



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA



**“Evaluación del cultivo de anteras y el cocultivo de microesporas de chile (*Capsicum annum* L.) con ovarios de chile y Sorgo (*Sorghum bicolor* L.)” y “Regeneración *in vitro* de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.)”**

**POR**

**GERSON MOISES MARTÍNEZ MEDRANO**

**RESUMEN DE PASANTIA DE INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, JUNIO 2023**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

M.Sc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

**SECRETARIO GENERAL**

M.Sc. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS**

**DECANO**

DR. FRANCISCO LARA ASCENCIO

**SECRETARIO**

ING. AGR. BALMORE MARTÍNEZ SIERRA

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**

ING. AGR. M.Sc. FIDEL ÁNGEL PARADA BERRÍOS

**DOCENTE ASESOR**

ING. AGR. M.Sc. JULIO CÉSAR ORTIZ PAVÓN

**TRIBUNAL EVALUADOR**

ING. AGR. BALMORE MARTÍNEZ SIERRA

ING. AGR. M.Sc. RAUL VILLATORO

ING. AGR. M.Sc. JULIO CÉSAR ORTIZ PAVÓN

**COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE  
FITOTECNIA**

ING. AGR. MARIO ALFREDO PÉREZ ASCENCIO

## RESUMEN

El cultivo *in vitro* de anteras y el cultivo de microesporas son técnicas mediante las cuales se pueden obtener plantas haploides. En Chile (*Capsicum annum* L.) estas técnicas no han sido aplicadas con total éxito, debido a la recalcitrancia de la especie y la dependencia de la respuesta al genotipo. En el presente trabajo se estudió microscópicamente los diferentes estados de desarrollo de las microesporas de dos variedades de Chile (*Capsicum annum* L.) Var. Largo de Reus y Dulce Italiano. Posteriormente, se establecieron diferentes ensayos mediante el aislamiento de microesporas de Chile y su cocultivo con ovarios de sorgo (*Sorghum bicolor*). De igual forma, se investigó el cultivo de anteras de Chile mediante el uso de medios de cultivo suplementados con las sales minerales de Gamborg B5 (1968). Todos los ensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar.

Se logró determinar el estado binucleado temprano de los granos de polen como primer paso al aislamiento de las microesporas. El cocultivo de microesporas de polen y ovarios de sorgo no mostró una respuesta favorable a la regeneración, para la variedad Chile *Capsicum annum* L. var. Largo de Reus (LR), esto por el protocolo utilizado en el aislamiento de las microesporas. Los callos desarrollados se obtuvieron mediante el cultivo de anteras en cajas Petri, mantenidos en oscuridad durante un período de dos meses a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se transfirieron al medio regenerativo R1 modificado (Lantos, 2009) y mantenidos en condiciones de fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad, a 1,500-2,000 lux y  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Se logró así el establecimiento de un protocolo del cultivo *in vitro* de anteras de *Capsicum annum* (var. Largo de Reus) adaptado a los recursos y equipos disponibles en el laboratorio.

Por otro lado, se evaluó la regeneración *in vitro* de Loroco (*Fernaldia pandurata* W), a través del uso de segmentos nodales. En este estudio se utilizaron medios Murashige y Skoog (1962) en combinación de tres diferentes reguladores de crecimiento. Se encontró que el uso de Bencilaminopurina (BAP) a razón de  $1\text{mg l}^{-1}$ ,  $1\text{mg l}^{-1}$  BAP+ $1\text{mg l}^{-1}$  Kinetina y el uso de Kinetina a razón de  $5.0\text{mg l}^{-1}$  mostraron mejores respuestas en relación a número de brotes y crecimiento vegetativo. Estos dos aspectos son fundamentales dentro del desarrollo de plántulas y posteriores estudios de micropropagación *in vitro* y aclimatación de esta especie.

## INDICE

4. MARCO TEÓRICO .....	9
4.1 Proyecto Evaluación del cultivo de anteras y el cocultivo de microesporas de chile ( <i>Capsicum annum</i> L.) con ovarios de chile y Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> L.) .....	9
4.1.1 Origen .....	9
4.1.2 Clasificación taxonómica .....	9
4.1.3 Morfología y biología floral.....	9
4.1.4 Importancia nutricional .....	10
4.1.5 importancia económica.....	10
4.1.6 Regeneración <i>in vitro</i> de Chile.....	10
4.1.7 División meiótica en las plantas.....	12
4.1.8 Condiciones de cultivo.....	15
4.1.9 Importancia del establecimiento de un protocolo de desinfección para cultivo <i>in vitro</i> .....	15
4.1.10 Embriogénesis <i>in vitro</i> en el género <i>Capsicum</i> .....	16
4.1.11 Embriogénesis a partir del cultivo de microesporas .....	17
4.1.12 Marcadores morfológicos de evaluación del desarrollo floral .....	18
4.1.13 Estado adecuado de las microesporas para el cultivo <i>in vitro</i> .....	19
4.1.14 Producción de plantas doble haploides mediante androgénesis .....	19
4.2 Proyecto Regeneración <i>in vitro</i> de Loroco ( <i>Fernaldia pandurata</i> W).....	21
4.2.1 Origen y distribución .....	21
4.2.2 Clasificación taxonómica .....	21
4.2.3 Importancia nutricional .....	21
4.2.4 Importancia económica.....	22
4.2.5 Cultivo tradicional de Loroco.....	22
4.2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de Loroco .....	22

5. DESARROLLO DE LA PASANTÍA.....	24
5.1 Proyecto Evaluación del cultivo de anteras y el cocultivo de microesporas de chile ( <i>Capsicum annum</i> L.) con ovarios de chile y Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> L.) .....	24
5.1.1 Ubicación de la pasantía .....	24
5.1.2 Material vegetal .....	24
5.1.3 Metodología de campo .....	24
5.1.3.1 Selección del área de siembra.....	25
5.1.3.2 Siembra.....	25
5.1.3.3 Trasplante .....	25
5.1.3.4 Manejo agronómico .....	25
5.1.3.4.1 Fertilización .....	25
5.1.3.4.2 Riego.....	26
5.1.3.4.3 Control de plagas .....	27
5.1.3.4.4 Colecta .....	27
5.2 Metodología de laboratorio .....	27
5.2.1 Análisis histológicos .....	27
5.2.2 Desinfección de los botones florales.....	30
5.2.3 Extracción de microesporas y ovarios.....	30
5.2.4 Cocultivo de microesporas y ovarios para la regeneración de callos.....	31
5.2.5 Sub cultivo en medio regenerativo (R1).....	34
5.2.6 Condiciones de cultivo <i>in vitro</i> .....	34
5.2.7 Evaluación de la regeneración.....	34
5.2.8 Análisis estadístico .....	34
5.3 Proyecto Regeneración <i>in vitro</i> de Loroco ( <i>Fernaldia Pandurata</i> W) .....	36
5.3.1 Material vegetal y disección de explantes.....	36
5.3.2 Cultivo <i>in vitro</i> de loroco .....	37
5.3.3 Diseño estadístico .....	37

5.3.4 Evaluación de la regeneración <i>in vitro</i> de <i>Fernaldia Pandurata</i> W. ....	38
5.3.5 Ensayo de enraizamiento .....	38
5.3.6 Análisis estadístico .....	39
6 RESULTADOS .....	42
6.1 Proyecto Evaluación del cultivo de anteras y el cocultivo de microesporas de chile ( <i>Capsicum annum</i> L.) con ovarios de chile y Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> L.) .....	42
6.1.1 Análisis histológico .....	42
6.1.2 Formación de callo embriogénico .....	46
6.2 Regeneración <i>in vitro</i> de <i>Fernaldia pandurata</i> W.....	48
6.2.1 Análisis estadístico .....	49
6.2.2 Enraizamiento de <i>Fernaldia pandurata</i> W.....	52
7 DISCUSIÓN.....	54
7.1 Proyecto Evaluación del cultivo de anteras y el cocultivo de microesporas de chile ( <i>Capsicum annum</i> L.) con ovarios de chile y Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> L.) .....	54
7.2 Regeneración <i>in vitro</i> de <i>Fernaldia pandurata</i> W.....	58
8 CONCLUSIONES .....	60
9 RECOMENDACIONES .....	62
Bibliografía.....	63
ANEXOS.....	70

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del Chile.....	9
Cuadro 2. Antecedentes de embriogénesis y cultivo de microesporas desarrollados en <i>Capsicum</i> con diferentes tejidos vegetales y reguladores de crecimiento.....	18
Cuadro 3. Clasificación taxonómica de Loroco.....	21
Cuadro 4. Descripción de las estrategias experimentales para la generación de plantas haploides de Chile ( <i>Capsicum annum</i> L) a partir de microesporas de Chile y cocultivo con ovarios de trigo y sorgo .....	28
Cuadro 5. Descripción de los ensayos establecidos en proyecto de androgénesis de Chile ( <i>Capsicum annum</i> L.) .....	32
Cuadro 6. Componentes del medio de cultivo para la etapa de regeneración modificado a partir de Lantos (2009) .....	35
Cuadro 7. Composición de los tratamientos para la evaluación de la regeneración de segmentos nodales de Loroco ( <i>Fernaldia pandurata</i> W).....	38
Cuadro 8. Concentraciones de reguladores de crecimiento I.B.A y A.N.A para el ensayo de enraizamiento de Loroco ( <i>Fernaldia pandurata</i> W.) .....	39
Cuadro 9: Diseño del cuadro de Análisis de Varianza (ANVA) univariado utilizado en el ensayo de regeneración <i>in vitro</i> de Loroco ( <i>Fernaldia pandurata</i> W.) .....	41
Cuadro 10. Comparativa en cuanto a características morfológicas entre las variedades de Chile ( <i>Capsicum annum</i> L.). Los números y letras al inicio de cada descripción corresponden a la Figura 13 y 14 .....	43
Cuadro 11. Evaluación estadística de las variables en estudio para la regeneración <i>in vitro</i> de Loroco ( <i>Fernaldia pandurata</i> W.) .....	52

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microgametogénesis y estructura del polen (Buchanan <i>et al.</i> 2000).....	14
Figura 2. Producción de plantas mediante el cultivo de anteras y el cultivo de microesporas, tanto por embriogénesis directa como con formación intermedia de callo u organogénesis (Reynolds 1997).....	20
Figura 3. Descripción de la fase de campo del proyecto de investigación de Chile .....	24
Figura 4. Descripción de algunos procesos realizados en campo .....	26
Figura 5. Descripción de la estrategia experimental para la generación de plantas por medio del cultivo de anteras de Chile ( <i>Capsicum annum</i> L.) .....	29
Figura 6. Descripción de algunos materiales utilizados en el proceso de desinfección	30
Figura 7. Proceso de aislamiento de microesporas.....	31
Figura 8. Seccionamiento de las anteras para el ensayo número 5.....	33
Figura 9. Seccionamiento de las anteras para el ensayo número 6.....	33
Figura 10. Segmentos nodales de Loroco ( <i>Fernaldia pandurata</i> W.) utilizados como material de siembra (explante). La escala está representada por milímetros.....	36
Figura 11. Extracción de segmentos nodales en condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar .....	36
Figura 12. Disposición de los segmentos nodales dentro de los frascos y distribución de los frascos por cada tratamiento .....	37
Figura 13. Descripción morfológica de los botones florales/anteras y etapas de desarrollo de las microesporas de polen en <i>Capsicum annum</i> L, variedad Largo de Reus .....	44
Figura 14. Descripción morfológica de los botones florales/anteras y etapas de desarrollo de las microesporas de polen en <i>Capsicum annum</i> L, variedad Dulce Italiano	45
Figura 15. Callos desarrollados a partir de la siembra de anteras de <i>Capsicum annum</i> ...	46
Figura 16. Callos subcultivados durante dos meses y tres semanas en medio de cultivo R1 .....	47
Figura 17. Desarrollo morfológico de los explantes de Loroco ( <i>Fernaldia pandurata</i> W.) 42 días después de su establecimiento .....	48

Figura 18. Plántula de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.) procedente del tratamiento nueve de regeneración in vitro suplementado con 0.5mg/l-1 de A.N.A..... 53

## INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1. Respuesta de los explantes de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.) a las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en estudio sobre la variable número de brotes ..... 49

Gráfico 2. Respuesta de los explantes de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.) a las diferentes combinaciones de reguladores crecimiento sobre la variable número de hojas 50

Gráfico 3. Respuesta de los explantes de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.) a las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en estudio, sobre la variable formación de callo ..... 51

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Proyecto Evaluación del cultivo de anteras y el cocultivo de microesporas de chile (*Capsicum annum* L.) con ovarios de chile y Sorgo (*Sorghum bicolor* L.)

#### 4.1.1 Origen

El chile (*Capsicum annum* L.) es originario de América del sur (Bolivia y Perú) (Maroto, 1985). Dicho género, *Capsicum*, compuesto por muchas variedades, en cuanto a formas, colores y sabores; variedades dulces o variedades picantes (Giaconi y Escaff 1996).

#### 4.1.2 Clasificación taxonómica

Según Janick (1965) la relación filogenética de *Capsicum annum* L. es la siguiente:

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del Chile

<b>Reino</b>	<b>Vegetal</b>
<b>División</b>	Tracheophyta
<b>Subdivisión</b>	Pteropsida
<b>Clase</b>	Angiospermae
<b>Subclase</b>	Dicotiledónea
<b>Orden</b>	Solanaceales
<b>Familia</b>	Solanácea
<b>Género</b>	<i>Capsicum</i>
<b>Especie</b>	<i>Annum</i>

#### 4.1.3 Morfología y biología floral

Las flores son generalmente hermafroditas, estas poseen cinco estambres y un pistilo en cada flor. Las flores de la especie *C. annum* se distinguen por ser de corola blanca, con sus pétalos generalmente rectos, sus anteras con antocianina y su cáliz acampanado. El pedicelo de la flor es generalmente curvo antes de que la flor se expanda completamente (antes). Las anteras pueden llegar a abrir de una a cuatro horas después de que la flor abra, aunque en ocasiones fallan totalmente en hacerlo. Es necesario que las anteras abran para que el polen sea liberado. El factor más importante que determina la florecida o diferenciación floral en el pimiento es la temperatura del aire, especialmente la temperatura nocturna (Fornaris 2005).

Las tasas de cruzamiento van del 7 al 91%. El género *Capsicum* podría considerarse una especie de polinización cruzada facultativa. De esta forma en estudios experimentales, así como en los cultivos comerciales, se ha observado que hay un buen porcentaje de polinización cruzada, generando así la gran variabilidad dentro del género (León 1987). El cruzamiento se asocia a insectos polinizadores, principalmente abejas, y no a factores como la lluvia, viento u otros insectos (Fornaris 2005).

#### **4.1.4 Importancia nutricional**

Uno de los fundamentos de la agricultura y producción de alimentos, es la de proporcionar todos los nutrientes minerales esenciales para la salud humana, y en promedio por cada 100g de chile se aportan macroelementos como el Na (28.00mg), K (700.00mg), Ca (53.05mg), Mg (56.83mg), P (104.25mg). En cuanto a microelementos suelen estar en pequeñas proporciones como el Fe (6.19mg), Zn (1.14mg), I (0.34µg) y Se (1.10µg). La cantidad requerida de oligoelementos o elementos trazas es mínima pero indispensable, desde gramos (Na, K y Cl) a microgramos (Fe, Zn, Cr y Mo), y los frutos de chile contienen estos elementos, además de contener beta caroteno (1400.15 µg) y vitamina C (81.73 mg), hasta el punto de contener más vitamina C que las naranjas. Sin embargo, se desconoce con precisión las cantidades, ya que este depende del genotipo y el manejo que se le proporciona, así como su consumo fresco o seco (Chávez *et. al.* 2016).

#### **4.1.5 importancia económica**

En el país, el cultivo de chile representa un área cultivada de 313 manzanas de tierra, con una producción de un poco más de 260 mil quintales al año (MAG 2020). La producción de semilla híbrida para el agricultor al no disponer de los medios necesarios para mantener las características del híbrido a lo largo de las generaciones, conlleva a una compra necesaria de semilla en cada periodo de cultivo. Esto debido que, al usar semilla híbrida, la primera generación (F1) no proporciona una semilla adecuada, debido al principio de la segregación la F2 es altamente heterogénea. Debido a esto, el agricultor suele optar por comprar dicha semilla pues le asegura una homogeneidad en todos los caracteres de interés en cuanto a producción (Cubero 2003).

#### **4.1.6 Regeneración *in vitro* de Chile**

El interés del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales es tan extenso que el desarrollo de protocolos para cada especie es determinante para el éxito de la producción de plantas

sanas que mantengan rasgos de producción y rendimiento sobresalientes independientemente del clima, suelo y entornos sociales y políticos en que se puedan encontrar envueltos los materiales, sin dejar de lado las demandas de los consumidores también se pueden seleccionar aquellos rasgos que den respuesta a estas necesidades (Llorente *et. al.* 2022). El cultivo *in vitro* a su vez permite la adaptación de especies que no han sido domesticadas o es difícil su desarrollo directamente en campo, útil también para la conservación de germoplasma independientemente cual sea la finalidad como plantas en vías de extinción o para la producción de compuestos químicos obtenidos de plantas con crecimiento lento o difíciles de extraer. Además, el cultivo *in vitro* de chile permite el establecimiento de programas de mejoramiento genético más rápidos a comparación de los métodos tradicionales, el desarrollo de organismos genéticamente modificados que sean de interés en rasgos que se demanden en respuesta a cambios climáticos, patrones de consumo o alternativas viables a problemáticas alimentarias futuras. Finalmente, el cultivo *in vitro* permite el uso de biorreactores en la producción de proteínas, carbohidratos o lípidos que secuestren metales pesados de suelos contaminados (Llorente *et. al.* 2002).

Dentro de las vías de regeneración de plantas, la embriogénesis somática es considerada como el método más eficiente de obtención de plantas haploides. Sin embargo, diversos grupos de investigación han catalogado al género *Capsicum* como recalcitrante a la morfogénesis *in vitro*, además de que los protocolos de embriogénesis somática han tenido baja eficiencia, son poco reproducibles y presentan un alto número de embriones deformados (Kristiansen y Andersen 1993; Ercan *et. al.* 2006). Por tal razón se planteó el uso de anteras (en estas se encuentran las células gaméticas); Los primeros informes sobre plantas haploides derivadas del cultivo de anteras de Chile (*Capsicum annum*) fueron publicados simultáneamente por tres laboratorios diferentes (George y Narayanaswamy, 1973; Kuo *et. al.* 1973; Wang *et. al.* 1973). Sibi (1979) introdujo el sistema de cultivo de anteras de dos pasos, que fue optimizado aún más por Dumas de Vaulx *et al.* (1981). Este método ha sido posteriormente modificado y mejorado por diferentes laboratorios (Mittykó *et al.* 1995; Dolcet-Sanjuan *et. al.* 1997; Gémes Juhász *et. al.* 1988, 2006; Kim *et. al.* 2004).

En estos trabajos se documentó la baja reproducibilidad y eficiencia del proceso (Agrawal *et. al.* 1983; Ochoa y Moreno, 1990; Arroyo y Revilla, 1991; Szasz *et al.* 1995; Binzel *et al.* 1996; Husain *et al.* 1999). La mayoría de los reportes son de organogénesis y pocos trabajos de embriogénesis somática se han reportado para esta especie (Harini y Lakshmi-Sita, 1993; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Khan *et al.* 2006).

Específicamente para el cultivo a partir de microesporas, existen numerosos reportes de protocolos que permiten inducir la embriogénesis y la regeneración de plantas en Chile (*Capsicum annum*) (Bárány *et al.*, 2001, 2005; Dumas de Vaulx *et al.*, 1981; Mitykó y Fári, 1997). Algunos de estos experimentos de inducir la embriogénesis han resultado únicamente en la formación de estructuras multicelulares (González-Melendi *et al.* 1996; Mitykó y Fári, 1997; Regner 1996). Bárány *et al.* (2001), reportaron la formación de embriones en cultivo de microesporas de Chile, sin embargo, el sistema resultó de igual manera con baja eficiencia. Li y Devaux (2001) mejoraron con éxito la producción de embrioides de cultivos de microesporas aisladas mediante el cocultivo de ovarios de cebada para aquellos genotipos que presentan una respuesta androgénica baja. También se informó que la adición de ovarios derivados de especies extrañas a cultivos de microesporas aisladas mejora la androgénesis en varios estudios como es el caso del uso de ovarios de trigo y de cebada (Lantos 2009; 2012).

#### **4.1.7 División meiótica en las plantas**

La meiosis es la división celular por la cual se obtiene células hijas con la mitad de los juegos cromosómicos que tiene la célula madre, pero que cuentan con información completa para todos los rasgos estructurales y funcionales del organismo al que pertenecen (García 1990). Las microsporas en desarrollo son células en las que se puede encontrar la división meiótica (Buchanan *et al.* 2000). En ocasiones es difícil seleccionar yemas florales en estado apropiado de desarrollo, donde pueda observarse la meiosis. Las inflorescencias que presentan yemas florales en maduración escalonada son muy convenientes ya que se facilita la eliminación de yemas demasiado jóvenes o demasiado adultas (García 1990). Las células gaméticas son las encargadas de la reproducción sexual de los organismos, y su dotación cromosómica es haploide ( $n$ ) (Reynolds 1997). Las anteras son las estructuras que contienen las células gaméticas masculinas. Estas células se llaman microsporas durante su desarrollo temprano cuando todavía tienen un solo núcleo. El polen inmaduro tras la primera división mitótica que da lugar a los núcleos vegetativo y generativo. El polen tras la segunda división mitótica se divide el núcleo generativo para dar lugar a las dos espermátidas o núcleos espermáticos (Buchanan *et al.* 2000) (Figura 1).

Por lo general, las plantas monocotiledóneas liberan polen en estado trinucleado, ya que la segunda división mitótica ocurre dentro de la antera, mientras que las dicotiledóneas liberan el polen en estado binucleado (Reynolds 1997). González *et al.* (2002), menciona que el

éxito de las hibridaciones depende de la calidad del polen, la cual cambia por efectos de la temperatura del ambiente del cultivo, pues altas temperaturas inhiben el desarrollo del polen reduciendo el porcentaje de germinación; a su vez las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> produce un incremento de ésta. También menciona que pueden influir la esterilidad citoplásmica o esterilidad masculina, que se caracteriza por la inhabilidad de una planta para producir polen viable o así mismo la presencia de insectos cuyos hábitos alimenticios estén orientados al consumo de los botones florales.

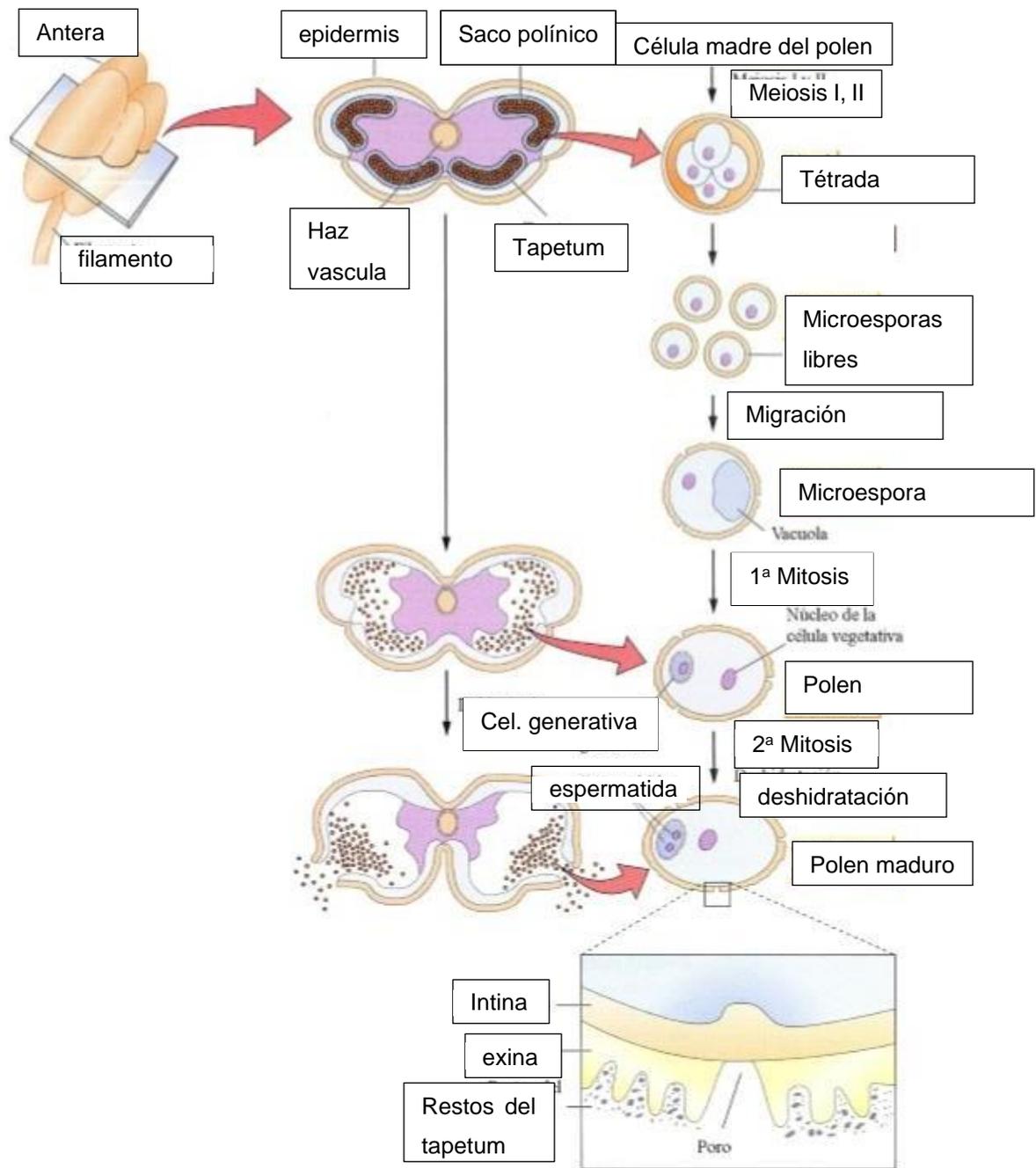


Figura 1. Microgametogénesis y estructura del polen de *Datura* (Buchanan *et al.* 2000)

#### **4.1.8 Condiciones de cultivo**

Una vez inducida la reprogramación de la microspora, esta debe encontrar unas condiciones de cultivo que favorezcan el desarrollo y crecimiento del embrión hacia plántula. Entre los agentes que influyen en el cultivo *in vitro* se encontró el tipo de fuente de carbono (sacarosa, glucosa, maltosa), la presencia de micronutrientes, macronutrientes, vitaminas y reguladores del crecimiento (fitohormonas) en concentraciones adecuadas, además de las condiciones de temperatura y luz (intensidad y fotoperiodo). También influyen la densidad de anteras o microsporas y el posible acondicionamiento con tejidos o extractos (ovarios, anteras o tejidos somáticos) procedentes de la misma o distinta especie. Este acondicionamiento puede ser previo o simultáneo (Seguí-Simarro 2010).

En lo referente al medio de cultivo, existe una gran dependencia de este sobre el éxito en el cultivo *in vitro*, ya que de este derivan los nutrientes disponibles y factores que regulan el estado de crecimiento del organismo (Lantos 2005). Actualmente se les llama reguladores del crecimiento a este grupo de sustancias que afectan el desarrollo de la planta a lo largo de su vida, dentro de estas, las más estudiadas son: Auxinas, Citocininas, Giberelinas, Ácido Abscísico y Etileno; el siguiente grupo que ha sido menos estudiado pero que toma importancia en la actualidad engloba a las Poliaminas, Jasmonatos, Ácido salicílico y los Brasinoesteroides (Davies 1995).

Un avance que se obtuvo en un principio para lograr el cultivo *in vitro* fue cuando se usaron en conjunto: reguladores de crecimiento junto a un medio rico en nutrientes, donde se logró la formación de brotes, raíces y tejido calloso usando combinaciones de Auxinas y Citocininas (Pauk *et al.* 2003). Desde entonces, el medio de cultivo MS se ha usado ampliamente como formulación básica para el cultivo de tejidos vegetales (Murashigue y Skoog 1962), sin embargo, el uso de otros medios de cultivo como es Gamborg B5 (1967) aunado a reguladores de crecimiento ha mostrado mejores resultados en el cultivo *in vitro* para el género *Capsicum* (Lantos 2012).

#### **4.1.9 Importancia del establecimiento de un protocolo de desinfección para cultivo *in vitro***

La desinfección del material vegetal es el primer paso para el establecimiento de *cultivo in vitro* de cualquier especie vegetal, pues el material vegetal a introducir puede contener microorganismos perjudiciales tales como bacterias y hongos que crecen mucho más

rápido que las células vegetales y podrían agotar los nutrientes del medio de cultivo y excretar sustancias tóxicas que impiden el desarrollo normal de los cultivos (Navarro *et al.* 2005). Es por eso que se necesita trabajar en condiciones asépticas para asegurar una siembra de explantes sanos, por ello se realiza dentro de una cámara de flujo laminar, que es una máquina que permite trabajar estérilmente ya que filtra el aire del ambiente dentro del área de la cámara. También se debe esterilizar los medios de cultivo y desinfectar superficialmente el material vegetal con agentes químicos como el etanol, hipoclorito de sodio o el hipoclorito de calcio que son los más utilizados (Navarro *et al.* 2005).

#### **4.1.10 Embriogénesis *in vitro* en el género *Capsicum***

En 1993 se reportó por primera vez la embriogénesis somática en *Capsicum* (Harini y Lakshmi-Sita, 1993). En dichos experimentos se utilizó como explante el embrión cigótico, y un medio de cultivo adicionado con 2,4-D y agua de coco. En el cuadro 2 se presentan otros reportes de embriogénesis en *Capsicum annum* y *Capsicum chinense*, donde se utilizaron diferentes explantes (embrión cigótico, hipocótilo, cotiledón, hojas, anteras y micrósporas) y diversos reguladores de crecimiento (Avilés- Viñas *et al.* 2013; Bárány *et al.* 2005; Binzel *et al.* 1996; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Harini y Lakshmi Sita, 1993; Khan *et al.* 2006; Kim *et al.* 2008; Koleva-Gudeva, *et al.* 2007; López-Puc *et al.* 2006; Santana-Buzzy *et al.* 2009; Steinitz *et al.* 2003; Supena y Custers, 2011; Zapata- Castillo *et al.* 2007).

Existen numerosos reportes que argumentan la recalcitrancia del género *Capsicum* a la morfogénesis *in vitro* (Cuadro 2). En el género *Capsicum*, este fenómeno se manifiesta a través de la baja eficiencia de los sistemas de regeneración, la baja reproducibilidad de los protocolos de regeneración, el alto índice de embriones somáticos deformados y la baja tasa de germinación y/o conversión de los embriones somáticos en plantas (Steinitz *et al.* 2003). La elaboración de protocolos de regeneración del género *Capsicum* ha avanzado lento comparado con otros miembros de la familia de las Solanáceas. Los diferentes estudios realizados han identificado algunos problemas como: la formación de brotes roseta, la ausencia de desarrollo vegetativo normal en embriones somáticos y la dependencia genotípica, lo que determina al género como recalcitrante (Kothari *et al.* 2010).

El cultivo de anteras es una técnica para la producción de haploides, las cuales son un gran potencial para los mejoradores de plantas. La haploidía puede intervenir en el mejoramiento de las plantas autógenas de dos modos diferentes, uno de ellos es la

facilitación de la identificación y selección de mutantes recesivos a nivel de plantas y de células. Por otra parte, la inducción de haploides en los híbridos, seguido de un doblamiento cromosómico permite la obtención de líneas perfectamente homocigóticas que evitan una larga serie de autofecundaciones. La haploidía acelera notablemente los programas de selección después del cruzamiento. Los éxitos en el cultivo de anteras han sido descritos por muchos investigadores (Niizeki y Oono 1968; Guha, *et al.* 1970; Guha 1973; Oono 1975; Chen y Lin 1976; Chaleff 1979; Chaleff *et al.* 1981; Mercy y Zapata 1987).

El cultivo de anteras ha demostrado ser una técnica útil para acelerar la introgresión de características deseables en poblaciones de mejoramiento. Pero el uso de la técnica del cultivo de anteras se ha visto limitada por la baja frecuencia de producción de callos y También se ha registrado que la inducción de callos y la regeneración de plantas normales están influenciadas por el genotipo utilizado, el estado de desarrollo de la microspora, las condiciones de desarrollo de los padres donantes (fotoperíodo e intensidad de la luz), tratamiento físico de las anteras antes de su inoculación, medio definido, entre otros (Gómez 2016).

#### **4.1.11 Embriogénesis a partir del cultivo de microesporas**

El uso de aislados de microesporas es un método de producción de embriones para muchas especies de plantas (Davies y Morton 1998). Algunas de las ventajas que tiene este método, es que evita la formación de callo proveniente del tejido de antera, al tener acceso directo a las microesporas aisladas se optimizan las condiciones del medio de cultivo, el cultivo de microesporas produce un mayor número de embriones que en cultivo de anteras, como se demostró en un estudio realizado con cebada bajo condiciones óptimas de cultivo, donde se logró una mayor cantidad de embriones de hasta 200 veces más que en el cultivo hecho con antera (Davies y Morton 1998). Todo el proceso puede ser fácilmente monitoreado a través del microscopio (Indrianto *et al.* 2001). Además, cabe mencionar que debido a que las microesporas son haploides y unicelulares, la generación de haploides y doble haploides de estos aislados ofrece oportunidades de transformación genética, mapeo de genes y selección del deseado recesivo/ dominante a comparación de la producción de homocigotos (Graner *et al.* 1996; Stöger *et al.* 1995).

Cuadro 2. Antecedentes de embriogénesis y cultivo de microesporas desarrollados en *Capsicum* con diferentes tejidos vegetales y reguladores de crecimiento

<b>Explante</b>	<b>Regulador de crecimiento</b>	<b>Referencias</b>
Embrión cigótico inmaduro	10% CW, 2, 4-D	Harini y Lakshmi Sita (1993)
Embrión cigótico maduro	2, 4-D	Buyukalaca & Mavituna (1996)
Embrión cigótico inmaduro	2, 4-D y TDZ	Binzel <i>et al.</i> (1996)
Embrión cigótico	2, 4-D y Centrofenoxina	Steinitz <i>et al.</i> (2003)
Microespora	2, 4-D	Bárány <i>et al.</i> (2005)
Hipocótilos	TDZ e IBA	Khan <i>et al.</i> (2006)
Anteras	2, 4-D y IAA	Koleva- Gudeva <i>et al.</i> (2006)
Microesporas	Choque térmico	Kim, M., Jang, I. <i>et al.</i> (2008)
Microesporas	AIA y Zea	Supena, E., y Custers, J. (2011)

#### 4.1.12 Marcadores morfológicos de evaluación del desarrollo floral

Durante la microesporogénesis y la microgametogénesis el desarrollo de la microesporas y el grano de polen es paralelo a cambios en la antera y el botón floral, relacionados al tamaño, forma y color del botón floral (Gómez 2016). El estudio de cambios correlativos es importante para la identificación de marcadores visibles que permiten inferir sobre el estado de las microesporas y el polen, en su desarrollo obtenido en la antera. Es en otras palabras, un método no invasivo evitando la división o rompimiento del botón floral (Gómez 2016).

Los marcadores morfológicos tienen varias aplicaciones prácticas, donde el polen o la microespora pueden ser identificados en particulares estados de desarrollo (Lantos 2009). En la esporogénesis o gametogénesis se han empleado para seleccionar el momento de la estación de RNA (Ácido ribonucleico) o guiar el momento de observación a través del microscopio. Por ello estos marcadores morfológicos, se consideran de suma importancia en la identificación de los botones florales con relación a las anteras y microesporas en estado óptimo para ser inducidas a la androgénesis (Shivanna 2003).

En la mayoría de especies con reportes de inducción a la androgénesis, se ha aceptado que la inducción de la androgénesis solo puede hacerse durante un lapso corto que fluctúa alrededor de la mitosis del grano de polen. Esto se refiere a que las anteras (y por tanto los botones florales) contienen las microesporas vacuoladas y recién divididas. Este estado debe ser precisamente identificado ya que la eficiencia en la inducción de la androgénesis puede ser dramáticamente reducida (Seguí-Simarro 2010).

#### **4.1.13 Estado adecuado de las microesporas para el cultivo *in vitro***

Para que la inducción de la androgénesis sea exitosa se deben recolectar yemas florales que contengan microsporas en el estadio adecuado (Lantos 2009). La etapa de desarrollo más sensible a la inducción se sitúa en torno a la primera mitosis del polen, entre microsporas vacuolada y polen bicelular joven, es decir, entre el final de la microesporogénesis y el inicio de la microgametogénesis. Esta capacidad de reprogramarse hacia la embriogénesis se debe al estado todavía no diferenciado y, por tanto, reversible de estos estadios del desarrollo del polen (Seguí-Simarro 2010).

#### **4.1.14 Producción de plantas doble haploides mediante androgénesis**

La embriogénesis de la microspora, o androgénesis, se fundamenta en la posibilidad de cambiar *in vitro* el patrón normal de desarrollo gametofítico de la microspora, y en su lugar inducir un desarrollo esporofítico, que dé lugar a la formación de un embrión o estructura organizada capaz de regenerar una planta completa como se muestra en la Figura 2 (Reynolds 1997).

Debido al gran potencial de esta técnica para producir plantas doble haploides, se llevaron a cabo varias investigaciones que no dieron resultados exitosos (Tulecke 1953; Yamada *et al.* 1963), antes de que Guha y Maheshwari (1996) tuvieran éxito y consiguieran los primeros embriones haploides formados a partir del cultivo *in vitro* de anteras de *Datura*.

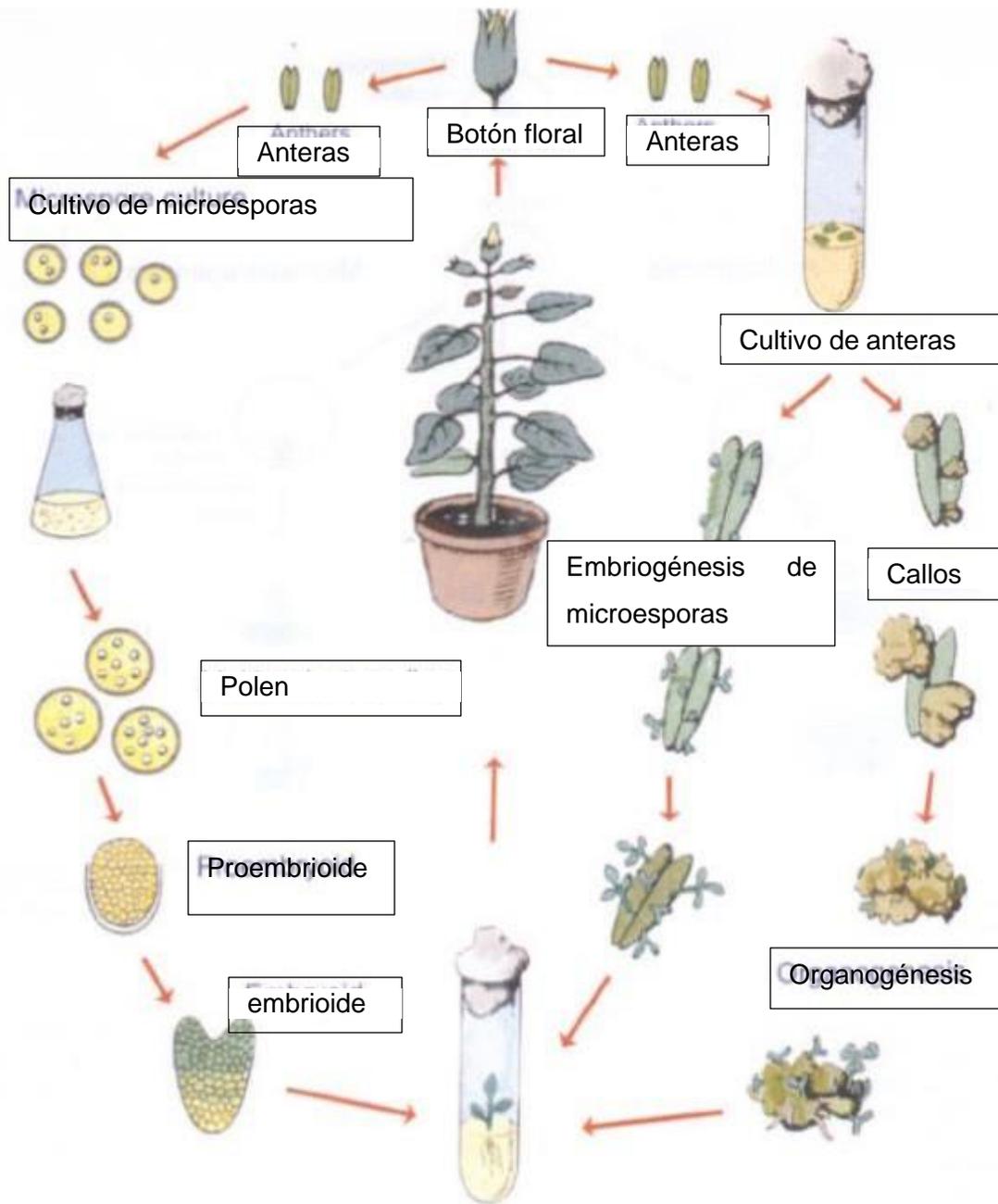


Figura 2. Producción de plantas mediante el cultivo de anteras y el cultivo de microesporas, tanto por embriogénesis directa como con formación intermedia de callo u organogénesis (Reynolds 1997).

## 4.2 Proyecto Regeneración in vitro de Loroco (*Fernaldia pandurata* W)

### 4.2.1 Origen y distribución

El loroco (*Fernaldia pandurata* W) es una planta nativa, de gran arraigo en la cultura de El Salvador, Guatemala y parte de México. Anteriormente ésta era conocida como "Quilite", nombre con el cual se le conoce en algunos lugares del país, dicha palabra significa "Cohollo" que traducido del náhuatl es "Hierba comestible". Es una planta silvestre asociada a la selva baja caducifolia y mediana sub-caducifolia, distribuyéndose desde el nivel del mar hasta los 800 msnm. Especialmente en la zona central y occidental del país, también se han encontrado cultivares de loroco a 1200msnm en Perkin, departamento de Morazán, ampliándose la facilidad de cultivarlo en otras zonas (Jaco *et. al.* 2002) Padilla (1941), reportó su distribución en los departamentos de San Salvador y Ahuachapán.

### 4.2.2 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del Loroco según Woodson, quien describió el género *Fernaldia* es la siguiente:

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de Loroco.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Clase</b>	Magnoliatae
<b>Subclase</b>	Asteridae
<b>Orden</b>	Gentianales
<b>Familia</b>	Apocynaceae
<b>Tribu</b>	Echitoideae
<b>Género</b>	<i>Fernaldia</i>
<b>Especie</b>	<i>Pandurata</i>

### 4.2.3 Importancia nutricional

Análisis realizados por el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) reportaron que 100gr de flor de loroco cruda representa una fuente significativa de vitaminas

y minerales como la tiamina (0.64mg), vitamina C (12mg), hierro (1.10mg), niacina (2.3mg), calcio (58mg), fósforo (46mg) y riboflavina (0.11mg) (INCAP 2011).

#### **4.2.4 Importancia económica**

El loroco es un cultivo no tradicional que representa una alternativa viable para la generación de ingresos. Hasta hace algunos años solamente se encontraba de manera silvestre o cultivado en huertos caseros por pequeños agricultores, sin una técnica adecuada de manejo agronómico y fitosanitario. Como una política del Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), se impulsó el desarrollo de cultivos no tradicionales lo cual hizo del loroco una fuente de divisas. Con un potencial tanto en fresco como industrializado con posibilidades en el mercado nacional e internacional, lo cual ha llevado al loroco a ser cultivado por muchos agricultores, empresas privadas y Organizaciones Nacionales no Gubernamentales (Jaco *et. al.* 2002).

#### **4.2.5 Cultivo tradicional de Loroco**

La técnica de propagación del Loroco determina los tiempos de floración, ya sea tardía o precoz. La reproducción sexual presenta desventajas como la viabilidad de las semillas para germinar, además de la variabilidad genética producto del uso de semilla (Osorio *et al.* 2002).

La propagación asexual debe realizarse con material vegetativo fisiológicamente maduro, lo cual limita la reproducción. Además de que las plantas desarrolladas mediante el uso de este material aún no logran satisfacer la demanda de los mercados locales en cuanto a material semilla (Quintanilla 2003).

#### **4.2.6 Cultivo *in vitro* de Loroco**

Por ello el uso de la técnica de cultivo *in vitro* se ha tratado de implementar con el objetivo de producir suficiente material para garantizar y asegurar una producción durante todo el año. El cultivo de tejidos es útil para propagar masivamente plantas con calidad genética y fitosanitaria, además de conservar y distribuir el germoplasma vegetal, mediante el uso de diferentes partes de la planta (Quintanilla 2003).

López (1990) menciona que, a diferencia de otros métodos de propagación, éste demanda condiciones asépticas y medios de cultivo con los componentes idóneos para promover el crecimiento y expresión morfogénica de los tejidos aislados y fragmentos u órganos de la

planta utilizados. Esta técnica consiste en la clonación de tejidos vegetales en medio artificial con el fin de multiplicar determinadas variedades con características sobresalientes y de manera masiva, se garantiza a su vez la generación de plantas libres de patógenos (FAO 2016). Para ello se utilizan explantes (parte de un tejido o de un órgano que se aísla para ser cultivado). Los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos (brotes en estado vegetativo de crecimiento) terminales muestran una mejor respuesta *in vitro*, que los meristemas laterales (Vasil y Torpe 1994).

En los medios utilizados para el cultivo *in vitro* se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos (esto está determinado por las cantidades relativas de auxinas y citoquininas suministradas). Además, se usan para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las auxinas se relacionan con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento y otros que hacen importante la implementación de estos reguladores de crecimiento dentro de esta técnica, lo cual se hace necesario el desarrollo y optimización de las concentraciones adecuadas de diferentes reguladores de crecimiento que permitan una formación adecuada de plántulas (Hurtado y Merino 1987). Cabe aclarar que específicamente para la inducción de raíces es comúnmente utilizado el ácido indolbutírico (I.B.A) y el ácido naftalenacético (A.N.A) (Narender y Kutty 1994).

## 5. DESARROLLO DE LA PASANTÍA

### 5.1 Proyecto Evaluación del cultivo de anteras y el cocultivo de microesporas aisladas de Chile (*Capsicum annum* L.) con ovarios de Chile y Sorgo (*Sorghum bicolor* L.)

#### 5.1.1 Ubicación de la pasantía

La pasantía se desarrolló en el área de vivero de la Facultad de Ciencias Agronómicas y en el área de Cultivo de Tejidos Vegetales del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador, ubicado en la ciudad de San Salvador, con las coordenadas geográficas: latitud 13°43'6" N, longitud: 89°12'11" O. Las actividades se realizaron en un periodo de diez meses.

#### 5.1.2 Material vegetal

Se utilizaron semillas de Chile (*Capsicum annum* L.) de las variedades Dulce Italiano (DI) y Largo de Reus (LR). La variedad Dulce Italiano (DI) se caracteriza por producir frutos de forma puntiaguda de 5cm de diámetro y 18 cm de longitud, con pulpa delgada, sabor dulce, piel fina y de colores verde brillante hasta rojizo a la madurez. La variedad Largo de Reus (LR) se caracteriza por producir plantas vigorosas de 50-60cm de altura y abundante follaje. Produce numerosos frutos de 18-20cm de longitud con pulpa compacta y dulce. De igual forma, se utilizó un material de sorgo (*Sorghum bicolor*) del cual no fue posible determinar su genotipo debido a la adquisición de las semillas en un mercado local.

#### 5.1.3 Metodología de campo

La fase de campo se llevó a cabo bajo la estrategia descrita en la Figura 3.



Figura 3. Descripción de la fase de campo del proyecto de investigación de Chile.

#### **5.1.3.1 Selección del área de siembra**

Se determinó un área de 15m<sup>2</sup> para el establecimiento de los cultivos dentro del vivero de la Facultad de Ciencias Agronómicas de acuerdo a los requerimientos para *Capsicum annum* L. y *Sorghum bicolor* (Figura 4a).

#### **5.1.3.2 Siembra**

Las semillas de Chile se sembraron en bandejas de plantines (162 alveolos) con sustrato compuesto de materia orgánica de marca comercial. Se colocó una semilla por postura y se sembraron 81 posturas por variedad (LR y DI) (Figura 4b).

El sorgo se sembró directamente en bolsas plásticas de 15x18 cm a una profundidad de 4-5cm de profundidad (Figura 4c). Previo a la siembra se realizó una prueba para determinar la viabilidad de la semilla, esta consistió en colocar las semillas en un recipiente con agua, donde aquellas semillas que se mantuvieron flotando sobre la superficie del agua se descartaron; se sembró un total de cuatro semillas por bolsas y posterior a ello se realizó un raleo y se dejaron dos plantas por bolsas. Con el fin de sincronizar la floración de ambas especies, la siembra se realizó con un intervalo de 19 días de diferencia.

#### **5.1.3.3 Trasplante**

Para la variedad LR se realizó a los 32 días después de la siembra y para DI a los 44 días (Figura 4d). Para ambas variedades se sembraron dos plantines por bolsa plásticas con dimensiones de 15x18 llenas con sustrato de vivero (Figura 4e).

#### **5.1.3.4 Manejo agronómico**

##### **5.1.3.4.1 Fertilización**

Se fertilizó al trasplante con 1.1g de fertilizante 15-15-15. Posteriormente se fertilizó cada 20 días, con dosis de 2.5g por planta, de acuerdo con los requerimientos de la fase fenológica del cultivo de Chile (*Capsicum annum* L). Para la finalidad de la investigación se enfocó principalmente a las 2 primeras fases (Bolaños 1998). Además, se aplicó foliarmente Ultrafert® cada 8 días en dosis de 250ml por cada 100L de agua (Figura 4f). Con el fin de evitar la presencia de hongos debido al aumento de la humedad relativa, se aplicó una mezcla a razón de 2.5ml por L, de 3 productos: fungicida (Amistar ®), insecticida (Connect®) y un multimineral (Poliquel®).

Para el cultivo de Sorgo, se realizó la primera fertilización al momento de la germinación con 1.3g de fertilizante 15-15-15 por bolsa. Posterior a ello, hasta la aparición de la hoja

bandera se mantuvo una fertilización con fuente de nitrógeno o en su defecto con formula a razón de 2.5g por planta cada 15 días.

#### 5.1.3.4.2 Riego

El riego para cada cultivar se realizó de manera periódica, durante la mañana, el cual se pausó durante la incidencia de tormentas tropicales.



Figura 4. Manejo agronómico del cultivo de chile (*Capsicum annum* L.) y sorgo (*Sorghum bicolor*).

a: Área de siembra. b: Semillero de *Capsicum*. c: Plantas de sorgo en siembra directa. d: Plantín de chile de 32 días listo para el trasplante. e: Disposición de plantines de chile en las bolsas de 15x18cm. f: Dosis de foliar aplicado a las plantas de chile. g: Barrenador encontrado en sorgo. h: plaga del género *Tettigoniidae*. i: colecta de botones florales de chile en cajas Petri de vidrio. j: Colecta de inflorescencias de sorgo en cajas Petri de vidrio.

#### **5.1.3.4.3 Control de plagas**

Debido a las condiciones de cultivo, se presentaron en el cultivo de sorgo plagas como la *Diatraea saccharalis* conocida comúnmente como barrenador (Figura 4g). Su incidencia se presentó en un porcentaje inferior a 4% del total de plantas que fueron 40, su control se realizó de forma manual.

Para el cultivo de chile la plaga que se presentó fue el insecto de la familia *Tettigoniidae*, el cual provocó una pérdida significativa de botones florales (Figura 4h). Su incidencia se debió a la presencia de 3 miembros de esta familia, su control se realizó de manera manual.

#### **5.1.3.4.4 Colecta**

Los botones florales de las variedades de chile (*Capsicum annum* L.), se recolectaron en diferentes etapas para la determinación del desarrollo de las microesporas. Para el cultivo de sorgo, la colecta se realizó 2 días antes de la liberación del polen (Figura 14-B) el cual estuvo marcado con la aparición de la hoja bandera (seguido del estado de bota; culminación de la fase vegetativa) (Vanderlip 1972) (Figura 4i-j).

### **5.2 Metodología de laboratorio**

Se realizó una adaptación de la metodología descrita por Lantos (2009) y Lantos (2012), la cual se describe en el Cuadro 4 (a).

La investigación experimental en su fase de laboratorio se llevó a cabo bajo la siguiente estrategia descrita en el Cuadro 4 (b).

#### **5.2.1 Análisis histológicos**

Con el fin de determinar el estado de desarrollo de las anteras y las microesporas, se colectaron los botones florales a partir de los 60 días después de la siembra. Se disectaron con ayuda de pinzas y bísturis 3 botones florales por cada tamaño de desarrollo floral y para determinar cuatro fases de las microesporas: tétradas, fase uninucleada tardía, fase binucleada temprana y granos de polen maduros. Los botones florales se observaron en un microscopio estereoscopio para la determinación de los marcadores morfológicos: tamaño de antera, tamaño de botón floral y color de las anteras. Las anteras aisladas se montaron en laminillas porta objetos y se les agregó una gota de colorante carmín acético previo a la maceración con el cubre objeto. Estas preparaciones microscópicas se observaron en un microscopio óptico compuesto a un objetivo de inmersión de 100x.

Cuadro 4. Descripción de las estrategias experimentales para la generación de plantas haploides de Chile (*Capsicum annum* L) a partir de microesporas de Chile y cocultivo con ovarios de trigo y sorgo

Estrategia descrita por Lantos (2009) <sup>a</sup>	Estrategia desarrollada en la investigación <sup>b</sup>
Determinación del desarrollo celular del grano de polen en <i>Capsicum</i>	Determinación del desarrollo celular del grano de polen en <i>Capsicum</i>
Desinfección de los botones florales con solución NaClO al 1.25%+ 1 gota de Tween 20.	Desinfección de los botones florales y ovarios con solución NaClO al 0.55%.
Pretratamiento de anteras con Manitol y mantenidas en oscuridad por 7 días a 32°C.	-----
Aislamiento de las microesporas mediante un gradiente de Manito (30%)I-Maltosa (21%) y llevado a centrifugación.	Aislamiento de microesporas mediante medio de cultivo Gamborg B5(1968) y llevado a centrifuga en un agitador (SA 2) durante 15min.
Determinación de la cantidad de microesporas mediante conteo con el uso de cámara de Burker.	-----
Siembra de microesporas en cocultivo con ovarios de Trigo.	Siembra de microesporas en cocultivo con ovarios de Sorgo.
Incubación de microesporas bajo condiciones de oscuridad, 28°C y 80% de humedad relativa durante dos meses.	Incubación de microesporas bajo condiciones de oscuridad, 26°C y 90%-100% de humedad relativa durante dos meses.
Embrioides de Chile desarrollados fueron transferidos a cajas Petri con medio regenerativo R1. En condiciones de 24°C y 16h de fotoperiodo a una intensidad de 100µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> de intensidad.	-----
Embrioides con 1 a 2 raíces se transfirieron a tubos de ensayo con medio MS(1962) libre de reguladores de crecimiento.	-----
Determinación de la ploidía mediante citometría de flujo (PARTEC 1).	-----

a. Diseño experimental descrito por Lantos (2009) y b. Estrategia desarrollada con los recursos y reactivos disponibles en el laboratorio para la presente investigación

En ausencia de reactivos y equipo de laboratorio se desarrolló un protocolo para la regeneración de plantas haploides mediante el cultivo *in vitro* de anteras de chile (*Capsicum annum* L.), el cual se describe en la Figura 5.

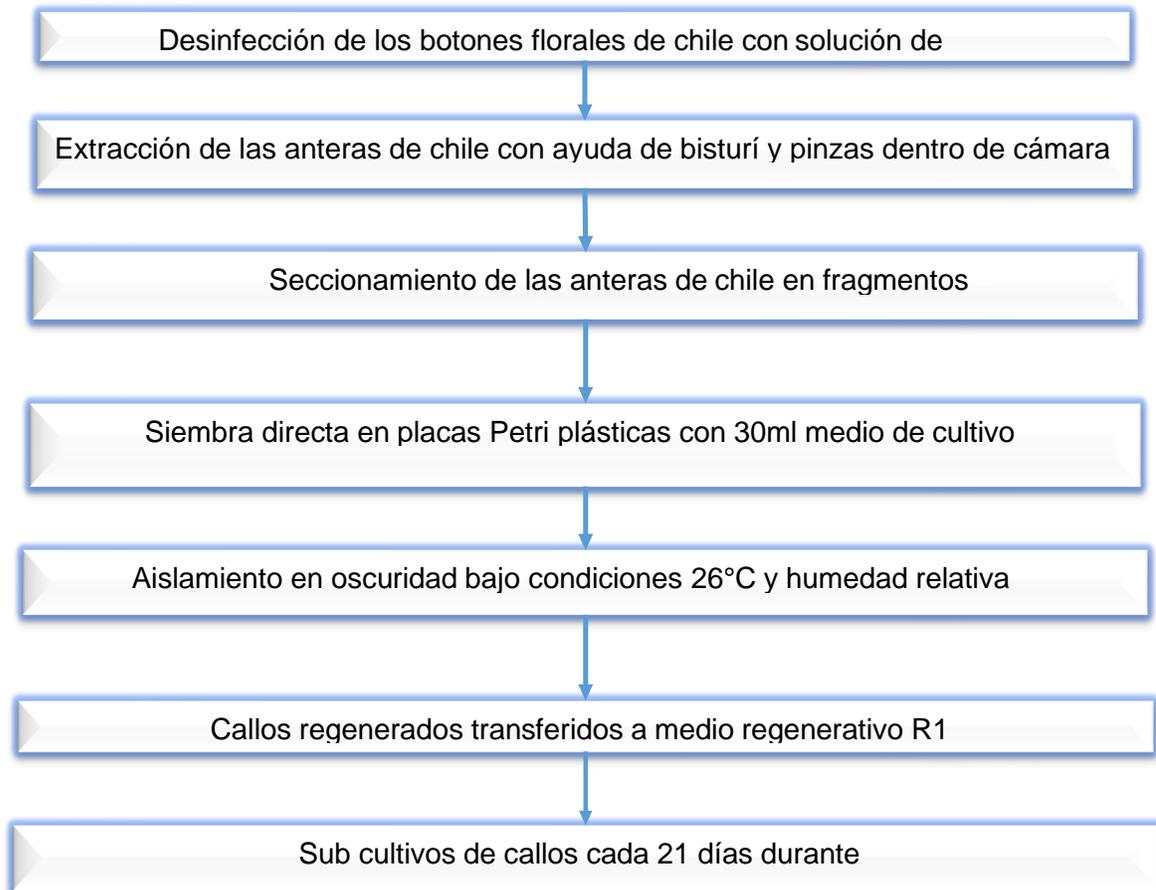


Figura 5. Descripción de la estrategia experimental para la generación de plantas por medio del cultivo de anteras de Chile (*Capsicum annum* L.)

### 5.2.2 Desinfección de los botones florales

Los botones florales de *Capsicum* (donantes de anteras y microesporas) y la inflorescencia de *Sorghum* (donante de ovarios) se colocaron en tubos Falcon® estériles con hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.55% y se agitaron manualmente durante 25 minutos. Posteriormente, se desechó la solución de NaClO y se lavaron con agua destilada estéril tres veces. Este procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar (Figura 6).

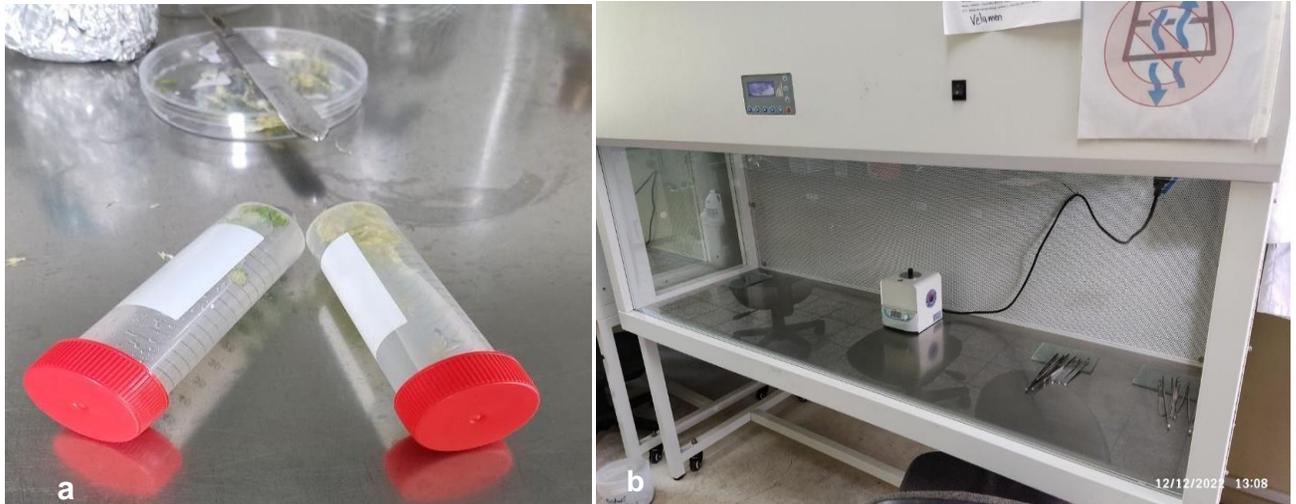


Figura 6. Descripción de algunos materiales utilizados en el proceso de desinfección.

La figura 6a muestra el seccionamiento de las inflorescencias de Sorgo (*Sorghum bicolor*) y los botones florales de chile (*Capsicum annum* L.) los cuales se depositaron en tubos Falcon de 50ml para su desinfección. La figura 6b muestra la cámara de flujo laminar utilizada para la realización de todo el proceso de regeneración *in vitro*.

### 5.2.3 Extracción de microesporas y ovarios

En cámara de flujo laminar, las anteras se disectaron en pequeños fragmentos no mayores a 1mm, los cuales se depositaron en un tubo Falcon de 50ml con 25ml de medio de cultivo Gamborg B5 (Figura 7a). Los tubos se agitaron durante 15 minutos en un auto vortex modelo Stuart SA 2 (Figura 7b).

Los ovarios de sorgo fueron disectados bajo un microscopio estereoscópico debido al tamaño de las flores, apoyándose de bisturí para cortar cada parte de la flor y llegar hasta el ovario sin dañarlo.

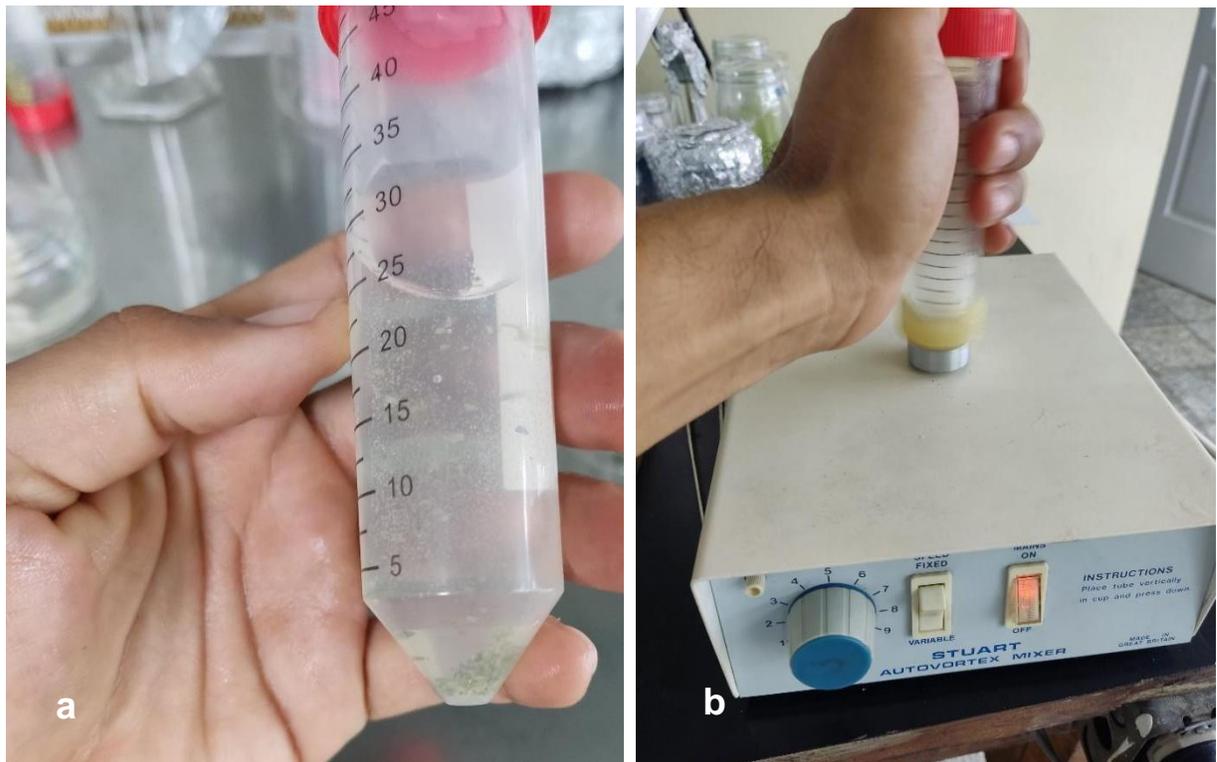


Figura 7. Proceso de aislamiento de microesporas mediante el uso de un vortex.

La Figura 7a muestra un tubo Falcon® con medio de cultivo Gamborg B5 (1968) en donde se observan grumos suspendidos en el medio y al fondo un sedimento compuesto de tejidos de anteras esto posterior al tiempo de 15 minutos de agitación. La Figura 7b muestra el agitador vortex modelo Stuart SA2, equipo utilizado para el aislamiento de microesporas de chile (*Capsicum annum* L.).

#### 5.2.4 Cocultivo de microesporas y ovarios para la regeneración de callos

Los ensayos establecidos se describen en el Cuadro 5. Los medios de cultivo estuvieron compuestos por sales minerales Murashige y Skoog (1962) (MS), Gamborg B5 (1968) y medio regenerativo modificado de Lantos (2009) (R1) adicionando Agar como gelificante. Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 20min a 0.125 MPa y 121°C. Las anteras utilizadas en los ensayos cuatro y cinco se disectaron de acuerdo a las Figuras 8 y 9.

Cuadro 5. Descripción de los ensayos establecidos en proyecto de androgénesis de chile (*Capsicum annum* L.)<sup>1</sup>.

Número de ensayo	Medio de cultivo			Reguladores de crecimiento (mg l <sup>-1</sup> )		Material utilizado		Número de cajas Petri	Tamaño de caja
	MS	B5	Agar	Kinetina	2,4-D	Cocultivo: microesporas(Chile)+ ovarios(Sorgo)	Anteras		
1	X			0.2	0.1	X		10	60mm*15mm
2		X		0.2	0.1	X		10	
3		X		0.2	0.1	X		10	90mm*15mm
4		X	X	0.2	0.1	X	X	2-3	
5		X	X	0.2	0.1		X	5	
6		X	X	0.2	0.2		X	5	

<sup>1</sup>. Luego de establecer los ensayos, estos se sellaron con plástico adhesivo y se mantuvieron en oscuridad durante un periodo de 2 meses, en condiciones de 26°C y humedad relativa entre el 90%-100%.

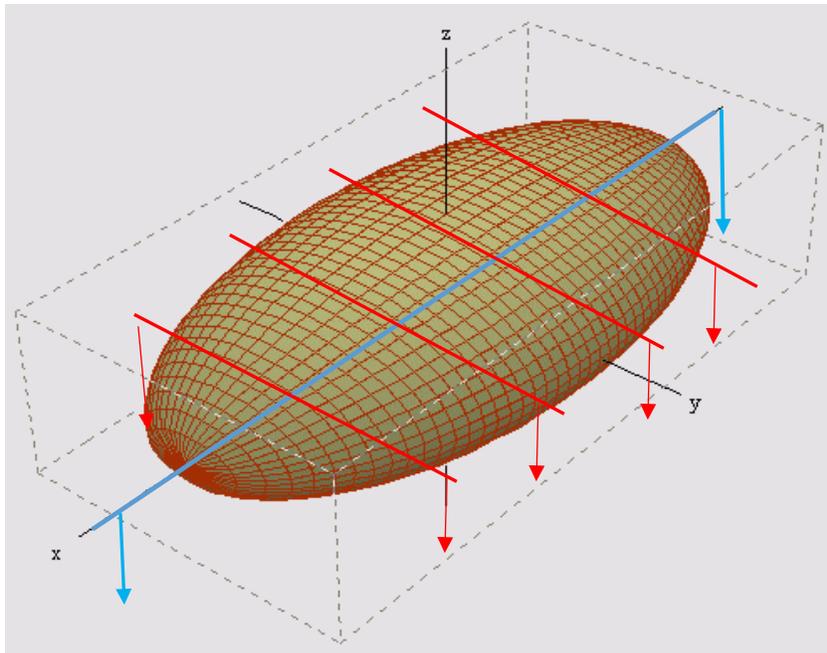


Figura 8. Seccionamiento de las anteras para el ensayo número 5. Primeramente, se hizo el corte marcado con la línea azul, posteriormente se realizaron cuatro cortes transversales (color rojo).

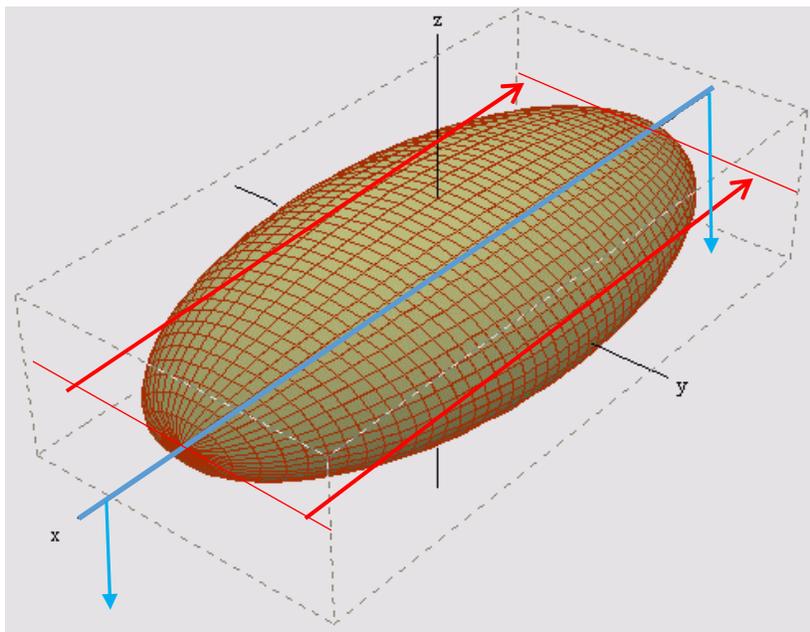


Figura 9. Seccionamiento de las anteras para el ensayo número 6. Se realizó el corte marcado con la línea color azul y posteriormente se realizaron dos cortes más (color rojo).

Las figuras 8 y 9 describen los cortes realizados a las anteras para la técnica de regeneración *in vitro* mediante la siembra de anteras de chile (*Capsicum annum* L.)

### **5.2.5 Sub cultivo en medio regenerativo (R1)**

Transcurrido el período de incubación de 2 meses, las estructuras desarrolladas (callos) fueron transferidas al medio regenerativo descrito por Lantos (2009) modificado de acuerdo al Cuadro 6. Se realizaron subcultivos en medio R1 cada 21 días durante un periodo de tres meses.

### **5.2.6 Condiciones de cultivo *in vitro***

Las condiciones de cultivo en las que se mantuvieron los callos embriogénicos posterior al periodo de incubación fueron: fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas de oscuridad, temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 1500-2000 lux y una humedad relativa de 90-100%.

### **5.2.7 Evaluación de la regeneración**

Se evaluó a los seis meses después de iniciada la investigación y se observó la presencia de cualquier estructura regenerada. Se llevó un registro fotográfico.

### **5.2.8 Análisis estadístico**

Debido a la naturaleza experimental, limitantes de recursos dentro del laboratorio y condiciones de cultivo en campo, no se logró alcanzar la cantidad de datos necesarias para la aplicación de pruebas estadísticas.

Cuadro 6. Componentes del medio de cultivo para la etapa de regeneración modificado a partir de Lantos (2009).

<b>Medio R1 (Lantos 2009)</b>		<b>mg l<sup>-1</sup></b>	<b>Medio R1 modificado</b>	<b>mg l<sup>-1</sup></b>
Nitrato de potasio-	(KNO <sub>3</sub> )	2,150.00	Nitrato de potasio	2,500.00
Sulfato de amonio-	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	34.00	Sulfato de amonio	134.00
Nitrato de calcio-	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	50.00		
Fosfato monopotásico-	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	142.00	Fosfato monopotásico	0.15
Sulfato de magnesio-	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	412.00	Sulfato de magnesio	250.00
Nitrato de amonio-	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,238.00	Nitrato de amonio	1,238.00
Cloruro de calcio-	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	313.00	Cloruro de calcio	150.00
Difosfato de sodio-	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	38.00		
Cloruro de potasio-	KCl	7.00		
Sulfato de hierro-	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27.85	Hierro	27.8
EDTA		37.25	EDTA	37.25
Microelementos MS			Microelementos MS	
Sulfato de manganeso-	Mn <sub>4</sub> SO. H <sub>2</sub> O	16.90	Sulfato de manganeso	16.90
Sulfato de zinc-	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8.60	Sulfato de zinc	8.60
Ácido bórico-	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	Ácido bórico	6.20
Ioduro de potasio-	KI	0.83	Ioduro de potasio	0.83
Sal sódica-	NaMo <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.25	Sal sódica	0.25
Sulfato de cobre-	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.025	Sulfato de cobre	0.025
Cloruro de cobalto-	CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.025	Cloruro de cobalto	0.025
Glicina		0.10	Glicina	0.10
Tiamina		0.55	Tiamina	10.00
Piridoxina		5.00	Piridoxina	1.00
Ácido nicotínico		0.75	Ácido nicotínico	1.00
Mesoinositol		50.00	Mioinositol	100.00
Pantotenato		0.50		
Biotin		0.005	Biotina	0.0005
Kinetina		0.50	Kinetina	0.50
Sucrosa		30.00	Azúcar	30.00
pH		6.1	pH	6.1
Agar		6,800.00	Agar	8,000.00

### 5.3 Proyecto Regeneración *in vitro* de Loroco (*Fernaldia Pandurata W*)

#### 5.3.1 Material vegetal y disección de explantes

Se utilizaron plántulas de loroco cultivadas en condiciones *in vitro*, las cuales habían sido previamente regeneradas a partir de meristemos axilares de un material vegetal de la Estación Experimental y de Practicas de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, ubicada en San Luis Talpa, La Paz, El Salvador, con una elevación de 50 metros sobre el nivel del mar, con coordenadas geográficas 13°28'3" Latitud Norte, -89°05'8" Longitud Oeste y coordenadas planas de 261.5 km Latitud Norte, 489.6 km Longitud Oeste. Los explantes consistieron en los segmentos nodales de las plántulas de 6 meses de edad que se muestran en la Figura 10. Estos segmentos se diseccionaron con ayuda de un bisturí dentro de una cámara de flujo laminar (Figura 11).

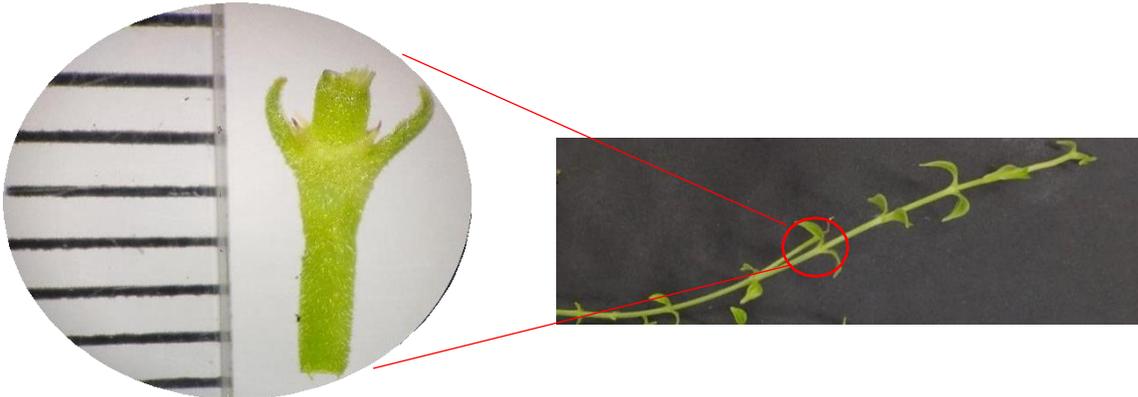


Figura 10. Segmentos nodales de Loroco (*Fernaldia pandurata W.*) utilizados como material de siembra (explante). La escala está representada por milímetros.



Figura 11. Extracción de segmentos nodales de loroco en condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar.

### 5.3.2 Cultivo *in vitro* de loroco

Los explantes se cultivaron frascos tipo Gerber con 30ml de medio de cultivo compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) y suplementados con diferentes concentraciones de ANA, Kinetina y BAP (Cuadro 6). A los medios se les agregó agar (8g l<sup>-1</sup>) como gelificante y se ajustó el pH a 5.7 con KOH o HCl previo a la esterilización en autoclave durante 20 minutos a 0.125 MPa y 121°C.

Los explantes fueron cultivados durante dos meses bajo condiciones de 25±1°C y un fotoperiodo 16 horas luz/8 horas oscuridad (2000 Lux). Durante este período se realizaron un total de 2 subcultivos en el mismo medio de 21 días cada uno.

### 5.3.3 Diseño estadístico

El ensayo se llevó a cabo mediante un Diseño Completamente al Azar. Se utilizaron un total de 81 frascos que fueron divididos en 9 tratamientos con 3 repeticiones (de 3 frascos cada tratamiento) (Cuadro 7). Se sembraron 4 segmentos nodales de loroco por frasco y se utilizaron un total de 324 (Figura 12).

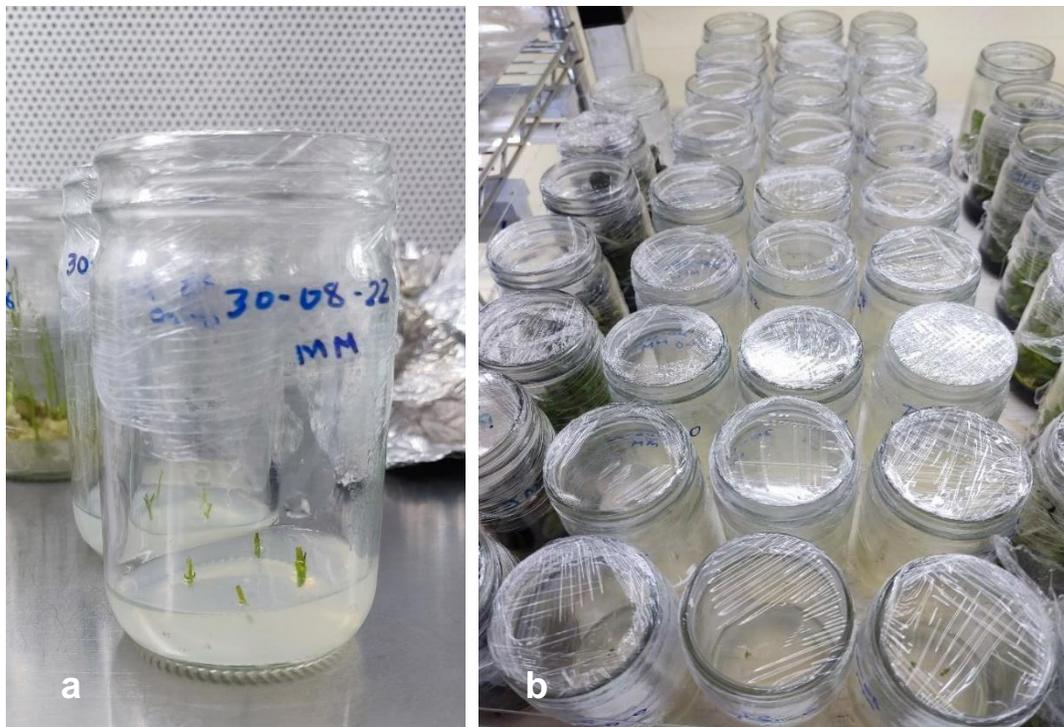


Figura 12. Disposición de los segmentos nodales de loroco dentro de los frascos y distribución de los frascos por cada tratamiento.

La figura 13a muestra la distribución de los explantes de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.) dentro de los frascos tipo Gerber. La Figura 13b muestra la distribución de los tratamientos en los estantes del cuarto de regeneración bajo las condiciones descritas anteriormente.

Cuadro 7. Composición de los tratamientos para la evaluación de la regeneración de segmentos nodales de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.).

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg l <sup>-1</sup> )		
	B.A.P	Kinetina	A.N.A
1	0.0	0.0	0.0
2	1.0	0.0	0.0
3	1.0	1.0	0.0
4	1.0	0.0	0.5
5	3.0	0.0	0.0
6	3.0	1.0	0.0
7	3.0	0.0	0.5
8	0.0	1.0	0.0
9	0.0	5.0	0.0

### 5.3.3 Evaluación de la regeneración *in vitro* de *Fernaldia Pandurata* W.

Para la evaluación a los 42 días de iniciado el ensayo de regeneración *in vitro* de Loroco, se midieron las siguientes variables: número de brotes, número de hojas, presencia de raíces y formación de callos.

### 5.3.4 Ensayo de enraizamiento

Se realizó un ensayo de enraizamiento que consistió en aquellas plántulas cuyas características sobresalieron en cuanto al desarrollo vegetativo de los tratamientos T1, T2, T3 y T9. Se utilizaron medios semisólidos de sales minerales MS con cuatro diferentes

concentraciones de los reguladores de crecimiento: ácido indol butírico (I.B.A) y ácido naftalenacético (A.N.A) descritos en el Cuadro 8. Este ensayo tenía prevista una duración de dos meses, en el cual se realizarían tres subcultivos cada 21 días. Sin embargo, solo se logró realizar 2 subcultivos y se detuvo la continuidad de la investigación. Las condiciones de cultivo son las mismas descritas previamente.

Cuadro 8. Concentraciones de reguladores de crecimiento I.B.A y A.N.A para el ensayo de enraizamiento de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.).

Tratamiento	Reguladores de crecimiento	
	(mg l <sup>-1</sup> )	
	I.B.A.	A.N.A.
1	0.0	0.0
2	0.25	0.0
3	0.0	0.5
4	0.25	0.25

### 5.3.5 Análisis estadístico

Para la organización, procesamiento y análisis de los datos obtenidos en la investigación sobre la regeneración *in vitro* de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.) se utilizó métodos descriptivos univariados que aseguren la distribución de frecuencias, representaciones gráficas, medidas de tendencia central, medidas de dispersión e intervalos de confianza. A cada una de las variables se les aplicó un análisis de Shapiro-Wilk para muestras inferiores a 50; análisis de Varianza (ANVA), específicamente un diseño univariado representando las cuatro variables en estudio, bajo el Diseño Completamente al Azar (DCA) esto debido a las condiciones controladas existentes en el cultivo *in vitro* dentro del

laboratorio: luz, temperatura y humedad relativa. Aunado a ello, las características del material experimental (segmentos nodales de *Fernaldia*) el cual fue homogéneo. Se estableció un total de nueve tratamientos con tres repeticiones de doce unidades experimentales cada una.

Con el propósito de demostrar cuál de los medios de cultivo suplementados con: BAP, Kinetina y ANA, con el uso de segmentos nodales de un cultivar de Loroco procedente del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, y su efecto sobre la regeneración *in vitro*, debido al resultado del ANOVA, donde se rechazó la hipótesis nula y por lo cual se aplicó la prueba estadística de comparación de medias de Tukey. Todo el análisis se realizó con un nivel de significancia estadística (alfa)  $\alpha$  del 1% = 0.01. Mediante la utilización del programa de análisis estadístico de IBM InfoStat® v25. Las variables dependientes sometidas a evaluación sobre los diferentes tratamientos fueron: número de brotes, número de raíces, formación de callo y número de hojas. Según Argüellas y Carvajal (2013). el modelo matemático lineal aditivo que define a un Diseño Completamente al azar, univariado es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$ = características bajo estudio observado en la parcela "j" y donde aplicó el tratamiento "i"

$\mu$ = media experimental

$T_i$ = efecto del tratamiento "i"

$\epsilon_{ij}$ = error experimental de la celda (i,j) i=1,2,...,

a= número de tratamientos

j= 1,2...r= número de repeticiones de cada tratamiento

Cuadro 9: Diseño del cuadro de Análisis de Varianza (ANVA) univariado utilizado en el ensayo de regeneración *in vitro* de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.)

Fuente de variación	Grados de libertad (G.L)	Suma de Cuadrados (S.C)	de Cuadrados Medios (C.M)	F cal	F tab
Tratamientos	9-1=8	$1/n \sum Y_i.^2 - Y..^2/na$	S.C. TRAT/a-1	C.M	TRAR/C.M.E.
Error experimental	323-8=315	S.C. TOTAL- S.C. TRAT	S.C.Error exp/a (n-1)		
<b>TOTAL</b>	324-1=323	$\sum \sum y^2_{ij} - Y^2.../ra$			

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Proyecto Evaluación del cultivo de anteras y el cocultivo de microesporas de chile (*Capsicum annum* L.) con ovarios de chile y Sorgo (*Sorghum bicolor* L.)

#### 6.1.1 Análisis histológico

Mediante la disección de los botones florales y análisis microscópico de las anteras y microesporas, se logró determinar eficientemente los marcadores morfológicos para cada uno de los estados de desarrollo de las microesporas para las variedades de *Capsicum annum* L. Largo de Reus (LR) y Dulce Italiano (DI) tal como se muestra en las Figuras 13 y 14.

La observación y determinación de estos marcadores morfológicos facilita el proceso aislamiento y cocultivo para la androgénesis *in vitro* en chile. De esta forma se determinaron los siguientes marcadores: -el desarrollo del botón floral mediante la apariencia del cáliz y la corola y el desarrollo de las anteras mediante su coloración y tamaño. Las características de los botones florales en cuanto a la apertura del cáliz es un rasgo muy notorio apoyado por la coloración de la antera como segundo rasgo distintivo y no tanto al tamaño de la misma ya que este suele ser variable, con la coloración azul del ápice de las anteras se puede asumir que el estado binucleado de las microesporas está presente. A pesar de tener claro los marcadores morfológicos, estos varían de un genotipo a otro como es el caso de las variedades en estudio y como se muestra en el Cuadro 10, manteniéndose como único rasgo fuertemente relacionado la coloración de la antera.

Cuadro 10. Comparativa en cuanto a características morfológicas entre las variedades de chile (*Capsicum annum* L.). Los números y letras al inicio de cada descripción corresponden a la Figura 13 y 14.

Variedad Largo de Reus			Variedad Dulce Italiano		
Botón floral	Antera	Desarrollo de la microespora	Botón floral	Antera	Desarrollo de la microespora
<b>1a.</b> se observa un botón de 4mm con sus sépalos (cáliz) cerrados.	<b>1b.</b> antera de coloración café con cristalino de 1.5mm de tamaño aprox.	<b>1c.</b> microespora en estado de tétrada.	<b>1a.</b> se observa un botón floral de 3.5mm con el cáliz cerrado casi en su totalidad.	<b>1b.</b> antera de apariencia transparente con coloración café de aprox 1.5mm de tamaño	<b>1c.</b> microespora en estado de desarrollo de tétrada.
<b>2a.</b> Botón floral de 5mm con una apertura del cáliz que denota la corola asomándose	<b>2b.</b> antera con coloración blanquecina y de apariencia sólida de 2mm de tamaño aprox.	<b>2c.</b> microesporas en estado uninucleado	<b>2a.</b> se observa un botón floral de 5mm aprox con una corola apenas visible.	<b>2b.</b> antera con apariencia blanquecina y color sólido de aprox 2.5mm de tamaño.	<b>2c.</b> microespora en estado uninucleado.
<b>3a.</b> Botón floral de 8mm aprox. Corola casi al 45% de su estado final	<b>3b.</b> antera con una coloración azul en la zona distal hasta la mitad. De 3.2mm aprox de tamaño.	<b>3c.</b> microesporas en estado binucleado temprano.	<b>3a.</b> se observa un botón floral de 6.5mm aprox. Con una corola del 40% del tamaño total.	<b>3b.</b> antera de color azul en su ápice tornándose blanco en su base de aprox 3.5mm de tamaño.	<b>3c.</b> microespora en estado binucleado temprano.
<b>4a.</b> Botón floral de 11mm donde se puede apreciar la reducción del cáliz y la prominente corola	<b>4b.</b> antera con coloración azul cerca del 80%. De 4mm aprox de tamaño.	<b>4c.</b> Grano de polen totalmente maduro.	<b>4a.</b> botón floral de 8mm aprox. Cáliz prominente y corola equitativa.	<b>4b.</b> antera con coloración azul y celeste en su totalidad de aprox 3.5mm de tamaño.	<b>4c.</b> Grano de polen totalmente maduro.

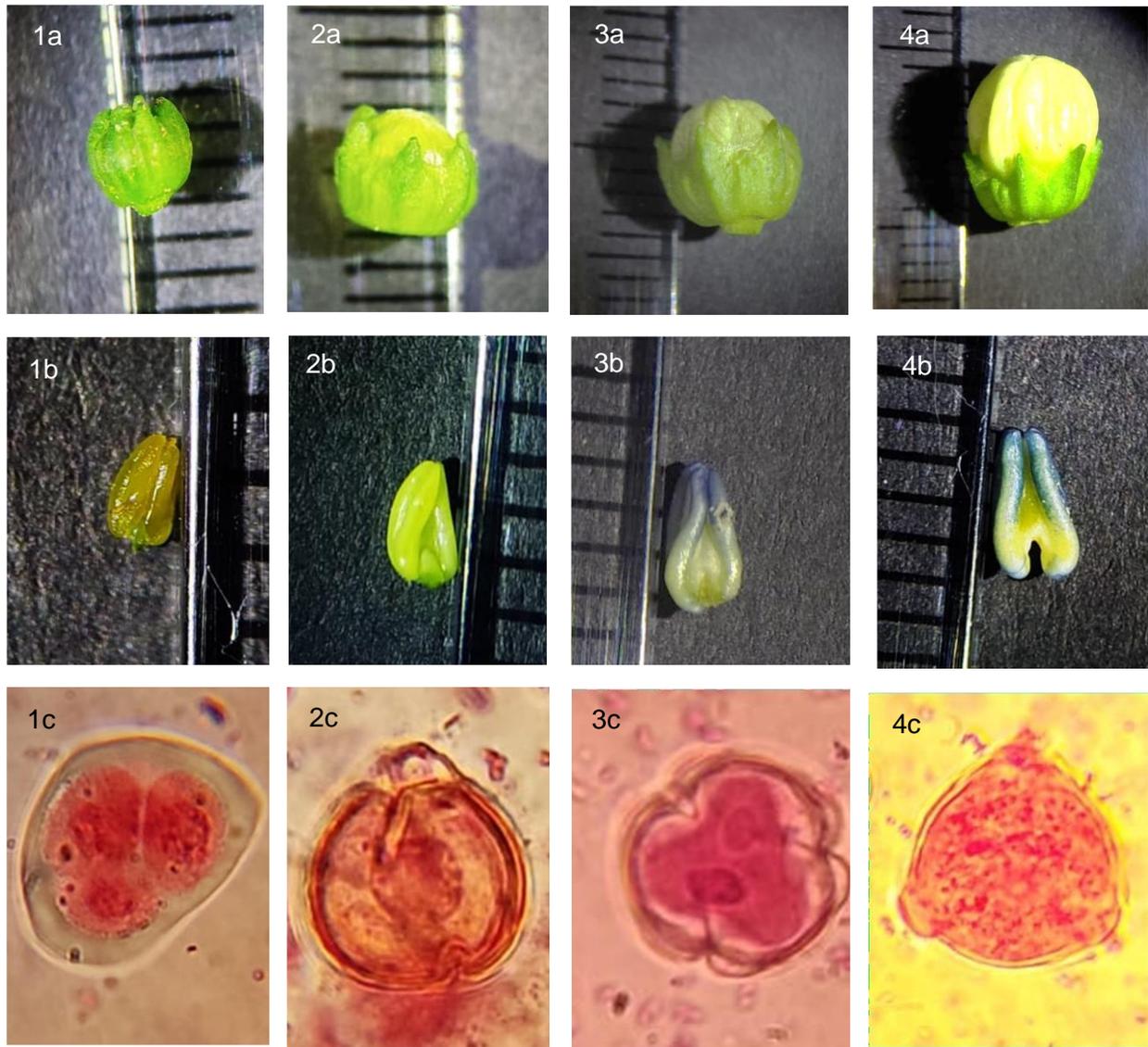


Figura 13. Descripción morfológica de los botones florales/anteras y etapas de desarrollo de las microsporas de polen en *Capsicum annum* L., variedad Largo de Reus.

Los botones florales (1a, 2a, 3a, 4a) pueden ser clasificados en base a la coloración que presentan las anteras (1b, 2b, 3b, 3c), siendo este uno de los mejores indicadores para la extracción de las microsporas con el grado de desarrollo de interés. El estado de desarrollo de las microsporas de polen (1c, 2c, 3c, 4c). El grupo 1c consiste de anteras con tétradas; el grupo 2c consiste de anteras con microsporas unicelulares; el grupo 3c consiste en anteras con 53.85% de microsporas binucleadas y 46.15% de microsporas uninucleadas; y el grupo 4c consiste en microsporas con granos de polen maduros.

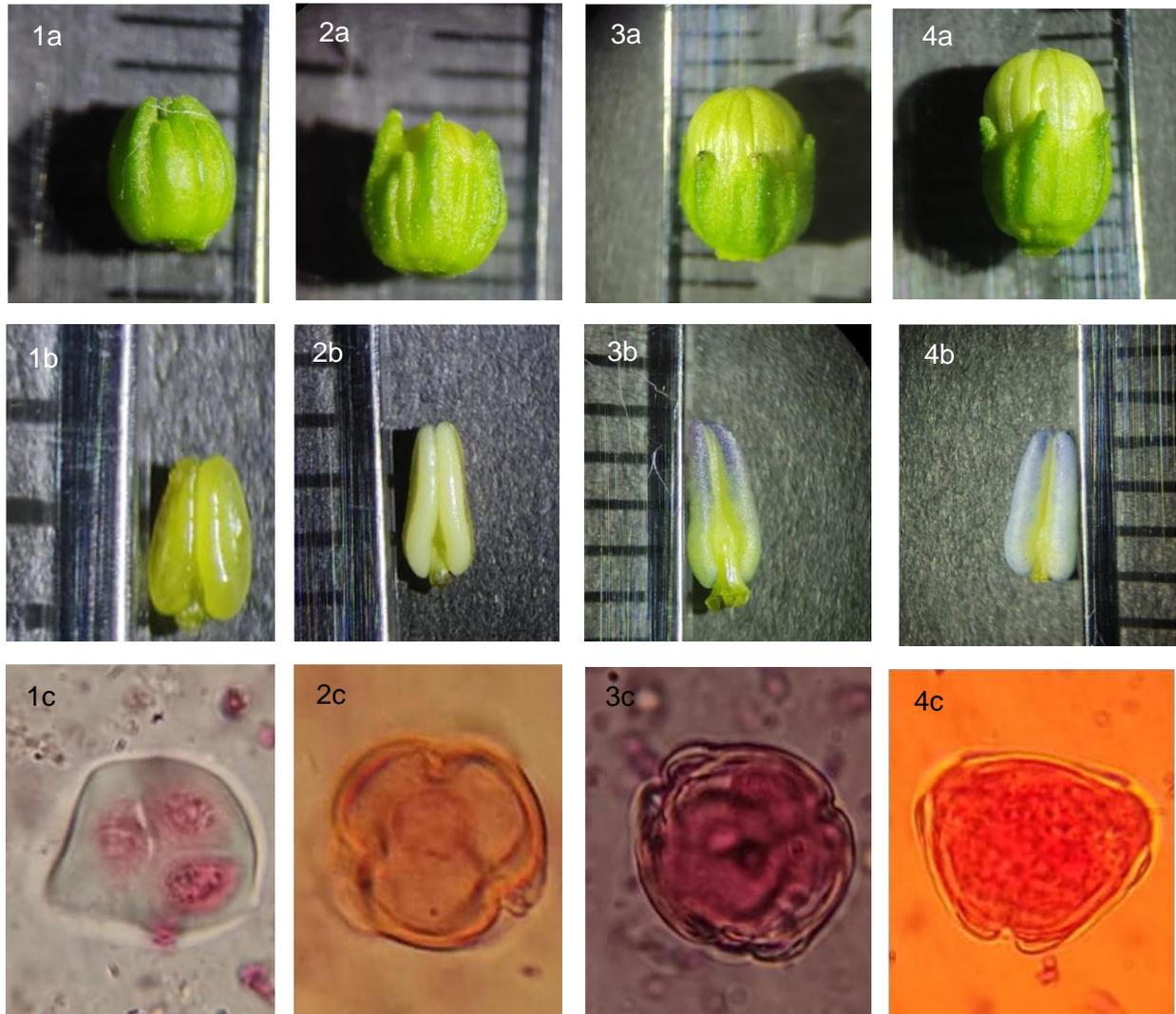


Figura 14. Descripción morfológica de los botones florales/anteras y etapas de desarrollo de las microesporas de polen en *Capsicum annum* L, variedad Dulce Italiano.

Los botones florales (1a, 2a, 3a, 4a) pueden ser clasificados en base a la coloración que presentan las anteras (1b, 2b, 3b, 3c), siendo este uno de los mejores indicadores para la extracción de las microesporas con el grado de desarrollo de interés. El estado de desarrollo de las microesporas de polen (1c, 2c, 3c, 4c). El grupo 1c consiste de anteras con tétradas; el grupo 2c consiste de anteras con microesporas unicelulares; el grupo 3c consiste en anteras con 17.6% de microesporas binucleadas y 82.4% de microesporas uninucleadas; y el grupo 4c consiste en microesporas con granos de polen maduros. En las imágenes a y b la escala representa milímetros.

### 6.1.2 Formación de callo embriogénico

A los dos meses de cocultivo microesporas-ovarios e incubación de las anteras, se observaron el desarrollo de callos únicamente en el ensayo número seis, el cual estuvo conformado por el cultivo únicamente de anteras en Gamborg B5 (1968). Para este ensayo se utilizaron anteras con microesporas en estado de desarrollo binucleado temprano. Se obtuvo un total de 4 callos en dos de las 5 cajas Petri que conformaron dicho ensayo. Los callos mostraron una apariencia blanquecina de consistencia friable (Figura 15) de 1.5cm de diámetro.

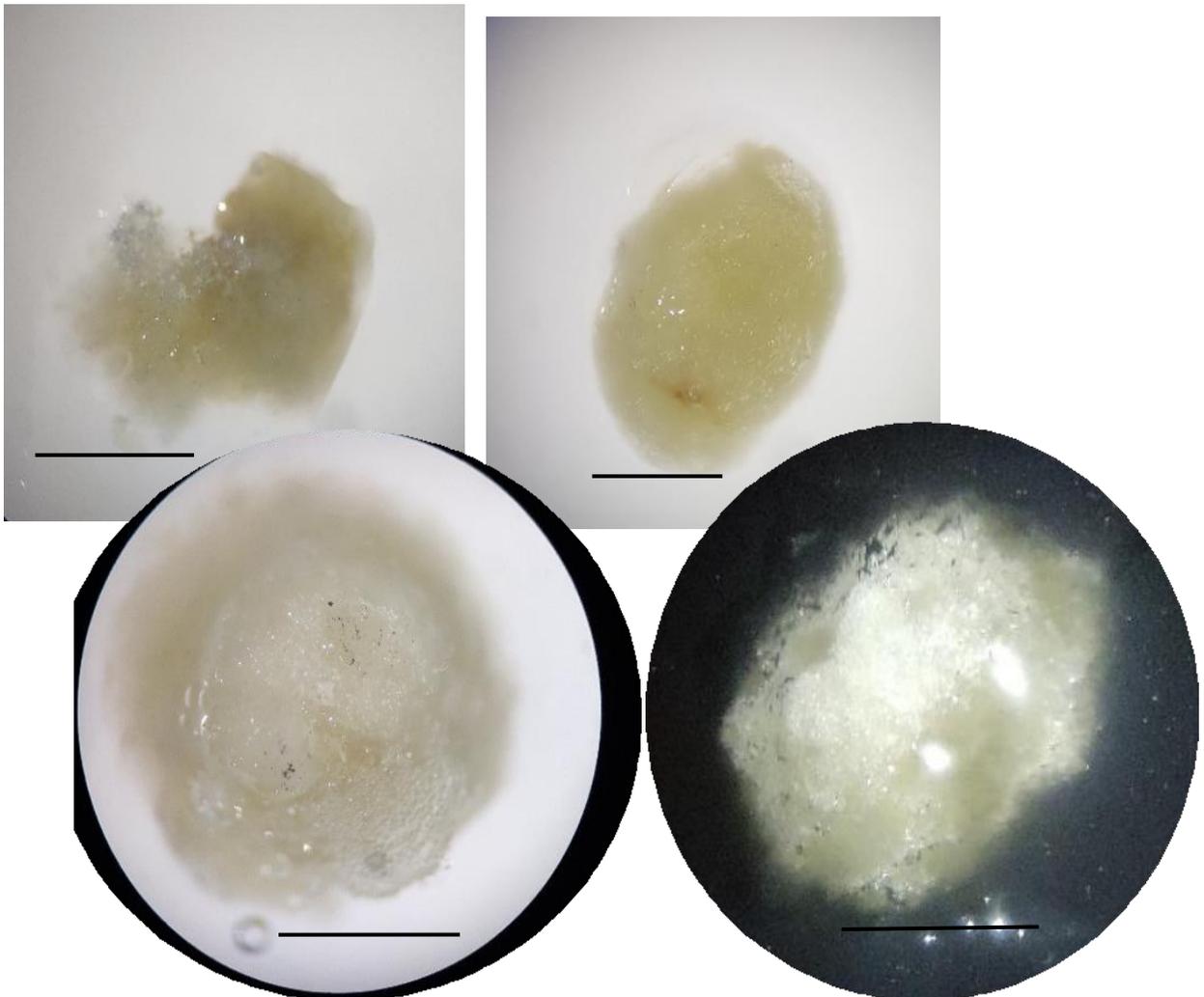


Figura 15. Callos desarrollados a partir de la siembra de anteras de *Capsicum annum*, posterior al período de incubación de dos meses en oscuridad y  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa de 90-100%. Estructuras observadas bajo un estereoscopio. La escala indica un centímetro.



Figura 16. Callos regenerados a partir de anteras de Chile (var. LR) subcultivos durante 11 semanas en medio de cultivo R1 modificado en condiciones de fotoperiodo 16h luz/ 8h oscuridad (2000 Lux), temperatura  $25\pm 1$ . Los callos se tornaron un color café y verde claro, lo que indica presencia de cloroplastos.

Debido al cierre de las instalaciones de la Universidad, la continuidad de la investigación se vio limitada en su desarrollo y los siguientes subcultivos que podrían dar origen a la diferenciación de los callos no fueron realizados.

## 6.2 Regeneración *in vitro* de *Fernaldia pandurata* W

Transcurridos 42 días de cultivo *in vitro* con diferentes reguladores de crecimiento, se evaluó la respuesta a la regeneración *in vitro* de los explantes de Loroco como se pueden observar en la Figura 17.



Figura 17. Desarrollo morfológico a partir de segmentos nodales de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.) a los 42 días después del cultivo en diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. a. ausencia de reguladores. b.  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP sin Kinetina ni ANA. c.  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  Kin sin ANA. d.  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP +  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  ANA, sin Kin. e.  $3 \text{ mg l}^{-1}$  BAP sin Kinetina ni ANA. f.  $3 \text{ mg l}^{-1}$  BAP +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  Kin, sin ANA. g.  $3 \text{ mg l}^{-1}$  BAP +  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  ANA, sin Kin. h.  $1 \text{ mg l}^{-1}$  Kin, sin BAP ni ANA. i.  $5 \text{ mg l}^{-1}$  Kin sin BAP ni ANA.

En la Figura 17 se muestran las diferentes respuestas a las combinaciones de reguladores de crecimiento evaluadas, se puede destacar que el tratamiento 1 ("a" en la Figura 17) muestra un leve desarrollo de raíz a pesar de no haber sido suplementado con reguladores

de crecimiento. Los tratamientos 5, 6 y 7 ("e", "f", "g" en la Figura 17) manifestaron un crecimiento o desarrollo bajo, lo cual descarta dichas concentraciones de reguladores en futuras investigaciones.

### 6.2.1 Análisis estadístico

El resultado de las pruebas estadísticas de ANOVA rechazó la homogeneidad en los tratamientos con un p valor (0.00) menor al nivel de significancia (0.01), por lo cual se aplicó una prueba Post Hoc, la prueba aplicada fue la de comparación de medias de Tuckey con el objetivo de determinar la diferencia estadística de las diferentes combinaciones de Bencilaminopurina (B.A.P), Kinetina (Kin) y ácido naftalenacético (A.N.A) sobre las variables: número de brotes desarrollados, presencia de callo, formación de raíz y número de hojas a partir de segmentos nodales de *Fernaldia pandurata* W. Los resultados de la prueba se presentan en los Gráficos 1,2 y 3. En el cuadro 11 se puede ver las diferencias según la prueba estadística aplicada.

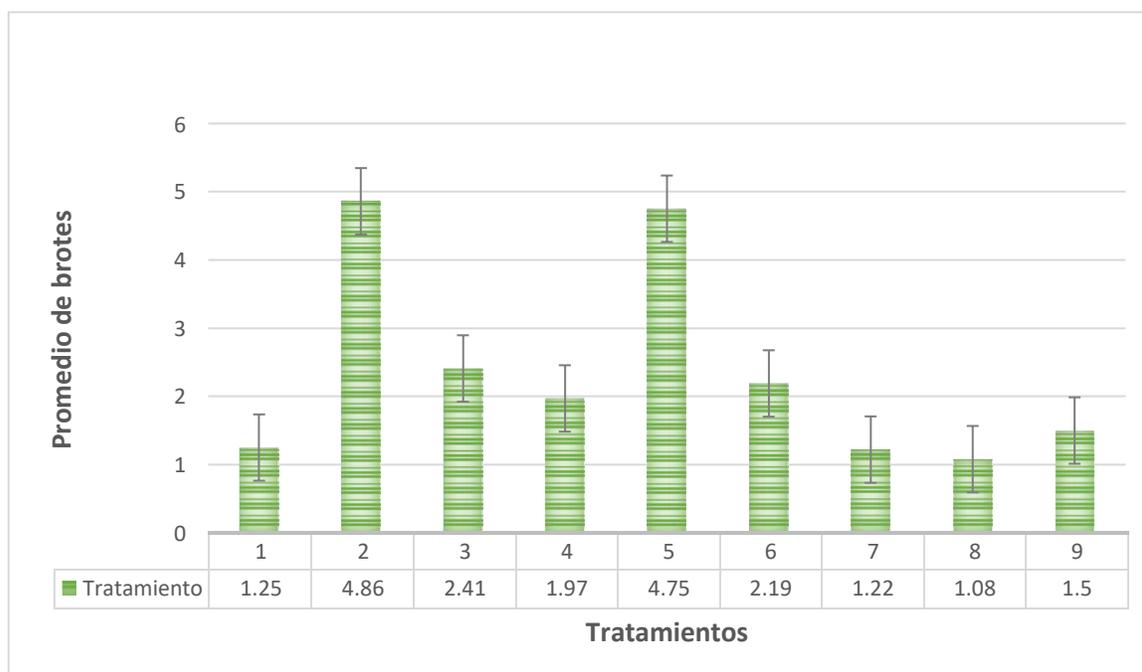


Gráfico 1. Respuesta de los explantes de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.) a las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en estudio sobre la variable número de brotes. 1) ausencia de reguladores. 2) 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP sin Kinetina ni ANA. 3) 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP + 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> Kin sin ANA. ,4). 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP + 0.5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> ANA, sin Kin. 5) 3 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP sin Kinetina ni ANA. 6) 3 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP + 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> Kin, sin ANA. 7) 3 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP + 0.5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> ANA, sin Kin. 8) 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> Kin, sin BAP ni ANA. 9) 5mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> Kin sin BAP ni ANA.

En el Gráfica 1 se observa que el tratamiento 2 ( $1\text{mg l}^{-1}$  de B.A.P) y el tratamiento 5 ( $3\text{mg l}^{-1}$  de B.A.P), suplementados únicamente con Bencilaminopurina (B.A.P) son los que mayor número de brotes desarrolló, lo cual puede resultar conveniente según la naturaleza de la investigación que se desee desarrollar. Por otro lado, el tratamiento 8 ( $1\text{mg l}^{-1}$ ) es el que menor número de brotes registró.

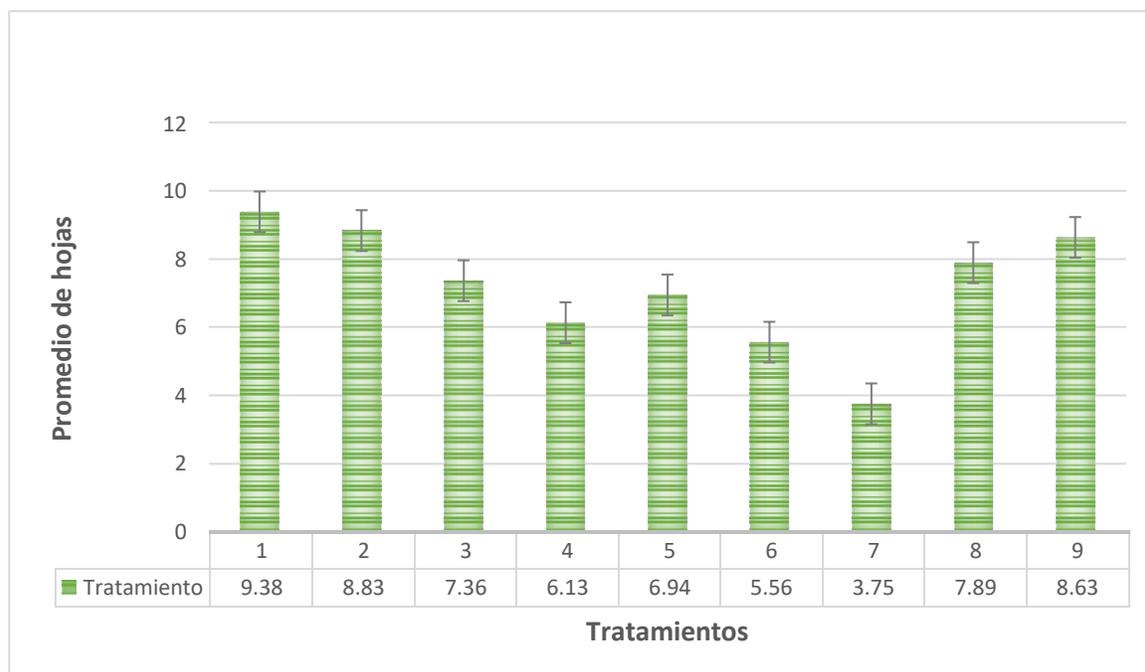


Gráfico 2. Respuesta de los explantes de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.) a las diferentes combinaciones de reguladores crecimiento sobre la variable número de hojas. 1) ausencia de reguladores. 2)  $1\text{mg l}^{-1}$  BAP sin Kinetina ni ANA. 3)  $1\text{mg l}^{-1}$  BAP +  $1\text{mg l}^{-1}$  Kin sin ANA. 4)  $1\text{mg l}^{-1}$  BAP +  $0.5\text{mg l}^{-1}$  ANA, sin Kin. 5)  $3\text{mg l}^{-1}$  BAP sin Kinetina ni ANA. 6)  $3\text{mg l}^{-1}$  BAP +  $1\text{mg l}^{-1}$  Kin, sin ANA. 7)  $3\text{mg l}^{-1}$  BAP +  $0.5\text{mg l}^{-1}$  ANA, sin Kin. 8)  $1\text{mg l}^{-1}$  Kin, sin BAP ni ANA. 9)  $5\text{mg l}^{-1}$  Kin sin BAP ni ANA.

En el Gráfico 2 se muestran el promedio de hojas por tratamiento, en el cual destacan los tratamientos 1 (sin reguladores), 8 ( $1\text{mg l}^{-1}$  de Kinetina) y 9 ( $5\text{mg l}^{-1}$  de Kinetina) en relación a la variable número de brotes, en los que se produjeron la menor cantidad de brotes, esto indica una buena relación con respecto al desarrollo de plántulas individuales o según sea el interés del investigador. Cabe destacar que el tratamiento 7 ( $3\text{mg l}^{-1}$  de B.A.P) es el que menor número de hojas desarrolló.

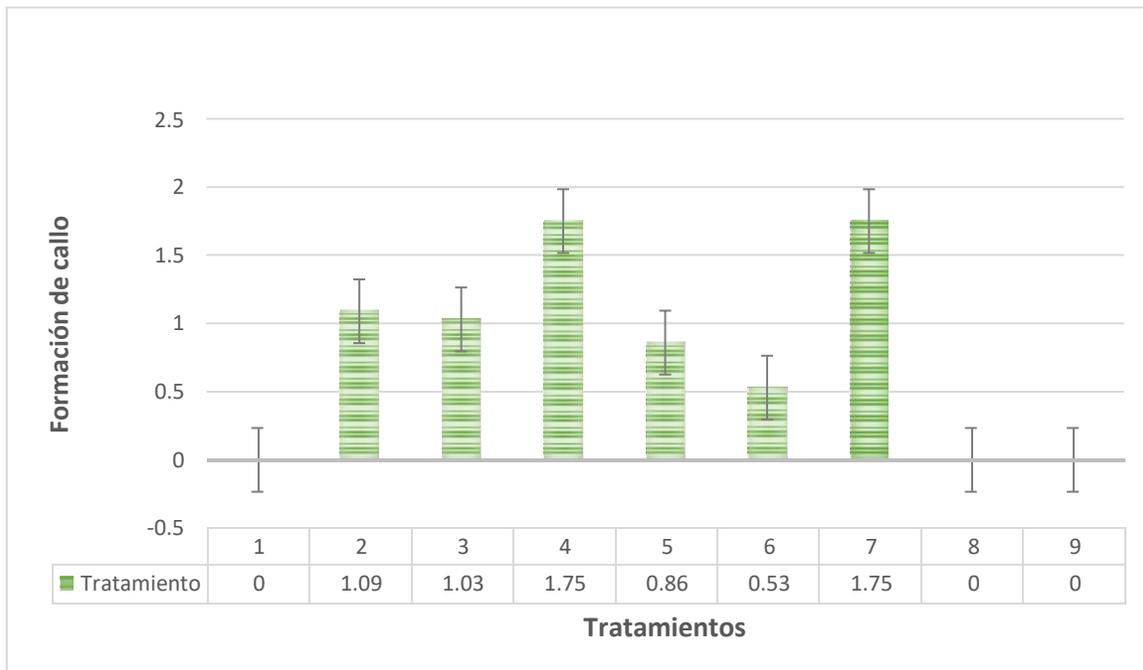


Gráfico 3. Respuesta de los explantes de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.) a las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en estudio, sobre la variable formación de callo. 1) ausencia de reguladores. 2) 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP sin Kinetina ni ANA. 3) 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP + 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> Kin sin ANA. ,4). 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP + 0.5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> ANA, sin Kin. 5) 3 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP sin Kinetina ni ANA. 6) 3 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP + 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> Kin, sin ANA. 7) 3 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP + 0.5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> ANA, sin Kin. 8) 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> Kin, sin BAP ni ANA. 9) 5mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> Kin sin BAP ni ANA.

En el Gráfico 3 se muestran la formación de callo, siendo el interés dentro de la investigación la no formación de este, debido a ello se resaltan los tratamientos 1 (0 reguladores de crecimiento), 8 (1mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de Kinetina) y el tratamiento 9 (5mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de Kinetina).

Cuadro 11. Evaluación estadística de las variables en estudio para la regeneración *in vitro* de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.)

Tratamiento (B.A.P-Kinetina- A.N.A) mg/l <sup>-1</sup>	Número de brotes	Número de raíces	Número de hojas	Formación de callo
1 (0-0-0)	1.25 <sup>bc</sup>	.61 <sup>a</sup>	9.38 <sup>a</sup>	0.0 <sup>d</sup>
2 (1-0-0)	4.86 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>	8.83 <sup>ab</sup>	1.09 <sup>b</sup>
3 (1-1-0)	2.41 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	7.36 <sup>ab</sup>	1.03 <sup>b</sup>
4 (1-0-.5)	1.97 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>b</sup>	6.13 <sup>bc</sup>	1.75 <sup>a</sup>
5 (3-0-0)	4.75 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>	6.94 <sup>b</sup>	.86 <sup>b</sup>
6 (3-1-0)	2.19 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>b</sup>	5.56 <sup>c</sup>	.53 <sup>c</sup>
7 (3-0-.5)	1.22 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>b</sup>	3.75 <sup>d</sup>	1.75 <sup>a</sup>
8 (0-1-0)	1.08 <sup>c</sup>	0.0 <sup>b</sup>	7.89 <sup>ab</sup>	0.0 <sup>d</sup>
9 (0-5-0)	1.5 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>b</sup>	8.63 <sup>ab</sup>	0.0 <sup>d</sup>

Estadísticamente bajo la prueba Post Hoc de Tukey, para la comparación de medias para cada una de las variables, donde aquellos promedios con letras iguales no representan diferencias estadísticas significativas. Esto con un nivel Alpha de 0.1 y N=36 en cada tratamiento.

### 6.2.2 Enraizamiento de *Fernaldia pandurata* W.

Transcurridos 40 días de iniciado el ensayo de enraizamiento se procedió a la evaluación del número de raíces. Sin embargo, no se encontraron en ninguna de las combinaciones de reguladores de crecimiento evaluadas la formación de raíces (Figura 18).



Figura 18. Plántula de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.) procedente del tratamiento nueve de regeneración *in vitro* suplementado con 0.5mg/l-1 de A.N.A.

En la Figura 18a se muestra una raíz blanquecina con pelos radiculares observables a simple vista. En la Figura 18b encontramos el desarrollo aéreo sobresaliente de la plántula de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.).

## 7 DISCUSIÓN

### 7.1 Proyecto Evaluación del cultivo de anteras y el cocultivo de microesporas de chile (*Capsicum annum* L.) con ovarios de chile y Sorgo (*Sorghum bicolor* L.)

El cultivo *in vitro* de microesporas permite de acuerdo con numerosos reportes la inducción de embriogénesis somática y la regeneración de plantas de chile (*Capsicum annum* L.) (Bárány *et al.*, 2001, 2005; Dumas de Vaulx *et al.*, 1981; Mitykó *et al.* 1997). Sin embargo, en algunos informes sobre la inducción de la embriogénesis por medio del cultivo de microesporas, se destaca únicamente la formación de estructuras multicelulares o callos y no plantas completas (González-Melendi *et al.* 1996; Mitykó *et al.* 1997; Regner 1996). Al respecto, Bárány *et al.* (2001) reportaron la formación de embriones mediante el cultivo de microesporas de chile pero este sistema de regeneración resultó con baja eficiencia.

Por otro lado, Lantos (2009) afirma que el uso de ovarios de especies extrañas cultivadas en el mismo medio junto con las microesporas de chile promueve la regeneración de plántulas. A esto se le conoce como cocultivo. Li y de Vaulx (2001), también mencionan que se mejora con éxito la producción de embrioides de cultivos de microesporas aisladas y cocultivadas con ovarios de otras especies. En este sentido, Lantos (2009) reportó una estrategia de cocultivo que consistió en aislar ovarios de trigo (*Triticum* spp.) y cocultivarlos con microesporas de chile (*Capsicum annum* L.) durante aproximadamente 2 meses en condiciones de oscuridad. Los resultados fueron callos embriogénicos regenerados en medios Gamborg (1968) y posteriormente plantas haploides.

La idea de cocultivar microesporas de chile junto con ovarios de alguna gramínea sustentó la hipótesis de la presente investigación. La utilización de ovarios de sorgo cocultivados con microesporas aisladas de chile no produjeron callos embriogénicos probablemente por las diferentes condiciones de pretratamiento de las anteras, el método de extracción de las microesporas y el tipo de medio de cultivo utilizado. Lantos (2009), utilizó un pretratamiento con una solución compuesta de 5ml de manitol 0.3M, cuya aplicación está relacionada al método de crecimiento mínimo, utilizado en la práctica para la conservación de germoplasma (Taylor y Dukin, 1993; Roca *et al.* 1994; Toledo y Golmirzaie, 1998). Este método se basa en la disminución de la división celular y el metabolismo de la planta, con el objetivo de incrementar la longevidad *in vitro* de los cultivos sin que se produzcan cambios genéticos, por tanto, no hay una detención total de los procesos celulares sino una disminución en la velocidad con que ocurren los mismos (Roca *et al.* 1994).

Esta limitación del crecimiento por efecto de la concentración osmótica se debe a la reducción de la absorción de agua y nutrientes del medio de cultivo, los agentes osmóticos no metabolizables, como el manitol y el sorbitol, son los más efectivos en la limitación del crecimiento (Bhat y Chandel 1993). En la presente investigación, no se realizó por falta de agentes osmóticos (como el manitol y la maltosa) el pretratamiento de las anteras que describió Lantos (2009) y se procedió directamente al aislamiento y cocultivo de las microesporas. Este paso se asume ahora como indispensable para un protocolo de cocultivo de microesporas de Chile con ovarios de gramíneas, con el fin de obtener callos embriogénicos haploides.

Por otro lado, el método de extracción o aislamiento de microesporas utilizado por Lantos (2009) utiliza un gradiente con solución de maltosa al 21% y manitol 0.3M. Este paso se basa en el principio de gradiente de densidades que implica la utilización de un soporte fluido cuya densidad aumenta desde la zona superior a la inferior. El gradiente se consigue con un soluto preferiblemente de baja masa molecular, de tal manera que la muestra a analizar pueda ser suspendida en la solución resultante, actuando de esta manera el manitol y la maltosa, en busca del punto "medio" ya que la maltosa ayuda a subir la presión mientras que el manitol proporciona un efecto de reducción de la presión osmótica al punto de que la presión dentro de la célula (para el caso las microesporas dentro del saco polínico) sea igual a la presión del medio y la membrana permita la salida de los protoplastos (las microesporas) (Llorente y Mejía 2015). Además, este método requiere de un equipo especializado (ultracentrífugas) para separar mediante centrifugación a grandes velocidades los componentes del gradiente de densidades y así aislar en capas únicamente las células que corresponden a la necesidad de la investigación (en este caso las microesporas binucleadas) (Lantos 2009). Nuevamente, el no disponer de equipos necesarios en el laboratorio, así como los agentes osmóticos no permitieron el desarrollo de este paso que resultó ser muy importante para el desarrollo del protocolo de investigación. Cabe resaltar que Lantos (2009, 2012) sugieren una concentración mínima de  $3 \times 10^4$  microesporas por ml de solución de cultivo que corresponden a las microesporas en estado binucleado. En esta investigación tampoco fue posible determinar la concentración de microesporas de Chile cocultivadas en el medio.

Dentro de los medios de cultivo utilizados para la obtención de embrioides, Lantos (2012) evaluó diferentes medios de cultivo para el desarrollo de estructuras derivadas de

microesporas. Este investigador determinó que el medio Gamborg B5 (1968) favorece el desarrollo de un mayor número de estructuras, en comparación con el medio de Murashige y Skoog (MS) (1962), el cual produjo la mitad de estructuras callogénicas que el medio B5. De acuerdo a la disponibilidad de reactivos para la elaboración de medios de cultivo en el Laboratorio, para los primeros ensayos de cocultivo se utilizaron medios de MS y no de Gamborg, lo cual repercutió indudablemente en los resultados de la investigación.

Por estas condiciones presentadas en el desarrollo de la investigación se planteó el cultivo *in vitro* de anteras, ya que este prescinde de pasos como el pretratamiento de las mismas anteras y la extracción de microesporas con los equipos y reactivos antes mencionados. Los primeros informes sobre plantas haploides derivadas del cultivo de anteras de Chile (*Capsicum annum* L.) fueron publicados simultáneamente por tres laboratorios diferentes (George y Narayanaswamy, 1973 en la India; Kuo *et al.* 1973; Wang *et al.* 1973 en China). Sin embargo, el cultivo de anteras presenta ciertas desventajas como lo es la regeneración de un alto número de embriones deformados (Kristiansen y Andersen 1993; Ercan *et al.* 2006). Además, en múltiples trabajos se ha documentado la baja reproducibilidad y eficiencia del proceso (Agrawal & Chandra 1983; Ochoa & Moreno, 1990; Arroyo & Revilla, 1991; Szasz *et al.*, 1995; Binzel *et al.*, 1996; Husain *et al.*, 1999; Binzel *et al.*, 1996). Dentro de la investigación, estos puntos son altamente destacados, ya que, de un total de 3 ensayos correspondientes al cultivo de anteras de Chile, únicamente se logró obtener un total de cuatro callos embriogénicos.

Otro factor que contribuye al bajo rendimiento en la obtención de callos es el desarrollo de producción de las anteras. Powell (1990) y Bajaj (1992) reportaron que existe una estrecha relación entre los primeros botones florales y una alta capacidad de regeneración *in vitro* de plantas. Powell (1990) utilizó los primeros botones florales emergidos en la etapa reproductiva de Chile dulce y encontraron una mejor respuesta a la regeneración con respecto a los botones florales desarrollados en etapas más avanzadas de la floración. En la presente investigación, no se utilizaron los primeros botones florales debido a que estos se cosecharon para la determinación de los marcadores morfológicos ligados al desarrollo de los granos de polen, razón que agronómicamente podría influir dentro de los resultados obtenidos.

El genotipo es quizás, el factor más importante y en gran medida el limitante a la regeneración androgénica en Chile (Rodeva *et al.* 2004; Koleva-Gudeva *et al.* 2007; Liu *et al.* 2007). Los genotipos son recalcitrantes hacia la inducción de androgénesis y la

formación de plantas haploides (Comlekcioglu et al. 2001; Rodeva, 2001; Wang y Zhang 2001). Para las líneas F1 (híbridos) de Chile, la frecuencia de embriogénesis directa varía de 0,5 a 75 embrioides por cada 100 anteras cultivadas, lo que vuelve al Chile genotipo dependiente de acuerdo con Qin y Rotino (1993), Lifi y Wenzel (1994), Mityko *et al.* (1995) y Koleva-Gudeva *et al.* (2007). En la presente investigación se utilizaron dos genotipos de Chile (Largo de Reus y Dulce Italiano) y solo se logró desarrollar callos a partir de anteras del genotipo Largo de Reus. Estos callos resultaron en apariencia semejantes a los desarrollados por Lantos (2009, 2012) por lo que probablemente podrían tratarse de callos embriogénicos haploides.

## 7.2 Regeneración *in vitro* de *Fernaldia pandurata* W.

El uso de bencilaminopurina (BAP) ha sido reportado necesario para el crecimiento de los tejidos en concentraciones de 0.1 a 1.0 mg $l^{-1}$  (CIAT 1991). En los medios de cultivo se utiliza para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Se utiliza también para la proliferación de tallos axilares debido a la ruptura de la dominancia apical (Narender y Kutty 1994). Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con la utilidad del BAP en los medios de cultivo debido que los tratamientos que contenían BAP a 3mg $l^{-1}$ (T5: 3-0-0) y 1mg $l^{-1}$  (T2: 1-0-0) fueron los que mayor número de brotes desarrollaron con un promedio de 4.7 y 4.8, respectivamente. Estos datos también son comparables con lo reportado por Quintanilla (2003) en el cultivo *in vitro* de meristemas apicales de loroco, quien utilizó 0.5 mg $l^{-1}$  de BAP y 1.0 mg $l^{-1}$  de BAP y obtuvo brotes. Sin embargo, dicho informe solo denota la formación de brotes sin especificar la cantidad de ellos. López (2007) utilizó 0.5mg $l^{-1}$  de BAP y obtuvo también plantas de loroco a partir de semillas sexuales como explantes. Este método incorpora la variabilidad genética de un embrión cigótico, por lo que la micropropagación de segmentos nodales constituye una mejor opción para la clonación y futuras investigaciones en esta especie.

Las auxinas están relacionadas con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento, entre otros (Narender y Kutty 1994). En el caso de la auxina conocida como ácido naftalenacético o ANA por sus siglas en inglés, ha sido ampliamente utilizada por muchos investigadores. Hurtado y Merino (1987), afirmaron que un callo puede formar brotes, raíces, embriones o simplemente continuar su proliferación de acuerdo a la cantidad relativa de auxinas y citoquininas suministradas. En el cultivo *in vitro* de loroco desarrollado en la presente investigación, la respuesta a la suplementación con ANA (0.5mg $l^{-1}$ ) fue la formación de callos en aquellos tratamientos en combinación 1mg $l^{-1}$  de BAP (T4) y 3mg $l^{-1}$  de BAP (T7). Este resultado concuerda con los datos reportados por Quintanilla (2003), donde los medios suministrados con 0.5mg $l^{-1}$  y 1.0mg $l^{-1}$  de ANA respondieron sin falta a la formación de callos de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.)

La citocinina conocida como Kinetina (Kin), es utilizada para estimular la división celular, el crecimiento y el desarrollo vegetativo (Narender y Kutty 1994). La Kinetina en concentraciones elevadas entre 1.0mg $l^{-1}$  y 10mg $l^{-1}$  induce la formación de brotes adventicios, inhibe la formación de raíces y retarda el envejecimiento, lo que hace necesario encontrar un balance de este regulador de crecimiento dentro de los medios de cultivo (Pierik 1990). Esto apoya los resultados obtenidos en la investigación donde los

tratamientos con presencia de al menos  $1\text{mg l}^{-1}$  de Kinetina son los que mostraron el mayor número de hojas según la prueba estadística de comparación de medias de Tukey. Además, para los tratamientos con  $1\text{mg l}^{-1}$  (T3, T6, T8) y  $5\text{mg l}^{-1}$  (T9) de Kinetina no mostraron desarrollo de raíces. Debido al poco estudio relacionado al uso de Kinetina y demás reguladores de crecimiento sobre el cultivo *in vitro* de loroco se hace necesario el uso de diferentes dosis en la evaluación de la respuesta tanto a auxinas como citoquininas.

Para el caso específico del tratamiento uno (libre de reguladores de crecimiento), y sus características sobresalientes en cuanto a desarrollo (número de hojas) y formación de raíces, se puede apoyar con lo descrito por Vasil y Torpe (1994) en donde algunas especies, durante la fase de iniciación, no requieren el uso de reguladores de crecimiento externos; razón que podría describir a la perfección al género *Fernaldia*.

## 8 CONCLUSIONES

### **Proyecto Evaluación del cultivo de anteras y el cocultivo de microesporas de chile (*Capsicum annum* L.) con ovarios de chile y Sorgo (*Sorghum bicolor* L.)**

- La recalcitrancia del género *Capsicum* ha sido manifestada en la presente investigación, esto por la baja eficiencia de regeneración de embriodes y plántulas en las variedades de chile utilizadas.
- Para las variedades Largo de Reus y Dulce Italiano el desarrollo de las microesporas está determinado por marcadores morfológicos de coloración de las anteras y de la relación en tamaño del cáliz y la corola de los botones florales.
- El cultivo de anteras resultó ser más reproducible que el cocultivo de microesporas con ovarios de sorgo debido a la sencillez del protocolo y a que se prescinden de algunos pasos que incluyen equipos especializados y reactivos que no se cuentan actualmente en el laboratorio.
- El medio de cultivo de Gamborg B5 (1968) en comparación con el medio de Murashige y Skoog (1962) permite la regeneración de callos a partir del cultivo *in vitro* de anteras de chile.
- No fue posible determinar la influencia de los ovarios de sorgo en la regeneración de callos embriogénicos debido principalmente al poco control de otros factores influyentes en el protocolo de regeneración.
- A pesar de las múltiples limitaciones de equipos, reactivos y materiales en el desarrollo de la investigación, se logró la formación de callos a partir del cultivo *in vitro* de anteras de chile.
- El pretratamiento de las anteras, el aislamiento de las microesporas mediante gradientes osmóticos de azúcares y la utilización de medios de cultivo con las sales minerales de Gamborg B5 son pasos importantes en un protocolo de regeneración de plantas haploides de chile.

### **Proyecto Regeneración *in vitro* de *Fernaldia pandurata* W.**

- Es posible regenerar plántulas de loroco a partir de segmentos nodales.
- La utilización de 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de BAP y la combinación de 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de BAP con 0.5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> ANA produce principalmente brotes.

- La utilización de 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de BAP, la combinación de 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de BAP con 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> Kin y 3 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de BAP con 0.5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> de ANA inducen la formación principalmente de callos.
- No fue posible enraizar los brotes de loroco mediante la utilización de IBA (ácido indol butírico) y ANA como reguladores de crecimiento, debido principalmente al periodo muy corto de la evaluación.
- Este es el primer protocolo de regeneración de plántulas de loroco a partir de segmentos nodales.

## 9 RECOMENDACIONES

### **Proyecto Evaluación del cultivo de anteras y el cocultivo de microesporas de chile (*Capsicum annum* L.) con ovarios de chile y Sorgo (*Sorghum bicolor* L.)**

- Desarrollar protocolos propios y acorde a los equipos e insumos de laboratorio, brindan una perspectiva positiva para continuar perfeccionando el camino al desarrollo de plántulas haploides de chile.
- Aplicar los pasos: 1) pretratamiento de las anteras, 2) aislamiento de las microesporas mediante gradientes osmóticos de azúcares y 3) utilización de medios de cultivo con las sales minerales de Gamborg B5, para una mejor regeneración de callos embriogénicos a partir del cocultivo de microesporas de chile con ovarios de sorgo.
- Evaluar la utilización de ovarios de sorgo en el cocultivo con microesporas de chile para la regeneración de callos embriogénicos y plántulas haploides de chile.
- Utilizar sales minerales de Gamborg B5 para el cultivo *in vitro* de chile.

### **Regeneración *in vitro* de *Fernaldia pandurata* W.**

- Utilización de segmentos nodales de Loroco para la micropropagación masiva, *in vitro*, de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.)
- Utilizar sales minerales de Murashigue & Skoog (1962) suplementados con los reguladores de crecimiento en estudio para la micropropagación *in vitro* de Loroco según el interés del investigador.
- Evaluar nuevamente y durante el periodo de al menos dos meses las concentraciones de reguladores de crecimiento para la fase de enraizamiento de las plántulas de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.)

## Bibliografía

- Agrawal, RC; Singh, N; Chandra, S. 1983. Characterisation of electro-codeposited films of MAg4I5. *Solid State Ionics*, 9, 1455-1458.
- Arroyo, R; Revilla, MA. 1991. *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Reports*, 10, 414-416.
- Avilés-Viñas, SA; Lecona-Guzmán, CA; Canto-Flick, A.; López-Erosa, S; Santana-Buzzy, N. 2013. Morpho-histological and ultrastructural study on direct somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. in liquid medium. *Plant biotechnology reports*, 7, 277-286.
- Bárány, I; Gonzalez, P; Fadón. B; Mitykót, J; Risueño, M; Testillano, P. 2005. Microspore derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annum* L): subcellular rearrangements through development. *Biol Cell* 97: 709-722.
- Bárány, I; Testillano, PS; Mityko, J; Risueño, MD. 2001. The switch of the microspore developmental program in *Capsicum* involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. *International Journal of Developmental Biology*, 45(S1), S39-S40.
- Bhat, SR ; Chandel, KPS. 1993. *In vitro* conservation of *Musa* germplasm: effects of mannitol and temperature on growth and storage. *Journal of horticultural science*, 68(6), 841-846.
- Bajaj, Y. 1992. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In: *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 12. Haploids in crop improvement I. Springer, Berlin, pp 3–44
- Binzel, M; Sankhla, N; Joshi, S; Sankhla, D. 1996. Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annum* L.) *Plant Cell Reports*. 15: 536-540.
- Buchanan, B; Grussem, W; Jones, R. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD
- Buyukalaca, S; Mavituna, F. 1996. Somatic Embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 46: 227-235.
- Buyukalaca S; Comlekcioglu, N; Abak, K; Ekbic, E; Kilic, N. 2004. Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annum* L.) haploid embryos via anther culture. *Eur J Hort Sci* 69:206–209
- Chaleff RS .1979. Tissue culture in rice improvement: an overview. In: *Innovative approaches to rice breeding*, tnt Rice Res Inst, Los Bafios, pp 81-91

- Chaleff RS; Stolarz, A. 1981. Factors influencing the frequency of callus formation among cultured rice (*Oryza sativa* L.) anthers. *Physiol Plant* 51:201-206
- Chávez, J; Vera, A; Carrillo, J; Heredia, E. 2016. Variación del contenido de minerales en frutos autóctonos de Chile (*Capsicum annuum* L.), cultivadas en invernadero. Medellín, Colombia. Vol. 23. Pp 48-57.
- Chen, CC; Lin, MH. 1976. Induction of rice plantlets from anther culture 99.
- Comlekcioglu, N; Buyukalaka, S; Abak, K. 2001. Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.). In: XIth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of capsicum and eggplant, Antalya, Turkey, pp 133–136
- Cubero, J. 2003. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Madrid: Mundi-Prensa.
- Davies, PJ. 1995. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: Davies, PJ. (Ed). *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp 1-11.
- Davies, PA; Morton, S. 1998. A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density. *Plant Cell Reports*, 17, 206-210.
- Dolcet-Sanjuan, R; Claveria, E; Huerta, A. 1997. Androgénesis en *Capsicum annuum* L. Efecto del enriquecimiento de carbohidratos y dióxido de carbono. *J Am Soc Hortic Sci* 122: 468–475
- Dumas de Vault, R; Chambonnet D; Sibi, M. 1981. Stimulation of in vitro androgenesis in Pepper (*Capsicum annuum* L.) by elevated temperature treatments. C.R. N.S.F.-C.N.R.A. Meeting, Orsay, Juillet 1980, Dr. Earle (Ed.), (sous presse).
- Ercan, N; Sensoy, FA; Sensoy, S. 2006. Influencia de la temporada de crecimiento y la edad de la planta donante en la respuesta del cultivo de anteras de algunos cultivos de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Hortic* 110: 16-20. [doi:10.1016 / j.scienta.2006.06.007](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.06.007)
- Fari, M; Sazsz, A; Mitykó, J; De Melo, NF. 1997. Production of wheat starch based artificial endosperm by gel-sandwich technique and plantlet conservion from isolated zygotic embryos in pepper (*Capsicum annum* Lv. Feherozon).
- Fornaris, GJ. 2005. Carcateristicas de la planta, *Capsicum annum*. Conjunto Tecnológico para la Producción de Pimiento. Universidad de Puerto Rico. Mayagüez.
- Gamborg, OL; Miller, RA; Ojima, K. 1968. Nutrient requeriments of suspensión cultures of soybean root cell. *Exp Cell Res* 50: 151-158.
- García, VA. 1990. Técnicas y procedimientos de citogenética vegetal. Tercera Ed. Editorial Colegio de Posgraduados Montecillos. Edo. De México. México 144pgs.

- George, L; Narayanaswamy, S. 1973. Haploid capsicum through exper- androgénesis mental. *Protoplasma* 78: 467-470. doi:10.1007 / [BF01275781](https://doi.org/10.1007/BF01275781)
- Gémes Juhász, A; Wenceslas, G; Sági, Z; Gajdos, L; Kristóf, Z; Vági, P; Zatykó, L. 2006. Producción de líneas de cría doble haploides en el caso de pimentón, berenjena, pepino, calabacín y cebolla. *Acta Horti* 725: 845–854.
- Giaconi, V; Escaff, M. 1996. Cultivo de hortalizas. Editorial universitaria. Santiago.Chile. 15 pp.
- Gómez, L. 2016. Establecimiento de un protocolo para la inducción de la androgénesis en *Capsicum chinense Jacq.* Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Mérida, Yucatán, México, pp 1-15.
- González-Melendi, P; Testillano, PS; Ahmadian, P; Fadón, B; Risueño, MC. 1996. New *in situ* approaches to study the induction of pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. *European journal of cell biology*, 69(4), 373-386.
- González, M; Estévez, A; Verde, G; More, O; Castillo, J. 2002. Métodos para la determinación de la calidad del polen en especies de papa.
- Gonzalez-Garcia, J. 2002. Plant induction by anther culture of jalapeno pepper (*Capsicum annuum* L.). *Yeast genetics and molecular biology 2002*, University of Wisconsin, Madison, USA,
- Graner, A; Foroughi-Wehr, B; Tekauz, A. 1996. RFLP mapping of a gene in barley conferring resistance to net blotch (*Pyrenophora teres*). *Euphytica*, 91, 229-234.
- Guha, S; Iyer, N; Gutpa, N; Swaminathan, MS. 1970. Totipotency of genetic cells and the production of haploid in rice. *Curr. Sci.* 8:174-176.
- Guha, S. 1973. Genotypic differences in the *in vitro* formation of embryoids from rice pollen. *J. Exp. Botanic.* 24: 139-144.
- Harini, I; Sita, GL. 1993. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, 89(1), 107-112.
- Hurtado, D; Merino, M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas, S.A. de C.V. México, D.F. 232 p
- Husain, S; Jain, A; Kothari, SL. 1999. Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum* L. *Plant cell reports*, 19, 64-68.
- Indrianto, A; Barinova, I; Touraev, A; Heberle-Bors, E. 2001. Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta*, 212, 163-174.
- Jaco, M; Sermeño, J; Rivas, A. 2002. El cultivo de Loroco (*Fernaldia pandurata*) en El Salvador. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA).

- Manual técnico. San Salvador, El Salvador, C.A. p.1-3.
- Janick, J. 1965. Horticultura Científica e Industrial. Ed. Acriba. Zaragoza, España.
- Khan, T; Singh, AK.; Pant, RC. 2006. Regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis in different cultivars of cotton (*Gossypium* spp). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 42(6), 498-501.
- Kim, M; Kim, J; Yoon, M; Choi, DI; Lee, KM. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper. *Plant Cell Tissue Org Cult* 77: 63- 72.
- Koleva-Gudeva, L; Spasenovski, M; Trajkova, F. 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: the effect of incubation treatments and different media. *Sci Hortic* 111:114-119.
- Kothari, SL; Joshi, A; Kachhwaha, S; Ochoa-Alejo, N. 2010. Chilli peppers—a review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology advances*, 28(1), 35-48.
- Kristiansen, K; Andersen, SB. 1993. Efecto de la temperatura de la planta donante, fotoperiodo y edad en la respuesta del cultivo de anteras de *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 67: 105–109. doi:10.1007 / [BF00022732](https://doi.org/10.1007/BF00022732)
- Kuo, JS; Wang, ZZ; Chien, NF; Ku, SJ; Kung, ML; Hsu, HC. 1973. Investigación del cultivo de anteras in vitro de *Nicotiana tabacum* Tierra *Capsicum annuum* L. *Acta Bot Sin* 15: 43–47.
- Lantos, C; Gémes Juhász, A; Somogyi, G; Otvos, K; Vági, P; Mihály, R; Kristóf, Z; Somogyi, N; Pauk, J. 2009. Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co- culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant cell Tissue Org Cult* 97(3): 285-293.
- Lantos, C; Juhász, A; Vági, P; Mihály, R; Kristóf, Z; Pauk, J. 2012. Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Biotechnol Rep* 6: 123-132.
- Lantos, C; Jancsó, M; Pauk, J. 2005. Microspore culture of small grain cereals. *Acta Physiol Plant* 27(4B): 631-639. Doi: 10.1007/s11738-005-0067-6.
- Li, H; Devaux, P. 2001. Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Reports*, 20(6), 475-481.
- Liu, F; Zhao, H; Chen, B; Zhang, YY. 2007. Embryogenesis of microspore derived multicells in *Capsicum annuum* L. *Fen Zi Xi Bao Cheng Wu Xue Bao* 40:371–379.
- Ltifi, A; Wenzel, G. 1994. Anther culture of hot and sweet pepper (*Capsicum annuum* L.): influence of genotype and plant growth temperature. *Capsicum Eggplant Newsl* 13:74–77

- Llorente, BE; Yarte, ME; Larraburu, EE. 2022. Native putatively endophytic bacteria from *Handroanthus impetiginosus* improve its in vitro rooting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 151(2), 265-274.
- Llorente, G; Mejía, M. 2015. Manitol versus Hypertonic saline solution in neuroanesthesia. *Columbian Journal of Anesthesiologi. Rev. Colomb. anesthesiol.* vol.43 supl.1 Bogotá.
- López, C.1990. Fundamentos teórico-práctico del cultivo de tejidos vegetales: Establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estudio FAO producción y protección vegetal. Roma, Italia. p. 9-13.
- Lopez-Puc, G. 2006. Direct Somatic Embriogenesis: A Highly Efficient Protocol for *In vitro* Regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) *HortSciencie* 41(7): 1645-1650.
- Mercy, ST; Zapata, FJ. 1987. Position of anthers at plating and its influence on anther callusing in rice. *Plant cell reports*, 6, 318-319.
- Murashigue, T; Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). 2020. Anuario de Estadísticas Agropecuarias El Salvador 2020-2021. El Salvador.
- Mittykó, J; Andrásfalvy, A; Csilléri, G; Fáy, M. 1995. Respuesta de cultivo de anteras en diferentes genotipos e híbridos F1 de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breed* 114: 78–80. doi:10.1111 / j.1439-0523.
- Narender, S; Kutty, K. 1994. Plant cell and tissue culture. In: Vasil, I y Thorpe, T eds. Meristem and shoot tip culture. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 593 p.
- Navarro, K; Juárez, J; Aleza, P; Pina, JA; Olivares-Fuster, O; Cuenca, J; Julve, JM. 2005. Programa de obtención de híbridos triploides de mandarino en España. *Phytoma*. 170: 36-41.
- Niizeki, H; Oono, K. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proceedings of the Japan Academy*, 44(6), 554-557.
- Ochoa, AN; Moreno, IL. 1990. Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured in vitro. *Scientia Horticulturae*, 42(1-2), 21-28.

- Oono, K. 1975. Production of haploid plants of rice (*Oryza sativa*) by anther culture and their use for breeding. *Bull. Natl. Inst. Agr. Sci. Ser. D* 26: 139-222.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) .2016. Las plantas vitales para la alimentación humana se enfrentan a la amenaza creciente de plagas y enfermedades. <http://www.fao.org/news/story/es/item/409205/icode/>
- Pauk, J; Mihály, R; Puolimatka, M. 2003. Protocol for wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Doubled haploid production in crop plants: a manual*, 59-64.
- Pierik, R. 1990. Rejuvenation and micropropagation. In *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology: Proceedings of the VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*, Amsterdam, The Netherlands, 24–29 June 1990 (pp. 91-101). Springer Netherlands.
- Powell, W.1990. Environmental and genetical aspects of pollen embryogenesis. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 12. Haploids in crop improvement I. Springer, Berlin, pp 45–46
- Qin, X; Rotino, GL. 1993. Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. *Capsicum Eggplant Newsl* 12:59–62
- Quintanilla-Moreno, AM. 2003. Establecimiento *in vitro* de loroco (*Fernaldia pandurata* Woodson). Laboratorio de Biotecnología, Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA-MAG). La Libertad, El Salvador, C.A.
- Regner, F. 1996. Anther and microspore culture in *Capsicum*. In *In Vitro Haploid Production in Higher Plants: Volume 3—Important Selected Plants*, 77-89.
- Roca, WM; Escobar R; Mafla G. 1994. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. CIAT, Cali
- Rodeva, V. 2001. *In vitro* regeneration in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Sci Works Agricult Univ Plovdiv* 3:211–214.
- Rodeva, V; Irikova, T; Todorova, V. 2004. Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): comparative study on effect of the genotype. *Biotechnol Biotechnol Equip* 3:34–38
- Reynolds, TL. 1997. Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 33: 1-10.
- Santana- Buzzy, N. 2005. Regeneration of Habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) Via Organogenesis. *HortSciencie* 40(6): 1829-1831.
- Seguí-Simarro, JM. 2010. Androgenesis revisited. *The Botanical Review*, 76: 377-404.
- Shivanna, KR. 2003. *Pollen biology and biotechnology*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire.

- Sibi, M; Dumas de Vault, R; Chambonnet, D. 1979. Obtención de andrógenos en el campo de la materia orgánica (*Capsicum annuum* L.). *Ann Amclior Plantas* 29: 583–606.
- Steinitz, B; Kusek, M; Tabib, Y; Paran, I; Zelcer, A. 2003. Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In vitro Celular Development Biology Plant*, 39: 296-303.
- Stöger, E; Fink, C; Pfosser, M; Heberle-Bors, E. 1995. Plant transformation by particle bombardment of embryogenic pollen. *Plant cell reports*, 14, 273-278.
- Supena, E. D. J., & Custers, J. B. M. (2011). Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, 130(4), 769-774.
- Szász, A; Nervo, G; Fári, M. 1995. Screening for in vitro shoot-forming capacity of seedling explants in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient plant regeneration using thidiazuron. *Plant cell reports*, 14, 666-669.
- Taylor, PJ; Dukin S. 1993. Development of an in vitro culture technique for conservation of *Saccharum* ssp. hybrid germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34: 217-222
- Toledo, J; Golmirzaie A. 1998. Conservación in vitro de *Solanum spp* bajo condiciones de estrés osmótico y ambiental. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. Libro de Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO 98. Junio/1-5. Palacio de Convenciones. Habana. Cuba.
- Tulecke, WR. 1953. A tissue derived from the pollen of *Ginkgo biloba*. *Science*, 117(3048), 599-600.
- Vasil, I; Torpe, T. 1994. *Plant Cell And Tissue Culture*. Klumer Academic Publisher The Netherlands. 587 p.
- Wang, YY; Sun, CS; Wang, CC; Chien, NF. 1973. La inducción de la plántulas de polen de *triticale* y *Capsicum annuum* de cultivo de anteras. *Scientia Sin Vol. XVI* 1: 147-151.
- Wang, LH; Zhang, BX .2001. Advancement in the anther culture of *Capsicum annuum* L. *China Veg* 3:52–53
- Yamada, Y; Shibuya, I; Hoshino, S. 1963. Phase transition in  $\text{NaNO}_2$ . *Journal of the Physical Society of Japan*, 18(11), 1594-1603.
- Zapata- Castillo, P. 2007. Somatic Embryogenesis in Habanero pepper (*C. cinense* Jacq.) from Cell Suspensions. *HortSciencie* 42(2): 329-333.

## ANEXOS

Cuadro A-1. Prueba de normalidad para la variable número de hojas, con un nivel de significancia del 0.01 % y grados de libertad 36.

		Pruebas de normalidad					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
número de hojas	Tratamientos utilizados	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
	bap 0, kin 0, ana 0	.222	36	.000	.914	36	.009
	bap 1, kin 0, ana 0	.150	36	.041	.950	36	.103
	bap 1, kin 1, ana 0	.180	36	.005	.895	36	.002
	bap 1, kin 0, ana 0.5	.177	36	.006	.964	36	.279
	bap 3, kin 0, ana 0	.159	36	.022	.931	36	.026
	bap 3, kin 1, ana 0	.133	36	.110	.947	36	.083
	bap 3, kin 0, ana 0.5	.226	36	.000	.863	36	.000
	bap 0, kin 1, ana 0	.208	36	.000	.895	36	.003
	bap 0, kin 5, ana 0	.141	36	.068	.959	36	.195

a. Corrección de significación de Lilliefors

Cuadro A-2. Prueba de normalidad para la variable número de raíces, con un nivel de significancia del 0.01 % y grados de libertad 36.

		Pruebas de normalidad					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
número de raíces	Tratamientos utilizados	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
	bap 0, kin 0, ana 0	.327	36	.000	.746	36	.000
	bap 1, kin 0, ana 0	.	36	.	.	36	.
	bap 1, kin 1, ana 0	.	36	.	.	36	.
	bap 1, kin 0, ana 0.5	.	36	.	.	36	.
	bap 3, kin 0, ana 0	.	36	.	.	36	.
	bap 3, kin 1, ana 0	.	36	.	.	36	.
	bap 3, kin 0, ana 0.5	.	36	.	.	36	.
	bap 0, kin 1, ana 0	.	36	.	.	36	.
	bap 0, kin 5, ana 0	.	36	.	.	36	.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Cuadro A-3. Prueba de normalidad para la variable formación de callos, con un nivel de significancia del 0.01 % y grados de libertad 36.

		Pruebas de normalidad					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
Tratamientos utilizados	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
formación de callo	bap 0, kin 0, ana 0	.	36	.	.	36	.
	bap 1, kin 0, ana 0	.534	36	.000	.312	36	.000
	bap 1, kin 1, ana 0	.538	36	.000	.158	36	.000
	bap 1, kin 0, ana 0.5	.465	36	.000	.540	36	.000
	bap 3, kin 0, ana 0	.515	36	.000	.412	36	.000
	bap 3, kin 1, ana 0	.352	36	.000	.636	36	.000
	bap 3, kin 0, ana 0.5	.480	36	.000	.507	36	.000
	bap 0, kin 1, ana 0	.	36	.	.	36	.
	bap 0, kin 5, ana 0	.	36	.	.	36	.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Cuadro A-4. Prueba de normalidad para la variable número de brotes, con un nivel de significancia del 0.01 % y grados de libertad 36.

		Pruebas de normalidad					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
Tratamientos utilizados	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
número de brotes	bap 0, kin 0, ana 0	.465	36	.000	.540	36	.000
	bap 1, kin 0, ana 0	.170	36	.010	.959	36	.194
	bap 1, kin 1, ana 0	.278	36	.000	.877	36	.001
	bap 1, kin 0, ana 0.5	.239	36	.000	.897	36	.003
	bap 3, kin 0, ana 0	.173	36	.008	.963	36	.257
	bap 3, kin 1, ana 0	.169	36	.011	.892	36	.002
	bap 3, kin 0, ana 0.5	.279	36	.000	.822	36	.000
	bap 0, kin 1, ana 0	.534	36	.000	.312	36	.000
	bap 0, kin 5, ana 0	.342	36	.000	.704	36	.000

a. Corrección de significación de Lilliefors

Cuadro A-5. Análisis de Varianza para cada variable. Según el valor p (sig.) siendo menor a 0.01 se acepta la existencia de diferencias estadísticas entre las medias de cada tratamiento sobre las variables en estudio.

		<b>ANOVA</b>				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
número de brotes	Entre grupos	613.611	8	76.701	38.161	.000
	Dentro de grupos	633.139	315	2.010		
	Total	1246.750	323			
número de raíces	Entre grupos	11.951	8	1.494	25.359	.000
	Dentro de grupos	18.556	315	.059		
	Total	30.506	323			
número de hojas	Entre grupos	929.444	8	116.181	11.634	.000
	Dentro de grupos	3145.556	315	9.986		
	Total	4075.000	323			
formación de callo	Entre grupos	141.500	8	17.688	161.495	.000
	Dentro de grupos	34.500	315	.110		
	Total	176.000	323			