



DESARROLLO DE UN SISTEMA EFICIENTE DE REGENERACIÓN VEGETAL *in vitro* PARA CINCO VARIEDADES ÉLITE DE *Lolium multiflorum* Lam[†]

[DEVELOPMENT OF A RELIABLE *in vitro* PLANT REGENERATION SYSTEM FOR FIVE ELITE CULTIVARS OF *Lolium multiflorum* Lam]

Luisa M. Gómez-Torres¹, Blanca Moreno-Gómez²,
Mario Enrique Velásquez-Lozano³ and Gerardo A. Aguado-Santacruz^{4*}

¹ *Sistemas y Recursos Ambientales Sostenibles SYRAS. Vicerrectoría de Investigaciones. Universidad Manuela Beltrán. Av. Circunvalar no. 60-00. Bogotá, Colombia. Tel 57(1) 5460600 Ext. 1187.*

² *Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 6.5 Carr. Celaya-San Miguel de Allende CP 38110, Celaya, Guanajuato, México. Tel y Fax 01 (461) 6115323.*

³ *Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia. Avenida Carrera 30 No. 45-03. Bogotá, Colombia. Tel 57 (1) 3165000 Ext. 14306.*

⁴ *Tecnológico Nacional de México/I.T. Roque, Carretera Celaya-Juventino Rosas Km. 8 CP 38110, Celaya, Guanajuato, México. Tel 01 (461) 6115903.*

Email: gaguados@gmail.com

**Corresponding author*

RESUMEN

Se desarrolló un sistema de regeneración eficiente y reproducible para variedades comerciales de *Lolium multiflorum* Lam, denominadas ‘Magnun’, ‘Bargala’, ‘Tetragold’, ‘Hercules’ y ‘Maximus’. Se estudió la eficiencia de formación de callo morfogénico y su capacidad de regeneración usando como explantes ápices de vástago cultivados en seis formulaciones basadas en el medio Murashige y Skoog suplementado con hidrolizado de caseína y diferentes concentraciones de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D; 1 o 2 mg L⁻¹), benzilaminopurina (BA; 2 o 4 mg L⁻¹) y adenina (40 u 80 mg L⁻¹). Se observaron dos tipos morfológicos de callos; uno friable y con capacidad de regeneración y otro acuoso sin capacidad de formación de plantas. El mayor porcentaje de formación de callos morfogénicos (37 % en ‘Tetragold’ y ‘Hércules’ vs. 58 % y 65 % en ‘Maximus’ y ‘Magnun’, respectivamente) se logró en el medio 2D4B80A (2 mg L⁻¹ 2,4-D, 4 mg L⁻¹ BA y 80 mg L⁻¹ adenina). El mayor número de plántulas regeneradas g⁻¹ peso fresco (PF) de callo morfogénico fue de 48.71 para los ápices de vástago de la variedad ‘Magnun’ cultivados en el medio 2D4B40A (2 mg L⁻¹ 2,4-D, 4 mg L⁻¹ BA y 40 mg L⁻¹ adenina). Las plantas regeneradas crecieron en suelo bajo condiciones de invernadero alcanzaron la madurez y produjeron semillas. Los resultados confirman la ventaja de usar ápices de vástago como explantes iniciales al cultivar en las formulaciones de medios desarrolladas en este estudio.

Palabras clave: *Lolium multiflorum*; cultivo *in vitro*; embriogénesis; regeneración.

SUMMARY

The response to *in vitro* tissue culture of five commercial annual ryegrass cultivars, namely ‘Magnun’, ‘Bargala’, ‘Tetragold’, ‘Hercules’ and ‘Maximus’, was evaluated. Morphogenic callus induction and plant regeneration capacity were assessed in shoot apices cultured on six media formulations that included Murashige and Skoog medium supplemented with casein hydrolyzate and different concentrations of 2,4 phenoxyacetic acid (2,4-D; 1 or 2 mg L⁻¹), benzylaminopurine (BA; 2 or 4 mg L⁻¹) and adenine (40 or 80 mg L⁻¹). Two morphological kind of calli were observed: one of them friable and regenerable and the other watery without regeneration capacity. The highest morphogenic callus formation (37 % in ‘Tetragold’ and ‘Hercules’ varieties vs. 58 % and 65 % in ‘Maximus’ and ‘Magnun’, respectively) was achieved using 2D4B80A medium (2 mg L⁻¹ 2,4-D, 4 mg L⁻¹ BA and 80 mg L⁻¹ adenine). On the other hand, the highest number of regenerated plants per g⁻¹ fresh weight (FW) of morphogenic callus was 48.71 for ‘Magnun’ shoot apices cultured on 2D4B40A medium (2 mg L⁻¹ 2,4-D, 4 mg L⁻¹ BA and 40 mg L⁻¹ adenine). Regenerated plants grew in soil under greenhouse conditions reached maturity and subsequently produced seeds. The results obtained in this study confirm the suitability of using the shoot tips of *Lolium multiflorum* as starting material when cultured on the formulation media developed in this study.

Keywords: *Lolium multiflorum*; culture *in vitro*; embryogenesis; regeneration.

[†] Submitted November 23, 2017 – Accepted September 13, 2018. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License

INTRODUCCIÓN

El “ryegrass” italiano o “ryegrass” anual (*Lolium multiflorum* Lam) es uno de los pastos más importantes en los climas templados y es ampliamente usado como forraje debido a sus características deseables como alta producción, rápido establecimiento y crecimiento, precocidad extraordinaria y alto valor nutricional. El mejoramiento genético de *Lolium multiflorum* Lam tiene un alto potencial a través del empleo de las actuales herramientas biotecnológicas, tales como el cultivo de tejidos y la transformación genética, por el interés en desarrollar nuevas variedades con resistencia a enfermedades, tolerancia a sequía y bajas temperaturas, incremento de la digestibilidad, mayor producción de biomasa y mejor contenido de nutrientes (Humphreys et al., 2010; Ran et al., 2007). Se prevé que estas plantas mejoradas puedan ser empleadas por los productores de ganado de México y otros países para mejorar la alimentación animal.

Se sabe que los pastos, entre ellos *Lolium multiflorum* Lam, están entre las especies más recalcitrantes al cultivo de tejidos *in vitro* y por lo tanto a la aplicación de los diferentes métodos de transformación genética (Giri y Praveena, 2015; Regalado et al., 2017). Consecuentemente, existen solo unos pocos reportes de variedades comerciales de *Lolium multiflorum* con capacidad de regeneración *in vitro* consistentes y eficientes, y han sido desarrollados especialmente para variedades japonesas, surcoreanas y europeas. Los reportes de variedades comerciales de *Lolium multiflorum* están basados principalmente en cultivos *in vitro* organogénicos o embriogénicos (Ran et al., 2007). Los callos embriogénicos para *Lolium multiflorum* han sido inducidos a partir de cultivos meristemáticos obtenidos a partir de semillas maduras (Chenna-Reddy et al., 2005; Lee et al., 2009), ápices de vástago (Takahashi et al., 2004), óvulos (Kumlehn y Nitzsche, 1996) y embriones inmaduros (Dale, 1980). Por otro lado, suspensiones celulares (Pavlova y Kordyum, 1996) y protoplastos (Dalton, 1988) también han sido usados como sistemas de regeneración.

Los principales problemas de los cultivos de tejidos vegetales en pastos, han sido la baja regeneración, la pérdida de capacidad de regeneración con el tiempo y la obtención de plantas albinas. Estos factores restringen mucho la aplicación del cultivo *in vitro* en *Lolium multiflorum*. Además, la existencia de una amplia diversidad genética presente en esta especie que resulta en una gran variedad de respuestas al cultivo de tejidos, dificulta aún más el establecimiento de protocolos eficientes y reproducibles para el cultivo *in vitro* de esta especie.

El desarrollo de protocolos eficientes y reproducibles en cultivo de tejidos *in vitro* es un prerrequisito para aplicar herramientas biotecnológicas modernas tendientes a la producción de nuevas variedades y el mejoramiento genético de cultivos, tales como la recuperación de variantes somaclonales, producción de plantas transgénicas, obtención de plantas libres de patógenos y la multiplicación de germoplasma deseable, entre otros (Aguado-Santacruz et al., 2011). Se han obtenido plantas transgénicas de *Lolium multiflorum* mediante el bombardeo con microproyectiles (Dalton, 1988; Ye et al., 1997) y el empleo de *Agrobacterium* (Bettany et al., 2003; Lee et al., 2010). Sin embargo, la optimización de condiciones de cultivo que requiere cada genotipo de esta especie en cuanto a tipo de explante, medio de cultivo y suplementos nutricionales es necesaria para lograr una transformación genética exitosa de *Lolium multiflorum*. El objetivo de este estudio fue probar diferentes formulaciones de reguladores de crecimiento para la inducción de respuestas morfogénicas en explantes de ápices de vástago de cinco genotipos de *Lolium multiflorum* y desarrollar un sistema de cultivo de tejidos regenerable y de largo plazo para facilitar su manejo biotecnológico en laboratorio. Hasta donde se sabe, ninguna de las variedades utilizadas en este estudio ha sido previamente considerada para el análisis de la capacidad de regeneración *in vitro* de plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El germoplasma de cinco variedades élite de *Lolium multiflorum* Lam, denominadas ‘Magnun’, ‘Bargala’, ‘Tetragold’, ‘Hercules’ y ‘Maximus’, fue utilizado para los experimentos de cultivo de tejidos. Se utilizaron ápices de vástago como material de inicio para evaluar la respuesta morfogénica de estas cinco variedades al cultivo *in vitro*. Las semillas de las cinco variedades de *Lolium multiflorum* fueron tratadas con 50 % (v/v) de ácido sulfúrico por 30 minutos para remover la lema y posteriormente fueron cuidadosamente enjuagadas con agua destilada. Subsecuentemente, las semillas fueron esterilizadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (5.6 % v/v) por 20 minutos y enjuagadas cinco veces con agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas *in vitro* colocándolas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) solidificado con 2.5 g L⁻¹ de Gelrite. Posteriormente, los ápices de vástago fueron aislados a partir de las plántulas de 3 a 5 días de desarrollo. Para aislar estos explantes, las semillas fueron germinadas en la oscuridad para promover la elongación del internodo subcoleoptilar y entonces se disectaron usando un estereoscopio.

Medios probados para la inducción de respuestas morfológicas en *Lolium multiflorum*

Con el objetivo de inducir callos a partir de segmentos de 1 cm de largo que incluían el nodo coleoptilar, estos fueron sembrados en cajas de Petri que contenían 30 mL de los diferentes medios de inducción. Se usaron cinco cajas de Petri (réplicas) con 10 ápices de vástago en cada una para cada variedad de *Lolium multiflorum* y condición de luz. Las seis formulaciones de medio contenían las vitaminas y las sales basales del medio MS, 1 o 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 40 u 80 mg L⁻¹ de adenina, 2 o 4 mg L⁻¹ de BA, 500 mg L⁻¹ de hidrolizado de caseína, 3 % de sacarosa; todos los medios formulados fueron solidificados con 2.5 g L⁻¹ de Gelrite (Tabla 1).

Las concentraciones de reguladores de crecimiento escogidas para el experimento fueron sugeridas por un experto en el tema de cultivo de tejidos vegetales en gramíneas (Aguado-Santacruz et al., 2007; Aguado-Santacruz et al., 2011). La combinación de auxinas y citocininas utilizadas en estos experimentos, fueron similares a las que se usaron para desarrollar la única línea celular clorofílica en Poaceae reportada hasta la fecha, la cual corresponde al pasto *Bouteloua gracilis* (Aguado-Santacruz et al., 2001). Los explantes fueron cultivados bajo dos condiciones de luminosidad distintas: oscuridad completa e iluminación fluorescente continua (40 µmol fotón m⁻² s⁻¹, a 25 ± 1 °C) para evaluar el efecto de la luz en la inducción de callos morfológicos. El medio fue ajustado a un pH de 5.8 y entonces esterilizado a 121°C por 15 minutos.

La eficiencia de inducción de callo primario fue medida como porcentaje de ápices de vástago que produjeron callo. Los porcentajes de inducción de callo fueron cuantificados 30 días después de sembrar los explantes en los diferentes medios. El medio MS, la sacarosa y el hidrolizado de caseína fueron comprados a la empresa Phytotechnology (Shawnee Mission, KS). Los reguladores de crecimiento y el Gelrite fueron adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Tabla 1. Medios utilizados para inducción de respuestas morfológicas a partir de ápices de vástago de cinco variedades de *Lolium multiflorum*.

Medio	Sales Basales	2,4-D mg L ⁻¹	BA mg L ⁻¹	Adenina mg L ⁻¹
MPC	MS	1	2	40
MPC80	MS	1	2	80
D3B40A	MS	1	3	40
D4B80A	MS	1	4	80
2D4B40A	MS	2	4	40
2D4B80A	MS	2	4	80

MS: Medio Murashige y Skoog; 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BA: Benzilaminopurina

Propagación y mantenimiento de callos y regeneración de plantas

Líneas clonales individuales de callos se propagaron disectando y subcultivando las masas iniciales de callos formados sobre el mismo medio de inducción durante tres subcultivos (a intervalos de 30 días para cada uno) en la oscuridad o en presencia de luz (40 µmol fotón m⁻² s⁻¹) a una temperatura de 25 °C ± 1 °C y humedad relativa de 13 %. Se cuantificó la formación de callo morfológico y la presencia de necrosis en los callos formados en cada formulación. La eficiencia de formación de callo morfológico fue medida como el porcentaje de ápices de vástago que produjeron callo morfológico. Los porcentajes de inducción de callos morfológicos fueron cuantificados 90 días después de sembrar los callos primarios en los diferentes medios.

Para determinar la capacidad de las líneas celulares individuales para regenerar plantas completas, parte de los callos multiplicados fueron transferidos a cajas de Petri que contenían MS o 1/2 MS y entonces fueron colocadas en un cuarto de crecimiento a 25 °C ± 1 °C, humedad relativa de 13 % y un fotoperiodo de 8 horas (40 µmol fotón m⁻² s⁻¹). Posteriormente, los brotes de 1 a 2 cm de altura fueron transferidos a cajas Magenta GA7 de 400 mL de capacidad, que contenían 50 mL de medio 1/2 MS suplementado con 0.5 a 1.0 mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA) y mantenidos en las condiciones ambientales ya mencionadas hasta que las plántulas alcanzaron alturas de 7 a 9 cm y desarrollaron de tres a cinco raíces con longitudes entre 2 y 4 cm.

Aclimatación y adaptación de las plantas regeneradas

Después que las plántulas regeneradas *in vitro* alcanzaron el estado de desarrollo proyectado, fueron removidas de las cajas de Magenta, y las raíces formadas se enjuagaron con agua corriente para eliminar el medio residual. Subsecuentemente, las plántulas fueron transferidas a macetas de medio litro que contenían una mezcla estéril de suelo arcilloso y arena (50:50), cubiertas con bolsas de polietileno transparentes y entonces fueron colocadas en un cuarto de crecimiento a 25 °C ± 1 °C, 13 % de humedad relativa y 40 µmol fotón m⁻² s⁻¹. Después de 15 a 20 días de aclimatación en el cuarto de crecimiento y cuando las plántulas tenían 20 a 25 cm fueron transferidas a campo donde se les aplicaron dos dosis de 10 g cada una de fertilizante NPK (17-17-17) cada 20 días.

Análisis estadístico

Se evaluaron las diferencias estadísticas entre los porcentajes de inducción de callo primario y de formación de callos morfológicos obtenidos para los distintos medios y para las distintas variedades de

Lolium multiflorum Lam evaluadas utilizando un análisis ANOVA factorial (abc/y). Las medias fueron analizadas usando la prueba de Fisher LSD. El software usado para los análisis estadísticos fue Statgraphics centurion XVI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuestas *in vitro* de los ápices de vástago

Una semana después del cultivo en los diferentes medios, en condiciones de oscuridad o luz fluorescente continua ($40 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, los ápices de vástago continuaron su desarrollo, aparecieron nuevas hojas y se formaron los callos (Figura 1-a). Por lo tanto, los ápices de vástago tuvieron que ser re-disectados para eliminar esas nuevas hojas y colocados en el mismo medio de inducción. Un mes después, el callo empezó a formarse en la mayoría de los ápices de vástago. La eficiencia de inducción de callo primario osciló entre 40 y 94 % después de 4 semanas de cultivo (Tabla 2). El callo primario fue separado y transferido al mismo medio para su subcultivo. Callos de tipo morfológico fueron obtenidos después de tres subcultivos (Figura 1-b y 1-c).

Al realizarse el análisis estadístico ANOVA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.01$) en términos de eficiencia de inducción de callo primario, en condiciones de luz u oscuridad, variedades y medio de cultivo usado. Sin embargo, se observó que los porcentajes de inducción de callo primario son altos para todas las variedades y

concentraciones de reguladores de crecimiento probadas en los medios.

Competencia regenerativa de los callos inducidos

Después de obtener el callo primario probando diferentes genotipos, condiciones de luz y oscuridad y formulaciones de medio se estudió la eficiencia de formación de callo morfológico (Tabla 3). Durante los experimentos de formación de callo, se obtuvieron diferentes morfologías de callos (Figura 1-d). Algunos de estos callos formaron estructuras duras, compactas, nodulares y amarillentas, mientras que otros desarrollaron masas suaves, acuosas, sueltas, friables y de color crema a translúcidas. Cuando se transfirió a la luz, el callo morfológico se tornó verde, exhibiendo un mejor crecimiento y al realizar el subcultivo en el mismo medio cada 30 d, en algunos callos se inició el proceso de regeneración. Aunque la mayoría de los ápices de vástago fueron capaces de producir callo primario, una gran parte de este material no fue estable, generó raíces y no mostró una competencia para la regeneración de plantas completas; la apariencia de este callo no morfológico fue predominantemente suave y esponjosa.

No hubo diferencias significativas en la inducción de callo morfológico a partir de las condiciones de luz u oscuridad. Sin embargo, si hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre las variedades probadas y entre los medios utilizados (Tabla 3).

Tabla 2. Eficiencia de inducción de callo primario (%) a partir de ápices de vástago de cinco variedades de ryegrass en condiciones de luz y oscuridad

Condición Luz		Variedad				
Medio		'Magnun'	'Bargala'	'Tetragold'	'Hercules'	'Maximus'
MPC		56 $\pm$ 2.8	88 $\pm$ 13.0	80 $\pm$ 12.2	58 $\pm$ 13.0	76 $\pm$ 8.9
MPC80		54 $\pm$ 5.5	60 $\pm$ 3.8	58 $\pm$ 2.7	52 $\pm$ 8.4	88 $\pm$ 13.0
D3B40A		64 $\pm$ 3.6	72 $\pm$ 5.9	62 $\pm$ 13.0	60 $\pm$ 8.7	88 $\pm$ 10.9
D4B80A		56 $\pm$ 5.5	88 $\pm$ 17.9	72 $\pm$ 14.8	66 $\pm$ 13.4	78 $\pm$ 2.7
2D4B40A		70 $\pm$ 7.1	52 $\pm$ 16.4	46 $\pm$ 5.5	60 $\pm$ 12.2	94 $\pm$ 8.9
2D4B80A		66 $\pm$ 15.2	70 $\pm$ 2.4	80 $\pm$ 2.0	68 $\pm$ 13.0	88 $\pm$ 8.4
Condición Oscuridad		Variedad				
Medio		'Magnun'	'Bargala'	'Tetragold'	'Hercules'	'Maximums'
MPC		70 $\pm$ 2.1	82 $\pm$ 10.9	66 $\pm$ 11.4	82 $\pm$ 14.8	54 $\pm$ 9.5
MPC80		56 $\pm$ 2.7	74 $\pm$ 11.4	74 $\pm$ 8.9	78 $\pm$ 13.0	40 $\pm$ 14.1
D3B40A		74 $\pm$ 8.2	82 $\pm$ 8.4	76 $\pm$ 16.7	78 $\pm$ 4.5	46 $\pm$ 18.2
D4B80A		58 $\pm$ 10.9	70 $\pm$ 2.2	68 $\pm$ 8.4	74 $\pm$ 11.4	64 $\pm$ 8.9
2D4B40A		68 $\pm$ 16.4	86 $\pm$ 5.5	76 $\pm$ 8.9	68 $\pm$ 10.9	62 $\pm$ 10.9
2D4B80A		76 $\pm$ 5.5	64 $\pm$ 31.3	78 $\pm$ 8.4	68 $\pm$ 17.9	62 $\pm$ 10.4

Tabla 3 Eficiencia de formación de callo morfogénico (%) a partir de ápices de vástago para cinco variedades de *Lolium multiflorum*.

Medio	Variedad				
	'Magnum'	'Bargala'	'Tetragold'	'Hercules'	'Maximus'
MPC	28 ± 10.33 ^a	22 ± 11.35 ^b	29 ± 8.76 ^a	11 ± 13.70 ^a	26 ± 13.50 ^{ab}
MPC80	41 ± 8.70 ^{bc}	6 ± 6.99 ^a	34 ± 8.43 ^a	10 ± 11.55 ^a	28 ± 17.51 ^{ab}
D3B40A	32 ± 13.17 ^{ab}	30 ± 12.47 ^b	36 ± 17.76 ^a	35 ± 12.69 ^b	20 ± 18.26 ^a
D4B80A	32 ± 4.22 ^{ab}	19 ± 11.01 ^{ab}	34 ± 5.16 ^a	38 ± 6.32 ^b	37 ± 12.52 ^b
2D4B40A	49 ± 7.38 ^c	6 ± 12.65 ^a	33 ± 13.37 ^a	35 ± 12.69 ^b	55 ± 13.54 ^c
2D4B80A	65 ± 15.09 ^d	7 ± 12.65 ^a	37 ± 10.59 ^a	37 ± 4.83 ^b	58 ± 19.89 ^c

Nota: Las medias seguidas por distintas letras son significativamente diferentes ($P \leq 0.01$) entre formulaciones de medio. Los experimentos fueron llevados a cabo cinco veces.

La variedad 'Hercules' tuvo una media de formación de callo morfogénico de 27.7 %, sin diferencias significativas con la variedad 'Tetragold' que presentó una media de 33.8 %. Las variedades que presentaron los mayores valores en esta variable fueron Tetragold' (33.83 %), 'Maximus' (37.3 %) y 'Magnum' (41.2 %), las cuales no presentaron diferencias significativas entre ellas en cuanto al porcentaje de formación de callo morfogénico. Por su parte, la variedad que tuvo el menor porcentaje de formación de callo morfogénico fue la variedad 'Bargala' (15.0 %).

Para la variedad 'Magnum' se observa que hay efectos significativos al cambiar la concentración de adenina de 40 a 80 mg L⁻¹; esto se puede observar al comparar el porcentaje de formación de callos morfogénicos entre los medios MPC y MPC80 y los medios 2D4B40A y 2D4B80A. Cuando se varía la concentración de BA de 2 a 3 mg L⁻¹ y de 2 a 4 mg L⁻¹ no se observan diferencias significativas, por lo que a estas concentraciones de BA no hay mejora en la formación de callos morfogénicos, siempre y cuando que los demás reguladores de crecimiento no varíen (Tabla 3). Al aumentar 2,4-D de 1 a 2 mg L⁻¹ si se encuentran diferencias significativas en la formación de callos morfogénicos en 'Magnum'. Para esta misma variedad los mayores porcentajes de formación de callo morfogénico se obtuvieron en los medios 2D4B40A (49 %) y 2D4B80A (65 %) con diferencias significativas entre ellos ($p < 0.01$), indicando que las concentraciones de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D y 4 mg L⁻¹ de BA y el aumento de adenina de 40 a 80 mg L⁻¹ potenció la generación de callo morfogénico.

En términos generales, la variedad 'Bargala' tuvo los menores porcentajes de formación de callos morfogénicos entre las 5 variedades analizadas con una media de 15 %, y encontrándose diferencias estadísticamente significativas con las demás variedades ($p \leq 0.01$). Para este genotipo, los menores valores de formación de callo morfogénico fueron para los medios de inducción MPC80, 2D4B40A y 2D4B80A, con valores de 6, 6 y 7 %, respectivamente,

mientras que los mayores porcentajes, sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0.01$), se observaron en los medios MPC y D3B40A, 22 y 30 %, respectivamente; por lo tanto el mejor porcentaje de formación de callo morfogénico se obtiene con concentraciones de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, 40 mg L⁻¹ de adenina y una concentración de BA entre 2 y 3 mg L⁻¹. Al comparar los medios MPC y MPC 80 se observa una disminución en la eficiencia de generación de callo morfogénico de 22 a 6 %. El aumento de la concentración de adenina de 40 a 80 mg L⁻¹ no mejora la eficiencia de formación de callo morfogénico para esta variedad, lo mismo sucede cuando se aumenta la concentración de 2,4-D de 1 a 2 mg L⁻¹ (Tabla 4).

La respuesta de formación de callos morfogénicos en la variedad 'Tetragold' no presenta diferencias significativas entre los medios utilizados; el porcentaje de inducción de callos morfogénicos se encuentra en el intervalo de 29 a 37 %. Estos valores de formación de callo morfogénico son relativamente buenos y las concentraciones de reguladores de crecimiento probadas, 2,4-D (1 a 2 mg L⁻¹), BA (1 a 4 mg L⁻¹) y adenina (40 a 80 mg L⁻¹) son adecuadas para la obtención de callo morfogénico en esta variedad.

En cuanto a la variedad 'Hercules' se observa que los menores valores de porcentaje de formación de callo morfogénico se presentaron en los medios MPC y MPC80 con 10 y 11 %, respectivamente, mientras que los mayores valores sin diferencias significativas ($p > 0.01$) se encontraron en los medios D3B40A, D4B80A, 2D4B40A, 2D4B80A con porcentajes entre 35 y 38 %. Esto demuestra que para este genotipo, la capacidad regenerativa aumenta principalmente cuando se incrementa el valor de BA en el medio de cultivo de 1 a 3 mg L⁻¹ y de 2 a 4 mg L⁻¹, y se mantienen constantes las concentraciones de 2,4-D y adenina. Los aumentos en las concentraciones de 2,4-D entre 1 y 2 mg L⁻¹, y de adenina entre 40 y 80 mg L⁻¹, no afectaron significativamente la formación de callo morfogénico para este genotipo.