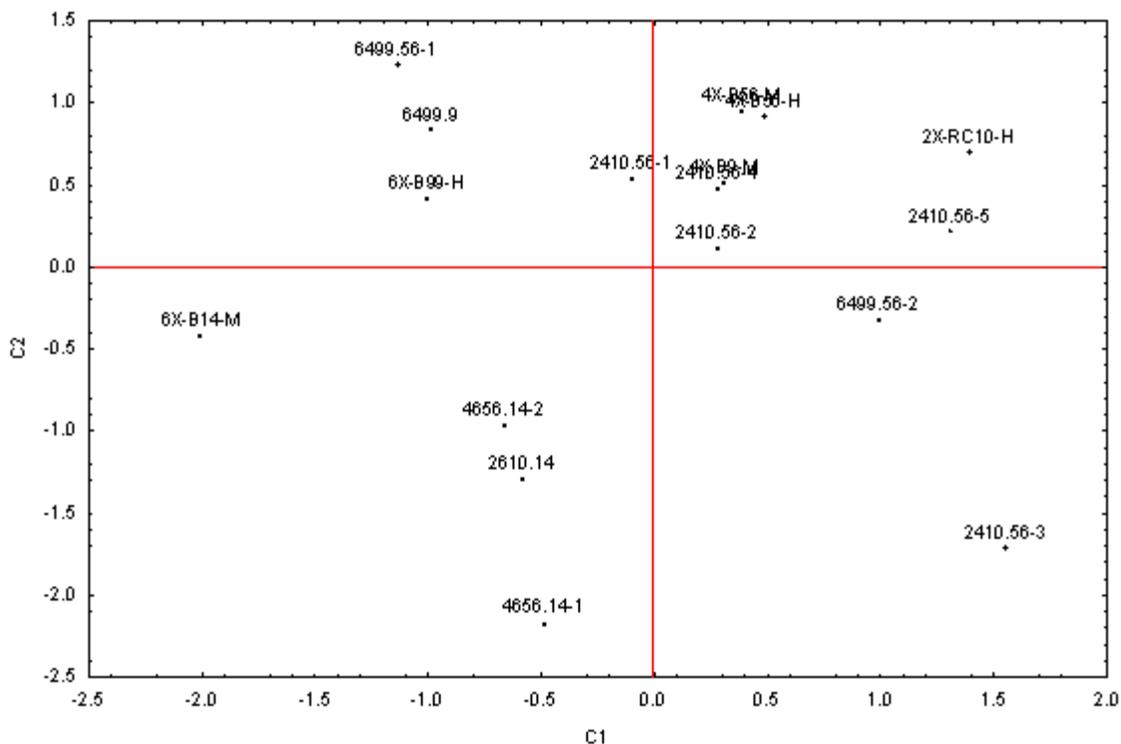


Figura 4.8. Distribución espacial de los materiales de zacate búfalo, conforme a los dos primeros componentes principales.

La distribución espacial de los materiales de zacate búfalo se describe en el Cuadro 8.4 del apéndice, y estos permiten la asociación de materiales que están estrechamente relacionados de acuerdo a la variable que se estaba evaluando.

### Agrupación de los Materiales

De acuerdo a la agrupación que se hace para 17 materiales respecto a las características morfológicas, con el análisis de conglomerados se definieron 4 grupos para las 12 variables morfológicas de calidad de césped.

En el Cuadro 4.7 se observan los diferentes grupos usando los materiales híbridos y los progenitores para determinar las características

morfológicas de calidad de césped. En este caso se definen 4 grupos. El grupo 1, la mayor parte integrada por materiales diploides y cuando estos fueron cruzados con tetraploides o hexaploides se expresaron más las características morfológicas de los materiales diploides, esto también se puede corroborar en la Figura 4.8, al tener los materiales diploides más cargados hacía el lado derecho. El Grupo 2, de acuerdo a la distribución espacial de la Figura 4.8, están distribuidos en la parte del centro donde existen representados diploides, triploides, tetraploides y pentaploides. El Grupo 3 esta representado por las características morfológicas de materiales hexaploides, aún cuando estos se cruzaron con materiales tetraploides expresan características morfológicas maternas hexaploides, hojas anchas, mayor pubescencia y color verde grisáceo. El Grupo 4, representado por uno de los materiales que sobresalió en características de calidad de césped hoja angosta, color verde, poca pubescencia y un gran desarrollo de cobertura.

Cuadro 4.7 Agrupación de 17 materiales usando las variables morfológicas de calidad de césped.

<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>
2XRC10	4XB56-M	6XB99	2410.56-3
2410.56-5	2410.56-4	6499.9	
4XB9-M	4XB56-H	6XB14-M	
2410.56-1	2410.56-2	6499.56-1	
2610.14	4656.14-1	6499.56-2	
4656.14-2			

En la Figura 4.9 se muestra el dendograma obtenido en el análisis de conglomerados, en éste se pueden observar y comparar la agrupación de los

materiales híbridos y sus progenitores de acuerdo a las variables morfológicas de calidad de césped.

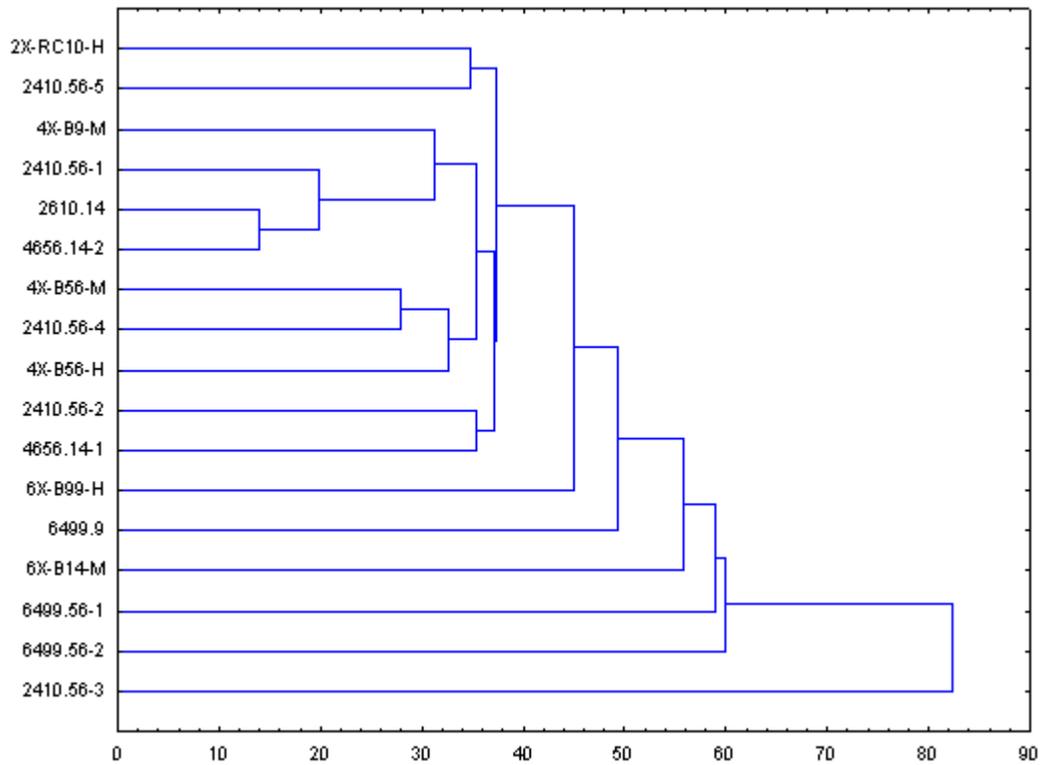


Figura 4.9 Grupos generados mediante el análisis de conglomerados usando variables morfológicas de calidad de césped.

## V. CONCLUSIONES

Las cruas interploidales en *Buchloe dactyloides* producen cariósides normales, rugosos y con embriones abortivos. Asimismo la presencia de anormalidades en el desarrollo del endospermo en híbridos obtenidos en cruzamientos de materiales con el mismo nivel de ploidía, evidencía diferentes EBN en la especie.

En los casos donde se presentó aborción prematura del embrión, fue posible llevar a cabo hibridación interploidal usando el rescate de embriones *in vitro* para obtener nuevo germoplasma de zacate búfalo.

Para el rescate de embriones se definió el medio de cultivo y se estableció un protocolo para el rescate de embriones, considerando tres etapas de regeneración *in vitro*.

En cariósides que formaron embrión abortivo, se determinó que el tiempo más apropiado para aislar los embriones inmaduros y desarrollarlos *in vitro* es de 15 días después de la polinización, donde se logró una eficiencia del 30 por ciento.

De acuerdo a la caracterización morfológica de calidad de césped se consideró el híbrido 241056-3 como uno de los materiales más idóneos para ser utilizado como césped.

## VI. RESUMEN

Esta investigación realizada en zacate búfalo (*Buchloe dactyloides*), con la finalidad de realizar una selección de progenitores con características apropiadas de calidad de césped y que en estos a su vez estuvieran representados los principales niveles de ploidía, permitió conocer como evolucionó el desarrollo del cariósipide en diferentes cruzas interploidaes, lográndose desarrollar cariósipides normales, rugosos y con embrión abortivo. Al encontrar híbridos abortivos de algunas cruzas interploidaes se plantea como objetivo establecer un protocolo de propagación *in vitro* para el rescate de embriones, ya que es la única alternativa que se conoce para lograr obtener plantas de esas cruzas. Los cariósipides con embriones inmaduros fueron separados a los 15, 20, 25 y 30 días después de la polinización. Luego se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio diluído en agua (1:9 v/v) durante 10 minutos y enjuagadas durante tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente se realizó el cultivo *in vitro* y se transfirieron al cuarto de incubación a temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}$  C con un fotoperiodo de 12 horas. El medio usado para establecimiento fue el medio básico de Murashige y Skoog (1962) (MS-62) complementado con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de Benciladenina (BA). La mayor germinación *in vitro* (65%) se logró en cariósipides separados a los 30 días

después de la polinización. Sólo las plántulas del híbrido 2410.56 desarrolladas *in vitro* fueron transferidas a tratamientos para multiplicación complementados con hormonas. El mejor medio fue MS-62 complementado con BA 1 mg L<sup>-1</sup> + ANA 0.3 mgL<sup>-1</sup> con 24.1 brotes por explante. Para el enraizamiento, todas las auxinas utilizadas favorecieron en número y longitud de raíces. Asimismo se establece que el tiempo más apropiado para aislar los cariósides inmaduros y desarrollarlos *in vitro* es de 15 días después de la polinización. En estos materiales se realizó una caracterización morfológica de calidad de césped lográndose definir que el híbrido 241056-3 es considerado como uno de los materiales más idóneos para ser utilizado como césped. Los resultados indican que es posible llevar a cabo hibridación interploidal usando el rescate de embriones *in vitro* para obtener nuevo germoplasma de zacate búfalo.

## VII. LITERATURA CITADA

- Armendáriz, E.S., P.M.C. López., S.T. Cervantes., V.P. Ramírez. 2000. inducción de variación somaclonal mediante colchicina en cultivos *in vitro* de orégano (*Lippia berlandieri* S). En: XVIII Congreso Nacional SOMEFI. 15 al 20 de Octubre, Irapuato Gto. p 42.
- Armendáriz, E.S., P.M.C. López., S.T. Cervantes., V.P. Ramírez. 2000. variación somaclonal inducida con radiaciones gamma en cultivos *in vitro* de orégano (*Lippia berlandieri* S). En: XVIII Congreso Nacional SOMEFI. 15 al 20 de Octubre, Irapuato Gto. p 41.
- Baran, J.T. and B. Ghosh. 2005. Plant Tissue Culture: Basic and Applied. Universities Press. India. 216 p.
- Barker B., M. Clark, P. Davis, M. Fisk, M. Hedlin, H. Israelsson, V. Khalturin, W. Y. Kim, K. McLaughlin, Ch. Meade, J. Murphy, R. North, J. Orcutt, Ch. Powell, P. G. Richards, R. Stead, J. Stevens, F. Vernon and T. Wallace. 1998. Monitoring Nuclear Tests. Science 281 (5385): 1967-1968.
- Brede, D. 2000. Turfgrass maintenance reduction handbook: sports, lawns, and golf. Chelsea and harbor press, Michigan, EUA. 173 p.
- Cantú, J.E. 1989. 150 Gramíneas del Norte de México. Monografía UAAAN. Saltillo, Coh. 145 p.
- Capote, R.A., M.Z. Fundora y D.O. Pérez. 2000. Estudio de la variabilidad inducida en células y plántulas de cebolla (*Allium cepa*, L.) cv. Caribe-71 regeneradas *in vitro*. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT). La Habana, Cuba.
- Cheplick, P. 1998. Population biology of grasses. Cambridge University Press. New York, N.Y. 145 p.
- Chikhale, N.J., S.N. Aimire, M.K. Rai, A.P. Ramteke. 2006. *In vitro* embryo rescue culture of hybrid cotton (*Gossypium*). Department of

Biotechnology, Amravati University, Amravati . Scientific Publishers, India.

- Dhar, A.C., P.B. Kavi Kishor, A.M. Rao. 1989. *In vitro* propagation of guayule (*Parthenium argentatum*) a rubber yield shrub. Plant Cell Reports 8 (8): 489-492.
- Ehlenfeldt, U.K., and R.E. Hanneman. 1984. The use of endosperm balance number and 2n gametes to transfer exotic germoplasm in potato. Theor. Appl. Genet. 68:155-161.
- Farías, F.J.M., N. Thomas y H. Quiroga. 1983. Utilización del análisis de componentes principales en la selección de líneas y variedades de ballico annual, *Lolium multiflorum* Lam. Agr. Téc. Méx. 9:125-140.
- Fei, S.Z., T.P. Riordan and P.E. Read. 2002. Stepwise decrease of 2,4-D and addition of BA in subculture medium stimulated shoot regeneration and somatic embryogenesis in buffalograss. Plant Cell Tissue and Organ Culture 70 (3): 275-279.
- Fei, S.Z., P.E. Read and T.P. Riordan. 2000. Improvement of embryogenic callus induction and shoot regeneration of buffalo grass by AgNO<sub>3</sub>. Plant Cell Tissue Organ Culture. 60 (3): 197-203.
- Matzk, F. 1996. Hybrids of Crosses between Oat and Andropogoneae or Paniceae Species. Crop Sci. 36:17-21.
- Ferguson N.H., E.A. Rupert and P.T. Evans. 1990. Interspecific *Trifolium* hybrids produced by embryo and ovule culture. Crop Sci. 30:1145-1149.
- Gould, F.W., y R.B. Shaw. 1992. Gramíneas clasificación sistemática. 1a ed., Ed. AGT, México D.F. 288 p.
- Hanneman, R.E. 1994. Assignment of endosperm balance numbers to the tuber-bearing solanums and their close non-tuber-bearing relatives. Euphytica 74: 19-25.
- Hannig B. 1904. First attempt in embryo culture of selected Crucifers. Bot. Zeitung. 62: 45-80.
- Hernández, E. 1987. Los pastos y pastizales de las zonas áridas del centro y noreste de México. Xolocotzia (II): 530.
- Hernández, C.R.E., R.J.M. Martínez, V.M.H. Reyes, D.J.R. González y S.H. Díaz. 2007. Caracterización morfológica y de calidad de césped de ecotipos de zacate búfalo [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engem.]. Rev. Fitotec. Mex. 30(4): 381-390.

- Hoopes, R.W., and R.L. Plaisted. 1987. Potato. In: Principles of cultivar development. Fehr, W. Ed., New York MacMillan. p 385-436.
- Hopper, T.H., and L. Nesbitt. 1930. The chemical composition of some North Dakota pasture and hay grasses. Bull. 236. Fargo, ND: North Dakota Agricultural College, Agricultural Experiment Station. 39 p.
- Huff D.R., and L. Wu. 1987. Sex expression in buffalograss under different environments. Crop Sci. 27:623-626.
- Huff, D.R., R. Peakall and P.E. Smouse. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe datyloides* (Nutt.) Engelm.] Theor. Appl. Genet. 86:927-934.
- Isebrands, P.J. and T.R. Crow. 1975 Introduction to uses and interpretation of Principal Component Analysis in forest biology. USDA, Forest Service. General Technical Report NC-17. 1989-1997.
- Jaskani, M.J., A.I. Khan and M.M. Khan. 2005. Fruit set, seed development and embryo germination in interploidy crosses of citrus. Scientia Horticulturae 107:51-57.
- Johnson P.G., E.K. Kenworthy, L.D. Auld and T.P. Riordan. 2001. Distribution of buffalograss polyploid variation in the Southern Great Plains. Crop Sci. 41:909-913.
- Johnson, P.G., T.P. Riordan and C.J. Johnson. 2000. Low-mowing tolerance in buffalograss. Crop Sci. 40:1339-1343.
- Johnson, P.G., T.P. Riordan and K. Arumuganathan. 1998. Ploidy level determinations in buffalograss clones and populations. Crop Sci. 38:478-482.
- Johnston, S.A., A.P.M. De Ninjs, S.J. Peloquin and R.E. Hanneman. 1980. The significance of genic balance to endosperm development in interespecific crosses. Theor. Appl. Genet. 57:5-9.
- Khachatourians G.G., A. McHughen, R. Scorza, W.K. Nip y Y.H. Hi. 2002. Transgenic plants and crops. Edit. Marcel Dekker, New York, NY.
- Li Y., J. Gao and S.Z. Fei. 2009. High frequency *in vitro* embryogenic callus induction and plant regeneration from indiagrass mature caryopsis. Scientia Horticulturae, 119 (3): 306–309.
- Luévanos, E.M.P, V.M.H. Reyes, Q.J.A. Villarreal and H.R. Rodríguez. 2010. Obtención de híbridos intergenéricos *Helianthus annuus* x *Tithonia rotundifolia* y su análisis morfológico y molecular. Act. Bot. Mex. 90.

- Martínez, R.J.M. 2008. Triploid buffalograss occurring naturally in México. In: Annual Meeting Abstracts. Society for Range Management. Louisville, Ky. USA.
- Martínez, R.J.M. y E.S. Armendáriz. 2010. Bases morfológicas de cómo pudo haberse originado el dimorfismo sexual en el pasto búfalo. *Rev. Fitotec. Mex.* 33 (4): 69-73.
- Monnier, M. 1980. Contribution de la culture de l'embryon zygotique a la connaissance du development et de la physiologie de l'embryon in situ. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 127: 59-70.
- Moore, R.W. 1991. The *in vitro* culture of *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm. M.S. Thesis. University of Nebraska-Lincoln.
- Nelson, E.R. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Edit. CIP-IPGRI-PRACIPA-IBTA-PROINPA-COSUDE-CID. 372: 235-242
- Nitsch, J.P. 1951. Growth and development *in vitro* of excised ovaries. *Am. J. Bot.* 38: 566-577.
- Ortiz, R., and M.K. Ehlfeldt. 1992. The importance of endosperm balance Number in potato breeding and the evolution of tuber-bearing *Solanum* species. *Euphytica* 60: 105-113.
- Pierik, R.L.M. 1997. *In vitro* cultures of higher plants. Edit. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p 348.
- Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Edit. Ediciones Mundi Prensa. Madrid España. p 326.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* cultures of higher plants. Edit. Martinus Nijhoff Publishers. Boston. 319 p.
- Qian, Y.L., S. Ball, Z. Tan, A.J. Koski and S.J. Wilhem. 2001. Freezing tolerance of six cultivars of buffalograss. *Crop Sci.* 41:1174-1178.
- Rajeevan, M.S., and R.M. Pandey. 1986. Lateral bud cultura of papaya (*Carica papaya L.*) for clonal propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 6:181-188.
- Razdan, M.K. 2003. Introduction to plant tissue culture. Science Publishers. 2a edition. 375 p.
- Richards, A.J. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. *The Royal Society* 1085-1093.

- Rives, M. 1983. Introducing new technology to plant breeding. In: UPOV. Genetics Engineering and Plant Breeding. Records of a Symposium held on the occasion of the 16th. Session of the International Union for the Protection of New Varieties of Plants. pp. 53-6.
- Roberts, E.C., W.W. Huffine, F.V. Grau and J.J. Murray. 1992. Turfgrass science historical overview. *In: Turfgrass*. D.V. Waddington, R.N. Carrow, R.C. Sherman (eds.) Agronomy Mongraph No. 32 ASA-CSSA-SSSA Madison, WI. USA. pp 1-27.
- Rodrigues O.B.M., O.M.I. Penteado and C.B. Valle. 2000. Embryo rescue of interspecific hybrids of *Brachiaria* spp. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61(3): 175–182.
- Santillán, S.R.M., E.S. Armendáriz and C.R. Trejo .2001. Propagación *in vitro* de tres clones de candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 2 (1): 49-52.
- Sathyanarayana B.N., and D.B. Varghese. 2007. *Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols*. Edit. I.K. International. Discovery Publishing House. New Delhi, India. 292 p.
- Statistical Analysis System. 1999. SAS for Windows Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Stubbendieck J., L.S. Hatch and L.M. Landholt. 2003. *North American wildland plants*. University of Nebraska. Nebraska, USA.
- Terrell, E.E. 1971. Survey of occurrences of liquid or soft endosperm in grass genera. *Bull Torrey Bot. Club* 98: 264–268.
- Vargas, Ch.D. 1984. Análisis de componentes principales. INIA. Mesa de control (Estadística y cálculo). Oficinas centrales. México.
- Watson, J.R., H.E. Kaerwer and D.P. Martin. 1992. The turf industry. *In: Turfgrass*. D.V. Waddington, R.N. Carrow, R.C. Shearman (Eds.) Agronomy Mongraph No. 32 ASA-CSSA-SSSA Madison, WI. USA. pp 29-88.
- Yadav, P.R., and R. Tyagi. 2008. *Biotechnology of plant tissues*. Edit. Discovery Publishing House. New Delhi, India. 256 p.
- Yamashita H., I. Shigehara and T. Haniuda .1998. Production of triploid grapes by in ovulo embryo culture. *Vitis*, 37: 113-117.

Ye, C. W. E., H. Díaz, A.J. Lozano, V.V.M. Zamora y M.J. Ayala. 2001. Agrupamiento de germoplasma de triticales forrajero por rendimiento, ahijamiento y gustosidad. Tec. Péc. Méx. 39(1):15-30.

## VIII. APÉNDICE

Cuadro 8.1. Valores que definen la caracterización morfológica de 33 materiales en los primeros tres componentes.

<b>MATERIALES</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>
<b>B62-H</b>	0.84058	0.78374	-0.68780
<b>B-106-M</b>	1.76625	1.89140	1.84189
<b>RC-3</b>	0.56734	0.64419	0.53539
<b>RC-10</b>	1.09940	-0.41402	-0.74160
<b>RC-7</b>	1.37933	0.13037	0.83919
<b>RC-1-M</b>	0.54771	-1.01728	-0.39269
<b>RC-2</b>	0.63132	-0.74997	-0.26674
<b>B-14-4x</b>	1.00586	-0.07006	0.05976
<b>GPS-153-4x</b>	0.12286	-1.09268	-0.08754
<b>B-9-H</b>	0.49756	-1.02990	-0.06222
<b>B-9-M</b>	0.70612	-0.27281	1.35989
<b>B-12</b>	1.59503	-1.44655	-1.01529
<b>B-13-H</b>	0.32717	0.98578	-0.00340
<b>B-15</b>	0.45585	-0.56815	-0.35205
<b>B-22</b>	0.24999	0.27838	0.38303
<b>B-56-H</b>	0.03674	0.62566	-0.98012
<b>GPS-228</b>	0.25301	-1.80660	0.48958
<b>ZAC-26</b>	0.44559	-0.21521	-1.07458
<b>NE-86-120</b>	-0.06340	1.30235	0.33936
<b>B-12xB-14</b>	-0.74825	1.55251	1.68072
<b>B-74</b>	-1.00286	-1.99919	1.18855
<b>B-99-H</b>	-1.97626	0.30127	-2.38071
<b>TAM-86</b>	-0.41031	2.22889	-2.01858
<b>B-87</b>	-1.20386	-0.97244	-0.92932
<b>B-87 color</b>	-0.05863	-0.12723	-0.15979
<b>B14-6x</b>	-1.50431	-0.90009	0.92843
<b>GPS-133</b>	-1.62253	0.30854	0.45013
<b>GPS-153-6x</b>	-0.34843	-0.37593	0.34391
<b>GPS-233</b>	-0.70821	0.54613	0.89216
<b>TECO</b>	-1.86166	0.17411	1.31531
<b>TECO-sel</b>	-1.34884	0.37064	-0.53142
<b>GPS-152</b>	-0.58654	0.33501	0.35720
<b>GPS- 155</b>	0.91637	0.59915	-1.32065

Cuadro 8.2. Cuadrados medios del ANVA de las variables morfológicas de calidad de césped en progenitores e híbridos F1 de zacate búfalo.

FV	GL	Co1	Co2	NG	LG	NN	LE	LH	AP	DE	AH	De	Pu
Trat	16	76.77**	0.427**	6.07**	86.12*	13.1*	144.3**	88.81**	2.7*	45.97**	1.23**	0.91**	88.78**
Bloq	2	0.296	0.0007**	0.69	0.26	0.034	0.71	0.138	2.22	0.38	8.19**	0.14	0.71
Error	32	529.23	315.51	42.91	34.84	1.6	212.9	143.33	202.8	0.18	0.04	0.18	0.13
C.V		47.83	21.58	60.09	38.09	49.34	25.28	11.26	14.23	19.09	10.10	19.09	18.95

Cuadro 8.3. Comparación en algunas de las variables morfológicas de calidad de césped entre progenitores y los híbridos F1 resultantes de las cruzas.

T		MEDIAS							
		Co1		Co2		NG		LG	
1	<b>2RC10 H</b>	2410.56-3	93.33 a	2RC10 H	100 a	2RC10 H	20.33 a	2410.56-3	29.433 a
2	<b>4B9 M</b>	2RC10 H	91.67 ab	2410.56-5	100 a	2410.56-3	20.33 a	6499.56-2	22.833 ab
3	<b>4B56 M</b>	2410.56-5	76.67 abc	2410.56-3	100 a	2410.56-5	18.66 a	2RC10 H	19.200 abc
4	<b>4B56 H</b>	4B9 M	66.33 abc	4B9 M	98.33 a	4B56 H	18.33 a	2410.56-5	17.967 abc
5	<b>6B14 M</b>	2410.56-2	60.33 abc	4B56 H	96.67 ab	2410.56-2	13.00 a	2410.56-4	17.667 abc
6	<b>6B99 H</b>	2610.14	52.33 abc	6499.56-2	96.67 ab	6499.56-2	12.67 a	4656.14-1	17.600 abc
7	<b>2410.56-1</b>	4B56 H	50.33 abc	2610.14	91.67 abc	4B9 M	12.33 a	2410.56-2	17.233 abc
8	<b>2410.56-2</b>	6499.56-2	48.00 abc	4B56 M	90.33 abc	2410.56-4	12.00 a	4B56 M	15.233 abc
9	<b>2410.56-3</b>	2410.56-4	45.33 abc	2410.56-4	90 abc	2610.14	11.67 a	6B99 H	14.600 abc
10	<b>2410.56-4</b>	4656.14-1	42.33 abc	4656.14-2	88 abc	4B56 M	11.33 a	4B56 H	14.567 abc
11	<b>2410.56-5</b>	4656.14-2	42.33 abc	2410.56-1	87 abc	4656.14-1	7.67 a	2610.14	13.067 abc
12	<b>2610.14</b>	4B56 M	38.33 abc	4656.14-1	84.33 abc	2410.56-1	7.33 a	2410.56-1	12.967 abc
13	<b>4656.14-1</b>	2410.56-1	35.67 abc	2410.56-2	72.67 abc	4656.14-2	7.33 a	4656.14-2	12.467 abc
14	<b>4656.14-2</b>	6499.9	23.00 abc	6B99 H	63.33 abc	6499.9	4.67 a	4B9 M	12.367 abc
15	<b>6499.56-1</b>	6B14 M	22.33 bc	6499.9	59.33 abc	6B14 M	3.67 a	6499.56-1	12.000 abc
16	<b>6499.56-2</b>	6B99 H	16.67 c	6B14 M	42.3 bc	6499.56-1	2.33 a	6499.9	9.567 bc
17	<b>6499.9</b>	6499.56-1	12.67 c	6499.56-1	38.33 c	6B99 H	1.67 a	6B14 M	4.633 c

Continuación.....  
Cuadro 8.3A.

		MEDIAS					
	NN	LE		LH		AP	
6499.56-2	4.000 a	2410.56-3	85.27 a	2410.56-3	133.533 a	6499.56-2	120.67 a
2410.56-3	3.867 a	6499.56-2	76.60 ab	4656.14-1	129.333 ab	2410.56-3	119.33 a
2410.56-5	3.867 a	2410.56-4	71.53 ab	6B99 H	121.733 abc	6499.56-1	111.00 a
2RC10 H	3.733 a	4B56 M	70.60 ab	6499.56-2	118.867 abcd	2410.56-1	110.00 a
4B9 M	3.200 a	6B99 H	68.27 ab	6499.9	117.800 abcd	2RC10 H	109.00 a
4656.14-1	3.000 a	6499.9	66.47 ab	2610.14	111.467 abcd	4656.14-1	108.00 a
2410.56-2	2.933 a	2410.56-5	63.93 ab	4B9 M	109.000 abcd	2410.56-2	105.67 a
4B56 M	2.867 a	4656.14-2	60.20 ab	6B14 M	108.867 abcd	4B9 M	104.33 a
4B56 H	2.800 a	2610.14	57.67 ab	4656.14-2	108.133 abcd	4B56 M	100.67 a
2610.14	2.600 a	4656.14-1	57.60 ab	2410.56-5	106.733 abcd	4656.14-2	96.33 a
2410.56-4	2.533 a	4B56 H	54.07 ab	2410.56-2	103.933 abcd	2410.56-5	96.00 a
4656.14-2	2.133 a	2410.56-1	51.80 ab	2410.56-1	100.533 abcd	2410.56-4	93.00 a
2410.56-1	1.933 a	2RC10 H	48.47 ab	2410.56-4	93.267 bcd	2610.14	93.00 a
6499.9	1.200 a	2410.56-2	48.00 ab	6499.56-1	89.267 cd	6B99 H	93.00 a
6499.56-1	1.133 a	4B9 M	34.47 b	2RC10 H	86.200 cd	6B14 M	83.00 a
6B99 H	0.933 a	6499.56-1	33.47 b	4B56 M	84.600 d	6499.9	80.67 a
6B14 M	0.867 a	6B14 M	32.77 b	4B56 H	83.200 d	4B56 H	78.00 a

Continuación.....  
Cuadro 8.3B.

		MEDIAS					
	DE	AH		Den		Pu	
4656.14-1	1.21 a	6B14 M	2.46 a	4656.14-1	3.00 a	6B14 M	3.0 a
6B14 M	1.21 a	2610.14	2.31 ab	2410.56-5	3.00 a	4656.14-2	3.0 a
2610.14	1.14 ab	4656.14-1	2.28 abc	4656.14-2	2.67 ab	4656.14-1	3.0 a
4656.14-2	1.07 abc	4656.14-2	2.15 abcd	4B56 H	2.67 ab	2610.14	3.0 a
2410.56-3	1.03 abc	6499.56-1	1.98 abcd	2RC10 H	2.67 ab	6499.56-1	2.0 ab
6B99 H	0.98 abc	2410.56-2	1.98 abcd	2410.56-3	2.67 ab	6499.56-2	2.0 ab
2410.56-1	0.97 abc	6B99 H	1.94 abcd	2410.56-2	2.33 abc	6499.9	2.0 ab
2410.56-2	0.90 abc	2410.56-3	1.91 abcd	2610.14	2.33 abc	4B9 M	1.7 b
2410.56-4	0.88 abc	6499.9	1.89 abcd	4B56 M	2.33 abc	2410.56-1	1.7 b
4B9 M	0.87 abc	2410.56-4	1.85 bcd	4B9 M	2.00 abcd	2410.56-4	1.7 b
4B56 H	0.84 bc	2410.56-5	1.84 bcd	2410.56-1	2.00 abcd	4B56 H	1.7 b
6499.9	0.83 bc	2410.56-1	1.79 bcd	2410.56-4	2.00 abcd	6B99 H	1.7 b
6499.56-2	0.82 bc	4B56 H	1.75 bcd	6499.56-1	2.00 abcd	2410.56-2	1.7 b
2RC10 H	0.80 bc	6499.56-2	1.72 bcd	6499.56-2	2.00 abcd	4B56 M	1.3 b
6499.56-1	0.79 bc	4B56 M	1.70 cd	6B14 M	1.67 bcd	2410.56-3	1.0 b
4B56 M	0.76 c	4B9 M	1.64 d	6499.9	1.33 cd	2410.56-5	1.0 b
2410.56-5	0.74 c	2RC10 H	1.57 d	6B99 H	1.00 d	2RC10 H	1.0 b

Cuadro 8.4. Coeficientes de correlación en los tres primeros componentes, al evaluar materiales diploides, triploides, tetraploides, pentaploides y hexaploides de zacate búfalo (*Buchloe dactyloides*).

<b>MATERIALES</b>	<b>CP1</b>	<b>CP2</b>	<b>CP3</b>
<b>2RC10 H</b>	<b>1.483</b>	0.788	0.897
<b>4B9 M</b>	0.451	0.660	0.553
<b>4B56 M</b>	0.298	0.836	-0.175
<b>4B56 H</b>	0.576	1.021	1.338
<b>6B14 M</b>	<b>-1.992</b>	-0.365	0.663
<b>6B99 H</b>	-1.062	0.320	-2.067
<b>2410.56-1</b>	-0.126	0.515	-0.214
<b>2410.56-2</b>	0.326	0.176	0.318
<b>2410.56-3</b>	<b>1.545</b>	-1.757	-1.348
<b>2410.56-4</b>	0.246	0.432	-0.366
<b>2410.56-5</b>	1.198	0.119	0.494
<b>2610.14-1</b>	-0.574	-1.254	1.030
<b>4656.14-1</b>	-0.484	-2.136	0.627
<b>4656.14-2</b>	-0.656	-0.939	0.876
<b>6499.56-1</b>	<b>-1.124</b>	1.245	0.109
<b>6499.56-2</b>	0.899	-0.445	-1.511
<b>6499.9</b>	-1.004	0.785	-1.223