



Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Fitomejoramiento
Tema estratégico (ANA/PEP):	Biotecnología Agrícola				
Línea de investigación:	Cultivo de Tejidos, Mejoramiento Genético				
Título del proyecto:	<b>Cultivo de anteras para la obtención de haploides y doblehaploides en chile <i>Capsicum annuum</i> para su utilización en la formación de híbridos</b>				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$50,000.00	El proyecto es:	Nuevo	<input checked="" type="checkbox"/>	Continuación
Tipo de investigación:	Básica	<input checked="" type="checkbox"/>	Aplicada	<input checked="" type="checkbox"/>	Tecnológica
Vinculación:	Si	<input type="checkbox"/>	No	<input checked="" type="checkbox"/>	Fondos concurrentes:
Cooperante(s):					
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo y General Cepeda		
Localidades:	Saltillo y General Cepeda				
A realizar durante el(los) año(s):	2018, 2019, 2020				

Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma
Responsable	Dra. Francisca Ramírez Godina	0203	1145	
Colaborador:	Dra. Hermila Trinidad García Osuna	0203	4220	
Colaborador:	Dr. Valentín Robledo Torres	1029	3031	
Colaborador:	Dr. M. Humberto Reyes Valdés	0203	2174	
Colaborador:				
Colaborador:				
		Grado por obtener	Matrícula	Firma
Tesista:	Estefanía Contreras Gordillo	Licenciatura	41132812	
Programa Docente:	Ingeniero Agrónomo en Producción			
Tesista:				
Programa Docente:				
Tesista:				
Programa Docente:				

Vo. Bo.		Autoriza	
Firma y sello	 		
Nombre	Dr. Alfonso López Benítez Jefe de Departamento	Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación	

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo



## Protocolo para Proyecto de Investigación 2018

### Título del proyecto

Cultivo de anteras para la obtención de haploides y dobles haploides en chile *Capsicum annuum* para su utilización en la formación de híbridos

### Introducción

El chile (*Capsicum annuum*) es uno de los principales cultivos a nivel mundial, su producción es de suma relevancia. México produce 6.5% de la producción mundial de chile fresco, con una producción neta de más de 2,700,000 toneladas, además ocupa el primer lugar en exportaciones a países como Estados Unidos, Japón, Canadá, Reino Unido y Alemania (SAGARPA, 2015), sin embargo, cada día es más difícil cubrir las crecientes y aceleradas demandas del mercado, por lo que se precisan materiales innovadores y más rendidores por unidad de superficie y sobre todo que se adapten a condiciones de ambiente controlado para mejorar su calidad y rendimiento, por lo cual es importante modificarlos genéticamente con el fin de avanzar en el desarrollo de nuevos cultivares para su producción intensiva en invernadero y lograr el máximo potencial de rendimiento y calidad. Una alternativa para la generación de nuevos híbridos con estas características es la generación de líneas puras, 100% homocigotas mediante la obtención de haploides y doble haploides androgénicos, ya que es una prioridad actual para las empresas de producción de semilla híbrida, sin embargo usando técnicas convencionales de mejoramiento genético la obtención de estas líneas puede requerir al menos seis ciclos de autofecundación (Polci *et al.*, 2004). El empleo de herramientas como la producción in vitro de haploides y doble haploides, permite obtener líneas homocigotas hasta en una generación, reduciendo tiempo y costo de producción de estas líneas (González y Jouve, 2003; Polci *et al.*, 2004; Maraschin *et al.*, 2005).

Las líneas puras son imprescindibles para la producción de semilla híbrida para la agricultura, se han venido obteniendo tradicionalmente mediante la fecundación de una planta por sí misma, una y otra vez a los largo de muchas generaciones, lo cual le supone al productor una gran inversión en tiempo, extensiones de cultivo y recursos económicos que luego traslada al precio final de la semilla, es por ello que en esta investigación se pretende obtener una líneas pura de chile con características sobresalientes, por medio de técnicas de biotecnología agrícola.

### Objetivos

- Establecimiento in vitro de anteras, para desarrollar plantas haploides.
- Análisis cromosómico para comprobar la haploidía de las plantas in vitro:
- Duplicación cromosómica para la obtención de doblehaploides.
- Análisis cromosómico para comprobar plantas doblehaploides.
- Desarrollo en campo y en invernadero de plantas doblehaploides o líneas puras

### Hipótesis

Es posible obtener líneas puras en chile, mediante cultivo de anteras

### Revisión de Literatura

#### Importancia Económica de chile:

*Capsicum* es un género de plantas que pertenecen a las angiospermas, dicotiledóneas nativo de las regiones tropicales y subtropicales de América y pertenecen a la familia de las solanáceas. Comprende 40 especies



aceptadas, de las casi 200 descritas, herbáceas o arbustivas, generalmente anuales, aunque las especies cultivadas se han convertido en perennes en condiciones favorables.

El cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) es uno de los cultivos más importantes en México por su gran consumo en la población, por el valor de su producción y por la alta demanda de mano de obra que genera. Se cultiva en casi todos los estados de la república desde altitudes a nivel del mar a los 2500 msnm, hasta el 2016 la superficie cosechada es de 159,939 ha, con un rendimiento promedio de 16.22 ton ha<sup>-1</sup> en chile jalapeño. En 2015 destacaron Chihuahua, Sinaloa y Zacatecas como principales productores del cultivo con más de la mitad del volumen nacional en su conjunto. En el caso de Sinaloa, un estado con alto grado de tecnificación, se registró una cosecha de 40 t ha<sup>-1</sup>, en Chihuahua, 20 ton ha<sup>-1</sup>, mientras Zacatecas, el de mayor superficie sembrada reportó 7 ton ha<sup>-1</sup> (SIAP 2015-2016). Sin embargo en algunos trabajos de investigación se ha logrado incrementar este rendimiento, gracias al uso de la agricultura protegida en interacción con una fertilización adecuada, como lo indica Duarte (2012) quien menciona que la mayor producción y calidad de chile jalapeño se obtuvo con uso de gallinaza + 80N, el cual presentó un rendimiento de 65.2 t ha<sup>-1</sup>, en comparación con 43.3, 17.2 y 16.2 t ha<sup>-1</sup> obtenidos con las siguientes fórmulas de fertilización; 150N-150P, 5 t ha<sup>-1</sup> de estiércol y testigo, respectivamente.

Mientras que el chile Mirador es un recurso valioso de gran importancia económica y social en la región de El Mirador, Chicontepec, Veracruz, México, además de tener un excelente sabor y la característica de no irritar el estómago, debido a que tiene una pungencia intermedia. Sin embargo, su producción se ve limitada debido a que en la etapa fenológica de floración se presenta un alto porcentaje de caída de flor (Ramírez *et al.*, 2010), por lo que dichos investigadores aplicaron algunos biorreguladores para mejorar algunas características fisiológicas y bioquímicas logrando rendimientos promedio que van de 350 a 500 gramos por planta.

En cuanto al rendimiento promedio de chile serrano se reportan 55 ton ha<sup>-1</sup> para el cultivar Tampiqueño 74, mientras que otros cultivares presentan rendimientos de 75 ton ha<sup>-1</sup> (SAGARPA 2015).

El rendimiento de chile pimiento (*Capsicum annuum* L.) en invernadero en México es 80 t ha<sup>-1</sup> con densidades de 9 a 10 plantas·m<sup>-2</sup> (Maroto, 1989). En Italia, manejan un promedio de 41.5 t ha<sup>-1</sup> cuando se cosecha el fruto verde, y 36.3 t ha<sup>-1</sup> cuando se cosecha maduro (Miccolis *et al.*, 1999). En Israel, el rendimiento medio es 16 kg m<sup>-2</sup> (Bart Tal *et al.*, 2000). En Alemania el rendimiento fue 17 kg m<sup>-2</sup> (Paschold y Zengerle, 2000) bajo cultivo en invernadero, mientras que Seminis (2015) reporta 150 ton ha<sup>-1</sup>, concluyendo que la tecnología de producción en invernadero ha incrementado el rendimiento por unidad de superficie.

#### **Cultivo de Anteras y producción de haploides:**

Consiste en el cultivo de anteras inmaduras en un medio de inducción, donde las micrósporas competentes originarán callos, que serán luego transferidos a un medio apropiado para la regeneración de plantas. Chirinos (2006); trabajo con anteras de café y señala que si éstas son sometidas a bajas temperaturas, se incrementa la respuesta callogénica o embriogénica, debido a la formación de dos núcleos iguales durante la primera mitosis.

La producción de plantas haploides ha capturado un gran interés de investigadores en el área de la genética, embriología, fisiología y mejoramiento desde el descubrimiento de la primera planta haploide producida en la especie *Datura stramonium*. Las bases del cultivo de haploides tienen su fundamento, en que, en un medio de cultivo apropiado las microsporas y/o granos de polen de algunas especies pueden ser inducidas a la formación de células vegetativas a partir de ellas. Las microsporas cambian el patrón sexual normal (gametofítico) a un patrón vegetativo (esporofítico). El resultado es que en lugar de tener polen con capacidad para producir gametos y un tubo polínico, la microspora es capaz de producir proembriones o callos haploides. A la formación de plantas a partir de microsporas ó polen se le llama androgénesis (Gutiérrez *et*



*al.*, 2002). Medio de cultivo: es el principal factor que puede controlarse para la inducción y desarrollo de plantas. Los medios más utilizados son el BDS, el de Murashige–Skoog (Murashige & Skoog, 1962), y en menor medida el medio B5. La combinación empleada exitosamente para esta técnica está representada por auxinas (2-4 D) y citocininas (BAP). El cultivo de los embriones obtenidos no requiere del agregado de reguladores de crecimiento.

### **Producción de Doblehaploide:**

La producción de plantas dihaploides (DH) representa una estrategia alternativa que permite obtener una completa homocigosis y uniformidad del genotipo en un corto tiempo (2 años) y es una estrategia utilizada en un gran número de especies, entre los cuales se puede mencionar maíz, cebada (actualmente el 50 % de las variedades utilizadas en Europa provienen de doblehaploides), arroz y en varias especies medicinales. Para un uso práctico de las líneas DH en el mejoramiento, los procedimientos en la inducción para la producción de plantas haploides deben ser eficientes, no muy laboriosos e insensibles al genotipo. Los regenerantes deben crecer bien en cultivo *in vitro* y su genoma debe ser duplicado fácilmente; además las plantas producidas se deben aclimatar sin problemas. Por otra parte, los DH regenerados tienen que conservar su integridad genética y producir semillas fértiles (Foschi *et al.*, 2009).

Factores que afectan la duplicación del número de cromosomas de haploides: Posteriormente a la obtención de embriones ginogenéticos (haploides) es necesaria la duplicación de sus cromosomas para producir líneas dihaploides homocigotas. La sustancia más utilizada para la duplicación de cromosomas es la colchicina con una eficiencia media de duplicación del 70 %, aproximadamente. Una de las desventajas del empleo de este compuesto es la elevada fitotoxicidad por las altas dosis que se requieren para lograr una alta tasa de duplicación (Nowak, 2000). En especies como maíz, zanahoria y trigo, la colchicina se ha utilizado 100 a 1.000 veces más que otras sustancias antimitóticas como trifluralina, orizalina y APM, para inducir efecto antimicrotubular.

El porcentaje de duplicación en embriones haploides de cebolla se incrementa al emplear 10 mg•L<sup>-1</sup> de colchicina durante 3 días de aplicación, produciendo 46 % de plantas completamente diploides (Campion *et al.*, 1995). También se han obtenido buenos resultados con concentraciones de 500 mg•L<sup>-1</sup> durante 10 días de aplicación, sobre plántulas micropropagadas de cebolla. En híbridos de *A. fistulosum* x *A. cepa* se obtuvo el mayor porcentaje de tetraploides con concentraciones de 2.000 mg•L<sup>-1</sup> de colchicina y 3 días de exposición en medio líquido, con posterior transferencia a medio de cultivo sólido (Song *et al.*, 1997).

### **Sustancias utilizadas para la duplicación cromosómica**

**Colchicina:** La acción de la colchicina fue descubierta en 1937 y desde entonces ha pasado a ser prácticamente el agente diploidizante más importante. Esta droga actúa impidiendo el auto ensamblaje de la tubulina, inhibiendo así la formación de los microtúbulos del huso y, en consecuencia, la segregación anafásica de las cromátidas. Afecta por lo tanto sólo a las células que se encuentran en división. Puede aplicarse a plántulas, plantas adultas, semillas, micrósporas y anteras. El tratamiento puede realizarse utilizando una solución acuosa donde se sumergen las raíces, dejando fuera la parte aérea. También se puede hacer llegar la solución al interior de la planta utilizando una jeringa con la dosis deseada (microinyección), o por absorción de la solución a través de los tallitos decapitados, sobre los que se vierte. Otra forma de hacerlo es tratar los callos con colchicina antes de trasladarlos al medio de regeneración. Este último método permite la obtención de gran número de doblehaploides, pero presenta la desventaja de que la mayoría de las plantas así obtenidas son mosaicos cromosómicos.

Otras sustancias que se pueden implementar: Existen otras sustancias antimitóticas como la trifluralina, orizalina y amiprofos-methyl (APM) que pueden reemplazar a la colchicina, siendo menos tóxicos y de mayor eficiencia que ésta, ya que con menores concentraciones se logran similares porcentajes de duplicación



(Bohanec & Jakse, 2000) o una mejor calidad de plantas.

#### Procedimiento Experimental

El trabajo se realizará en los Laboratorios de Cultivo de Tejidos y de Citogenética de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

#### **Material Vegetal**

Se emplearán materiales avanzados de chile, que presentan altos valores heteróticos, los cuales serán proporcionados por el departamento de horticultura: Jalapeño Mitla, Pimiento UAAAN rd, Súper Heavy Weigth

#### **Establecimiento in vitro de anteras:**

El medio a emplear para el cultivo de anteras es el de Murashige–Skoog (Murashige & Skoog, 1962) ajustado a un pH 5.7 los cuales serán esterilizados en autoclave.

Desinfección y Siembra; las anteras que se utilizarán para el cultivo in vitro se obtendrán de botones florales en estado de un núcleo, para definir el tamaño de los botones se realizará un estudio citológico que nos indicará el mayor número de granos de polen en la fase mononucleada, que es la etapa que desarrollará plantas haploides. La desinfección de las anteras se realizará con etanol al 96% durante 2 minutos luego en una solución de hipoclorito de sodio al 1.8 % durante un lapso de 10 minutos. Las anteras se sembrarán de dos maneras unas de ellas se colocarán sobre el medio de cultivo y la otra se le realizara una incisión longitudinal en la parte media.

Inducción de la embriogénesis somática: las anteras se cultivarán como explantes en frascos Gerber con 10 ml de medio MS, estas anteras se mantendrán en obscuridad durante 4 semanas para inducir la formación de callo embriogénico a una temperatura de 26°C.

Desarrollo de los embriones somáticos: para promover la diferenciación y germinación de los embriones somáticos que se formen de las anteras se cambiarán a un nuevo frasco con 10 ml de medio MS (2-4D) Aux, los cuales se tendrán 2 semanas en oscuridad y 2 semanas en un fotoperiodo de 16 horas de luz. (Lámparas de luz blanca fría fluorescente con intensidad lumínica de 25 micro mol). Las plántulas haploides que se obtendrán se pondrán en condiciones de luz para continuar su desarrollo.

Multiplicación de plantas haploides: los ápices de vástago de las plantas haploides que serán obtenidas a partir de las anteras se cultivaran durante 4 semanas en el medio posteriormente los brotes adventicios que se formaran se individualizaran y se colocaran en medio durante 2 semanas con la finalidad de promover la formación del sistema radicular.

#### **Análisis cromosómico para comprobar la haploidía de las plantas in vitro:**

Para observar los cromosomas mitóticos se colocarán los ápices radiculares de las plantas regeneradas in vitro en un pretratador que consiste en diferentes soluciones acuosas de colchicina (0.05, 0.10, 0.15 %) por 3, 6, 9, 12, 24 y 36 horas de exposición a temperatura ambiente y en oscuridad. Después los ápices serán transferidos a un fijador Farmer 3:1 (etanol: ácido acético) (v/v) por 12 horas; se pondrán a hidrolizar durante 10 min en HCl 1 N a 60 °C posteriormente serán coloreados con una solución de Feulgen a 60 °C por 5 min. Los ápices teñidos se macerarán en una solución enzimática (pectinasa 2%, celulasa 5% y buffer citrato, pH 4.5) después, se llevará a cabo la colocación de los mismos sobre portaobjetos agregando una gota de orceína propiónica al 2% para luego cubrirlos con cubreobjetos y así poder realizar el conteo y toma de fotografías de los cromosomas utilizando un microscopio.

#### **Duplicación cromosómica para la obtención de doblehaploides:**

Las plantas haploides regeneradas se van a extraer del medio de cultivo, se lavarán las raíces con agua



corriente para eliminar residuos del mismo y se sumergirán la raíz en diferentes concentraciones (0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3%) de solución acuosa de colchicina.

### **Análisis cromosómico para comprobar plantas doble haploides:**

Para observar los cromosomas mitóticos se colocarán los ápices radiculares de las plantas regeneradas in vitro en un pretratador que consiste en diferentes soluciones acuosas de colchicina (0.05, 0.10, 0.15 %) por 3, 6, 9, 12, 24 y 36 horas de exposición a temperatura ambiente y en oscuridad. Después los ápices serán transferidos a un fijador Farmer 3:1 (etanol: ácido acético) (v/v) por 12 horas; se pondrán a hidrolizar durante 10 min en HCl 1 N a 60 °C posteriormente serán coloreados con una solución de Feulgen a 60 °C por 5 min. Los ápices teñidos se macerarán en una solución enzimática (pectinasa 2%, celulasa 5% y buffer citrato, pH 4.5) después, se llevará a cabo la colocación de los mismos sobre portaobjetos agregando una gota de orceína propiónica al 2% para luego cubrirlos con cubreobjetos y así poder realizar el conteo y toma de fotografías de los cromosomas utilizando un microscopio.

### **Aclimatación y trasplante**

Después de comprobar por estudios citológicos que las plantas tratadas con colchicina duplicaron su número cromosómico, se colocarán en macetas de 10 litros con una mezcla de peat moss y perlita (1:1) v/v estas se cubrieran con bolsas de plástico transparente las cuales estarán previamente perforadas. Pasando una semana se retirarán las bolsas para llevar las plantas al invernadero donde continuarán su desarrollo.

### **Cronograma de actividades.**

Actividad a realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Análisis citológico para determinar tamaño de botones florales		X										
Preparación de medios de cultivo y establecimiento in vitro de anteras			X	X								
Regeneración de plantas in vitro				X	X	X						
Análisis cromosómico para comprobar la haploidía de las plantas in vitro						X	X					
Preparación de soluciones para duplicación cromosómica						X						
Duplicación cromosómica para la obtención de doblehaploides						X	X	X	X			
Regeneración de plantas in vitro									X	X		
Análisis cromosómico para comprobar plantas doblehaploides										X	X	X

### **Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.**

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
	Miles de pesos											
Análisis citológico para determinar tamaño de botones florales	2	2										
Preparación de medios de cultivo y establecimiento in vitro de anteras		3	3	3								



Regeneración de plantas in vitro						4	4	4				
Análisis cromosómico para comprobar la haploidía de las plantas in vitro									4	4	4	
Preparación de soluciones para duplicación cromosómica									5	4	4	

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2018	Año estimado de conclusión	2020
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos esperados

Una tesis, presentaciones en congresos y un artículo científico

6.-Literatura citada

Bar-Tal, A., M. Keinan, B. Aloni, L. Karni, Y. Oserovitz, S. Gantz, A. Hazan, M. Itach, N. Tartakovski, A. Avidan, and I. Posalski S. 2000. Relationships between blossom end rot and water availability and Ca fertilization in bell pepper fruit production. *Acta Hort.* 554: 97-103.

Bohanec, B. & Jakse, M. 2000. Studies of alternative approaches for genome doubling in onion. "Biotechnological Approaches for Utilitation of Gametic Cells" COST 824 final meeting, Bled, Slovenia 1-5 Julio, p.101-104.

Campion, B.; Azzimonti, M.; Perri, E.; Schiavi, M. & Vicini, E. 1995b. Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Breeding.* 114 (3): 243-246.

Chirinos, M. 2006. Cultivo de anteras en dos clones de yuca. *Agronomía Trop.* VE. 56(4): 633-641

Duarte, R. M., Contreras, R. L. G., & Contreras, F. R. (2012). Respuesta de la aplicación de estiércol y fertilizantes sobre el rendimiento y calidad del chile jalapeño. *Biotecnia*, 14(3), 32-38

Foschi, M., Martínez, L., Ponce, M, Galmarani, C. 2009. Doblehaploides, una estrategia biotecnológica para el mejoramiento genético en cebolla (*Allium cepa*). *Horticultura Argentina* 28(66): May.-ago. 2009.

González, J. M. y Jouve, N. 2003. Estudio del desarrollo de las microsporas en la androgénesis in vitro de triticale (*Triticosecale* Wittmack). In: V Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales. Memoria. Pamplona, España. 39 p.

Gutiérrez, M., Santacruz, F., Cabrera J., Rodríguez, G. 2002. Mejoramiento Genético Vegetal In Vitro. 2003, e-Gnosis [online] Vol.1 Art. 4. ISSN: 1665-5745.

Maraschin, S. F.; Priester, W.; Spaink, H. P. and Wang, M. 2005. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from male gametophyte perspective. *J. Exp. Bot.* 56:1711-1726.

Maroto, B. J. V. 1989. *Horticultura. Herbácea Especial.* Ed. MundiPrensa. Madrid. 566 p

Miccolis, V., V. Candido, and V. Marano. 1999. Influence of harvest time on yield of some sweet pepper cultivars grown in greenhouses. *Acta Hort.* 491: 205-208.

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15: 473-497

Nowak, E. 2000. Gynogenic onions plants-studies on regeneration and diploidization. "Biotechnological Approaches for Utilitation of Gametic Cells" COST 824 final meeting, Bled, Slovenia 1-5 Julio, p. 95-99.

Pashold, P. J., and K. H. Zengerle. 2000. Sweet pepper production in a closed system in mound culture with special consideration to irrigation scheduling. *Act. Hort.* 554: 329-333.

Polci, P.; Conti, V. y Miranda, R. 2004. Obtención de plantas doblehaploides. In: Echenique, V.; Rubinstein, C. y Mroginski, L. (eds). *Biotecnología y mejoramiento vegetal.* Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. 137-148 p.

Ramirez, H., Amado-Ramirez, C., Benavidez-Mendoza, A., Robledo-Torres, V., and Martínez Osorio, A.,

- (2010) Prohexadiona-Ca, AG3, ANOXA, y BA modifican indicadores fisiológicos y bioquímicos de Chile Mirador. Revista Chapingo. Serie Horticultura, 16(2) 83-89.
- SAGARPA 2015-2016. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación. [http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/siap/Paginas/superficie\\_agricola\\_protegida.aspx](http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/siap/Paginas/superficie_agricola_protegida.aspx)
- SIAP 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera Producción agrícola por cultivo. Disponible en línea <http://www.siap.gob.mx>
- Song, P.; Kang, W. & Peffley, B. 1997. Chromosome doubling of *Allium fistulosum* x *A. cepa* interspecific F1 hybrids through colchicine treatment of regenerating callus. *Euphytica*. 93: 257-262..