

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA
MEMORIA DE TÍTULO

**CRUZAMIENTOS INTERESPECÍFICOS EN *Alstroemeria* sp. Y RESCATE DE
EMBRIONES IN VITRO COMO BASE DEL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE
LA ESPECIE**

JAVIERA PÉREZ-COTAPOS DUNCKER

Santiago, Chile

2007

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA
MEMORIA DE TÍTULO

**CRUZAMIENTOS INTERESPECÍFICOS EN *Alstroemeria* sp. Y RESCATE DE
EMBRIONES IN VITRO COMO BASE DEL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE
LA ESPECIE**

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniero Agrónomo
Mención: Fitotecnia

JAVIERA PÉREZ-COTAPOS DUNCKER

PROFESOR GUÍA	CALIFICACIONES
Sr. Rodrigo Infante E. Ingeniero Agrónomo, Dr.	5.5
PROFESORES CONSEJEROS	
Sr. Carol Müller T. Ingeniero Agrónomo, M. S.	6.8
Sr. Ricardo Pertuzé C. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	6.5

Santiago, Chile

2007

“Un texto anónimo de la tradición dice que cada persona, en su existencia, puede tener dos actitudes: Construir o Plantar. Los constructores pueden demorar años en sus tareas, pero un día terminan aquello que estaban haciendo. Entonces se paran, y quedan limitados por sus propias paredes. La vida pierde el sentido cuando la construcción acaba.

Pero existen los que plantan. Éstos a veces sufren con las tempestades, las estaciones, y raramente descansan. Pero al contrario que un edificio, el jardín jamás para de crecer. Y, al mismo tiempo que exige la atención del jardinero, también permite que, para él, la vida sea una gran aventura.

Los jardineros se reconocerán entre sí, porque saben que en la historia de cada planta está el crecimiento de toda la Tierra.”

Dedicada a todos quienes dieron su ayuda
en este gran trabajo.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
MATERIALES Y MÉTODO	8
Material vegetal	8
Lugar de recolección y determinación taxonómica de las especies	8
Método	9
Autopolinizaciones y cruzamientos interespecíficos	9
Conservación de polen	9
Test de germinación de polen	9
Polinizaciones	9
Cosecha y medición de frutos	10
Desinfección de frutos	10
Rescate de embriones	10
Preparación de medios de cultivo	10
Medio de cultivo inicial	10
Medio de cultivo de crecimiento	10
Procedimiento de rescate de embriones	10
Incubación	11
Diseño experimental y análisis estadístico	11

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
Germinación de polen	12
Crecimiento de frutos	12
Autopolinizaciones y cruzamientos interespecíficos	15
Procedimiento y período óptimo de rescate de embriones	15
Compatibilidades	17
Crecimiento y desarrollo de embriones rescatados in vitro	17
CONCLUSIONES	21
BIBLIOGRAFÍA	22
ANEXOS	25
Anexo I	25
Anexo II	25
Anexo III	26
APÉNDICES	28
Apéndice I	28
Apéndice II	28

RESUMEN

La flora chilena es reconocida a nivel mundial tanto por su belleza como por su variada riqueza taxonómica y alto grado de endemismo. Dentro de ella, las alstroemerias pertenecen a un grupo numeroso de especies que presentan una gran variabilidad genética, lo que ha permitido el gran interés científico de países desarrollados, potenciando su valor económico y ornamental, para el uso de flor de corte, maceta y paisajismo.

En Chile, se han comenzado a implementar programas de fitomejoramiento genético, valorando el significado de sus recursos y su grado de conservación, realizándose diversos trabajos de investigación empleando variadas técnicas de mejoramiento genético y de laboratorio, entre ellas, el rescate de embriones. El uso de esta técnica es debido a la incompatibilidad y a las barreras postcigóticas que se generan en los cruzamientos interespecíficos, produciendo de esta manera el aborto de sus embriones.

Se realizaron autopolinizaciones y cruzamientos interespecíficos entre las especies diploides chilenas *Alstroemeria magnifica* Herbert ssp. *magnifica*, *A. pelegrina* L. y *A. pulchra* Sims ssp. *pulchra*, rescatando los embriones in vitro de cada combinación, a los 7, 14 y 21 días después de la polinización (DDP). Se evaluaron 2 procedimientos de rescate: embriones enteros con placenta y embriones sin placenta con su endosperma dividido. Para ello, se utilizó un medio MS (Murashige & Skoog, 1962) a mitad de concentración de sales y pH 5,7 en un período de 2 meses bajo oscuridad hasta lograr la germinación. Luego, los embriones germinados fueron llevados a un medio MS de crecimiento con un $\frac{1}{4}$ de concentración de sales, pH 5,7 más 0,02 ppm de benzilaminopurina (BAP) por 2 a 4 semanas adicionales hasta el estado de plántula.

Los resultados mostraron que el procedimiento de rescate de embriones no presenta diferencias entre los cruzamientos aquí descritos, a excepción de *A. magnifica* x *A. pulchra*. En este último caso, el mejor procedimiento fue sin placenta con su endosperma dividido a los 14 DDP. En tanto, el mejor momento de rescate de embriones fue a los 21 DDP en la autopolinización de *A. magnifica* junto a la combinación de *A. pelegrina* x *A. magnifica*.

La especie *A. pulchra*, como progenitor femenino, presentó incompatibilidad en los cruzamientos interespecíficos. Sin embargo, se observó una afinidad con *A. magnifica* y *A. pelegrina* solamente al ser utilizada como progenitor masculino. Las especies *A. magnifica* y *A. pelegrina*, resultaron ser compatibles entre sí por medio de combinaciones recíprocas.

De las 81 flores polinizadas, se obtuvo un total de 1.369 embriones, de los cuales, 214 de ellos germinaron en forma anormal (15,63%) y sólo 4 formaron plántulas normales (0,29%), 2 correspondientes al cruzamiento de *A. pelegrina* x *A. magnifica* y 2 a la autopolinización de *A. pulchra*. También se observó un 8,03% de formación de callos.

En definitiva, fue posible recuperar híbridos interespecíficos de especies nativas usualmente incapaces de producir progenie cuando se cruzan espontáneamente, obteniéndose al cabo de 2 meses, la germinación de sus embriones y alcanzando el estado de plántula a los 2,5 a 3 meses utilizando las técnicas de rescate de embriones in vitro.

Palabras clave: *Alstroemeria magnifica* Herbert ssp. *magnifica*, *Alstroemeria pelegrina* L., *Alstroemeria pulchra* Sims ssp. *pulchra*, cultivo in vitro, días después de la polinización (DDP), incompatibilidad.

ABSTRACT

Interspecific crosses in *Alstroemeria* sp. and in vitro embryo rescue as genetic breeding base of the specie

The Chilean flora is recognized around the world for its beauty, its taxonomic richness and its high grade of endemism. As part of it, alstroemerias belong to a big group of species that have an enormous genetic variation. The scientific interest of developing countries has resulted in a boost to the economical and ornamental value, such as cut-flower, pot-flower and landscaping.

In Chile, breeding programs have recently been implemented due to both the importance of the resources and the high level of conservation. For that reason, a number of different research projects have been conducted using several breeding and lab techniques like embryo rescue. This technique is required due to incompatibility and the postcigotyc barriers generated between interspecific crosses, producing embryo abortion.

In vitro embryos were rescued from self-pollination and crossed-pollination between diploid Chilean species of *Alstroemeria magnifica* Herbert ssp. *magnifica*, *A. pelegrina* L. and *A. pulchra* Sims ssp. *pulchra*. Embryos were rescued at 7, 14 and 21 days after pollination (DAP) for each combination. Complete embryos with placenta and half endosperm embryos without placenta were evaluated as 2 rescue procedures. MS culture media (Murashige & Skoog, 1962) was used at half salt concentration and pH 5,7 for about 2 months in complete darkness until germination. Then, germinated embryos were taken to a growing media with $\frac{1}{4}$ MS salt concentration, pH 5,7 and 0,02 ppm of benzylaminopurine (BAP) for 2 to 4 additional weeks until plantlets stage.

The results showed that the embryo rescue procedure has no differences among interspecific crosses, except for *A. magnifica* x *A. pulchra*. In this last case, the best embryo rescue moment was at 14 DAP with half endosperm embryos without placenta. *A. magnifica* self-pollination and the interspecific cross *A. pelegrina* x *A. magnifica* had a successful embryo rescue at 21 DAP.

A. pulchra, as a female parent, showed incompatibility between the interspecific crosses. However, there was an affinity with *A. magnifica* and *A. pelegrina* species, only used as a male parent. *A. magnifica* and *A. pelegrina* had compatibility among each other, through reciprocal combinations.

From 81 pollinated flowers, there were 1.369 total embryos, which 214 germinated to abnormal plantlets (15,63%) and only 4 normal plantlets were obtained (0,29%), 2 from *A. pelegrina* x *A. magnifica* cross and 2 from *A. pulchra* self-pollination. Also, there was an 8,03% of callus formation.

Definitively, it was possible to obtain interspecific hybrids from wild species, usually unable to produce progeny when they cross spontaneously. The germination of alstroemeria's embryos succeeded at about 2 months, achieving plantlets at 2,5 to 3 months through in vitro embryo rescue techniques.

Key words: *Alstroemeria magnifica* Herbert ssp. *magnifica*, *Alstroemeria pelegrina* L., *Alstroemeria pulchra* Sims ssp. *pulchra*, days after pollination (DAP), incompatibility, in vitro culture.

INTRODUCCIÓN

De los 5.739 taxones que conforman la flora vascular de Chile continental, 2.630 son endémicos (Marticorena, 1990). Se estima, además, que Chile presenta 35 géneros de geófitas, de los cuales 16 son endémicos, y es el segundo país, después de Sudáfrica, en cuanto a riqueza de estas plantas (Schiappacasse *et al.*, 2002). Uno de ellos, es el género *Alstroemeria*, nativo de América del Sur, que se encuentra distribuido entre Chile, Brasil, Argentina, Perú, Uruguay, Bolivia, Paraguay y Venezuela; siendo Chile (I a XII región), el centro de mayor diversidad (49 taxones) y endemismo (40 taxones), seguido por Brasil (Muñoz y Moreira, 2003).

La familia *Alstroemeriaceae* del orden *Alstroemeriales*, incluye tres géneros: *Alstroemeria* L. (ca. 82 taxones), *Bomarea* Mirb. (ca. 100 taxones) y el género monotípico *Leontochir* Phil., con la especie *Leontochir ovallei* Phil. (Muñoz y Moreira, 2003). Esta clasificación fue basada en la estructura morfológica de la inflorescencia, del tallo, hoja, fruto y rizoma, además de resultados de investigaciones químicas y taxonómicas (Bayer, 1987).

Las alstroemerias son plantas monocotiledóneas, herbáceas y perennes, compuestas por un rizoma o corona radical, del cual surgen raíces, raíces tuberosas y la parte aérea. A esta última la componen uno o varios tallos no ramificados, erectos o rastreros, provistos de hojas alternas, resupinadas y lanceoladas. En su extremo apical, se agrupan las flores generalmente zigomórficas, de forma alargada con tépalos de variados tonos y colores, constituyendo una inflorescencia cimosa umbeliforme (Hoffmann, 1978; Muñoz, 1985).

Hasta la fecha, se han realizado dos monografías que describen las especies chilenas de alstroemerias con sus respectivos patrones de distribución (Bayer, 1987, y Muñoz y Moreira, 2003).

Incluir parte de la variabilidad genética encontrada en las poblaciones naturales en los cultivares existentes permitiría mejorar su calidad y desarrollar otros nuevos (Sanso *et al.*, 2004).

Durante un período de 20 años, los mejoradores de alstroemerias han logrado producir cultivares a través de hibridaciones interespecíficas. Los primeros cultivares se obtuvieron entre dos especies chilenas: *A. aurea* R. Graham y *A. violacea* Phil. (Vonk-Noordegraaf, 1981), mientras que el principal origen de las variedades comerciales es a partir de los cruzamientos entre especies chilenas andinas (Tombolato *et al.*, 1993).

Desde 1987, se han logrado obtener híbridos interespecíficos e intraespecíficos a partir de especies de alstroemeria tales como *A. pelegrina*, *A. pelegrina alba*, *A. aurea*, *A. werdermanii*, *A. kingii* y *A. magnifica*, entre otras, que han sido mejoradas mediante el uso de cruzamientos tradicionales, cultivo in vitro y variación somaclonal. Una de las selecciones superiores, es el cultivar fragante de alstroemeria “Sweet Laura”, de flores

amarillas y estériles, producto del cruzamiento entre *A. aurea* x *A. caryophyllaea* (Lu y Bridgen, 1996). Además, se han logrado obtener exitosamente híbridos intergenéricos entre *Alstroemeria* y *Leontochir ovallei* (Bridgen *et al.*, 2002).

El cruzamiento *A. inodora* x *A. pelegrina*, fue una de las combinaciones originales hechas por los mejoradores para la producción del tipo “Butterfly”, obteniendo semillas verdaderas (De Jeu *et al.*, 1992).

En el presente, existen más de 130 variedades híbridas de alstroemeria, de las cuales, más de 80 han sido seleccionadas en Holanda, lo que muestra una de las mejores tendencias en el mercado internacional para la producción de flor de corte (Burchi *et al.*, 1999). Estas variedades comerciales han sido patentadas y usualmente son triploides estériles producto de los cruzamientos entre especies tetraploides y diploides (Heins y Wilkins, 1979). Para Buitendijk *et al.* (1995), las especies *A. pelegrina* y *A. magnifica* ssp. *magnifica* son diploides ($2n = 2x = 16$).

Las especies *A. pelegrina* var. *rosea* y *A. magenta*, difieren extremadamente una de otra en sus características morfológicas. La primera de ellas, es usada como planta en maceta en Japón, debido a la baja altura de la planta, mientras que la segunda, es utilizada para flor de corte dado a la gran altura de ésta (Ishikawa *et al.*, 2001).

Según Burchi *et al.* (1999), la mayor limitante en hibridaciones interespecíficas, entre genotipos chilenos y brasileños de alstroemerias, es la presencia de barreras genéticas que provocan aborto de embriones y la baja obtención de semillas. Para esto, desarrollaron un protocolo in vitro para el rescate de embriones, seleccionando nuevos genotipos para la Zona Mediterránea de Italia, dando buenos resultados, a diferencia de las variedades holandesas que requieren mayor humedad y menor temperatura de suelo.

Existen muchos factores esenciales para el rescate de embriones como el genotipo, el estado de desarrollo del embrión, el medio de cultivo y los reguladores de crecimiento (Lu y Bridgen, 1996). Sólo al aplicar el cultivo de embriones se pueden obtener semillas híbridas maduras de híbridos interespecíficos (De Jeu y Jacobsen, 1995; Buitendijk *et al.*, 1995). Para Lu y Bridgen (1996), los embriones de *A. pelegrina alba* y *A. violacea* tienen una alta capacidad de germinación in vitro.

No solamente en el género *Alstroemeria* se han realizado rescates de embriones con tejido materno. En otros géneros, como *Zephyranthes*, se han realizado cultivos de ovario y de embriones, obteniendo semillas a los 5 DDP. En *Allium*, el cultivo de embrión se desarrolla a los 4-5 DDP. Mientras que en *Lilium*, se han cultivado trozos de ovario comenzando exitosamente a los 5-8 DDP. En todos estos ejemplos, los embriones potenciales fueron cultivados por un largo tiempo junto al tejido materno (Sachar & Kapoor, 1959; Kanoh *et al.*, 1988; Nomura & Oosawa, 1990; Van Tuyt *et al.*, 1991).

Para Burchi *et al.* (1997) y De Jeu y Jacobsen (1995), el rescate de embriones en *Alstroemeria* se puede realizar desde los 2-3 DDP. Mientras que Lu y Bridgen (1996) y Pulido *et al.* (1999), mencionaron resultados a los 7 DDP, coincidiendo con la mayor turgencia y desarrollo del embrión. Ishikawa *et al.* (2001), colectaron ovarios a los 7, 14, 21, 28 y 35 DDP producto de los cruzamientos incompatibles entre *A. pelegrina* L. var. *rosea* y *A. magenta* Bayer. Buitendijk *et al.* (1995), señalan que el tiempo óptimo para el cultivo de embriones autopolinizados es a los 21 DDP; sin embargo, para la obtención de embriones híbridos el cultivo debería comenzar a los 14 DDP.

Las barreras de postfertilización, las diferencias a nivel cromosomal entre especies, la falta de desarrollo del endosperma del embrión y la incompatibilidad entre el embrión y el endosperma, son motivos suficientes para conducir a un aborto de embriones (Hu *et al.*, 1986; Bridgen, 1994). Los cruzamientos entre las especies chilenas, y entre especies chilenas y brasileñas, parecieran presentarse más de alguna de estas barreras mencionadas (De Jeu y Jacobsen, 1995).

Con estos antecedentes, se plantea como hipótesis de esta Memoria, que es posible obtener embriones viables a partir de cruzamientos interespecíficos del género *Alstroemeria*, utilizando como progenitores femeninos y masculinos, tres especies chilenas.

Los objetivos específicos son:

- Evaluar dos procedimientos para el rescate de embriones.
- Determinar el período óptimo para el rescate de embriones.
- Evaluar la compatibilidad en cada combinación de cruzamientos interespecíficos.
- Evaluar el crecimiento y desarrollo de los embriones rescatados in vitro.

MATERIALES Y MÉTODO

Material vegetal

La selección de germoplasma se basó principalmente en: color, tamaño de flor, largo de vara, follaje, vigor y período de floración. Las especies chilenas que se utilizaron en los cruzamientos interespecíficos fueron: *Alstroemeria magnifica* Herbert ssp. *magnifica*, *A. pelegrina* L. y *A. pulchra* Sims ssp. *pulchra* (Figura 1 y Anexo I).

Los cultivos se establecieron en el Laboratorio de Genética y de Certificación Frutal del Departamento de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.



Figura 1. 1: *A. magnifica* Herbert ssp. *magnifica*; 2: *A. pelegrina* L.; 3: *A. pulchra* Sims ssp. *pulchra*.

Lugar de recolección y determinación taxonómica de las especies

La especie *A. magnifica* se obtuvo a partir de la Colección Particular de la Sra. Gemma Contreras, situada en El Manzano, Comuna San José de Maipo, R.M., en noviembre de 2002. *A. pulchra* fue extraída desde la Quebrada de la Plata, Rinconada de Maipú, R.M., en noviembre de 2002. Las varas de *A. pelegrina* se recolectaron en Los Molles y Playa Ancha, V Región, en septiembre y octubre de 2003. La determinación taxonómica fue basada en la monografía de Bayer (1987) y en la asesoría del profesor Luis Faúndez, en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Método

Autopolinizaciones y cruzamientos interespecíficos

Las tres especies de alstroemerias fueron autopolinizadas, como muestra de testigo, y emasculadas para la realización de los cruzamientos interespecíficos, utilizando un total de 81 flores. Los cruzamientos realizados fueron: *A. magnifica* x *A. magnifica*; *A. magnifica* x *A. pelegrina*; *A. magnifica* x *A. pulchra*; *A. pelegrina* x *A. pelegrina*; *A. pelegrina* x *A. magnifica*; *A. pelegrina* x *A. pulchra*; *A. pulchra* x *A. pulchra*; *A. pulchra* x *A. magnifica* y *A. pulchra* x *A. pelegrina*.

Conservación de polen

Previo a las polinizaciones, se realizó un pre-ensayo para determinar la mejor temperatura de conservación de polen almacenado a -20°C y 4°C por un tiempo de una semana. Las anteras fueron colectadas y almacenadas en tubos identificados con fecha de colección, especie y temperatura de almacenamiento (Figura 2).

Test de germinación de polen. Se realizó una prueba de germinación de polen para cada especie, basándose en la metodología de Heslop-Harrison (1991), descrita en el Anexo II. Se contaron 100 granos de polen germinados, utilizando un microscopio Nikon Japan 026683 Labophot-2 (lente 10X) para su observación, fotografiando desde el ocular con una cámara digital (Figura 3).

Polinizaciones

Las plantas de *A. magnifica* y *A. pulchra* fueron polinizadas en maceta y protegidas con malla antiáfido en “screenhouse”. Las varas de *A. pelegrina* fueron polinizadas en florero con agua destilada, dentro del laboratorio.

Todas las polinizaciones se realizaron en flores emasculadas al momento de alcanzar el estado trífido junto a la secreción de líquido estigmático mediante caracterización visual, tanto en autopolinizaciones como en hibridaciones interespecíficas. En cada cruzamiento, se utilizó polen almacenado a -20°C. Estas polinizaciones se efectuaron manualmente temprano en la mañana y/o en la tarde. Cada flor fue identificada con fecha de polinización y número de fruto.

Cosecha y medición de frutos

Una vez polinizadas las flores, según tratamiento y repetición, se procedió a cosechar los frutos inmaduros a primera hora. Luego, con un pié de metro, se midió longitud y ancho (cm) de cada uno de ellos, siendo llevados inmediatamente al laboratorio para su desinfección y posterior rescate de embriones (Figura 4).

Desinfección de frutos. Cada fruto fue desinfectado con alcohol al 90%. Luego, fueron sumergidos en una solución desinfectante al 5% de cloro granulado, más una gota de jabón detergente por un tiempo de 20 minutos de agitación. Posteriormente, se hizo enjuague con agua destilada estéril.

Rescate de embriones

Se evaluó tres momentos para el rescate de embriones: 7, 14 y 21 días después de la polinización (DDP), para ver cuál de ellos es el mejor en todas las combinaciones realizadas.

Preparación de medios de cultivo. Se utilizó el tradicional protocolo propuesto por Murashige & Skoog (1962), establecido en el Anexo III. Los medios de cultivo fueron autoclavados a 1 atmósfera de presión y a 121°C por un tiempo de 20 minutos.

Medio de cultivo inicial. El medio inicial fue basado según el protocolo de Pulido *et al.* (1999), ya que en ensayos preliminares demostró ser el más adecuado. Este medio MS contenía ½ concentración de sales, 12% de sacarosa y pH 5,7 utilizándose en un período de 2 meses bajo oscuridad.

Medio de cultivo de crecimiento.¹ Se continuó con un medio MS con un ¼ de concentración de sales, 6% de sacarosa, 0,02 ppm de BAP (6-benzilaminopurina) y pH 5,7 por 2 a 4 semanas hasta el estado de plántula.

Procedimiento de rescate de embriones. Los rescates de embriones se realizaron en una cámara de flujo laminar bajo estrictas normas de sanidad. Al dividir los frutos previamente desinfectados, se extrajeron embriones enteros con placenta y embriones sin placenta con su endosperma dividido, para evaluar por separado, cuál de los procedimientos es el más adecuado para la germinación.

¹ Sr. Eduardo Olate, Ing. Agr., Ph. D., Director del Depto. de Ciencias Vegetales de la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la Pontificia Universidad Católica de Chile, 2003 (Comunicación personal).

Incubación

Los tubos fueron llevados a una cámara de crecimiento a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 8 semanas bajo absoluta oscuridad. Luego, fueron cambiados de medio de cultivo, con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad, manteniendo la temperatura anterior. Aquellos tubos o embriones contaminados, se eliminaron inmediatamente excluyéndose del análisis.

Diseño experimental y análisis estadístico

Este ensayo contempló un diseño experimental completamente al azar con 54 tratamientos y 3 repeticiones. Dentro de estos 54 tratamientos, están considerados 9 cruzamientos, 3 momentos de rescate (7, 14 y 21 DDP) y 2 procedimientos de rescate de embriones (enteros con placenta y sin placenta con su endosperma dividido). Cada fruto correspondió a una unidad de muestreo.

Para todos los tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA). Para ello, los valores porcentuales de germinación, fueron transformados con la fórmula de arcoseno ($\text{arcoseno } \sqrt{(x/100)}$). Cuando se presentaron interacciones, la totalidad de los tratamientos combinados se sometieron a un ANDEVA de una vía. Para el caso de las variables ancho y largo de fruto, así como para el número total de embriones de cada fruto, se realizó un ANDEVA de una vía y un test de rango múltiple en forma independiente para cada uno de los DDP.

En el análisis de polen, se evaluó la incidencia de 2 temperaturas de almacenamiento en las 3 especies durante una semana, realizándose un análisis de varianza con arreglo factorial (2×3), utilizando las transformaciones de los valores porcentuales mediante la transformación angular o de arcoseno. Este análisis se hizo con 3 repeticiones para cada temperatura y para cada especie.

Finalmente, en todas las mediciones cuando el ANDEVA mostró diferencias significativas a un 95% de confianza, las medias fueron separadas mediante la prueba de rango múltiple de Tukey utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación de polen

Al analizar el efecto de temperatura a -20°C y 4°C durante una semana para el almacenamiento de polen de *A. magnifica*, *A. pelegrina* y *A. pulchra*, no se observaron diferencias significativas ni interacciones entre los factores (Cuadro 1). Estos resultados indican que es indiferente la temperatura empleada para la conservación de polen durante el período de la polinización (Apéndice I y Figuras 2 y 3).

Cuadro 1. Porcentajes de germinación de polen a dos temperaturas de almacenamiento para cada especie de alstroemeria.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Media de germinación	Especie	Media de germinación
4	36,42 ¹	<i>A. pelegrina</i>	34,75 ¹
-20	38,54	<i>A. pulchra</i>	37,03
		<i>A. magnifica</i>	40,66

¹/ En este cuadro no se observan interacciones ni diferencias significativas para cada factor.



Figura 2. Anteras maduras e inmaduras de *A. magnifica* (1), *A. pelegrina* (2) y *A. pulchra* (3).

Crecimiento de frutos

El ancho y largo de los frutos muestran diferencias significativas, ya sea para uno o ambos factores, siendo en su mayoría, los frutos más grandes en las autopolinizaciones (Cuadro 2, Figura 4 y Apéndice II).

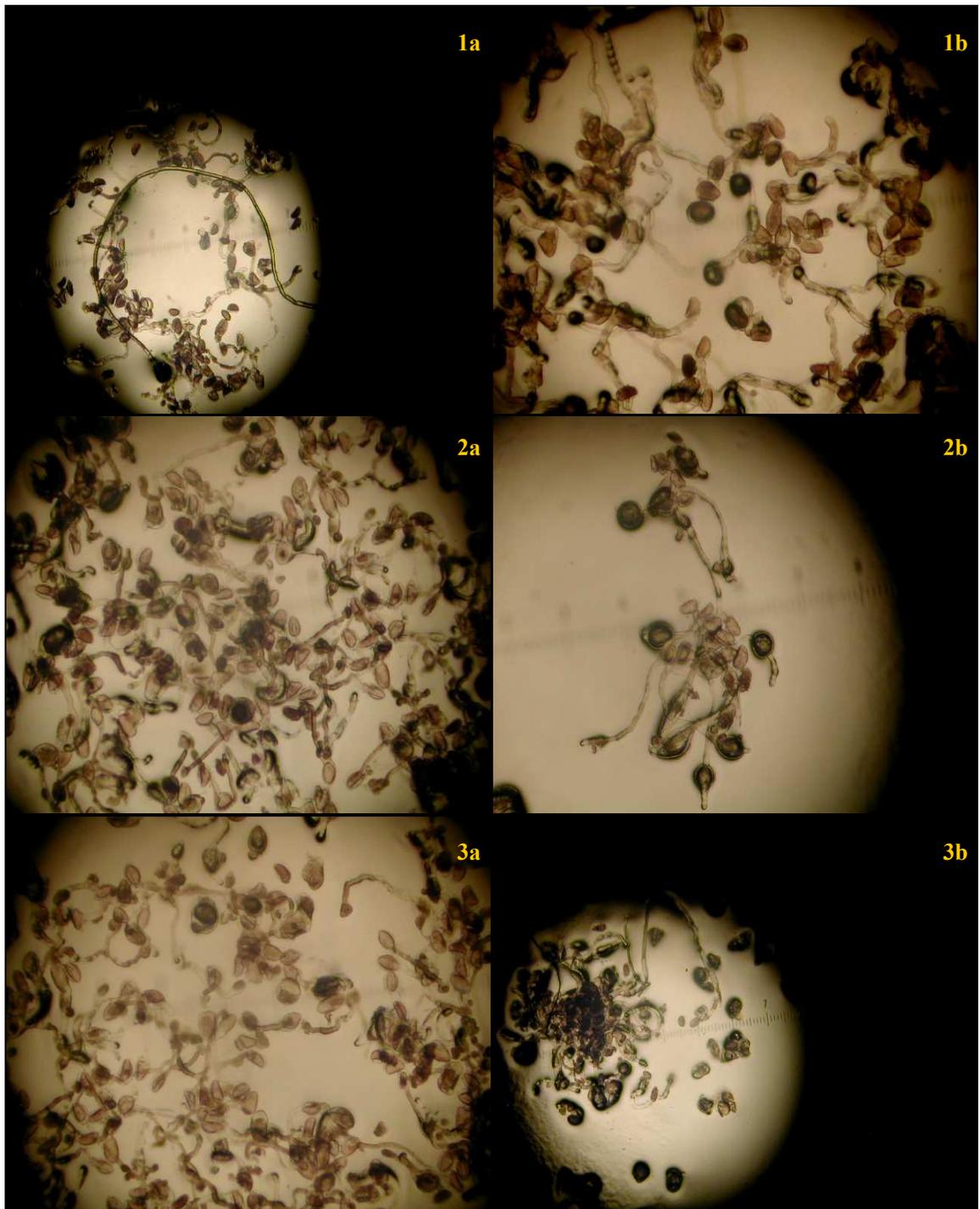


Figura 3. Granos de polen germinados y no germinados de *A. magnifica* (1), *A. pelegrina* (2) y *A. pulchra* (3), almacenados a -20°C (a) y a 4°C (b).

En el número total de embriones por fruto, no se observan diferencias significativas en los cruzamientos de *A. magnifica* y de *A. pelegrina* como madres en los 3 momentos de rescate. Esto mismo sucede en *A. pulchra* solamente a los 7 DDP; sin embargo, a los 14 y 21 DDP se pueden observar diferencias significativas que se deben más bien a la incompatibilidad de los cruzamientos que a la cantidad de embriones de cada uno de ellos (Cuadro 2).



Figura 4. Desarrollo de frutos cosechados a los 7, 14 y 21 DDP.

Cuadro 2. Ancho, largo y número total de embriones por fruto para cada cruzamiento de alstroemeria a los 7, 14 y 21 DDP.

Machos \ Hembras	<i>A. magnifica</i> x			<i>A. pelegrina</i> x			<i>A. pulchra</i> x		
	An ¹	La ¹	NTEF ¹	An	La	NTEF	An	La	NTEF
7 DDP									
x <i>A. magnifica</i>	1,36 a ²	2,86 b	20,33 A ²	1,06 ab	1,56 a	18,33 A	0,66 a	1,23 a	34,00 A
x <i>A. pelegrina</i>	1,06 a	2,70 ab	27,33 A	1,43 b	1,93 a	26,33 A	0,66 a	1,36 a	35,33 A
x <i>A. pulchra</i>	1,23 a	2,43 a	23,66 A	0,76 a	1,20 a	18,66 A	1,13 b	2,13 b	40,66 A
14 DDP									
x <i>A. magnifica</i>	1,70 b	3,63 b	22,66 A	0,80 a	1,26 a	16,00 A	0,60 a	1,33 a	0,33 A
x <i>A. pelegrina</i>	1,16 a	2,66 a	21,33 A	1,16 a	1,76 b	5,66 A	0,73 b	1,23 a	0,00 A
x <i>A. pulchra</i>	1,70 b	3,60 b	22,66 A	0,76 a	1,36 ab	1,66 A	1,23 c	2,20 b	24,33 B
21 DDP									
x <i>A. magnifica</i>	1,76 b	3,36 b	18,33 A	1,33 a	1,83 a	8,00 A	0,46 a	1,13 a	0,00 A
x <i>A. pelegrina</i>	1,13 a	2,60 a	20,33 A	1,16 a	1,86 a	6,66 A	0,53 a	1,16 a	0,00 A
x <i>A. pulchra</i>	1,66 b	3,70 b	20,66 A	0,70 a	1,43 a	0,00 A	1,33 b	2,26 b	25,33 B

^{1/} An: ancho; La: largo; NTEF: número total de embriones por fruto.

^{2/} Medias del cruzamiento de una misma madre para un mismo DDP acompañadas con letras distintas, muestran diferencias significativas para ancho y largo (minúscula) o NTEF (mayúscula), con un 95% de confianza.

Paralelo a los análisis de varianza, se hicieron correlaciones entre los factores ancho, largo y número de embriones totales por fruto entre todos los cruzamientos y autopolinizaciones. Los resultados mostraron valores de $r = -0,14$ y $-0,28$; lo cual representa una baja correlación.

Autopolinizaciones y cruzamientos interespecíficos

Procedimiento y período de rescate de embriones. En el cruzamiento *A. pelegrina* x *A. magnifica*, existe una diferencia significativa entre los 14 y 21 DDP. Del mismo modo, sucede para la autopolinización de *A. magnifica*, existiendo diferencias a los 21 DDP con respecto a los 7 y 14 DDP, siendo estos últimos, iguales entre sí (Cuadro 3). En ambos casos, en el período máximo de rescate (21 DDP), los embriones se encontraban con mayor tamaño en relación a los 7 y 14 DDP.

Sin embargo, para los cruzamientos *A. pulchra* x *A. magnifica* y *A. pulchra* x *A. pelegrina*, no hubo crecimiento de embriones, por lo que quedan excluidos del resto de las comparaciones. De Jeu y Jacobsen (1995), utilizaron las especies *A. pulchra* y *A. ligtu* como madres, donde la mayoría de los cruzamientos fracasaron como resultado de la temprana técnica de cultivo de embriones en todas las combinaciones, producto de la inhibición del crecimiento del tubo polínico, tras un minucioso estudio histológico. Para ellos, la especie *A. pulchra* no combina fácilmente con otras especies chilenas y brasileñas.

Los procedimientos de rescate de embriones son indiferentes para todas las combinaciones, a excepción del cruzamiento *A. magnifica* x *A. pulchra*, en el cual se observa una interacción entre los momentos y el procedimiento de rescate de embriones (Cuadro 4).

Cuadro 3. Porcentaje de germinación para 3 momentos y 2 procedimientos de rescate de embriones (A: embrión entero con placenta; B: embrión sin placenta con su endosperma dividido) para cada cruzamiento (A. mg.: *A. magnifica*; A. pel.: *A. pelegrina*; A. pul.: *A. pulchra*).

Cruzamiento	DDP			Procedimiento	
	7	14	21	A	B
A. mg. x A. mg.	6,86 A ¹	11,98 A	40,79 B	19,33 a ¹	20,42 a
A. mg. x A. pel.	14,66 A	24,86 A	16,79 A	22,75 a	14,79 a
A. mg. x A. pul. ²	--	--	--	--	--
A. pel. x A. pel.	26,26 A	8,89 A	22,50 A	23,06 a	15,37 a
A. pel. x A. mg.	7,87 AB	0,00 A	41,67 B	15,43 a	17,59 a
A. pel. x A. pul.	8,33 A	0,00 A	0,00 A	5,55 a	0,00 a
A. pul. x A. pul.	23,62 A	19,28 A	22,67 A	22,11 a	21,59 a
A. pul. x A. mg.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A. pul. x A. pel.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

^{1/} Medias de un mismo cruzamiento acompañadas con letras distintas, muestran diferencias significativas entre DDP (mayúscula) o Procedimiento (minúscula), con un 95% de confianza.

^{2/} En este cruzamiento hubo interacción entre DDP y Procedimiento de rescate (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de germinación para la interacción entre 3 momentos y 2 procedimientos de rescate de embriones (A: embrión entero con placenta; B: embrión sin placenta con su endosperma dividido) en el cruzamiento *A. magnifica* x *A. pulchra*.

		DDP		
		7	14	21
Procedimiento	A	7,14 ab	0,00 a ¹	7,79 ab
	B	0,00 a	30,89 b	6,40 ab

¹/ Las Medias acompañadas con letras distintas, significa que son diferentes entre sí, según la prueba de Tukey con un 95% de confianza.

El mejor procedimiento de rescate de embriones fue aquel basado en la división del endosperma, cercano a la ubicación del embrión, llevando esta porción sin placenta, al medio de cultivo preparado, siendo el mejor momento de rescate a los 14 DDP.

Según De Jeu y Calderé (1997), hacia el costado del micrópilo del saco embrionario, el suspensor juega el papel de suministrar nutrientes al embrión. Para Buitendijk *et al.* (1995), solamente los embriones hinchados son disectados cuando son rescatados a los 14 DDP, siendo separados en el medio de cultivo. Sin embargo, para Van Schaik *et al.* (1996), los cigotos provenientes de embriones jóvenes disectados, no pierden su diferenciación y podrían desarrollar raíz y brote meristemático, cuando el medio nutritivo sea el adecuado.

En este trabajo, la elección de los 7, 14 y 21 DDP se hizo en base a la bibliografía citada y a la facilidad de realizar los rescates de embriones. Un fruto cosechado a los 2-3 ó 4 DDP es muy pequeño y difícil de manipular, por otro lado, pasados los 21 DDP, los frutos comienzan a endurecerse dificultando el corte de éstos.

Los autores Lu y Bridgen (1996), establecen que muchos embriones provenientes de frutos cosechados a los 10-15 DDP se fueron secando y comenzando a abortar. Por otro lado, las diferentes respuestas *in vitro* de los genotipos, puede estar relacionada a la naturaleza de las especies parentales y al grado de compatibilidad. Además, si los embriones son cultivados muy tempranamente, la tasa de germinación puede verse reducida porque algunos de ellos pueden estar no fertilizados.

Tombolato *et al.* (1993), señalan que la degeneración del embrión se observa a los 10-14 DDP debido al aborto de éste. Las causas pueden ser por diferentes niveles de ploidía entre los padres, diferentes tipos cromosómicos entre especies de distinto origen y por la muerte de embriones durante su desarrollo debido a las diferencias entre éstos y los tejidos de ovario.

Para Buitendijk *et al.* (1995), las malformaciones y los embriones retardados en los cruzamientos interespecíficos de *A. pelegrina*, fueron observados desde los 25 DDP en adelante, donde el embrión llega a colapsar completamente entre los 21 a 35 DDP. Por otro

lado, para De Jeu y Calderé (1997), las primeras aberraciones aparecen en el desarrollo del embrión desde los 4 DDP. En este respecto, las observaciones detalladas difieren de aquellas propuestas por Buitendijk *et al.* (1995).

Ishikawa *et al.* (2001), obtuvieron híbridos interespecíficos entre *A. pelegrina* var. *rosea* y *A. magenta*, cultivando embriones inmaduros a los 7-14 DDP. A la vez, realizaron observaciones histológicas de los ovarios fertilizados a los 14, 28, 42, 56, 63 y 70 DDP, sugiriendo que los embriones híbridos incrementan en número y tamaño de células hasta los 28 DDP; pasado ese tiempo decrecen y a los 70 DDP no hay ningún embrión vivo. Durante el desarrollo de éste, el desarrollo del endosperma nunca fue observado. Estos resultados sugieren que la degeneración del embrión híbrido fue causada por la falta de desarrollo del endosperma.

Compatibilidades. Considerando los resultados obtenidos, podemos señalar que tanto las especies *A. magnifica* como *A. pelegrina*, son compatibles entre sí a través de cruzamientos recíprocos. Lo contrario sucede para *A. pulchra*, cuya incompatibilidad con estas 2 especies mencionadas, impide su uso como progenitor femenino en combinaciones interespecíficas, presentando afinidad sólo cuando es utilizada como progenitor masculino.

Según varios autores, la incompatibilidad está también demostrada a través del estudio del crecimiento del tubo polínico. Prueba de ello, las investigaciones realizadas por De Jeu y Jacobsen (1995), establecen que los tubos polínicos de *Alstroemeria*, penetran el micrópilo de los óvulos un día después de ser autopolinizados. No obstante, en *A. pulchra* x *A. aurea*, *A. pulchra* x *A. ligtu* y *A. pulchra* x *A. inodora* hubo germinación de los granos de polen pero no hubo penetración al estigma, a diferencia de otras combinaciones, donde hubo crecimiento del tubo polínico en parte del sendero estilar, alcanzando el micrópilo de los óvulos, sólo en algunos casos, dejando semillas abortadas en diferentes estados de desarrollo. Los restos de tubo polínico se encuentran presentes como una estructura hinchada en el micrópilo, a los 1 y 2 DDP. Esta estructura permanece ahí por 8 DDP y luego degenera tanto en autopolinizaciones como en fertilizaciones cruzadas.

Crecimiento y desarrollo de embriones rescatados in vitro. Al cabo de 2,5 a 3 meses de cultivo in vitro, y con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad, se obtuvieron plántulas normales con brotes solitarios a múltiples (2 a 3), rizoma y radícula simple a múltiple (2 a 3). A partir del rizoma, en casos particulares, se produjeron 2 a 3 radículas con pelos absorbentes, mientras que en otros casos, se observó enrollamiento o “loop” de raíces. También fue posible apreciar 4 tipos de plántulas anormales: sin radícula, sin brotes, con brotes amorfos y formación de callos de variados tamaños, en forma separada o compacta, donde algunos de ellos aparecían con radículas, brotes y brotes amorfos (Figura 5 y Cuadros 5, 6 y 7).

En general, durante los 75 a 90 DDP, se pudo observar que algunos embriones tuvieron una organogénesis completa hasta el estado de plántula normal, mientras que la mayoría presentó una organogénesis incompleta manifestándose a través de plántulas anormales.

A continuación, en los Cuadros 5, 6 y 7, se presenta una descripción morfológica y cuantitativa de lo que se observó hasta los 2,5 a 3 meses para cada una de las especies investigadas.

Cuadro 5. Número total de embriones, total germinados, plántulas normales y anormales para cada cruzamiento acumulado de *A. magnifica* como progenitor femenino.

Especie	x <i>A. magnifica</i>	x <i>A. pelegrina</i>	x <i>A. pulchra</i>
Total Embriones	184	200	201
Total Germinados	39	36	18
Plántulas Normales	0	0	0
Plántulas Anormales	39	36	18

Cuadro 6. Número total de embriones, total germinados, plántulas normales y anormales para cada cruzamiento acumulado de *A. pelegrina* como progenitor femenino.

Especie	x <i>A. pelegrina</i>	x <i>A. magnifica</i>	x <i>A. pulchra</i>
Total Embriones	116	127	61
Total Germinados	39	17	6
Plántulas Normales	0	2 con radícula, brotes y rizoma	0
Plántulas Anormales	39	15	6

Cuadro 7. Número total de embriones, total germinados, plántulas normales y anormales para cada cruzamiento acumulado de *A. pulchra* como progenitor femenino.

Especie	x <i>A. pulchra</i>	x <i>A. magnifica</i>	x <i>A. pelegrina</i>
Total Embriones	271	103	106
Total Germinados	63	0	0
Plántulas Normales	1 con brotes, raíz y rizoma 1 con 2 raíces, brote y rizoma	0	0
Plántulas Anormales	61	0	0

De las 81 flores polinizadas, se obtuvo un total de 1.369 embriones, de los cuales, 214 de ellos germinaron en forma anormal (15,63%) y sólo 4 formaron plántulas normales (0,29%), 2 correspondientes al cruzamiento de *A. pelegrina* x *A. magnifica* y 2 a la autopolinización de *A. pulchra*. También se observó un 8,03% de formación de callos.

Para Lu y Bridgen (1996), la adición de reguladores de crecimiento 2,4-D y BA, reducen la tasa y tiempo de germinación, además del desarrollo de brotes.

Los autores De Jeu y Jacobsen (1995), obtuvieron plántulas normales in vitro con raíz, brote y rizoma al cabo de 2,5 meses. También obtuvieron un 6% de desarrollo estructural de callos con similitudes de brotes y raíces. A través de la germinación directa de los embriones in vitro, se fueron obteniendo plántulas normales y anormales al cabo de 8 a 10 semanas después de la polinización. El más alto porcentaje de plantas fue encontrado en el cruzamiento *A. aurea* x *A. pelegrina*, cuyo cruzamiento recíproco produjo una plántula normal con brote y raíz. Para Ishikawa *et al.* (2001), el mayor número de plántulas obtenidas entre *A. pelegrina* var. *rosea* y *A. magenta*, fue a los 7 y 14 DDP, después de 4 meses de cultivo.

En el género *Alstroemeria*, así como en muchas otras plantas, las barreras presentes en los cruzamientos impiden la combinación entre las especies. Varios autores han comprobado que estas barreras aparecen antes y después de la fertilización. En la prefertilización pueden ser débiles y superadas por condiciones de estrés. Si la fertilización toma lugar, las barreras de postfertilización son aún más fuertes. En principio, éstas pueden ser superadas con un temprano cultivo de embriones (Hogenboom, 1984).

Para De Jeu y Calderé (1997), el aborto del embrión está asociado con el crecimiento retardado, a falta de endosperma, y una temprana degeneración del tejido esporofítico. El cultivo y rescate de embriones, prueba ser exitoso en la producción de híbridos. Este hecho es una clara indicación de que los embriones híbridos interespecíficos no son seriamente afectados. Aunque manifiestan anomalías en su forma, ellos son viables en la mayoría de los casos si son cultivados en un medio adecuado.

De Jeu *et al.* (1992), mencionan que la producción de semillas en *Alstroemeria* sp., toma 2,5 a 3 meses de desarrollo en la planta, mismo tiempo en el que se lograron obtener plántulas normales como resultado de este trabajo.

En síntesis, el aborto del embrión es el resultado de un desequilibrio entre el desarrollo de éste, el endosperma y el tejido esporofítico que lo rodea (Van Tuyl *et al.*, 1990). Con respecto a esto mismo, reportaron que el éxito del embrión depende del desarrollo normal del endosperma en casi todas las especies.



Figura 5. 1: callo con brotes amorfos. 2 y 5: plántula normal. 3: plántula anormal con brotes definidos. 4: inicio de germinación de embrión con placenta. 6: plántula anormal con radículas.

CONCLUSIONES

En los cruzamientos interespecíficos, el número total de embriones por fruto no tiene correlación al tamaño del fruto y no depende del cruzamiento, si no más bien, al genotipo de la madre.

El rescate de embriones, ya sea con placenta o sin placenta con su endosperma dividido, no manifiesta diferencias significativas entre los cruzamientos aquí descritos, a excepción del cruzamiento *A. magnifica* x *A. pulchra*. En este último caso, la mejor forma de rescate de embriones es sin placenta con su endosperma dividido a los 14 DDP.

El momento óptimo de rescate de embriones es a los 21 DDP en la autopolinización de *A. magnifica* y en el cruzamiento interespecífico *A. pelegrina* x *A. magnifica*.

A. pulchra, usada como progenitor femenino, es incompatible en los cruzamientos interespecíficos. Sin embargo, se observa una afinidad con *A. magnifica* y *A. pelegrina* solamente cuando es utilizada como progenitor masculino.

Las especies *A. magnifica* y *A. pelegrina* son compatibles entre sí en cruzamientos recíprocos.

A través de técnicas de rescate de embriones in vitro, es posible recuperar híbridos interespecíficos de especies nativas de Alstroemerias, usualmente incapaces de producir prole viable cuando se cruzan espontáneamente.

Finalmente, al cabo de 2 meses de cultivo in vitro, se puede obtener germinación de los embriones provenientes de cruzamientos incompatibles, alcanzando el estado de plántula a los 2,5 a 3 meses.

BIBLIOGRAFÍA

- BAYER, E. 1987. Die Gattung *Alstroemeria* in Chile. Mitt. Bot. Staatsamml. München. 241-362.
- BRIDGEN, M. 1994. A review of plant embryo culture. Hort. Sci. 29: 1.243-1.246.
- BRIDGEN, M., E. OLATE and F. SCHIAPPACASSE. 2002. Flowering geophytes from Chile. 8th International Symposium on Flower bulbs. Acta Horticulturae 570: 75-80.
- BUITENDIJK, J. H., N. PINSONNEAUX, A. C. VAN DONK, M. S. RAMANNA and A. A. M. VAN LAMMEREN. 1995. Embryo rescue by half-ovule culture for the production of interspecific hybrids in *Alstroemeria*. Sci. Hortic. (Amst.) 64: 65-75.
- BURCHI, G., A. MERCURI, C. BIANCHINI, L. GUGLIERI and T. SCHIVA. 1997. *Alstroemeria*: incroci interspecifici e recupero degli embrioni in vitro. Colture Protette 9: 113-118.
- BURCHI, G., A. MERCURI and T. SCHIVA. 1999. Breeding of *Alstroemeria* through interspecific crosses and embryo-rescue. Second Symposium on Ornamental Palms and Other Monocots from the Tropics. Acta Hort. 486: 317-322.
- DE JEU, M. J., H. SASBRINK, F. G. CALDERÉ & J. PIKET. 1992. Sexual reproduction biology of *Alstroemeria*. Acta Hort. 325: 571-575.
- DE JEU, M. J. and E. JACOBSEN. 1995. Early postfertilization ovule culture in *Alstroemeria* and barriers to interspecific hybridization. Euphytica 86: 15-23.
- DE JEU, M. J. and F. G. CALDERÉ. 1997. Retarded embryo growth and early degeneration of sporophytic tissue are associated with embryo abortion in the interspecific cross *Alstroemeria pelegrina* x *Alstroemeria aurea*. Can. J. Bot. 75: 916-924.
- HEINS, R. D. and H. F. WILKINS. 1979. Effect of soil temperature and photoperiod on vegetative and reproductive growth of *Alstroemeria* "Regina". Jour. Amer. Hort. Soc. 104 (3): 359-365.
- HESLOP-HARRISON, J. S. 1991. Cytological techniques to assess pollen quality. Intensive course on sexual plant reproduction: Notes to practical class, England.
- HOFFMANN, A. 1978. Flora silvestre de Chile, zona central. Ediciones Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 225 p.

HOGENBOOM, N. G. 1984. Incongruity: non functioning of intercellular and intracellular partner relationships through mismatching information. In: H. F. Linskens & J. Heslop-Harrison (Eds). *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Vol. 17. Cellular Interactions.* pp. 640-651. Springer-Verlag, Berlin.

HU, C. and P. WANG. 1986. Embryo culture: technique and applications, in: Evans, D. A., W. R. Sharp and P. V. Ammirato, (Eds.), *Handbook of Plant Cell Culture, Vol. IV,* Macmillan Publishing Co., New York, pp. 43-96.

ISHIKAWA, T., T. TAKAYAMA, H. ISHIZAKA, K. ISHIKAWA and M. MII. 2001. Production of interspecific hybrids between *Alstroemeria pelegrina* L. var. *rosea* and *A. magenta* Bayer by ovule culture. *Euphytica* 118: 19-27.

KANO, K., M. HAYASHI, Y. SERIZAWA and T. KONISHI. 1988. Production of Interspecific hybrids between *Lilium longiflorum* and *L. x elegance* by ovary slice culture. *Japan. J. Breed.* 38: 278-282.

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

MARTICORENA, C. 1990. Contribución a la estadística de la flora vascular de Chile. *Gayana Botánica* 47(3-4): 85-113.

MUÑOZ, M. 1985. *Flora del Parque Nacional Puyehue.* Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 557 p.

MUÑOZ, M. y A. MOREIRA. 2003. *Alstroemerias de Chile: diversidad, distribución y conservación.* Taller La Era. Santiago, Chile. 140 p.

MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cell cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

NOMURA, Y. and K. OOSAWA. 1990. Production of Interspecific hybrids between *Allium chinense* and *A. thunbergii* by in ovulo embryo culture. *Japan. J. Breed.* 40: 531-535.

PULIDO, I., L. E. RODRÍGUEZ and T. MOSQUERA. 1999. Rescue and culture of immature sexual embryos in two crosses of *Alstroemeria* (“Saxony” x “Tiará” and “Saxony” x “Azula”). *International Symposium on Cut Flowers in the Tropics. Acta Hort.* 482: 299-304.

RIEDEMANN, P. y G. ALDUNATE. 2002. *Flora nativa de valor ornamental, Chile, zona centro.* Editorial Andrés Bello. Santiago, Chile. 314-317.

SACHAR, R. C. and M. KAPOOR. 1959. In vitro culture of ovules of *Zephyranthes*. *Phytomorphology* 9: 147-156.

SANSO, M., M. SEO y C. XIFREDA. 2004. Evaluación de especies argentinas de *Alstroemeria* y *Bomarea* como recursos ornamentales. II Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. VI Jornadas Nacionales de Floricultura. I Encuentro Latinoamericano de Floricultura. Buenos Aires, Argentina. 46-48.

SCHIAPPACASSE, F., P. PENAILILLO y P. YÁÑEZ. 2002. Propagación de bulbosas chilenas ornamentales. Editorial Universidad de Talca. Talca, Chile. 65p.

TOMBOLATO, A. F. C., G. BURCHI, C. BIANCHINI, R. BREGLIANO and T. SCHIVA. 1993. Interspecific crosses on *Alstroemeria*. In: Proc. of the XVIIth EUCARPIA Symposium "Creating Genetic Variation in Ornamentals" (Schiva, T., Mercuri, A. eds.): 301-307.

VAN SCHAİK, C. E., A. POSTHUMA, M. J. DE JEU, and E. JACOBSEN. 1996. Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on immature embryos of *Alstroemeria* spp. L. *Plant Cell Rep.* 15: 377-380.

VAN TUYL, J. M., M. P. VAN DIËN, M. G. M. VAN CREIJ, T. C. M. VAN KLEINWEE, J. FRANKEN and R. J. BINO. 1991. Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in Interspecific *Lilium* crosses. *Plant Sci.* 74: 115-126.

VONK-NOORDEGRAAF, C. 1981. Bloemproductie bij *Alstroemeria* "Walter Flemming". Mededeling nr. 69. Proefstation voor de Bloemisterij in Nederland te Aalsmeer.

ANEXOS

Anexo I. Sinonimia de las especies (Bayer, 1987; Muñoz y Moreira, 2003) y sus respectivos nombres comunes (Riedemann y Aldunate, 2002; Muñoz y Moreira, 2003).

Alstroemeria magnifica Herbert (1843) ssp. *magnifica*
 (“Mariposa del Campo” o “Lirio del Campo”)

A. gayana Phil., 1857

A. magnifica ssp. *gayana* (Phil.) Bayer, 1986

Alstroemeria pelegrina L., 1762
 (“Pelegrina” o “Mariposa de Los Molles”)

A. amoena Salisb., 1796

A. peregrina var. *albescens* Herbert, 1837

A. ligtu “Feuillet” var. 3, Herbert, 1837

Alstroemeria pulchra (1832) var. *pulchra*, según Muñoz y Moreira (2003)
 (“Flor del Águila”, “Mariposa del Campo” o “Flor de San Martín”)

A. tricolor Hooker, 1828

A. flos-martinii Ker-Gawl., 1823

A. bicolor Hooker, 1828

A. ligtu var. *pulchra* (Sims) Baker, 1888

Anexo II. Preparación medio de cultivo semi-sólido, según HESLOP-HARRISON (1991).

Preparar 0.6183 g de H₃BO₃ y 2.3615 g de Ca(NO₃)₂, cada uno disuelto en 100 mL de agua destilada a partes. Adicionar 20% de sacarosa, 0.5 g de agarosa y 2 mL de H₃BO₃ y de Ca(NO₃)₂ en otros 100 mL de agua destilada alcanzando un pH 6,0. Agitar con temperatura la solución sin alcanzar hervor.

Anexo III. Medio de cultivo MURASHIGE & SKOOG (1962). Preparación de soluciones madres.

Macroelementos	
Sales	Solución Madre (x 10) g/L
NH ₄ NO ₃	16,5
KNO ₃	19,0
CaCl ₂ 2H ₂ O	4,4
MgSO ₄ H ₂ O	3,7
KH ₂ PO ₄	1,7

Cada una de las sales se disuelve separadamente y se van uniendo las sub-soluciones en un matraz en agitación hasta alcanzar un litro de solución final.

Microelementos	
Sales	Solución Madre (x 100) g/L
MnSO ₄ 4H ₂ O	2,23
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,86
H ₃ BO ₃	0,62
KI	0,083
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,0025
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,0025
Na ₂ MoO ₄ H ₂ O	0,025

Sales de Hierro (Fe)	
Sales	Solución Madre (x 100) g/L
FeSO ₄ H ₂ O	2,78
Na ₂ EDTA	3,73

Las sales de Fe se disuelven separadamente, luego se mezclan ambas soluciones y se calientan a 70-80°C para favorecer la formación del quelato.

Vitaminas y aminoácidos	
Vitamina o aminoácido	Solución Madre (x 100) g/L
Tiamina-HCl	0,04
Mio inositol	10,0
Piridoxina-HCl	0,05
Ácido nicotínico	0,05
Glicina	0,2

El ácido nicotínico requiere ser disuelto en un medio básico (pocas gotas de NaOH y después agua). Esta solución madre debe mantenerse en el freezer en pequeñas botellas de plástico (menor a 50 mL) para no descongelar todo el volumen cada vez que se requiera.

Hormonas		
Hormona	Concentración de la Solución Madre (g/100 mL)	Soluble en:
Citoquininas		
BAP	0,01	HCl, caliente (60-70°C)
Kinetina	0,01	HCl
2iP	0,01	HCl
Auxinas		
IAA	0,01	KOH, NaOH, NH ₃ , etanol
NAA	0,01	KOH, NaOH, NH ₃
IBA	0,01	KOH, NaOH, NH ₃
Giberelinas		
GA3	0,01	NH ₃ en caliente

Las soluciones madres de las hormonas deben mantenerse en el freezer en pequeñas botellas de plástico (menor a 50 mL) para no descongelar todo el volumen cada vez que se requiera.

APÉNDICES

Apéndice I. Porcentaje promedio de germinación de polen de las especies *A. magnifica*, *A. pelegrina* y *A. pulchra*, en 2 temperaturas de almacenamiento.

Especie	T° (°C)	Promedio (%)
<i>A. magnifica</i>	-20°	43,16
<i>A. magnifica</i>	4°	57,25
<i>A. pelegrina</i>	-20°	51,41
<i>A. pelegrina</i>	4°	52,85
<i>A. pulchra</i>	-20°	57,29
<i>A. pulchra</i>	4°	53,79

Apéndice II. Promedio de las tres repeticiones de largo y ancho (cm) para cada DDP de los frutos de *A. magnifica*, *A. pelegrina* y *A. pulchra* como madres en relación al progenitor masculino.

Especie	DDP	<i>A. magnifica</i> x		<i>A. pelegrina</i> x		<i>A. pulchra</i> x	
		largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho
x <i>A. magnifica</i>	7	2,87	1,37	3,40	1,07	1,23	0,67
x <i>A. magnifica</i>	14	3,63	1,70	1,27	0,80	1,30	0,60
x <i>A. magnifica</i>	21	3,37	1,77	1,83	1,33	1,13	0,47
x <i>A. pelegrina</i>	7	2,70	1,07	1,93	1,43	1,37	0,67
x <i>A. pelegrina</i>	14	2,67	1,17	1,77	1,17	1,23	0,73
x <i>A. pelegrina</i>	21	2,60	1,13	1,87	1,17	1,17	0,53
x <i>A. pulchra</i>	7	2,43	1,23	1,20	0,77	2,13	1,13
x <i>A. pulchra</i>	14	3,60	1,70	1,37	0,77	2,20	1,23
x <i>A. pulchra</i>	21	3,70	1,67	1,43	0,70	2,27	1,33