

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

**MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO
DE PLANTAS**



**“INDUCCIÓN DE CALLOS MEDIANTE EL CULTIVO *in vitro* DE
ANTERAS Y OVARIOS DE KIWICHA (*Amaranthus caudatus* L.)”**

Presentada por:

IRINA MABELL PORRAS MIJA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE EN
MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS**

Lima – Perú

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

**MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENETICO DE
PLANTAS**

**“INDUCCIÓN DE CALLOS MEDIANTE EL CULTIVO *in vitro* DE
ANTERAS Y OVARIOS DE KIWICHA (*Amaranthus caudatus* L.)”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

IRINA MABELL PORRAS MIJA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dr. Raúl Blas Sevillano

PRESIDENTE

Dr. Jorge Jiménez Dávalos

PATROCINADOR

Dr. Félix Camarena Mayta

MIEMBRO

Mg. Sc. Lourdes Tapia y Figueroa

MIEMBRO

DEDICATORIA

- A Dios por ser guía y brindarme bendiciones y perseverancia.
- A mi padre José Ángel, a quien admiro cada día más, por ser mi modelo de superación
- A mi madre Amelia, por su ejemplo de vida y ofrecerme siempre lo mejor
- A mi hija Ariana, mi principal motivación, tu amor me impulsa a esforzarme siempre
- A mi compañero Percy por su amor y apoyo incondicional incluso en los momentos más tormentosos creíste que lo podría lograr, gracias por motivarme.
- A mis hermanos Arturo, Fiorella † y Miluzka, mis sobrinas y a toda mi familia gracias

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Jiménez Dávalos, patrocinador de la presente tesis, por su amistad, apoyo y asesoría en la realización de la presente investigación.

A mis profesores de la maestría, por la formación científica, mención especial al Mg. Sc. Jorge Nakahodo† donde esté, gracias por sus enseñanzas.

A mis amigos y personal del Programa de Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina, a Liz García, Ángel Vera, Yoni Callohuari, Sandra Chiri, Jonathan Ormeño, Michelle Chirinos, Fiorella Sota, en especial Maribel Fernández y Sra. Ruth Paucar gracias por su apoyo, hospitalidad y amistad.

A la Escuela de Posgrado por financiarme en parte los estudios de maestría y la presente tesis.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Generalidades.....	3
2.2.1. Origen y Distribución geográfica.....	3
2.1.2. Clasificación Taxonómica.....	4
2.1.3. Botánica y descripción de la planta	4
2.1.4. Fisiología.....	5
2.1.5. Composición química.....	6
2.2. Producción de dobles haploides.....	6
2.2.1. APLICACIONES DE DOBLES HAPLOIDES.....	7
2.2.2. Técnicas para la obtención de plantas haploides.....	8
2.2.3. Cultivo in vitro de anteras y ovarios para la producción de haploides.....	11
2.2.4. Investigaciones en haploides y cultivo de anteras y ovarios.....	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Ubicación del experimento.....	16
3.2. Material Genético.....	16
3.3. Material de Laboratorio	16
3.3.1. Material de Vidrio.....	16
3.3.2. Material de Plástico.....	17
3.3.3. Equipo.....	17
3.3.4. Productos químicos.....	17
3.3.5. Otros.....	19
3.4. Fase de campo.....	19
3.4.2. Preparación de camas de propagación.....	19
3.4.3. Siembra.....	20
3.4.4. Riegos.....	20
3.4.5. Deshierbo y raleo.....	21
3.4.6. Control fitosanitario.....	21
3.5. Fase de laboratorio.....	21

3.5.1. Evaluación del desarrollo de las plantas donadoras.....	21
3.5.2. Formulación de los medios de cultivo	22
3.5.3. Desinfección de las inflorescencias.....	24
3.5.4. Inducción de callos o embrioides.....	25
3.5.5. Regeneración a partir de callos o embrioides.....	26
3.6. Análisis de datos.....	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	32
4.1. Momento de colección de inflorescencias.....	32
4.2. Método de desinfección.....	35
4.3. Inducción de callos.....	37
4.3.1. Efecto del medio basal.....	37
4.3.2. Efecto de los reguladores de crecimiento.....	39
4.3.3. Efecto del tipo de explante.....	40
4.3.4. Efecto de la interacción del medio basal, tratamiento hormonal y tipo de explante.....	43
4.4. Embriogénesis gamética indirecta.....	46
4.5. Regeneración	50
4.5.1. Formación de brotes.....	50
4.5.2. Formación de raíces	52
4.5.3. Regeneración de brotes verdes.....	56
V. CONCLUSIONES.....	58
VI. RECOMENDACIONES.....	59
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
VIII. ANEXOS.....	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Composición de los medios de cultivo basales utilizados para el cultivo <i>in vitro</i> kiwicha.....	23
Cuadro 2: Tratamientos de desinfección de inflorescencias para su introducción al cultivo <i>in vitro</i>	24
Cuadro 3: Tratamientos de inducción de callos o embrioides.....	26
Cuadro 4: Tratamientos de Regeneración con medio basal MS con diferentes concentraciones de sucrosa y hormonas.....	27
Cuadro 5: Tratamientos de Regeneración con medio N6, diferentes concentraciones de sucrosa y hormonas.....	28
Cuadro 6: Tratamientos de regeneración con medio N6, diferentes concentraciones de adenina, arginina y ácido pantoténico.....	28
Cuadro 7: Tratamientos de regeneración con medio N6 diferentes concentraciones de IBA, ABA y zeatina.....	29
Cuadro 8: Respuesta de los tres tipos de anteras, ovarios y co cultivo de anteras con ovarios de kiwicha en la inducción de callos.....	40
Cuadro 9: Medios de cultivo seleccionados para la evaluación de porcentaje de embrioides formados.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Morfología de <i>Amaranthus caudatus</i>	5
Figura 2: Métodos para la obtención de dobles haploides.....	10
Figura 3: Desarrollo de las plantas donadoras.....	20
Figura 4: Colecta de inflorescencias de kiwicha para la introducción al cultivo in vitro de anteras.	22
Figura 5: Procedimiento para la desinfección de inflorescencias.....	25
Figura 6: Explantes tomados a partir de la flor hermafrodita.....	26
Figura 7: Placas petri con el medio MS para la regeneración de las plántulas.....	27
Figura 8: Desarrollo del polen de kiwicha (<i>Amaranthus caudatus</i>).....	33
Figura 9: Tipos de flores de kiwicha.....	33
Figura 10: Momento de colección de las inflorescencias.....	34
Figura 11: Respuesta a los tratamientos de desinfección.....	35
Figura 12: Efecto del tiempo de exposición en lejía comercial en la tasa de contaminación de los explantes.....	36
Figura 13: Efecto de la concentración de lejía comercial en la tasa de contaminación de los explantes.....	36
Figura 14: Efecto de los tratamientos de desinfección (interacción de la concentración y tiempo de exposición de lejía comercial en la tasa de contaminación de los tres tipos de explantes.....	37
Figura 15: Efecto de medios basales N6 y NN en la tasa de inducción de callos.....	38
Figura 16: Efecto de los tratamientos hormonales en la tasa de inducción de callos.....	39
Figura 17: Respuesta de los tres tipos de explantes: anteras, ovarios, co-cultivo de antera con ovario de kiwicha en la inducción de callos.....	41
Figura 18: Cambios morfológicos de los tres tipos de explantes durante su permanencia en el medio de cultivo N6'3 para la inducción de callos.....	42
Figura 19: Placa Petri con cuatro callos embriogénicos color crema utilizando como explante ovarios en el medio basal N6 con el tratamiento hormonal t3 (2 mg/L BAP, 1.5 mg/L ANA y 0.5 mg/L 2,4-D).....	42
Figura 20: Efecto de los tratamientos de inducción (interacción del medio	

basal y tratamiento hormonal) en la tasa de inducción de callos de los tres tipos de explantes.....	43
Figura 21: Efecto de los tratamientos de inducción (interacción del medio basal y tratamiento hormonal) en la tasa de inducción de callos utilizando como explante las anteras.....	44
Figura 22: Efecto de los tratamientos de inducción (interacción del medio basal y tratamiento hormonal) en la tasa de inducción de callos utilizando como explante los ovarios.	45
Figura 23: Efecto de los tratamientos de inducción (interacción del medio basal y tratamiento hormonal) en la tasa de inducción de callos utilizando como explante el co-cultivo de anteras con ovarios.....	46
Figura 24: Embriogénesis en <i>Amaranthus caudatus</i>	47
Figura 25: Efecto de veinte medios de cultivo en la formación de embriones gaméticos.....	49
Figura 26: Embriones gaméticos con brotes.....	51
Figura 27: Efecto de los tratamientos de regeneración en la tasa de formación de brotes.....	51
Figura 28: Raíces formadas a partir de callos embrigenéticos sin la formación del área caulinar.....	52
Figura 29: Efecto de los tratamientos de regeneración en la formación de raíces.....	53
Figura 30: Coloración de callos.....	54
Figura 31: Embriones gaméticos observados en el tratamiento t3 con medio basal MS y las hormonas KIN y 2,4-D (0.2 y 1 mg/L respectivamente) luego de 96 días desde la siembra a partir de antera y co-cultivo.....	55
Figura 32: Evolución del color de los callos en el tiempo colocados en diferentes medios de regeneración.....	55
Figura 33: Regeneración de plantas verdes en el medio MS1 con las hormonas IAA y KIN (0.5 mg/L).....	56

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Código decimal desarrollado por Darwinkel, A, y Stolen, O. para quinua y kiwicha.....	66
Anexo 2: ANVA de la influencia del tipo de explante, tiempo exposición y concentración de lejía comercial en el porcentaje de contaminación (etapa de desinfección).....	67
Anexo 3: Análisis factorial de la influencia del tipo de explante, tiempo exposición y concentración de lejía comercial en el porcentaje de contaminación (etapa de desinfección).....	67
Anexo 4: ANVA de la influencia del tipo de explante, medio basal y tratamiento hormonal en el porcentaje de inducción de callos.....	67
Anexo 5: Análisis factorial de la influencia del tipo de explante, medio basal y tratamiento hormonal en el porcentaje de inducción de callos.....	68
Anexo 6: ANVA de la influencia los medios de cultivo en el porcentaje de formación de embrioides	68
Anexo 7: ANVA de la influencia los medios de cultivo en el porcentaje de formación de brotes.....	68
Anexo 8: ANVA de la influencia los medios de cultivo en el porcentaje de formación de raíces.....	69
Anexo 9: Cuadro para la caracterización de color de los callos embriogénicos.....	69

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la inducción de callos haploides a partir del cultivo *in vitro* de anteras y ovarios de kiwicha (*Amaranthus caudatus* L) variedad Centenario. Se evaluó la respuesta al cultivo *in vitro* de anteras, ovario, co-cultivo de anteras con ovarios en medios de cultivo para la inducción y regeneración, reguladores de crecimiento, sucrosa; además se evaluó la desinfección y el momento oportuno para la colecta de inflorescencias. El porcentaje de inducción de callos fue significativamente mayor con el medio basal N6 y la combinación hormonal de 2 mg/L BAP, 1.5 mg/L ANA y 0.5 mg/L 2,4-D, obteniéndose 7.2% en anteras, 79.2% en ovarios y 95.8% en co-cultivo, a los 15 días después de colocar el explante en el medio de cultivo. La formación de callos fue significativamente mayor en el co-cultivo de anteras con ovarios en kiwicha. En la etapa de regeneración se evaluaron 47 medios obteniendo callos embriogénicos de colores crema, amarillo y verde, también se observó anomalías en la regeneración como brotes solo con un eje caulinar o radicular. El método de desinfección más eficiente fue realizado con alcohol al 96% durante 1 min, seguido por lejía comercial disuelta al 25% durante 5 min. El estado óptimo de las microsporas es el uninucleado obtenido al inicio de piramidación de flores a los 90 a 100 días después de la siembra. El medio N6 solidificado con agar, con 50 g/L sucrosa, 0.5 mg/L de AIA y 0.9 mg/L de KIN produjo la mayor respuesta embriogénica (325 %). El medio MS con 30 g/L sucrosa, 0.5 mg/L de AIA y 0.5 mg/L de KIN fue el óptimo para la regeneración de brotes verdes. En conclusión, se estableció el primer protocolo de cultivo *in vitro* de anteras y ovarios de kiwicha con la inducción de callos haploides a partir del cultivo *in vitro* de anteras y ovarios.

Palabras clave: *Amaranthus caudatus*, dobles haploides, anteras, ovario, co-cultivo.

ABSTRACT

The objective of the current work was to evaluate haploid calli induction in *in vitro* anther/ovary culture conditions from kiwicha (*Amaranthus caudatus* L) Centenario variety. Responses to *in vitro* cultures of anthers, ovaries and co-culture of anthers with ovaries were evaluated by induction and regeneration, including growth regulators and sucrose. Other evaluation were related to a disinfection method and appropriate development moment of inflorescences with uninucleate microspores. Results showed that percentage of calli induction was significant higher at 15 days after placing the explant in the basal N6 culture medium and the hormonal combination of 2 mg/L BAP, 1.5 mg/L ANA and 0.5 mg/L 2,4-D, obtaining 7.2% in anthers, 79.2% in ovaries and 95.8% in co-culture. Callus formation was significantly greater in the co-culture of anthers with ovaries compared to others. In the regeneration stage, 47 culture media were evaluated and as result was obtained embryogenic calli of different colors (cream, yellow and green colors), also some abnormalities were observed such as shoots with a single caulinar or radicular axis. The most efficient disinfection method was performed with 96% alcohol for one minute followed by a 25% commercial bleach (sodium hypochlorite) for five minutes. The uninucleate state of the microspores was obtained at the beginning of flower pyramidation at 90 to 100 days after sowing. The N6 medium solidified with agar, with 50 g/L sucrose, 0.5 mg/L of IAA and 0.9 mg/L of KIN produced the highest embryogenic response (325 %). The MS medium with 30 g/L sucrose, 0.5 mg/L of IAA and 0.5 mg/L of KIN was the optimum for the green shoot regeneration. In conclusion, a first protocol of *in vitro* anthers and ovaries culture from kiwicha was established after the induction of haploid calluses.

Keywords: *Amaranthus caudatus*, double haploids, anthers, ovary, co-culture.

I. INTRODUCCIÓN

Amaranthus caudatus L; conocida como amaranto o kiwicha es una dicotiledónea C4, pseudocereal que ha sido identificada como un cultivo alimentario muy prometedor, debido a su excepcional valor nutritivo por su contenido de proteínas, lípidos y minerales. Una de las características más importantes del grano de amaranto es que su contenido de proteínas de almacenamiento es más alto y mejor balanceado en aminoácidos esenciales que el de los cereales (National Research Council 1984), propiedades nutricionales interesantes como alto contenido de calcio y proteína rico en lisina y ausencia de gluten (Gelinas y Seguin 2007), estas cualidades permiten que la kiwicha pueda ser utilizada en la industria pastelera (Zhu *et al.* 2008), además este grano posee polifenoles con capacidad antioxidante a los cuales se les atribuye propiedades para prevenir numerosas enfermedades crónicas como diabetes, cáncer, cardiovasculares, malaria, entre otras (Peter y Gandhi 2017) por lo que este cultivo ofrece la posibilidad de mejorar la alimentación y salud humana.

Sin embargo, existen pocas variedades comerciales en el mercado, el programa de mejoramiento es de vital importancia para la producción de líneas puras y luego nuevas variedades de kiwicha. Los métodos convencionales de mejoramiento requieren numerosas ciclos de autopolinización para alcanzar niveles prácticos de homocigosidad absoluta y no se alcanza para todos los caracteres. Las líneas dobles haploides son comúnmente usadas en mejoramiento de plantas para obtener genotipos completamente homocigotos de progenitores heterocigotos en una sola generación, los que puede usarse directamente para la producción de nuevas variedades. Este sistema proporciona dos ventajas importantes: la reducción del ciclo de mejoramiento y el incremento de la eficiencia de selección (Coronel 2000).

La obtención de líneas dobles haploides es importante en muchos programas de mejoramiento de especies cultivadas, sin embargo, el uso de la tecnología de cultivo de anteras/microsporas es limitada por el bajo porcentaje de regeneración de plantas verdes y alto porcentaje de regeneración de plántulas albinas; existiendo dependencia genotípica, es

decir hay diferencia en la respuesta de cada genotipo (Dwivedi *et al.* 2015; Wojnarowicz *et al.* 2004).

A la fecha no existe una metodología para la producción de líneas dobles haploides en *Amaranthus caudatus* L; siendo necesario desarrollar el protocolo adecuado que permita la obtención de líneas en corto tiempo. El presente trabajo es el primer reporte del cultivo *in vitro* de anteras, ovarios y su co-cultivo de kiwicha y servirá para el inicio de un programa de mejoramiento de este cultivo.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la inducción de callos haploides a partir del cultivo *in vitro* de anteras y ovarios de kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.)

Objetivos específicos

- Determinar el estado fenológico óptimo para la colección de las inflorescencias con microsporas uninucleadas, que permita la mayor inducción de callos o embroides.
- Determinar el método de desinfección apropiado para las inflorescencias de kiwicha
- Determinar el medio óptimo para la inducción de callos a partir del cultivo *in vitro* de anteras, ovarios y co-cultivo de kiwicha.
- Determinar el efecto del co-cultivo en la inducción de la callogenesis.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades

2.1.1. Origen y Distribución geográfica

El amaranto de grano se domesticó en América hace más de 4000 años por las culturas precolombinas y de allí posiblemente se difundió a otras partes del mundo. Fue cultivada y utilizada junto al maíz, frijol y calabaza por los aztecas en el valle de México, por los mayas en Guatemala y por los Incas en Sudamérica tanto en Perú, Bolivia como Ecuador junto a la papa, maíz y quinua. Los amarantos como verdura de hoja fueron utilizados en América y en otras partes del mundo desde la prehistoria en casi todo el mundo incluso desde mucho antes de su domesticación como lo demuestran las excavaciones arqueológicas (Mujica y Berti 1997).

El género *Amaranthus* contiene más de 70 especies, de las cuales la mayoría son nativas de América y solo 15 especies provienen de Europa, Asia, África y Australia. Las tres especies *A. cruentus*, *A. caudatus* y *A. hypochondriacus* se utilizan actualmente en la producción de grano. En tiempos precolombinos *A. cruentus* se encontraba desde el Norte de México hasta América Central, *A. hypochondriacus* compartía su distribución con *A. cruentus* solo que esta comenzaba en el sudoeste de Estados Unidos y a diferencia de las otras dos especies, la distribución de *A. caudatus* se encontraba distribuida en la zona andina sudamericana.

Análisis filogenéticos de amaranto silvestre y cultivado muestran una agrupación de estas especies por su origen geográfico de América del Sur y Central, pero no se diferenciaron de acuerdo con la asignación de especies. Diferentes poblaciones geográficamente separadas de *Amaranthus hybridus* parecen ser los antepasados comunes de las tres especies de grano cultivado y *A. quitensis* podría estar implicado adicionalmente en la evolución del *A. caudatus*. Las mediciones del tamaño de genoma indican que los eventos de poliploidización son muy raros en este género y *A. caudatus* posee ~502 Mbp en sus 32 cromosomas (Stetter y Schmid 2017).

2.1.2. Clasificación Taxonómica

Según (Mujica y Berti 1997)

División: Fanerógamas

Clase: Dicotiledoneae

Orden: Centrospermales

Familia: *Amaranthaceae*

Género: *Amaranthus*

Especie: *Amaranthus caudatus* L.

Según (APG 2016)

Clado : Superasteride

Orden: Caryophyllales

Familia: *Amaranthaceae*

Género: *Amaranthus*

Especie: *Amaranthus caudatus* L.

Denominaciones y nombres vulgares: amaranto (español), amaranth (inglés), kiwicha (Cuzco), achita (Ayacucho), coyo (Cajamarca), achis (Huaraz), coimi, millmi, inca pachaqui o grano inca (Bolivia), sangorache, ataco, quinua de castilla (Ecuador), alegría y huanthi (México), rejgira, ramdana, eeerai (India).

2.1.3. Botánica y descripción de la planta

El amaranto es una especie anual, herbácea o arbustiva de diversos colores que van del verde al morado o púrpura con distintas coloraciones intermedias. La raíz es pivotante con ramificaciones laterales y abundantes raicillas delgadas. La inflorescencia son panojas amarantiformes o glomeruladas muy vistosas, terminales o axilares, que pueden variar de totalmente erectas, semierectas, laxas y decumbentes, con colores que van del amarillo, anaranjado, café, rojo, rosado hasta el púrpura; el tamaño varía de 0.5-0.9 m pudiendo presentar diversas formas incluso figuras caprichosas y muy elegantes (Figura 1). Presentan flores hermafroditas y unisexuales (estaminadas o pistiladas). En cada glomérulo existe una flor estaminada terminal y varias flores pistiladas; las flores masculinas tienen cinco estambres con filamentos delgados y alargados que terminan en anteras que se abren en dos

sacos. Las flores femeninas tienen un ovario súpero, un ovulo y tres ramas estigmáticas. El fruto es pixidio, semillas pequeñas de 1 a 1.5 mm de diámetro. Las plantas por el tipo de polinización son predominantemente autógamas, variando el porcentaje de polinización cruzada con los cultivares (Mujica y Berti 1997).



Figura 1: Inflorescencia de *Amaranthus caudatus*. A la izquierda: inflorescencia en panoja. A la derecha de arriba hacia abajo: Glómérulo con dos flores pistiladas (femenina) y una central estaminada (masculina); flor hermafrodita con cinco estambres y un pistilo; flor unisexual masculina y femenina.

2.1.4. Fisiología

Los amarantos son un grupo de plantas que tienen su fotosíntesis por la vía especializada C4, reaccionan mejor que las plantas C3 bajo condiciones adversas cuando la planta está bajo estrés ambiental (como sequía o salinidad). Estas plantas reducen el número de estomas

abiertas y así se disminuye la pérdida de agua por transpiración. La gran habilidad para fotosintetizar en altos rangos a temperaturas altas es otra ventaja fisiológica de la fotosíntesis C₄, investigaciones en *Amaranthus caudatus* cv *edulis* mostró alta actividad fotosintética a los 40°C (National Research Council 1984).

2.1.5. Composición química

El género *Amaranthus* posee un contenido de proteínas de almacenamiento más alto y aminoácidos esenciales mejor balanceado comparado con los cereales tiene elevados niveles de lisina y aminoácidos azufrados (metionina y cistina), alto contenido de calcio y ausencia de gluten (Gelinas y Seguin 2007), lo cual resulta de suma importancia desde el punto de vista nutricional (National Research Council 1984).

Las proteínas de almacenamiento más importantes en amaranto son albúminas y globulinas, que representan entre 60 y 70 por ciento del nitrógeno proteínico total en el grano, y las glutelinas, que se hallan en menor porcentaje. La proteína de 35 kDa aislada de la albúmina de *Amaranthus caudatus* es una proteína específica de la semilla, rica en lisina, con una composición en aminoácidos balanceada comparable a lo recomendado por la FAO/OMS y adecuada para la nutrición humana (Villanueva y Arnao 2007).

Según (Bruni *et al.* 2001) las semillas de *A. caudatus* poseen un contenido similar de ácidos grasos y esteroides en muestras ecuatorianas e italianas, además el nivel de tocoferoles fue más alto en las muestras ecuatorianas analizadas.

Estudios previos muestran que diferentes betalainas de plantas en la familia Amaranthaceae posee capacidad antioxidante (Zhu *et al.* 2008), además este cultivo posee otros polifenoles como rutina, quercitina, isoquercitina, ácidos fenólicos e hidroxicinámicos con propiedades antioxidantes y provee protección en contra de enfermedades crónicas (Peter y Gandhi 2017).

2.2. Producción de dobles haploides

Los haploides son plantas esporofíticas que poseen un número gamético de cromosomas (n), son estériles por lo que es necesario el doblaje cromosómico (espontáneo o químico) para la producción y utilización de haploides como plantas doble haploide (2n) las cuales son fértiles (Ferrie 2017).

La producción de líneas dobles haploides es comúnmente usada en mejoramiento de plantas para fijar caracteres y obtener líneas puras en el menor tiempo posible (Maluszynski *et al.* 2001). El objetivo ideal es duplicar el número de cromosomas de una sola célula haploide y regenerar una planta a partir de ella, esto podría proporcionar plantas regeneradas que serán dobles haploides completamente fértiles. En estudios de mutación y transformación genética la duplicación de la célula haploide en la fase G1 del ciclo celular después de la mutación o inserción de genes se ha producido con el fin de obtener nuevas plantas homocigotos para el nuevo gen o alelo. El enfoque de duplicar los cromosomas también depende de los métodos utilizados para producir haploides; con el cultivo de anteras y microsporas aisladas, duplicar puede ser factible en la primera división mitótica del polen de la microspora obteniendo plantas que son completamente duplicadas y fértiles (Kasha 2005).

2.2.1 Aplicaciones de dobles haploides

La generación de dobles haploides tiene gran importancia en el mejoramiento genético de plantas porque tiene numerosas aplicaciones como:

- La eliminación de numerosos ciclos de autopolinización necesarios para alcanzar niveles prácticos de homocigosidad absoluta para todos los caracteres, no es alcanzable mediante métodos convencionales de mejoramiento (Dunwell 2010).
- Permite usar directamente la planta de características haploides, a través de la variación gametoclonal (ejemplo patrones de injertos enanizantes).
- Permite hallar caracteres genéticos que pueden estar enmascarados en cruzamientos normales, dada la incompatibilidad que se presenta en algunas especies.
- Elimina automáticamente de genes letales, deletéreos o simplemente, caracteres no convenientes, de manera análoga a los homocigotos en el caso de líneas puras, pues en un haploide los recesivos no están encubiertos por los dominantes.
- Permite diploidizar tejidos o partes de la planta, obteniendo homocigotos diploides, con lo cual se pueden seleccionar directamente pares de genes dominantes o recesivos en una sola generación, haciendo posible emplear este material en cruzamientos posteriores.
- Permite realizar mutaciones en células haploides, con lo cual se puede generar diversos materiales con propiedades de importancia genética (Camarena *et al.* 2008).

- Detecta uniones e interacciones entre genes, estima la variancia genética y el número de genes para característica cuantitativas, produce translocaciones y sustituciones genéticas y adiciona cromosomas; facilita los estudios de transformaciones genéticas y mutaciones (Shariatpanahi *et al.* 2006).
- Facilitan el estudio en genética molecular y genómica en plantas, así como mapeo genético, análisis de QTL, selección asistida por marcadores moleculares, aislamiento génico y clonación (Li y Devaux 2005).
- El cultivo de células haploides tiene grandes aplicaciones debido a que puede ser modificado genéticamente antes de inducir de nuevo su diploidización por métodos químicos (tratamiento por colchicina). El resultado es la generación de plantas dihaploides (diploides homocigotas) que expresan un solo alelo para todas sus características y que son de enorme valor para los programas de fitomejoramiento (Camarena *et al.* 2008).

2.2.2. Técnicas para la obtención de plantas haploides

Se ha reportado en más de 100 especies vegetales tanto angiospermas como gimnospermas la aparición de haploides en forma natural, cuyo mecanismo de haploidización es desconocido y de baja frecuencia. Por lo cual para la mejora genética de plantas se han utilizado numerosos métodos para inducir la embriogénesis haploide (Figura 2), siendo la eliminación cromosómica, androgénesis, ginogénesis y partenogénesis los cuatro métodos los más eficientes para la producción de dobles haploides (Ferrie 2017). La androgénesis por el cultivo de anteras, gameto masculino, es el procedimiento más habitual, sin embargo según lo menciona (Callohuari 2013), existen otros métodos los cuales se resumen a continuación:

- a. Método Bulbosum (hibridación interespecífica), muy usado en el cultivo de cebada, después de polinizar a *Hordeum vulgare* con *Hordeum bulbosum* silvestre, ocurre un desarrollo anormal de embriones que conduce a la eliminación de los cromosomas de *H. bulbosum* (Kasha y Kao 1970) también se ha realizado esta metodología por hibridación intergenérica, los dos tipos de hibridización han sido aplicados en otros géneros como *Solanum*, *Medicago*, *Trifolium*, *Raphanus*, *Brassica*, *Rosaceae*, *Avena*.

- b. Partenogénesis, es la producción de semillas sin fertilización, puede ser inducido por inactivación del polen antes de la polinización a través de tratamientos físicos (calor), químicos (azul de tolueno) o agentes irradiantes (Ferrie 2017). Por ejemplo la polinización con polen extraño (alfalfa, trigo, con polen de maíz o sorgo) o irradiado (peral, rosa).
- c. Por castración y aislamiento o polinización retrasada hasta el límite de receptividad (maíz).
- d. Por cultivo de óvulos no fecundados o de otras células de ovario (Lentini, Martínez, y Roca 1997), la ginogénesis ha sido empleada en *Hordeum vulgare*, *Beta vulgaris*, *Allium cepa*, *Gerbera jamesonii* (Ferrie 2017).
- e. El cultivo de microsporas aisladas, empleado para la obtención de protoplastos, que surgen como respuesta ante la desventaja del cultivo de anteras al generar plantas no sólo de polen sino también de otras partes de la antera, con el resultado de varios niveles de ploidía.

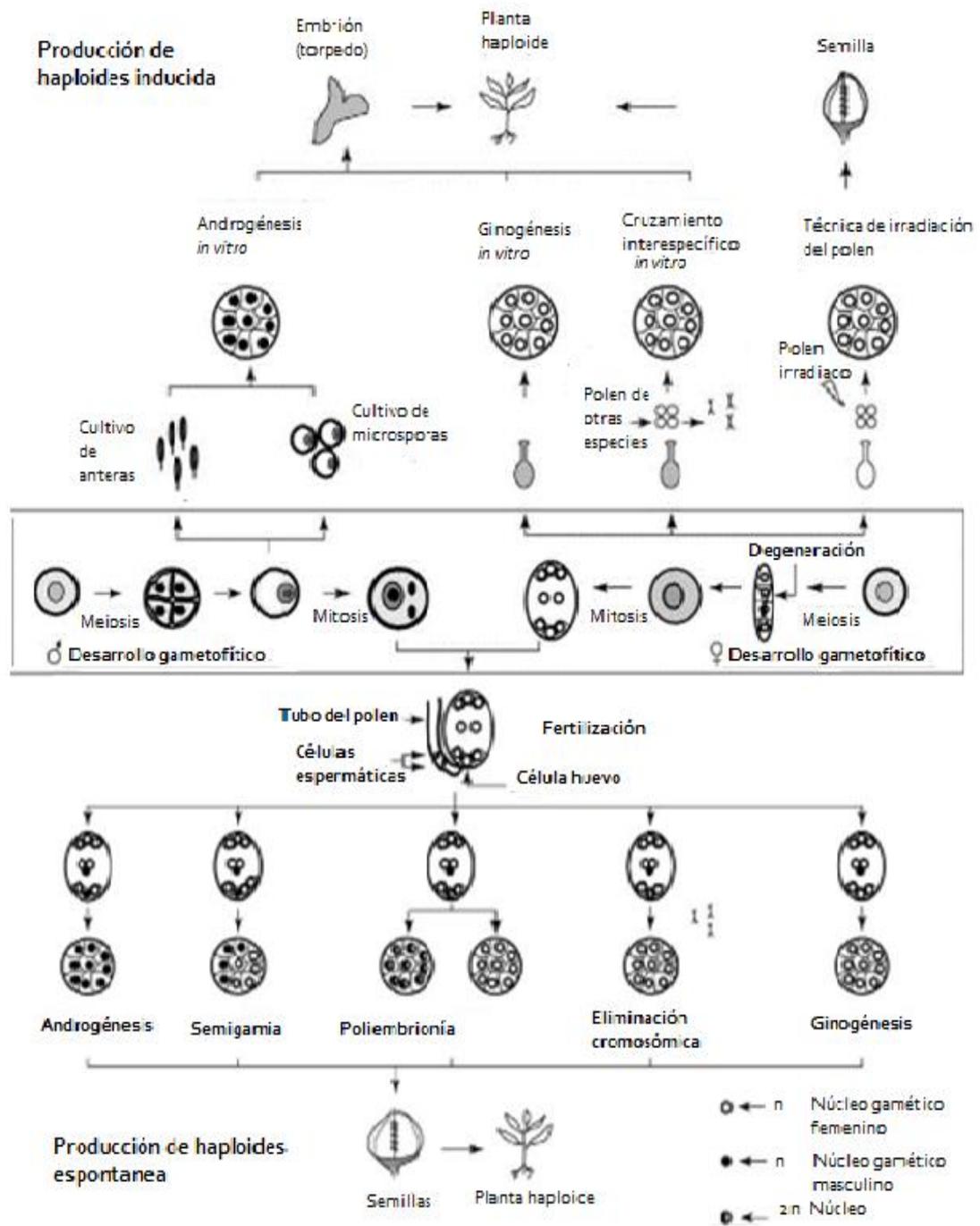


Figura 2: Métodos para la obtención de dobles haploides

FUENTE: Adaptado de Ferrie (2017)

2.2.3. Cultivo *in vitro* de anteras y ovarios para la producción de haploides

Existen dos rutas para la regeneración de plantas a partir del cultivo de anteras: embriogénesis gamética y la organogénesis. En la embriogénesis gamética, la microspora o polen inmaduro cultivado en un medio nutritivo se divide rápidamente formando embrioides; un correcto balance hormonas de crecimiento desarrolla brotes y raíces. En la ruta organogénica las microsporas son indiferenciadas en una masa de células llamada callo. Estos callos pueden inducir la diferenciación en brotes y raíces, en un proceso llamado organogénesis (Fritsche-Neto *et al.* 2014).

El aspecto técnico más importante de esta metodología es que los gametos deben encontrarse en el estadio correcto para ser embriogénicos. La embriogénesis gamética es una de las rutas diferentes de embriogénesis presente en vegetales y consiste en la capacidad de los gametofitos masculinos (microspora o grano de polen inmaduro) o femenino (ginogénesis) para cambiar de forma irreversible su vía gametofítica y desarrollar una vía esporofítica. A diferencia de la embriogénesis somática, la cual provee de una propagación clonal de los genotipos (de la variación somaclonal), la embriogénesis gamética resulta en plantas haploides (duplicación cromosómica inducida o espontánea), porque estas plantas son derivadas de la regeneración de gametos, producto de segregación meiótica (Germanà 2011).

Cuando las anteras inmaduras que contienen polen en una etapa específica de desarrollo se emplean como explante inicial, el resultado es una planta que posee la mitad del número cromosómico de la especie. Una división desorganizada de las células gaméticas origina un callo haploide, pero si se emplea el balance correcto de reguladores se produce un desarrollo organizado desde las primeras divisiones que origina embriones. Transferidos a medios de regeneración, se transforman en plantas haploides y en la mayoría de los casos pueden ser estériles, en otros casos ocurre una duplicación espontánea de los cromosomas en las etapas de desarrollo del callo y de regeneración de la planta (Roca *et al.* 1991).

La androgénesis a través del cultivo de anteras y cultivo de microsporas aisladas, es la vía más eficiente para la obtención de plantas haploides en la mayoría de especies, comparándola con la ginogénesis (Jiménez 1997).

El cultivo de ovarios no fertilizados para la producción de plantas haploides de cebolla fue descrita por primera vez en el año 1989, desde entonces numerosos investigadores han descrito metodologías utilizando óvulos, ovarios o flores no polinizadas como explante, sin embargo, el método más común es el cultivo de botones florales inmaduros, pero tiene numerosas dificultades como el bajo porcentaje de ginogénesis, bajo rango de doblaje espontáneo de cromosomas y dificultad en duplicar los cromosomas (Alan *et al.* 2003).

La eficiencia de la ginogénesis depende de la etapa de desarrollo del saco embrionario y el éxito del cultivo *in vitro* de ovarios varía desde los estadios uninucleados hasta maduros de los sacos embrionarios. Los regenerantes ginogénicos muestran una mayor estabilidad genética y una menor tasa de plantas albinas en comparación con los androgénicos, sin embargo la ginogénesis se utiliza menos frecuentemente para la producción de haploides, debido a la presencia de abundantes gametófitos en una única antera comparada con el gametofito único por óvulo y a la facilidad con que pueden aislarse las anteras y las poblaciones puras de gametófitos masculinos en desarrollo (Dwivedi *et al.* 2015).

El co-cultivo de anteras con ovarios ha sido empleado en especies recalcitrantes, porque produce una mayor respuesta en la formación de embrioides y regeneración de plantas verdes a partir de las microsporas (Patel *et al.* 2004).

El cultivo de ovarios podrían secretar sustancias de crecimiento que permiten estimular la embriogénesis de las microsporas, estas sustancias han sido identificadas siendo similares al ácido fenilacético (PAA) que actúan como auxinas; la presencia de nutrientes necesarios podrían optimizar la inducción y regeneración de genotipos recalcitrantes (Li y Devaux 2001).

2.2.4. Investigaciones en haploides a través del cultivo de anteras y ovarios

Las primeras plantas haploides fueron descritas en 1922 en el género *Datura stramonium*; posteriormente en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) pero el primer reporte de haploide derivado de cultivo *in vitro* de anteras fue en *Datura*, donde se demuestra su importancia para la obtención rápida de líneas homocigotas lo que tiene implicancia para el mejoramiento de cultivos (Dunwell 2010).

A inicios de los 90's se desarrollaron muchos protocolos básicos para la producción de dobles haploides, pero la mayoría eran ineficientes. El éxito en la tecnología se alcanzó principalmente gracias al ensayo de protocolos empíricos.

En el Perú, se han producido aproximadamente 470 dobles haploides de cebada desde el año 1996 en la Universidad Agraria La Molina (Solano 2002), incluyendo plantas dobles haploides mutantes que fueron obtenidas a partir del cultivo de anteras en dos líneas avanzadas de cebada 3545 y 2194, donde los tratamientos mutagénicos tuvieron efecto en la regeneración de plantas verdes (Jiménez 1997).

Existe una alta tasa de albinismo en plántulas regenerantes en líneas de cebada a partir del cultivo de anteras, esta ausencia de clorofila, podría estar relacionado al estadio temprano del desarrollo de la microspora y las condiciones del crecimiento de las plantas, que afecta la fase de regeneración del proceso de androgénesis (Maluszynski *et al.* 2003).

La temperatura y luz no tuvo efecto en la inducción de callos haploides vía cultivo *in vitro* de anteras en trigo de la variedad Pavón, además el medio óptimo fue un extracto de papa con nutrientes, hormonas kinetina al 0.5 mg/L y 1.5 mg/L de 2,4 D. Por otro lado, el medio MS complementado con 0.5 mg/L de ácido indol acético, 0.5 mg/L de kinetina y 0.1 mg/L de ácido giberélico fue exitoso para la regeneración de plantas (Tapia *et al.* 1998).

Los medios de cultivo requeridos influyeron en el éxito de inducción de callos a partir del cultivo *in vitro* de anteras de quinua, el medio NN solidificado con Gelrite proporciono mayor porcentaje de inducción a comparación de los medios N6 y Welander. La formación de callos es un paso fundamental en el cultivo *in vitro* de tejidos y en algunos métodos de transformación genética de plantas (Soplin 2009). La respuesta al cultivo de anteras *in vitro* de tres variedades comerciales de maíz fueron evaluadas para la producción de individuos haploides, además dos plantas verdes de la variedad Marginal 28T fueron regeneradas (Callohuari 2013).

El primer reporte de ginogénesis fue en el año 1976 en cebada, plantas obtenidas a partir del cultivo de ovulos y ovarios han sido usados en numerosos programas de mejoramiento como en *Beta vulgaris*, *Allium cepa* y *Gerbera jamesonii*; pero lamentablemente existen muchos factores dificultan la embriogénesis similares a los métodos androgénicos (Ferrie 2017).

Plantas ginogénicas fueron obtenidas por el cultivo de botones florales en dos líneas de *Allium cepa*. La primera plántula apareció después de tres meses del cultivo del botón floral en un medio suplementado con 2 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de 6-benzilaminopurina ajustado a un pH de 5.8, además las plantas donantes muestran diferencias en la respuesta a la inducción de la ginogénesis (Alan *et al.* 2003).

El cultivo *in vitro* de óvulos de cítricos produjo callos por embriogénesis, obteniendo el mejor resultado con glicerol en todas las variedades de cítrico, además una alta proliferación de callos fu obtenido en medio con altas concentraciones de lactosa; y suplementando la hormona 2,4-D al medio de cultivo para el caso de limón (Kayim y Koc 2006).

El cultivo de ovarios y óvulos *in vitro* ha tenido éxito en pocas especies (Lentini *et al.* 1997) y el cultivo de anteras tiene limitaciones como la renuencia a la regeneración de plantas, albinismo y bajos rendimientos de plantas haploides; por esta razón el mejoramiento genético mediante el cultivo de anteras u ovarios se desarrolla lentamente y se necesita desarrollar o mejorar las metodologías para la obtención de plantas dobles haploides (Roca *et al.* 1991).

El co-cultivo de microsporas embriogénicas con ovarios vivos de trigo sintetizan sustancias que aumentaron la maduración de embrioides y regeneración de ocho genotipos de trigo en un medio líquido; demostrando que los ovarios desempeñan un papel esencial para la reprogramación del desarrollo esporofítico (Liu *et al.* 2002).

El porcentaje de embriones y plantas regeneradas fue incrementado cuando se introdujo ovarios inmaduros al cultivo *in vitro* de microsporas de cebada, sólo cinco ovarios por mililitro de medio durante 20 días es óptimo para la respuesta embriogénica en genotipos recalcitrantes (Li y Devaux 2001). El co-cultivo con ovarios fue exitoso para el cultivo de microsporas de trigo, además las condiciones de cultivo optimas como el uso del gelrite y la hormona 2,4-D incrementaron la inducción de embrioides y regeneración de plantas (Patel *et al.* 2004).

El éxito de la estabilización del cultivo de callos requiere la consideración de cuatro importantes factores: selección del material parental óptimo; plantas vigorosas, libres de enfermedades y con característica genética deseada (planta madre élite); elección del

explante y método de aislamiento, método de desinfección y remoción adecuado para cada tipo de explante); condiciones y medio de cultivo requeridos, optimización de las condiciones de cultivo (Soplin 2009).

Debido a que no existen investigaciones realizadas en el cultivo *in vitro* de anteras y ovarios de kiwicha, la presente investigación se tuvo en consideración los trabajos realizados en otros cultivos como cebada y trigo los cuales tienen resultados exitosos en el cultivo *in vitro* de anteras, para la producción de líneas dobles haploides. El presente trabajo de investigación tiene como finalidad la obtención de callos a partir del cultivo *in vitro* utilizando como explante a las anteras y óvulos de kiwicha.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación y Proyección Social (PIPS) en Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina, distrito de la Molina, Provincia de Lima. Se encuentra situado a 12° 05' 06" S, 76° 75' 00" W y 251 m.s.n.m. Los ensayos se realizaron en el periodo de abril del 2009 a mayo del 2011.

3.2 Material Genético

Se utilizó semilla de kiwicha de la variedad mejorada "Centenario" producida por el PIPS en Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina en el año 2006 la cual tiene alto potencial de rendimiento. Es una variedad obtenida por la mutación del cultivar "selección Ancash" cuyas semillas fueron irradiadas con rayos gamma, a la dosis de 400 Gy.

3.3 Material de Laboratorio

3.3.1. Material de Vidrio

- Vasos de precipitado de 100, 500, y 1000 mL
- Probetas de 10, 25, 50, 100, 250, 500, y 1000 mL
- Pipetas
- Termómetros ambientales de mercurio
- Vasos Erlenmeyer de 200, 500 y 1000 mL
- Placas de Petri 60x10 y 100x15mm
- Gotero
- Matraces
- Láminas cubre y portaobjetos
- Frascos oscuros de 250 mL
- Embudo

- Viales
- Frascos de vidrio 1/8
- Mechero

3.3.2. Material de Plástico

- Tubos de microcentrífuga de 0.5, 1.5, 2.0 mL (Eppendorf).
- Tips de 1000 µl para micropipetas.
- Probetas de 1 y 2 L.
- Bolsas.
- Bandejas.

3.3.3. Equipos

- Cámara de flujo laminar EACI, ENVIRCO, Enviromental air control. INC
- Estereoscopio Zeizz Stemi DRC
- Incubadora
- Micropipetas
- Potenciometro Inolab WTW
- Cámara fotográfica digital
- Balanza de precisión Sartorius CP1245
- Autoclave Market Forge Sterilmatic
- Refrigeradoras (4 °C, -20 °C),
- Placa eléctrica con agitador magnético Heidolph MR 3001
- Estufa a 60° C
- Microscopio óptico Hund Wetzlar

3.3.4. Productos químicos

Los productos químicos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, J.T. Baker, USA y Merk, Alemania y se detallan a continuación:

a. Sales minerales

Macronutrientes

- KNO₃
- CaCl₂·2H₂O

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
- NH_4NO_3
- KH_2PO_4
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Micronutrientes

- KI
- H_3BO_3
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Fuentes de hierro

- Na_2EDTA
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

b. Vitaminas y aminoácidos

- Piridoxina HCl
- Acido nicotínico
- Tiamina HCl
- Glicina
- Myo-inositol

c. Hormonas

- ANA (Acido Naftaleno acético)
- BAP (Bencil amino purina)
- AIA (Acido indol acético)
- Kinetina

d. Aditivos orgánicos

- Sacarosa
- Agar
- Gelrita

e. Otros reactivos

- Acetocarmín
- Alcohol al 96 por ciento
- Agua destilada
- Lejía comercial Clorox

3.3.5. Otros

- Bisturíes
- Pinzas finas
- Gradillas
- Papel de aluminio
- Guantes
- Tubos de plástico con tapa de 50 mL
- Papel toalla
- Papel glazine
- Atomizador
- Papel de filtro
- Cinta Parafilm

3.4. Fase de campo

En esta etapa se obtendrá la plantas donadoras de anteras (Figura 3).

3.3.2. Preparación de camas de propagación

Consistió en regar, voltear y mullir bien el terreno en las camas de propagación de 1m de ancho, luego se niveló y se delimitó pequeños surcos a una distancia de 20 cm, donde se sembraron las semillas de kiwicha.



Figura 3: Desarrollo de las plantas donadoras: preparación de las camas de propagación ^a, germinación de las semillas de kiwicha ^b, el deshierbo manual ^c y las plantas de kiwicha en crecimiento en tres fechas de siembra en camas de propagación ^d.

3.3.3. Siembra

Se realizó la siembra directa en terreno húmedo a una profundidad de 1 a 2cm, a surco corrido, con una distancia entre surco de 20 centímetros.

3.3.4. Riegos

Estos se realizaron con una frecuencia inter-diaria.

3.3.5. Deshierbo y raleo

Se efectuó el deshierbo manual entre los surcos y entre plantas, eliminando la maleza, plantas débiles y pequeñas, porque evita la competencia por nutrientes dejando las más vigorosas para favorecer el mejor crecimiento y desarrollo del cultivo.

3.3.6. Control fitosanitario

El ataque por insectos al cultivo a las 2 o 3 semanas de la emergencia de las plántulas, fue controlado utilizando el piretroide Lambdacihalotrina que actúa por contacto e ingestión a la dosis de 50ml para 15litros de agua. La aplicación se realizó con protección (mascarilla vestimenta apropiada).

3.5. Fase de laboratorio

3.5.1. Evaluación del desarrollo de las plantas donadoras

Se evaluó en forma continua el desarrollo de las plantas durante la permanencia del cultivo en las camas de propagación, desde la aparición de las inflorescencias en la cual se inicia la etapa reproductiva, con el objetivo de relacionar el desarrollo de las microsporas en las anteras y los ovarios inmaduros (no fecundados) con el estadio de desarrollo de la planta.

Se colectaron inflorescencias en una placa petri (Figura 4) para evitar que pierdan su humedad hasta que se empiece a trabajar con ellas en el laboratorio. Para observar el desarrollo de la microspora se prepararon muestras citológicas teñidas con acetocarmín al 4 por ciento y se observó bajo el microscopio a 100X y 1000X de aumento.

Se consideró una muestra adecuada aquella con la mayor uniformidad posible, es decir que más del 50 por ciento de las microsporas presentaran el estado uninucleado por campo visual. El estadio de desarrollo se determinó utilizando el código decimal desarrollado por Darwinkel, A. y Stolen, O. para quinua y kiwicha (Anexo 1).

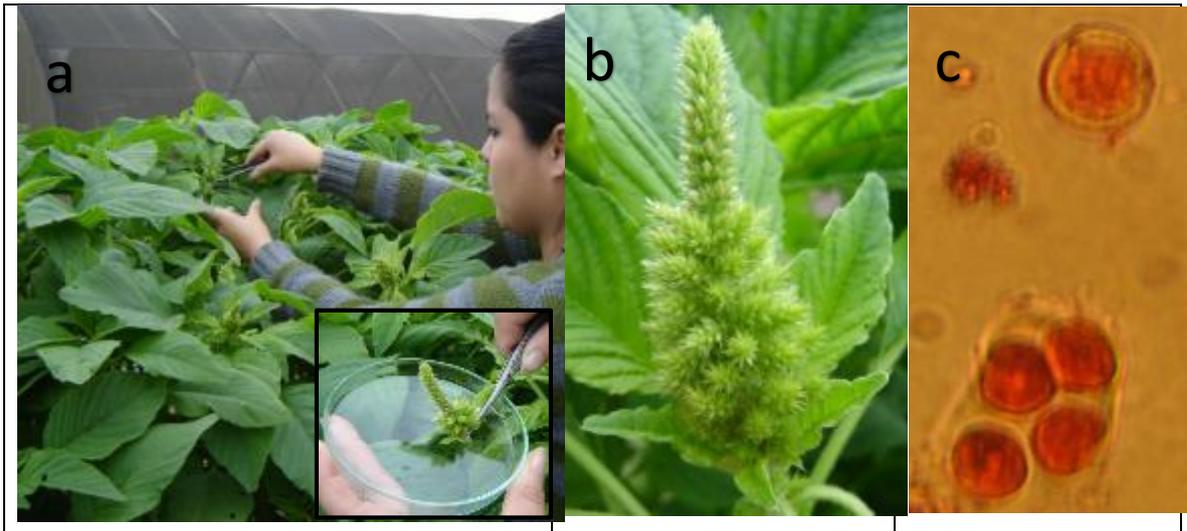


Figura 4: Colecta de inflorescencias de kiwicha para la introducción al cultivo *in vitro* de anteras. Plantas donadoras en etapa de colección de inflorescencia ^a, inflorescencia con flores inmaduras ^b y microsporas ^c (observadas en microscopio óptico a 100X)

3.5.2. Formulación de los medios de cultivo

Para el presente estudio se prepararon tres medios de cultivo basales MS (Murashige y Skoog 1962), N6 (Chu 1978) y NN (Nitsch y Nitsch 1969) modificados con diferentes concentraciones de hormonas, sucrosa, aminoácidos y agentes gelificantes, el detalle de la preparación de estos medios basales se muestran en el Cuadro 1.

Para la prueba de desinfección se preparó un medio simple compuesto de 6 g/L de agar con 40 g/ L de sucrosa.

El medio base para la inducción de callos fue el N6' y NN, adicionando sucrosa, reguladores de crecimiento, ajustado a pH 5.8 y 0.45 g/L de gelrite como agente gelificante.

Para la regeneración de explantes el medio base fue MS y N6 con diferentes hormonas y solidificados con 10 g/L de agar.

Las placas petri antes de ser utilizadas para dispensar los medios de cultivo fueron autoclavadas a una temperatura de 121 °C y a una presión de 15 libras/pulgada cuadrada durante 45 minutos.

Cuadro 1: Composición de los medios de cultivo basales utilizados para el cultivo *in vitro* kiwicha

Componentes del medio	Medio basal (mg/L)		
	N6 modificado	NN modificado	MS modificado
Macronutrientes			
KNO ₃	2,830	950	1,900
MgSO ₄ .7H ₂ O	185	185	370
KH ₂ PO ₄	400	68	170
CaCl ₂ .2H ₂ O	166	166	440
(NH ₄) ₂ .SO ₄	463	-	-
NH ₄ NO ₃	-	720	1,650
Micronutrientes			
H ₃ BO ₃	1.6	10	6.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	3.3	19	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.5	10	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025
KI	0.8	-	0.83
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	0.025	0.025
Fuentes de Hierro			
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8	27.8
Vitaminas			
Tiamina HCl	1	0.5	0.4
Piridoxina HCl	0.5	0.5	0.5
Acido Nicotínico	0.5	5	0.5
Glicina	40	5	2
Myo- Inositol	-	100	100
Aditivos orgánicos			
Sacarosa	50,000	20,000	30,000
Carbón activado	-	-	4,000
Agar (regeneración)	10,000	-	10,000
Gelrite (inducción)	450	450	-
pH	5.8	5.8	5.8

Todos los componentes a excepción del agente gelificante, se colocaron en un vaso de precipitado, se enrazó a 1000 ml de solución empleando agua destilada, se ajustó el pH a 5.8, se añadió el agente gelificante y se agitó hasta disolverlo, para posteriormente colocarse en matraces y autoclavarse durante 20 minutos a 121° C y 15 libras/pulgadas.

Finalmente el medio fue dispensado en placas petri dentro de la cámara de flujo laminar. Los medios se mantuvieron en la incubadora a 22°C por 3 días antes de utilizarlos.

3.5.3. Desinfección de las inflorescencias

Una vez colectadas las inflorescencias en la placa Petri, se procedió a evaluar los diferentes tratamientos de desinfección.

La desinfección de las inflorescencias se realizó en la cámara de flujo laminar, se procedió a sumergirlas en alcohol al 96 por ciento por un minuto para una limpieza inicial. Luego se colocaron en una solución con lejía comercial (NaClO al 5.25 por ciento) a diferentes concentraciones y durante tiempos distintos (Cuadro 2). Finalmente fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril y secadas con papel toalla autoclavado, después fueron colocadas a 5 °C para evitar el marchitamiento. (Figura 5).

Cuadro 2: Tratamientos de desinfección de inflorescencias para su introducción al cultivo *in vitro*

Tratamiento	Concentración y tiempo
d1	Alcohol 96% (60 segundos) + Lejía comercial 10% (2 minutos)
d2	Alcohol 96% (60 segundos) + Lejía comercial 25% (2 minutos)
d3	Alcohol 96% (60 segundos) + Lejía comercial 10% (5 minutos)
d4	Alcohol 96% (60 segundos) + Lejía comercial 25% (5 minutos)
d5	Alcohol 96% (60 segundos) + Lejía comercial 10% (8 minutos)
d6	Alcohol 96% (60 segundos) + Lejía comercial 25% (8 minutos)

Para la siembra de los explantes se observaron bajo el estereoscopio las inflorescencias seleccionadas y desinfectadas, con ayuda de pinzas y estilete se extrajeron las anteras y ovarios de las flores hermafroditas (Figura 6), se sembraron en placas Petri de 60 x 15 mm conteniendo medio (agar con sucrosa). El número de explantes colocados en el medio de cultivo fue diferente para cada tipo, 30 anteras por placa, 4 ovarios por placa o el co-cultivo de 4 ovarios con 20 anteras por placa. Cada placa constituyó una unidad experimental, se tuvo 8 repeticiones por tratamiento.

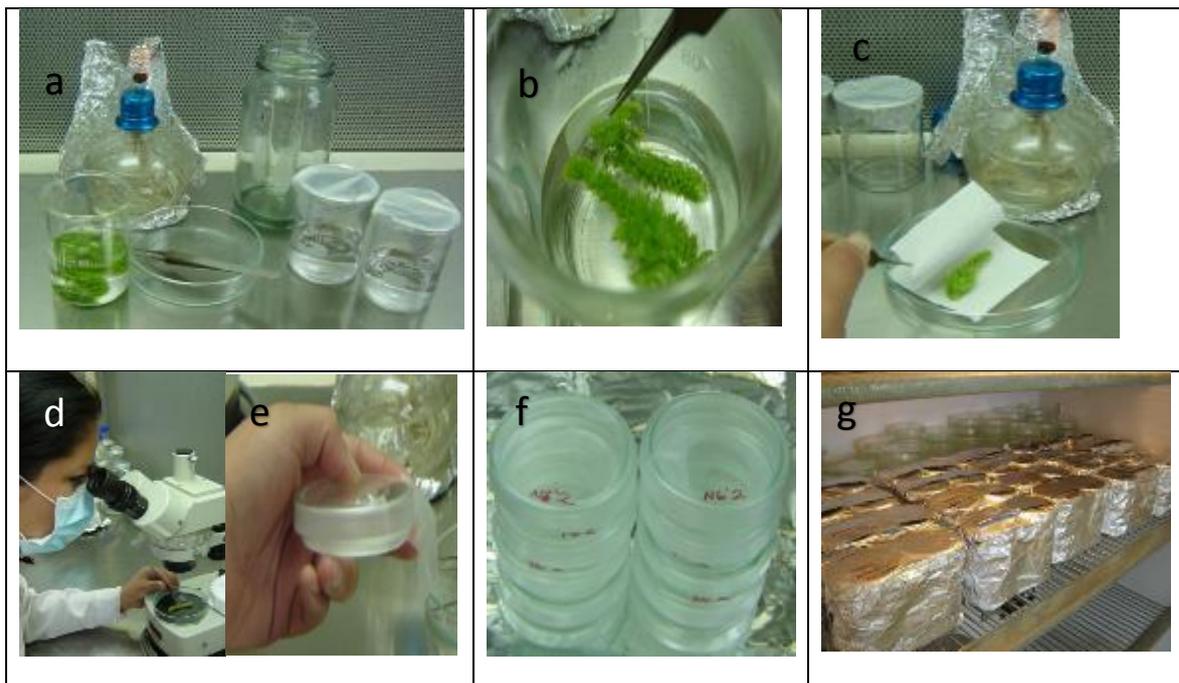


Figura 5: Procedimiento para la desinfección de inflorescencias. Inmersión en alcohol y solución de lejía comercial (NaClO al 5.25 por ciento) ^a, enjuague con agua destilada ^b, secado con papel toalla estéril ^c, extracción de los explantes ^d y sellado de las placas Petri con parafilm ^e, medio de cultivo ^f en volutos en papel aluminio para que estén oscuridad en la cámara de incubación a 22 °C ^g.

3.5.4. Inducción de callos o embrioides

En esta etapa se evaluó el medio de cultivo más conveniente para la inducción de callos, las inflorescencias conteniendo flores inmaduras fueron colectadas y desinfectadas con el mejor tratamiento determinado en la fase de desinfección. Se trabajó dentro de la cámara de flujo laminar, se colocaron los explantes en placa de 60 x 15 mm, conteniendo 3 mL de medio de cultivo (como se detalla en el Cuadro 3), las placas se sellaron con parafilm, se rotularon, luego se envolvieron en papel aluminio. Las características y el número de unidades experimentales fueron las mismas de la prueba de desinfección. Los explantes fueron

incubados a 22 °C en oscuridad. Se evaluó la respuesta inicial de anteras a los 30 días para detectar la producción de callos o embrioides en el medio basal NN o N6 con diferentes combinaciones de hormonas haciendo un total de 10 tratamientos. Cada placa equivale a una repetición, se harán 6 repeticiones por tratamiento.

Cuadro 3: Tratamientos de inducción de callos o embrioides

Tratamientos	Medio base	Hormonas (mg/L)			
		BAP	ANA	2,4 -D	AIA
t1	N6´	1	2		
t2	N6´	1	2	0.5	
t3	N6´	2	1.5	0.5	
t4	N6´	2	1.5		
t5	N6´			0.5	0.5
t6	NN´	1	2		
t7	NN´	1	2	0.5	
t8	NN´	2	1.5	0.5	
t9	NN´	2	1.5		
t10	NN´			0.5	0.5

Los medios N6´ y NN´ a pH 5.8 y 5.5 respectivamente. Todos los medios fueron solidificados con Gelrita (0.45 g/L). NN´ (medio basal Nitsch y Nitsch), N6 (medio para cultivo de anteras), BAP (6-Bencil Amino Purina), ANA (Acido Naftaleno Acético), 2,4 -D (2,4- Acido Diclороfenoxy Acético), AIA (Acido Indol Acético).

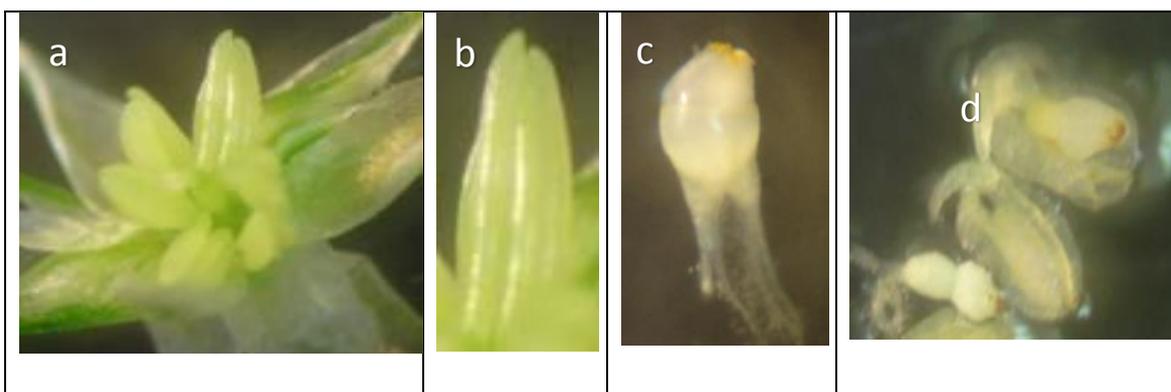


Figura 6: Explantes tomados a partir de la flor hermafrodita (a): antera (b), ovario(c) y co-cultivo (d)

3.5.5. Regeneración a partir de callos.

Los callos o embrioides obtenidos en la fase anterior pasaron a la etapa de regeneración. Para ello estos callos fueron transferidos a placas conteniendo medios de cultivo; se dejaron en estos medios hasta la regeneración de la parte aérea o radicular, bajo un fotoperiodo de 12

h. de luz. Cada placa equivale a una repetición, con un total de 6 repeticiones por tratamiento (Figura 7).

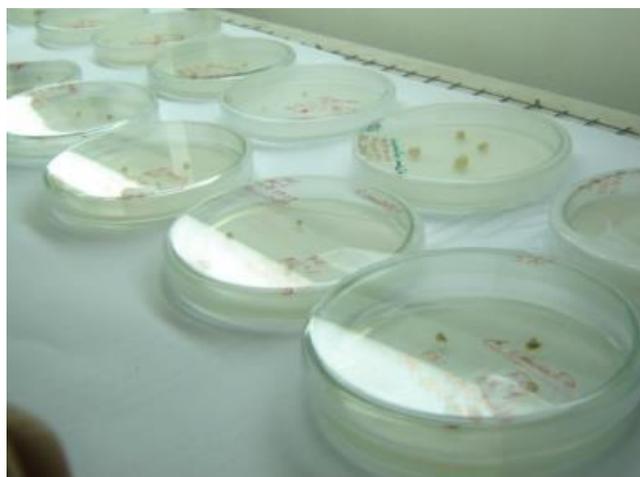


Figura 7: Medios de regeneración MS distribuidas en placas Petri.

En los ensayos de regeneración a partir de callos de *A. caudatus*, se evaluaron un gran número de combinaciones de reguladores de crecimiento (AIA, IBA, ANA, 2,4-D con diferentes citoquininas como BAP, zeatina, adenina) en dos medios basales MS o N6' con sucrosa a 25 y 50 mg/L, totalizando 47 medios de cultivo diferentes que corresponde cada uno a un tratamiento diferente, los cuales se evaluaron en cuatro diferentes etapas para un mejor manejo en el laboratorio. En la primera etapa se utilizó el medio de cultivo MS con diferentes combinaciones de hormonas haciendo un total de 3 tratamientos de regeneración con este medio (Cuadro 4).

Cuadro 4: Tratamientos de regeneración con medio basal MS con diferentes concentraciones de sucrosa y hormonas

Tratamiento	Medio base	Hormonas (mg/L)				
		BAP	ANA	KIN	AIA	2,4D
1	MS			0.5	0.5	
2	MS	0.4	0.4			
3	MS			0.2		1

pH 5,8, todos los medios solidificados con Agar (10 g/L). MS (Murashige y Skoog), KIN (Kinetina).

En la segunda etapa se evaluó N6 como medio basal solidificado con agar (10 g/L) con diferentes concentraciones de hormonas y sucrosa (Cuadro 5).

Cuadro 5: Tratamientos de regeneración con medio N6, diferentes concentraciones de sucrosa y hormonas

Tratamiento	Medio base	Sucrosa (g/L)	Hormonas (mg/L)		
			AG	AIA	KIN
1	N6	50		0.5	0.9
2	N6	50		0.5	2
3	N6	50		0.05	2
4	N6	25	10	0.5	0.9
5	N6	25	10	0.5	2
6	N6	25	10	0.05	2
7	N6	25	15	0.5	0.9
8	N6	25	15	0.5	2
9	N6	25	15	0.05	2
10	N6	25	5	0.5	0.9
11	N6	25	5	0.5	2
12	N6	25	5	0.05	2
13	N6	25	5	0.05	0.9
14	N6	25	10	0.05	0.9
15	N6	25	15	0.05	0.9

pH 5,8, todos los medios solidificados con Agar (10 g/L), AG (ácido giberélico)

En la tercera etapa se evaluó como medio basal el N6 y un contenido de 25 mg/L de sucrosa, adicionando adenina, arginina y ácido pantoténico (Cuadro 6).

Cuadro 6: Tratamientos de regeneración con medio N6, diferentes concentraciones de adenina, arginina y ácido pantoténico

Tratamiento	Medio base	Sucrosa (g/L)	Hormonas (mg/L)				ARG	PAN
			AG	AIA	KIN	BAP Adenina		
1	N6	25		0.5	1		20	
2	N6	25	15	0.5	1		20	
3	N6	25	10	0.05	2		20	
4	N6	25	1				20	4
5	N6	25				10	20	2
6	N6	25	15	0.05	0.9	10	20	
7	N6	25	15			10	20	
8	N6	25		0.5	1			
9	N6	25						
10	N6	25		1	1			
11	N6	25		1	2			
12	N6	25		1	1		20	
13	N6	25		1	2		20	
14	N6	25					20	

pH 5,8, todos los medios solidificados con Agar (10 g/L), ARG (arginina) PAN (ácido pantoténico)

En la cuarta etapa se prescindíó de la adenina y se probó otros componentes como IBA, ABA y zeatina a diferentes concentraciones como se muestra en la Cuadro 7.

Cuadro 7: Tratamientos de regeneración con medio N6 diferentes concentraciones de IBA, ABA y zeatina.

Tratamiento	Medio base	Sucrosa (g/L)	Hormonas (mg/L)			
			AG	IBA	ABA	Zeatina
1	N5	25		0.1		
2	N6	25		0.1		0.2
3	N6	25		0.1	0.1	0.2
4	N6	25				0.2
5	N6	25			0.1	
6	N6	25			0.1	0.2
7	N6	25		0.1	0.1	
8	N6	25	15	0.1	0.1	
9	N6	25	15		0.1	0.2
10	N6	25	15			
11	N6	25	15	0.1		
12	N6	25	15	0.1		0.2
13	N6	25	15	0.1	0.1	0.2
14	N6	25	15			0.2
15	N6	25	15		0.1	

pH 5,8, todos los medios solidificados con Agar (10 g/L), IBA (ácido indol acético), ABA (ácido absícico)

La transferencia a medio fresco se mantuvo durante cuatro meses con subcultivos en el mismo medio cada 15 días, para un total de cuatro subcultivos. Los callos diferenciados en brotes o raíces fueron transferidos a tubos de ensayo con el mismo medio de cultivo pero con la adición de carbón activado (4 g/L).

3.6. Análisis de datos

Se realizarán las siguientes evaluaciones:

1. Respuesta de las anteras, se realizará contando las anteras que han formado al menos un callo o embrión transformando luego estos datos a porcentaje. Se realizó el conteo a los 30 días de iniciada la incubación de las anteras.

Porcentaje respuesta de las anteras

$$= \frac{\text{Número de anteras con al menos un callo o embrión}}{\text{Número total de anteras introducidas al medio de cultivo}} \times 100$$

2. Inducción de callos o embriones, determinado en base al número de callos o embriones inducidos en medio de cultivo durante el periodo de incubación de anteras. En el conteo se tomó en cuenta todos los callos inducidos a los 45 días de iniciada la incubación de las anteras. El porcentaje se determinó en base a número de anteras en cultivo.

Porcentaje de callos o embriones

$$= \frac{\text{Número de callos o embriones formados}}{\text{Número total de anteras introducidas al medio de cultivo}} \times 100$$

3. Transferencia de callos o embriones a medio de regeneración, es el número de callos o embriones capaces de regenerar plantas y se consideran aquellos con 2 mm o más de diámetro.

$$\text{Porcentaje de transferencia} = \frac{\text{Número de callos o embriones transferidos}}{\text{Número de callos o embriones formados}} \times 100$$

4. Número de brotes regenerados, se realizó el conteo de brotes albinos o verdes regenerados por cada 100 anteras en medio de cultivo. Este dato es uno de los más importantes, pues va a determinar la respuesta del genotipo al cultivo *in vitro* de anteras.

Porcentaje de regeneración de brotes

$$= \frac{\text{Número de brotes regenerados (verdes y albinos)}}{\text{Número total de anteras introducidas al medio de cultivo}} \times 100$$

5. Número de raíces regeneradas, se realizó el conteo de raíces regeneradas por cada 100 anteras en medio de cultivo.

Porcentaje de regeneración de raíces

$$= \frac{\text{Número de raíces regeneradas}}{\text{Número total de anteras introducidas al medio de cultivo}} \times 100$$

Análisis estadístico

El modelo utilizado fue un DCA con arreglo factorial para la los tratamientos de desinfección e inducción. En el caso de desinfección fueron 3 factores: tipo de explante, tiempo y

concentración de lejía comercial (3Ax 3Bx2C), para inducción fueron 3 factores: tipo de explante, medio basal y hormonas (3Ax2Bx5C).

El diseño utilizado en el experimento de regeneración fue completamente al azar, realizándose el análisis de variancia.

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

$$i = 1, 2, 3 \dots, t$$

$$j = 1, 2, 3 \dots, r$$

Donde:

Y_{ij} : variable respuesta correspondiente al i-esimo tratamiento y a la i-esima repetición.

μ : Media general

t_i :Efecto del i-esimo tratamiento

e_{ij} : Error experimental

Los datos fueron procesados empleando el Software estadístico SAS 8.1. Este software nos permitió realizar el análisis de variancia y la prueba de Tukey con una significación de 0.01 por ciento.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Momento de colección de inflorescencias

La eficiencia de la embriogénesis de microsporas es afectada por algunos factores fisiológicos como las condiciones de crecimiento de las plantas donantes, estadio de desarrollo de la microspora (Shariantpanahi 2006). En el presente estudio se obtuvo plantas donantes libres de enfermedades bajo un adecuado manejo agronómico para obtener un buen desarrollo de inflorescencias, que fueron colectadas para la extracción de los explantes.

Se observó el desarrollo del polen en la variedad Centenario de kiwicha (Figura 8), en diferentes momentos de desarrollo de las inflorescencias (70, 80, 90, 100 y 110 días después de la siembra (dds) en las camas de propagación), y se determinó el momento oportuno para encontrar microsporas que el estado uninucleado se logra entre los 90 a 100 dds.

Numerosos autores recomiendan que la microspora se encuentre en el estadio uninucleado para promover el cambio de la vía gametofítica a la esporofítica para una óptima inducción vía embriogénesis u organogénesis (Dwivedi *et al.* 2015; Fritsche-Neto *et al.* 2014; Li y Devaux 2005; Puoumatka 1999). El momento de colecta es característico del genotipo como lo menciona (Callohuari 2013) quien determina diferentes momentos de colecta que son específicos para las tres variedades de maíz evaluadas para encontrar microsporas en estado uninucleado.

Las inflorescencias de *A. caudatus* posee tres tipos de flores, hermafroditas, masculinas (estaminadas) y femeninas (pistiladas) que están distribuidas en glomérulos como se observa en la Figura 9. Para la extracción de los explantes se utilizaron flores hermafroditas porque en estudios preliminares la siembra de anteras y ovarios de flores unisexuales obtuvo una baja respuesta al cultivo *in vitro*.

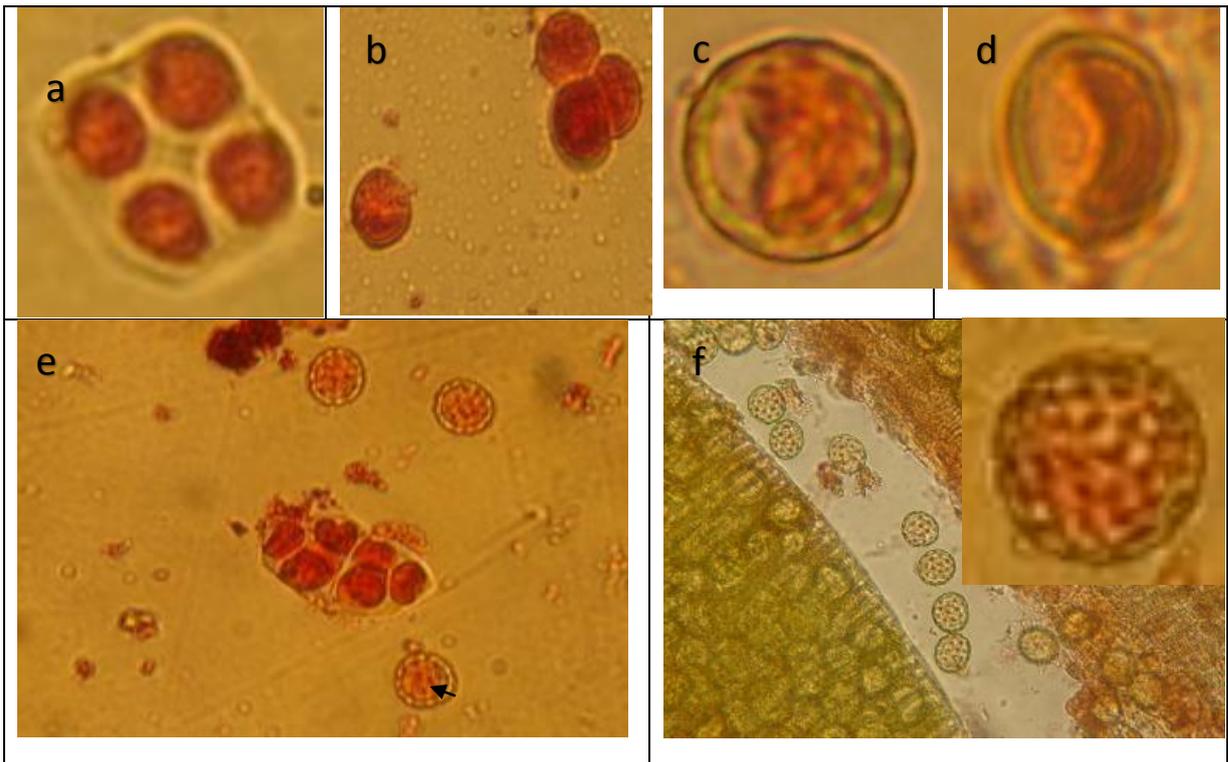


Figura 8: Desarrollo del polen de kiwicha (*Amaranthus caudatus*). Tétrada de esporas después de la meiosis ^a, Tétrada con microspora individual después de la disolución de la callosidad alrededor de la tétrada ^b, microspora parcialmente vacuola en estadio uninucleado ^c, microspora uninucleada con núcleo germinativo ^d, campo visual del microscopio donde se observa dos tétradas y microsporas en estadio uninucleado ^e, grano de polen maduro ^f. Todas las muestras han sido teñidas con acetocarmín.



Figura 9: Tipos de flores de kiwicha. Glomérulo con una flor masculina central y pequeñas flores femeninas ^a, flor hermafrodita se observa el ovario súpero y cinco anteras ^b, flor masculina ^c, flor femenina ^d

Antes de 90 dds se encontraron anteras muy pequeñas de color verde claro translúcidas, al observarse al microscopio se encontraron las microsporas en tétradas y no se formaron callos. Después de 100 dds se observaron anteras de color amarillo en botones florales abiertos posterior a la antesis, las cuales a los 10 días en el medio de cultivo se necrosaron todas sin la inducción de callos.

El momento de colección de inflorescencias óptimo fue a los 90 a 100 días después de la siembra, las inflorescencias tienen un tamaño de 2 a 3 cm de longitud y de color verde limón, en este momento las anteras no son visibles (antes de la antesis). Según el código decimal desarrollado por Darwinkel, A, y Stolen, O. para quinua y kiwicha corresponde al estado de crecimiento 37 o inicio de piramidación de flores (Figura 10).

Las anteras elegidas (conteniendo más del 50 por ciento de las microsporas en estado uninucleado por campo visual) fueron de 1 mm de largo y de color verde agua.

Ferrie 2017, menciona que uno de los factores que influye en la respuesta androgénica y ginogénica al cultivo es el estado de desarrollo del gametofito en inflorescencia primarias y secundarias, por esta razón se eligió inflorescencias primarias (en el inicio de piramidación), al observarse que con la madurez de la planta las inflorescencias secundarias o laterales tuvieron un desarrollo del polen más rápido (mayor porcentaje de granos de polen en anteras pequeñas).



Figura 10: Momento de colección de las inflorescencias. Estado fenológico de la planta: inicio de la piramidación ^a. Botón floral abierto con ayuda de estiletes en donde se aprecia las anteras de color verde agua ^b. Microspora en estadio uninucleado medio tardío ^c.

La etapa de desarrollo la microspora es crítica para la inducción de la embriogénesis de la microspora y la posterior regeneración, el estadio uninucleado es óptimo para el cambio de la vía gametofítica al desarrollo esporofítico por la inducción de agentes (Li y Devaux 2005); además está influenciada fuertemente por el uso de diferentes medios de cultivo, agentes gelificantes, aminoácidos y otros aditivos al medio de cultivo (Patel *et al.* 2004) lo que se discutirá en capítulos posteriores.

4.2. Método de desinfección

Para el establecimiento al cultivo *in vitro* es importante que los explantes estén libres de contaminación y que reaccionen favorablemente al medio de cultivo para lo cual se debe determinar un método de desinfección adecuado capaz de mantener vivo al tejido vegetal después de ser aislado evitando que se necrosen por acción de los agentes desinfectantes.

En la presente investigación la evaluación se realizó a los 10 días después de la introducción de los explantes en el medio de cultivo, en la Figura 11 se muestra la respuesta a los tratamientos de desinfección d4 y d1,

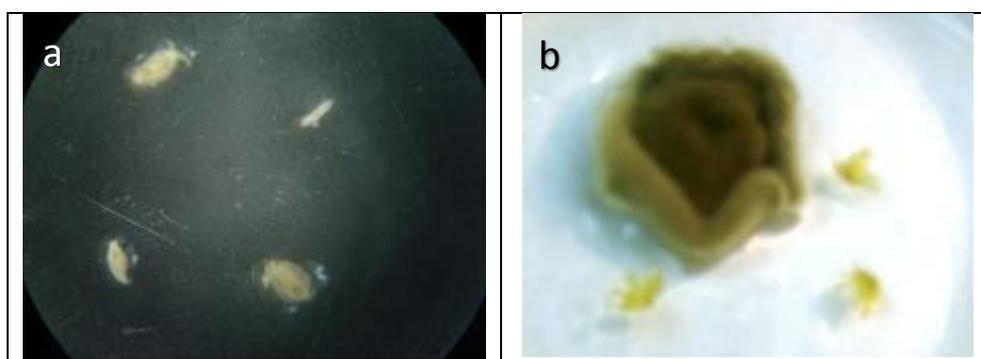


Figura 11: Respuesta a los tratamientos de desinfección. Placas petri con explantes bajo los tratamientos de desinfección d4 (no contaminado)^a y d1 (contaminado por hongo)^b después de 10 días en el medio de cultivo.

El análisis de variancia general, reveló que tanto la concentración de lejía comercial como el tiempo de exposición a este desinfectante repercute en el porcentaje de contaminación, bajo un nivel de significancia de 0.01 (Anexo 2 y 3). Además el tipo de explante no influyó en el porcentaje de contaminación, esto podría deberse a que todos los explantes anteras y ovarios se encuentran protegidos dentro del botón floral. Existen diversos métodos de desinfección dependiendo del tipo de explante, en cebada las espigas pueden esterilizarse por aspersión o inmersión con alcohol al 70 por ciento (Germanà 2011), por otro, lado la desinfección de ovarios en el género *Brassica* consiste en la inmersión durante 12 minutos en 0.1 por ciento de HgCl₂ después de la inmersión en alcohol al 75 por ciento durante 3 minutos (Zhang *et al.* 2004).

En la figura 12, se muestra la diferencia de medias por el método de Tukey (p 0.01), se observa que el 68.5 por ciento de los explantes se contaminaron con 2 minutos de exposición a la lejía comercial y que a 5 y 8 minutos son necesarios para obtener menos de 10 por ciento

de contaminación. Existe diferencia significativa entre las medias por las concentraciones del desinfectante, siendo más efectivo el tratamiento con 25 por ciento de lejía comercial (Figura 13).

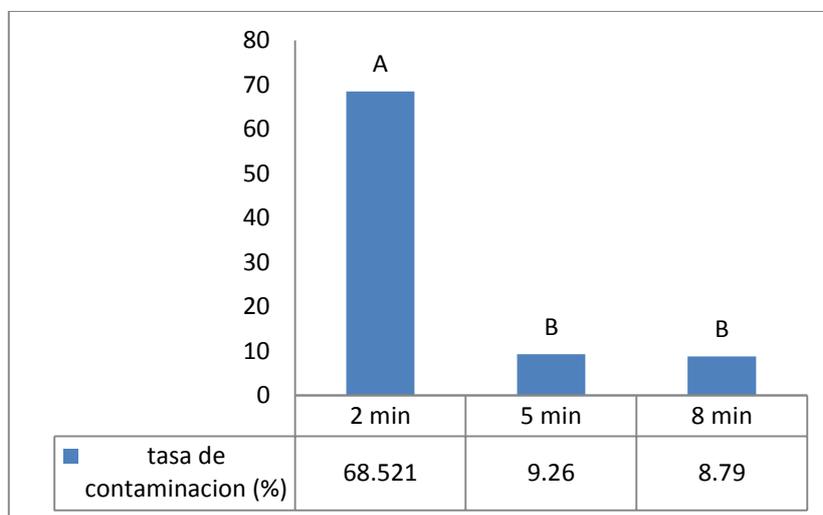


Figura 12: Efecto del tiempo de exposición en solución de lejía comercial en la tasa de contaminación de los explantes. Barras que no comparten una letra son significativamente diferentes.

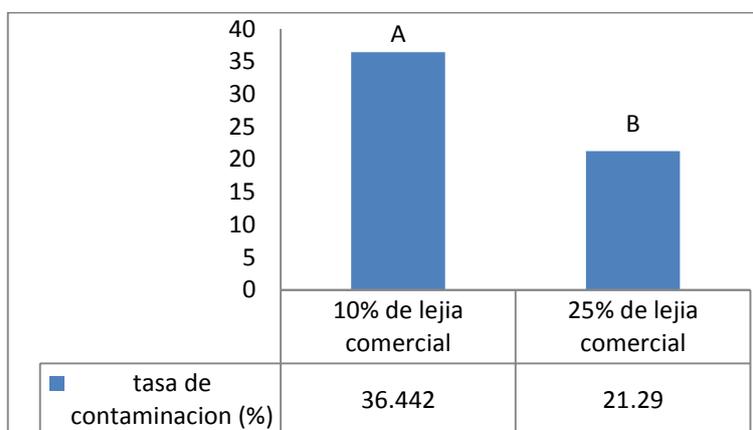


Figura 13: Efecto de la concentración de solución de lejía comercial en la tasa de contaminación de los explantes. Barras que no comparten una letra son significativamente diferentes.

De los 6 tratamientos de desinfección probados, los tratamientos D4 (solo Alcohol x 1 minuto+ Lejía al 25 por ciento por 5 minutos) y el D6 (Alcohol x 1 minuto+ Lejía al 25 por ciento por 8 minutos) fueron los más eficientes, con 0 por ciento de explantes contaminados como se observa en la Figura 14. No se observó la presencia de explantes necrosados en ninguno de los tratamientos. Para los demás tratamientos hubo más de 15 por ciento de contaminación.

Elegimos el tratamiento d4, por ser el más eficiente al realizarse en menor tiempo

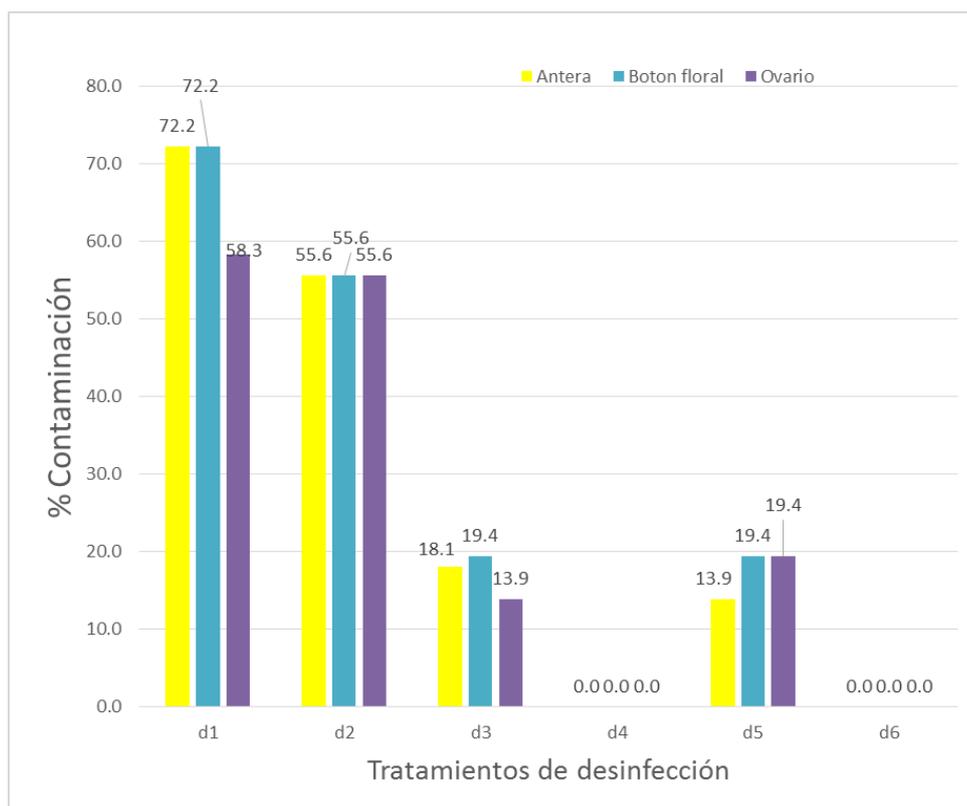


Figura 14: Efecto de los tratamientos de desinfección (interacción de la concentración y tiempo de exposición en lejía comercial en la tasa de contaminación de los tres tipos de explantes

Un tratamiento desinfección más económico fue empleado por Soplín, (2009) el cual incluía asperjar las inflorescencias de quinua con alcohol al 90 por ciento después de un lavado con agua de caño para eliminar el polvo o suciedad. En otros cultivos es necesario procesos de desinfección que incluyan además otro agente desinfectante como hipoclorito de sodio; por ejemplo, la inmersión en alcohol al 70 por ciento durante por pocos minutos seguido de inmersión en una solución de hipoclorito de sodio con gotas de tween 20 durante 10 a 15 minutos, enjuagados tres veces durante cinco minutos en agua destilada estéril (Germanà 2011).

4.3. Inducción de callos

4.3.1. Efecto del medio basal

El medio de cultivo es el factor esencial para el éxito del cultivo *in vitro* el cual debe proporcionar a los tejidos todos los alimentos que la planta encuentra en el suelo, tales como agua, sales minerales así como vitaminas, hormonas y azúcares que se forman a través de la

fotosíntesis (Soplín 2009). Los medios de cultivo están constituidos por dos grandes grupos de sustancias. El primer grupo, o medio basal, está formado por nutrientes inorgánicos (macro y micro elementos), hidratos de carbono, vitaminas y, en algunos casos, otros aditivos orgánicos. El segundo grupo de sustancias lo constituyen los reguladores de crecimiento de tipo hormonal (Lentini *et al.* 1997).

En esta etapa se evaluaron dos medios basales (NN y N6) y 5 combinaciones de hormonas y los tres tipos de explantes a los 30 días desde su introducción al cultivo *in vitro*.

El análisis de variancia general, reveló que el tipo de explante, medio basal y los tratamientos hormonales así como sus interacciones influyen significativamente ($p=0.01$) en la repuesta a la inducción de callos (Anexo 4 y 5).

En la figura 15, se muestra la diferencia de medias por el método de Tukey ($p=0.01$), por el cual se observa en el medio N6 un porcentaje de inducción significativamente mayor (37.2 por ciento) comparado con el medio NN (32 por ciento)

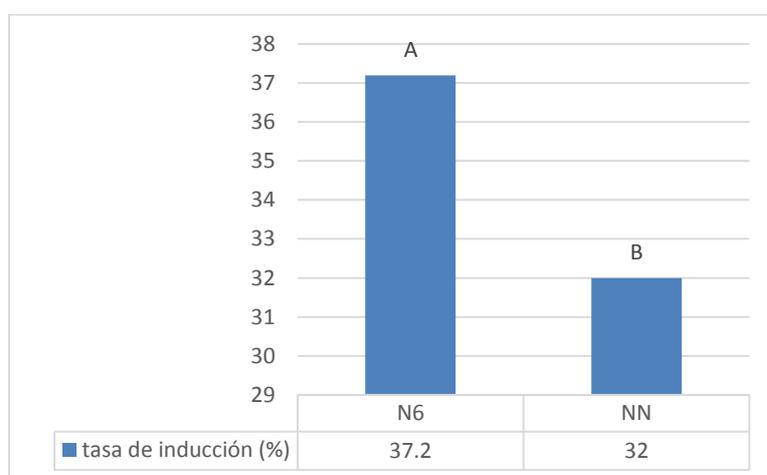


Figura 15: Efecto medios basales N6 y NN en la tasa de inducción de callos. Barras que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Los requerimientos nutricionales son diferentes por genotipo en general para el cultivo de anteras los medios basales más comunes son los medios N6, NN (Nitsch y Nitsch 1969) entre otros y para cereales el medio más utilizado es el N6. Soplín 2009, obtuvo mayor inducción de callos con el medio NN comparado con los medios N6 y Welander para el cultivo de anteras de quinua, además al adicionar Gelrite a una concentración de 0.45 mg/L

(la concentración usada también en el presente estudio) en lugar de Difco Bacto agar como agente gelificante se incrementó el porcentaje de inducción de callos.

4.3.2. Efecto de los reguladores de crecimiento

Existe diferencia significativa ($p=0.01$) con la prueba Tukey entre los 5 tratamientos hormonales, como se muestra en la figura 16, el tratamiento t3 (conteniendo BAP, ANA y 2,4-D a una concentración de 2, 1.5 y 0.5 mg/L respectivamente) obtuvo un mayor porcentaje de inducción (50 por ciento), seguido de t2 (37.4 por ciento) y t5 (30.6 por ciento). Los medios que sólo contenían las hormonas ANA y BAP (t4 y t1) tuvieron los más bajos porcentajes de inducción de callos 28.3 y 26 por ciento respectivamente, determinando la importancia el uso del 2,4-D para la inducción de callos como lo reportan Li *et al.* (2008), quienes tuvieron mejores resultados con una alta concentración de 2,4-D (2.26 μ M) en anteras de níspero. Por otro lado Chu *et al.* (1990) mencionan que bajas dosis como la empleada en esta investigación (0.5 mg/L) fue suficiente para iniciar la embriogénesis de la microspora sin la formación callo, así que los embrioides pudieron desarrollarse normalmente y tener una alta frecuencia de regeneración al transferirlos a un medio libre de 2,4-D.

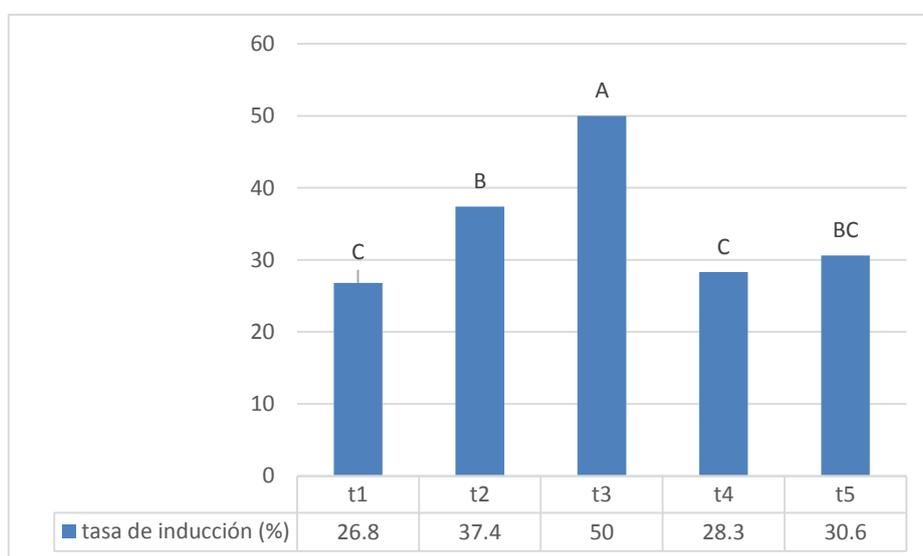


Figura 16: Efecto de los tratamientos hormonales en la tasa de inducción de callos. Barras que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Las auxinas en concentraciones altas o medias con citoquininas en concentraciones bajas favorecen la producción callos, además el uso de ANA como fuente de auxina es recomendable porque no inhibe la organogénesis posterior como la auxina 2,4-D (Lentini *et*

al. 1997), la cual se utiliza para la inducción de callos e incrementó el porcentaje de inducción de embrioides en trigo a una concentración de 5 mg/L (Patel *et al.* 2004).

4.3.3. Efecto del tipo de explante

El porcentaje de inducción de callos totales a partir de anteras fue de 2.28 por ciento, a partir de ovarios 39.5 por ciento, y del co-cultivo de ovarios con anteras fue de 62.08 por ciento, observándose que la inducción de callos se incrementa significativamente ($p=0.01$) con el co-cultivo como se muestra en la Cuadro 8 y mostrado por la prueba de Tukey en la Figura 17.

Cuadro 8: Respuesta de los tres tipos de explantea (anteras, ovarios y co cultivo de anteras con ovarios) de kiwicha en la inducción de callos

Tipo de explante	Nº placas totales	Nº explantes sembrados	Total callos obtenidos	% Inducción de callos
Anteras	60	1800	41	2.28
Ovarios	60	240	95	39.58
Co-cultivo	60	240	149	62.08
Total	180	2280	285	12.50

Li y Devaux (2001), confirmaron que 20 días después del co-cultivo de ovarios con microsporas se incrementa el porcentaje de embriogénesis de las microsporas en cebada. El mecanismo exacto del co-cultivo es desconocido, se cree que la función biológica de un ovario es una clase de efecto de “enfermera” en la embriogénesis. Otros autores reportan que los ovarios de cebada pueden reemplazar las sustancias de crecimiento con una gran estimulación de la embriogénesis, identificaron estas sustancias como similares al ácido fenilacético (PAA) o sus análogos.

El acondicionamiento de los medios de cultivo, ya sea con explantes de ovario o anteras además la hormona vegetal PAA originada naturalmente en la androgénesis ha demostrado ser exitoso para el cultivo de microsporas de trigo y cebada (Patel *et al.* 2004).

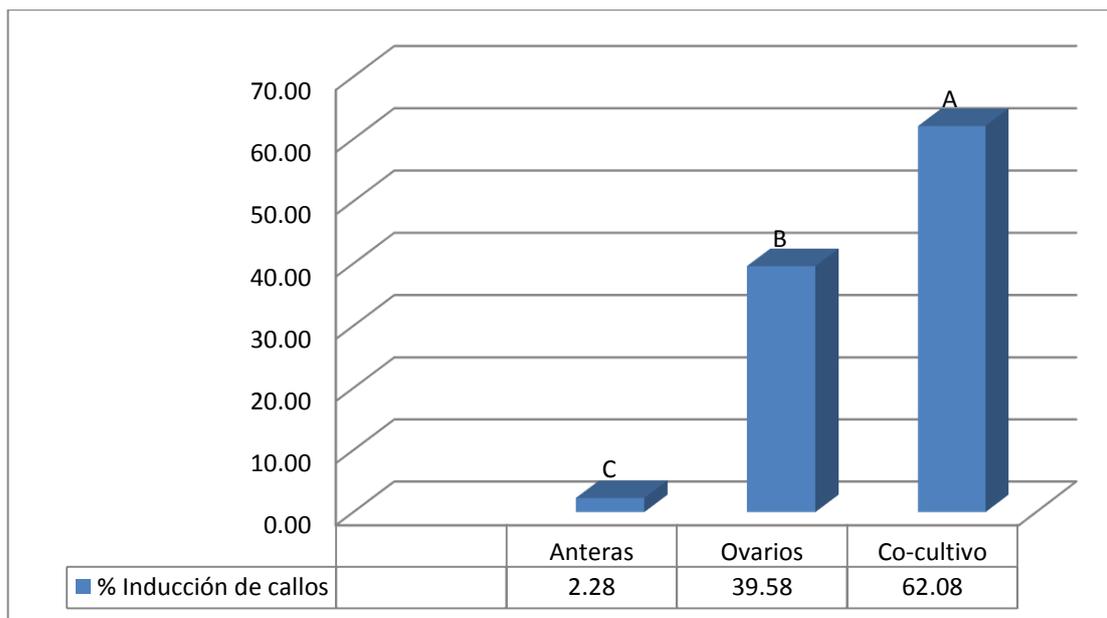


Figura 17: Respuesta de los tres tipos de explantes: anteras, ovarios, co-cultivo de antera con ovario de kiwicha en la inducción de callos. Barras que no comparten una letra son significativamente diferentes.

La formación de callos se inició a los 15 días de colocadas los explantes en los 10 medios de inducción, siendo más rápido en los medios que contenían co-cultivo como explante, observándose que después de 15 días de la siembra se obtuvo callos voluminosos, mientras que en el cultivo de anteras y ovarios, por separado, recién comenzaba la desdiferenciación (Figura 18). También se puede observar el crecimiento de callos a los treinta, sesenta y noventa días en los tres tipos de explantes.

El medio basal N6 con la combinación hormonal del tratamiento t3 produjo mayor porcentaje ($p=0.01$) de inducción de callos en los tres tipos de explantes (anteras 7.2 por ciento, ovarios 79.2 por ciento y co-cultivo 95.8 por ciento) siendo esta combinación la más óptima para inducir callo, además no se obtuvo necrosamiento de los explantes observando una coloración crema en todos los callos formados. En la Figura 19 se observa callos formados a partir de ovarios como explante en este medio de cultivo.



Figura 18: Cambios morfológicos de los tres tipos de explantes durante su permanencia en el medio de cultivo N6'3 para la inducción de callos. Las filas de arriba hacia abajo corresponden a las anteras, ovarios y co-cultivo de anteras con ovarios. Las columnas comenzando de izquierda a derecha corresponden al momento de la siembra, a los 15, 30 y 90 días de exposición al medio de inducción).



Figura 19: Placa Petri con cuatro callos embriogénicos color crema utilizando como explante ovarios en el medio basal N6 con el tratamiento hormonal t3 (2 mg/L BAP, 1.5 mg/L ANA y 0.5 mg/L 2,4-D)

4.3.4. Efecto de la interacción del medio basal, tratamiento hormonal y tipo de explante

En la Figura 20, se observa el efecto de los tratamientos de inducción (interacción del medio basal y tratamiento hormonal) en la tasa de inducción de callos de los tres tipos de explantes, con el medio de inducción con el medio N6 y el tratamiento hormonal t3 se presentaron los más altos y significativos porcentajes de inducción utilizando como explante ovarios y co-cultivo. 79.2 y 95.8 por ciento respectivamente.

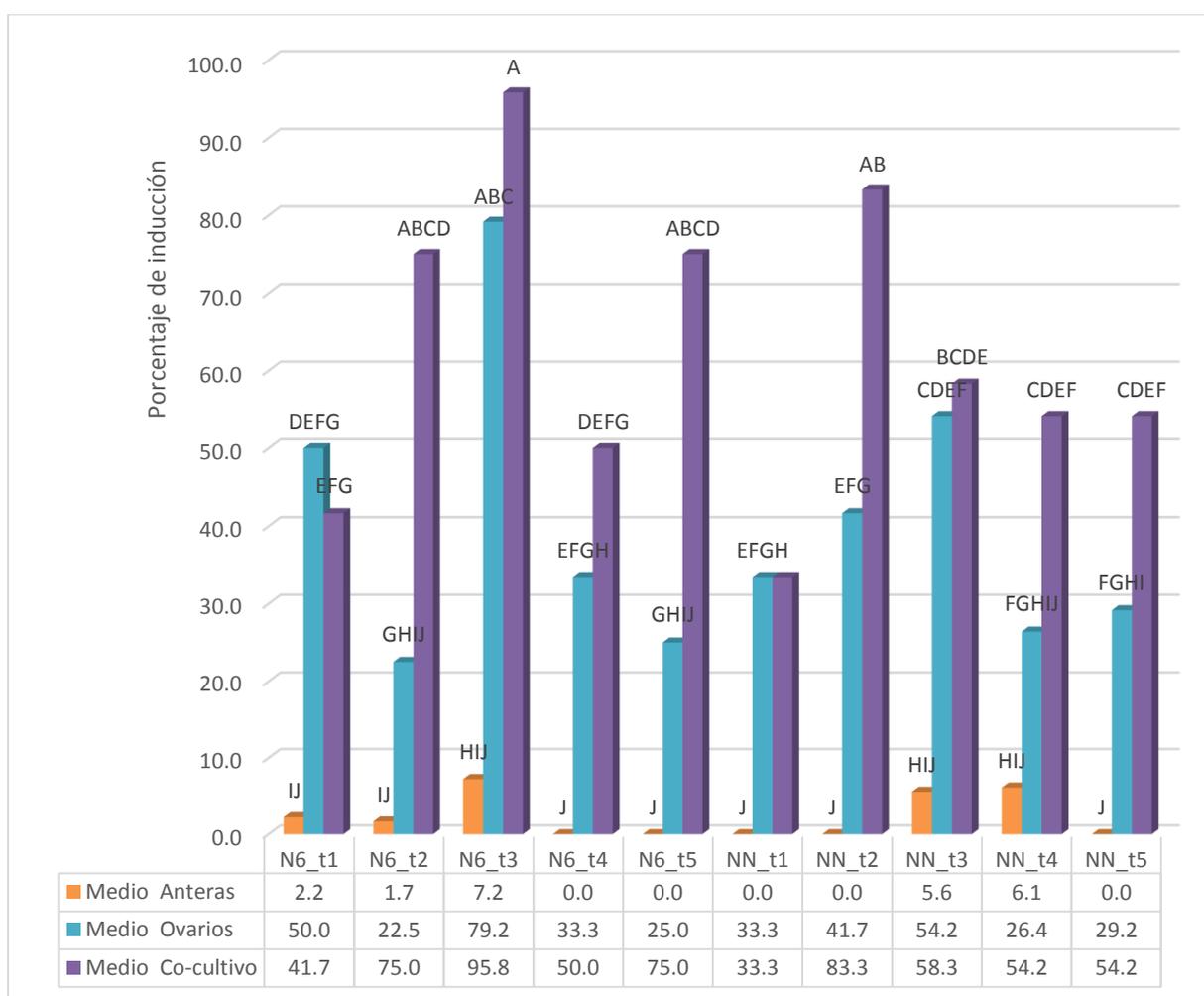


Figura 20: Efecto de los tratamientos de inducción (interacción del medio basal y tratamiento hormonal) en la tasa de inducción de callos de los tres tipos de explantes, Barras que no comparten una letra son significativamente diferentes.

También podemos observar que el cultivo de anteras tiene los más bajos porcentajes de inducción (Figura 20), los cuales fluctúan de 0 a 7.2 por ciento (Figura 21).

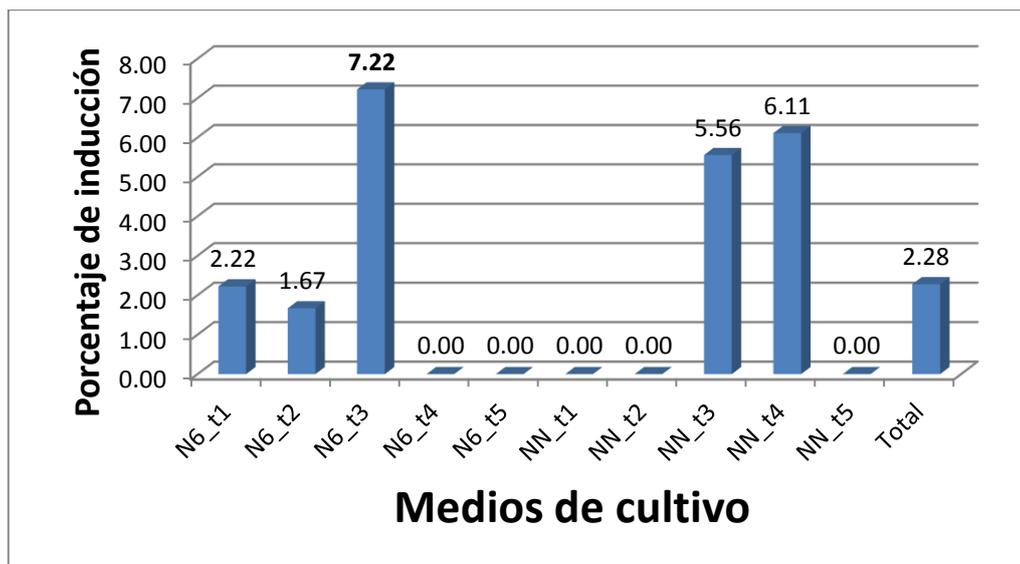


Figura 21: Efecto de los tratamientos de inducción (interacción del medio basal y tratamiento hormonal) en la tasa de inducción de callos utilizando como explante las anteras.

El porcentaje de inducción de callos totales a partir de anteras fue bastante bajo (2.28 por ciento en la Figura 17), sin embargo, este valor que duplica el resultado obtenido por Soplin 2009 con la variedad de quinua ‘Rosada de Huancayo’ la cual presentó 1.18 por ciento y superior porcentaje de inducción de callos o embrioides obtenido para las variedades de maíz Marginal 28-T y Dekalb 5005 (0.11 y 0.07 por ciento respectivamente) (Callohuari 2013). Castillo *et al.* 2000, recomienda el cultivo de anteras para la producción de dobles haploides en programas de mejoramiento genético, porque obtuvo mayor número de plantas comparado con el cultivo de microsporas lo cual necesita que la densidad sea 2.4×10^5 microsporas viables por mililitro.

La tasa de formación de callos a partir de ovarios con los tratamientos evaluados fluctuó de 22.5 a 79.17 por ciento (Figura 22), este resultado fue óptimo para kiwicha considerando que el cultivo de ovarios y óvulos *in vitro* no ha tenido éxito en otras especies, salvo unas pocas excepciones (Lentini *et al.* 1997).

Zhang et al (2004) menciona que los medios de cultivo con reguladores de crecimientos son cruciales para el cultivo de óvulos, para la formación de semillas de hibridación interespecífica, teniendo mejores resultados con el medio B5 y MS con diferentes concentraciones hormonales.

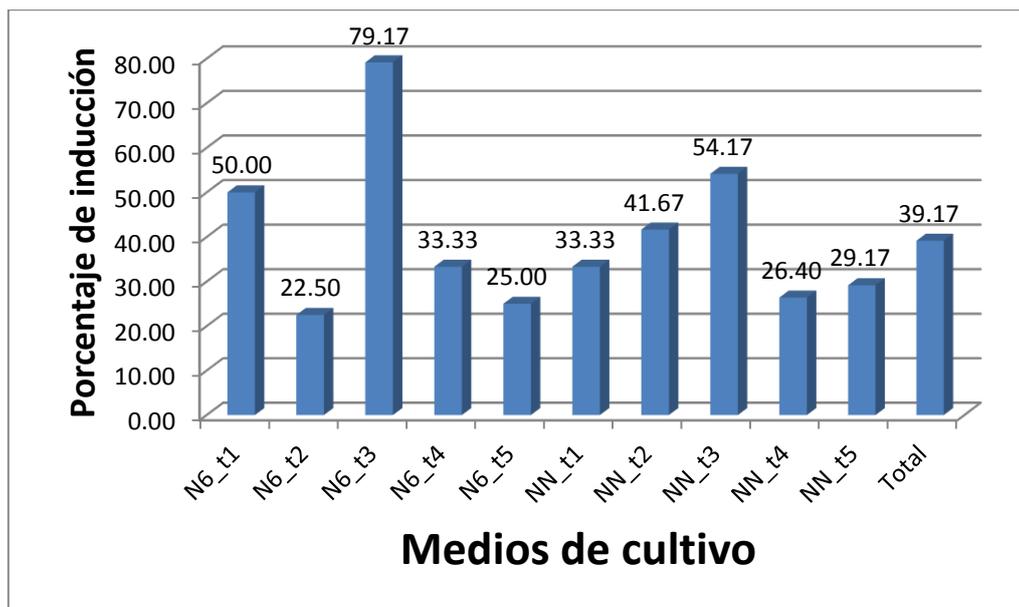


Figura 22: Efecto de los tratamientos de inducción (interacción del medio basal y tratamiento hormonal) en la tasa de inducción de callos utilizando como explante los ovarios.

El cultivo con anteras u ovarios por separado inició la desdiferenciación a los 15 días, y se observaron callos formados a los 30 días, este tiempo fue más rápido comparado con lo reportado por Prado et al.(2010) quienes obtuvieron callos embriogénicos (con o sin embriones visibles) después de tres meses de cultivo individual de anteras u ovarios de seis cultivares de *Vitis vinífera* L.

El porcentaje de inducción de callos a partir de co-cultivo de anteras con ovarios en los diferentes medios de cultivo fluctúa de 33.33 a 95.83 por ciento, donde el tratamiento t3 en el medio N6 obtuvo la mejor respuesta (Figura 23).

Estos resultados son mejores comparados con el cultivo de anteras y ovarios por separado y no está influenciado sólo por la composición de los medios de cultivo, sino que también podría haber influido el co-cultivo, Liu *et al.* (2002) afirma que la parte femenina del sistema reproductivo juega un rol esencial para la reprogramación del desarrollo esporofítico, estos ovarios vivos sintetizan sustancias responsables para obtener una mayor respuesta embriogénica.

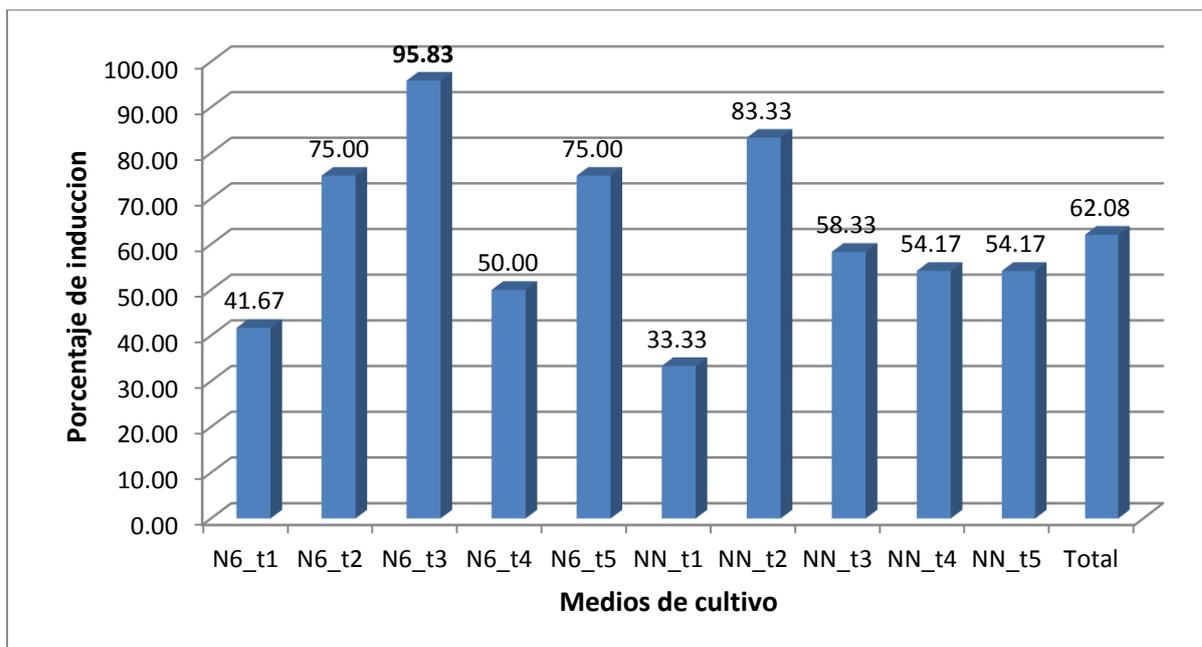


Figura 23: Efecto de los tratamientos de inducción (interacción del medio basal y tratamiento hormonal) en la tasa de inducción de callos utilizando como explante el co-cultivo de anteras con ovarios.

4.4. Embriogénesis gamética indirecta

La embriogénesis gamética es una de las diferentes rutas de embriogénesis presente en el reino vegetal, y consiste en la capacidad de los gametofitos masculinos y femeninos, para cambiar de la ruta gametofítica a la esporofítica, (Germanà 2011), produciendo embrioides a partir de estas células gaméticas. Estos embrioides pueden tener similares estadios morfológicos que los embriones cigóticos descritas para angiospermas dicotiledóneas (estadio globular, corazón torpeda y cotiledón) (Rose y Song 2017).

En la presente investigación se han podido observar embriones en todas las etapas de su desarrollo (Figura 24), esta asincronía es característico en los sistemas de embriogénesis somática *in vitro*; a su vez fue un poco difícil diferenciar entre el estadio globular y corazón debido a que la textura friable del callo las enmascaró.

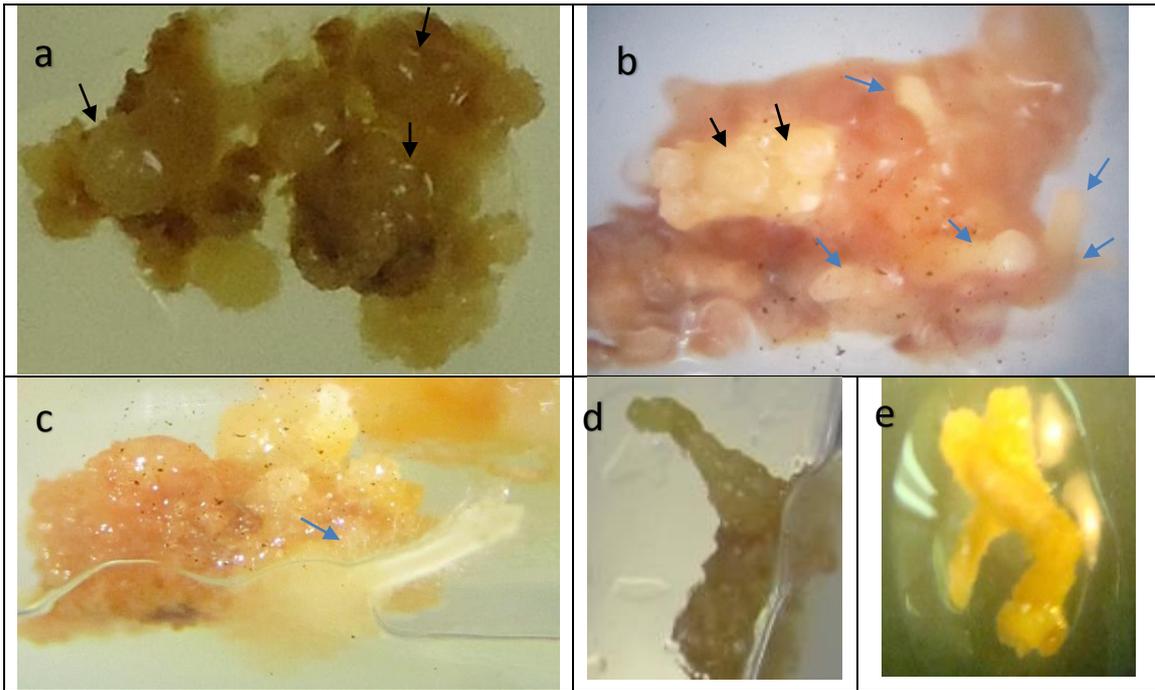


Figura 24: Embriogénesis gamética en *Amaranthus caudatus*. Callo embriogénico después de 119 días; flechas indican embriones en estadio globular y corazón ^a. Masa embriogénica con embriones gaméticos en estadios globular y torpedo ^b. Callos embriogénicos con embriones gaméticos en estadio torpedo ^{cd}. Embriones fusionados en estadio cotiledonar y torpedo ^e. Los embriones provienen del diferentes tipos de explante: de co-cultivo (abc), de ovarios (d) y anteras (e).

En esta etapa se evaluó porcentaje de embrioides gaméticos totales obtenido en cada medio de cultivo, cabe resaltar que en la fase de inducción sólo se obtuvieron callos simples o pro embriogénicos sin la formación de embrioides, por lo cual, los callos obtenidos fueron transferidos en los 47 medios de cultivo de regeneración, de los cuales se eligieron 20 medios de cultivo (Cuadro 9) para los análisis estadísticos, los cuales tuvieron mejor respuesta y menor porcentaje de necrosamiento incluyendo a los 3 tratamientos de la Cuadro 4, los 14 primeros tratamientos de la Cuadro 5, los tratamientos 3, 6 y 9 de la Cuadro 7.

Cuadro 9: Medios de cultivo seleccionados para la evaluación de porcentaje de embrioides formados

t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	t9	t10	t11	t12	t13	t14	t15	t16	t17	t18	t19	t20
Cuadro 4						Cuadro 5						Cuadro 7							
1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	3	6	9

Se observó que hubo menor porcentaje de necrosamiento de callos y mejor respuesta embriogénica en los tratamientos que incluían medio basal N6 con de 25 mg/L de sucrosa comparado con el mismo medio con el doble de sucrosa, Una alta concentración de este monosacárido podría inducir al cultivo de callos a producir etileno que podría inhibir la embriogénesis como lo mencionan Chu *et al.*(1990), quienes obtuvieron menor tasa de embrioides con sucrosa comparado con glucosa.

En los tratamientos de la Cuadro 6 (adicionando adenina) no hubo variación, por lo cual en la cuarta etapa se prescindió de la adenina. La adenina a una concentración de 5 mg/L indujo la formación de callos embriogénicos, sin la regeneración de plantas verdes, pero a una concentración de 50 mg/L la embriogénesis fue menor con bajo porcentaje de plantas; en general se obtuvo mejores resultados con otros reguladores de crecimiento como zeatina o BAP sin adenina. (Kiviharju *et al.* 2005). Podría ser que la concentración de adenina utilizada no fue suficiente para la inducción de embrioides como lo obtenido por Kayim y Koc (2006), quienes obtuvieron callos embriogénicos a partir del cultivo de óvulos en medio que contenían adenina a una concentración de 40 mg/L, la cual duplica a la presente investigación.

En el Anexo 6, el análisis de variancia muestra que existe diferencias significativas entre los tratamientos a un nivel de significancia de 0.01, el porcentaje de embriogénesis fluctuó de 37.5 a 325 por ciento, y la prueba de Tukey agrupa a los distintos tratamientos (Figura 25) revelando la mayor respuesta embriogénica (325 por ciento) con el medio t4 (N6 solidificado con agar, con 50 g/L sucrosa, 0.5 mg/L de AIA y 0.9 mg/L de KIN). Con el tratamiento t15 (N6 con 25 g/L de sucrosa, 0.5 mg/L de ácido giberélico, 0.05 mg/L de AIA y 2 mg/L de KIN) se obtuvo 238 por ciento de formación de embrioides.

Castillo (2000), menciona que el tipo de auxina (IAA, ANA o PAA), en el medio de cultivo no afecta el porcentaje de plantas o embrioides pero si afecta la calidad de las plantas; observó que las plantas desarrolladas en el medio con IAA y NAA tiene alto número de raíces comparado con los medios con PAA.

Lentini *et al.* (1997) menciona que las giberelinas y ciertas auxinas como AIA son extremadamente inestables y sus soluciones madre deben ser preparadas al momento de usarlas.

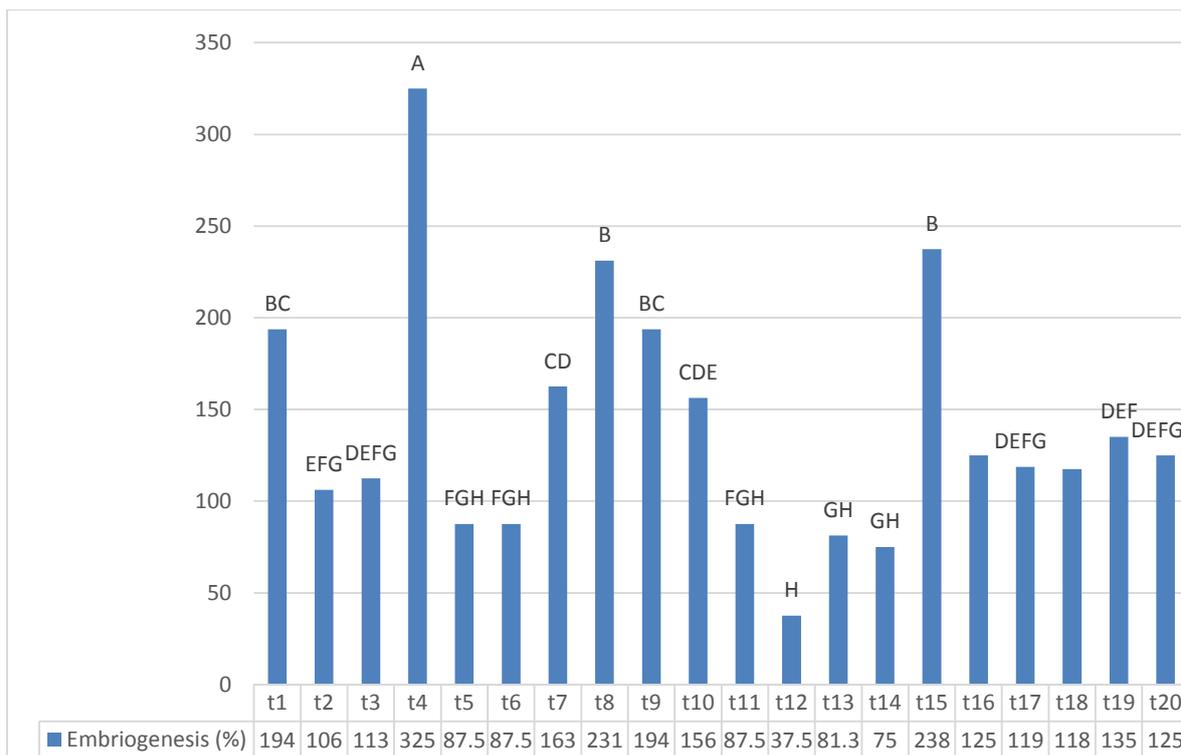


Figura 25: Efecto de veinte medios de cultivo en la formación de embriones gaméticos. Barras que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En esta investigación se obtuvieron brotes por embriogénesis gamética indirecta, es decir hubo formación de callos y posterior desarrollo de embrioides. En el cultivo *in vitro* de anteras de trigo, la hormona 2,4-D a una concentración de 0.5 mg/l fue suficiente para iniciar la embriogénesis del polen regenerando directamente plantas verdes sin la formación de callos, al transferirlos a un medio libre de 2,4-D (Chu *et al.* 1990).

El medio de inducción i3 (el cual obtuvo la mayor tasa de inducción de callos), contenía la misma concentración de 2,4-D y se transfirieron a medios sin esta hormona, sin embargo no fue suficiente para la embriogénesis directa.

(Rose y Song 2017) menciona que para inducir la embriogénesis se usa comúnmente una auxina, o auxina más citoquinina, y para la maduración se elimina la auxina, además puede utilizarse otras hormonas endógenas como ácido abscísico, etileno y ácido giberélico en concentraciones adecuadas para la embriogénesis. Con kiwicha se obtuvo un incremento de la embriogénesis al adicionar ABA (0.1 mg/L) y zeatina (0.2 mg/L) en los medios t18, t19 y t20 118,135 y 125 por ciento de embriogénesis respectivamente, comparándolo con los otros medios utilizados en los estudios preliminares.

La fructosa y especialmente la sucrosa son comúnmente empleados como fuente de carbono para el cultivo de tejidos de plantas, algunos autores mencionan que estos monosacáridos podrían influir en la inducción de callos embriogénicos; por otro lado (Chu *et al.* 1990) reporto una mayor tasa de embrioides con la glucosa que la sucrosa (monosacárido utilizado en nuestra investigación) podría inducir al cultivo de anteras a producir etileno que podría inhibir la embriogénesis. Los tratamientos t1, t2 y t3 contenían 50 g/L de sucrosa, el porcentaje fluctuó de 106 a 194 por ciento siendo mayor para el tratamiento t1. La concentración de sucrosa no influyo mucho en los resultados de embriogénesis pero podría haber influido en la regeneración de planta verde.

Según (Kayim y Koc 2006), la embriogénesis a partir de callos derivados de óvulos en cítrico fue inducida por los carbohidratos, sin embargo Liu et al (2002), Roca y Mroginski (1991) afirman que la formación de callos y embrioides está mucho más influenciada por el componente genético.

4.5. Regeneración

4.5.1. Formación de brotes

El análisis de variancia muestra que los medios de cultivo influyen en el porcentaje de formación de brotes (Anexo 7). Existen diferencias significativas entre los tratamientos de regeneración por la prueba Tukey ($p=0.01$), donde el tratamiento t12 (N6, 25 g/L sacarosa, 15 mg/L AG, 0.05 mg/L AIA, 2 mg/L KIN) fue el mejor y obtuvo 62.5 por ciento de formación de brotes (Figura 26). Se observó solo brotes a partir de los embriones sin la región radicular con una coloración crema o amarillenta, muchos de los cuales posteriormente necrosaron (Figura 27).

Maluszynski *et al.* (2003) reportaron el desarrollo de plántulas haploides albinas a partir de embriones androgénicos por el cultivo de anteras, afirmando que podría estar relacionado a los plastidios poco desarrollados en el estadio temprano del desarrollo de la microspora y las condiciones del crecimiento de las plantas.

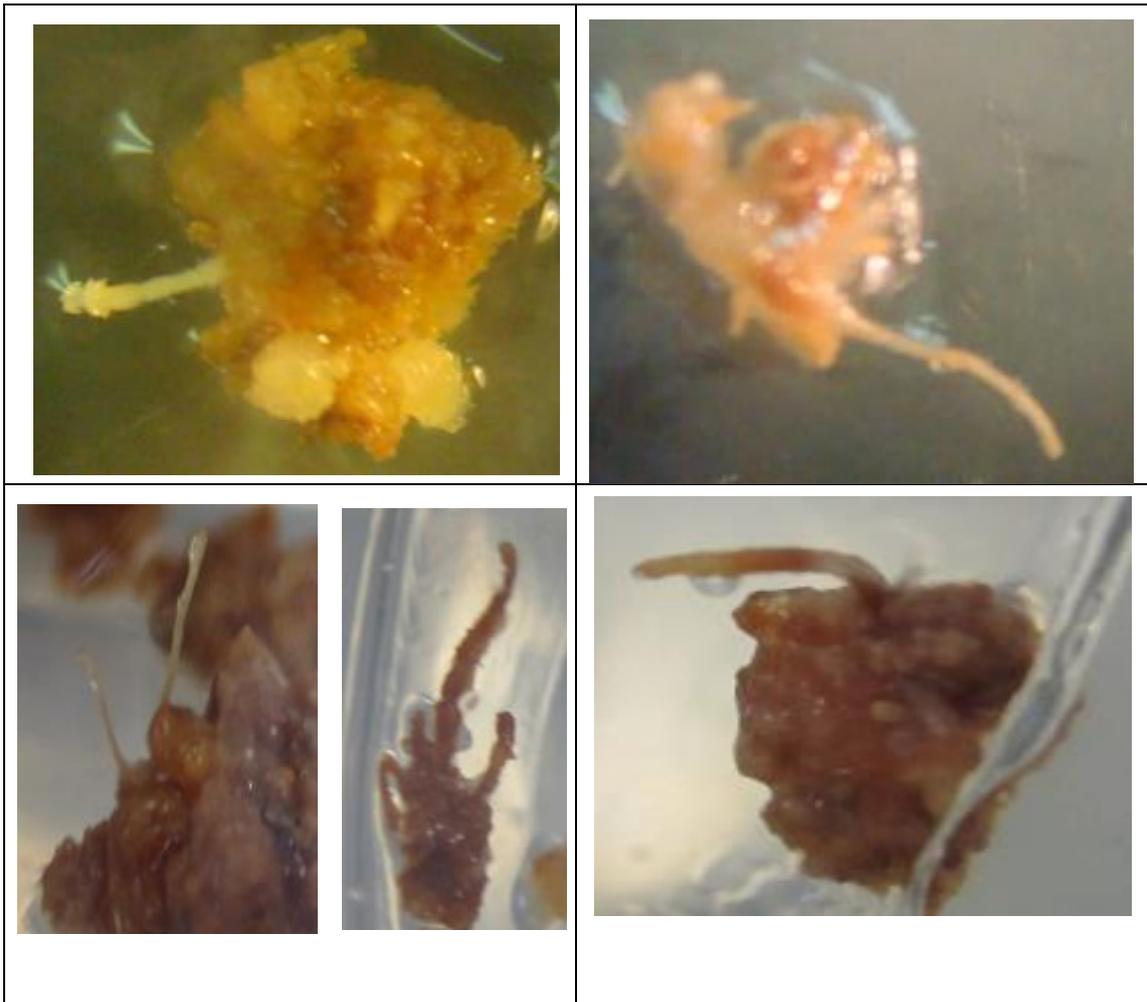


Figura 26: Embriones gaméticos con brotes. En el medio t2 con las hormonas ANA y BAP (0.4 mg/L) luego de 96 días desde la siembra a partir de co-cultivo (Superior). Brotes necrosados observados en el medio t10 y t11(inferior izquierda), con el medio t16 (inferior derecha)

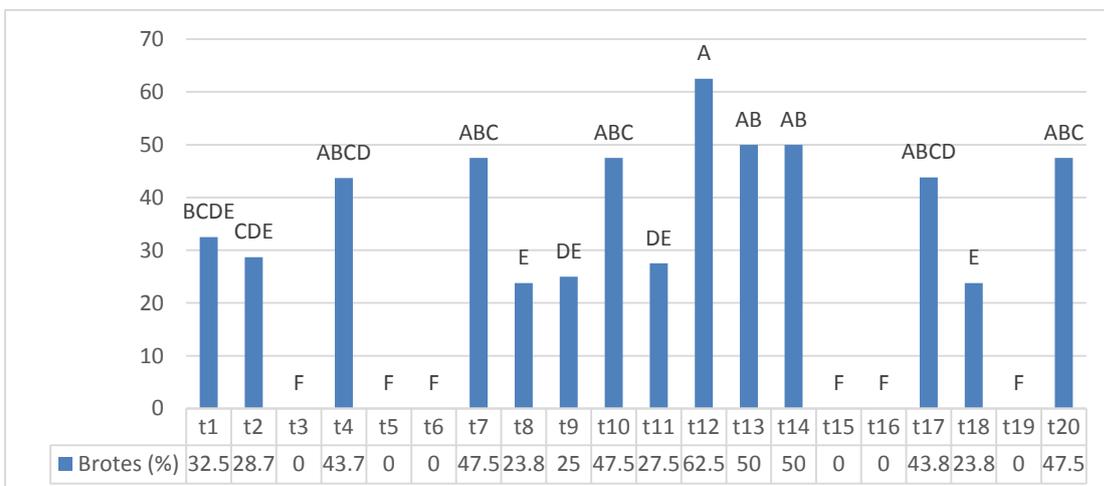


Figura 27: Efecto de los tratamientos de regeneración en la tasa de formación de brotes. Diferencias significativas entre los tratamientos por la prueba Tukey ($p=0.01$). Barras que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.5.2. Formación de raíces

Solo en seis medios de cultivo hubo formación de raíces a partir de callos embriogénicos (Figura 28), estas anomalías fueron observadas probablemente porque los medios no cubrieron los requerimientos necesarios para la formación del eje caular, y se originaron raíces, en esta etapa se cambiaron los medios de cultivo cada 30 días, tiempo en el cual se podría haber agotado las hormonas. (Chengalrayan *et al.* 1997) menciona que embriones morfológicamente anormales germinaron y produjeron raíces sólo en medio carente de reguladores de crecimiento. La maduración anormal del embrión somático es una de las dificultades de esta tecnología para la alta producción de plantas normales (Prado *et al.* 2010).

El proceso de autoclavado podría haber influenciado en la etapa de regeneración, Li y Devaux (2005) mencionan que este proceso podría degradar carbohidratos y precipitar algunos macroelementos como CaCl_2 y KH_2PO_4 , maltosa y FeEDTA , lo cual tendría a disminuir la tasa de regeneración de plantas verdes a comparación de los procesos de filtración y el autoclavado con filtración de componentes inorgánicos.

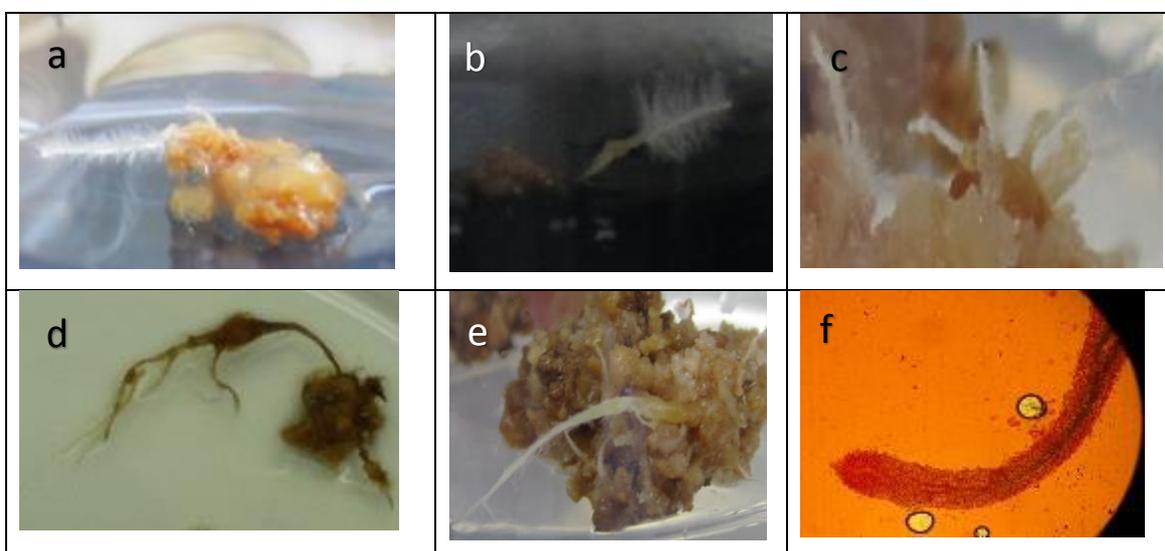


Figura 28: Raíces formadas a partir de callos sin la formación del área caular. Callos embriogénicos con raíces plumosas en medio con carbón activado ^{ab}, en la región apical y base del callo ^c, raíces ramificadas de 30 mm de longitud ^{de} y observación al microscopio electrónico (aumento de 100x) ^f.

El análisis de variancia (Anexo 8), muestra que no se obtuvo diferencias significativas entre los tratamientos de regeneración evaluados (6 tratamientos) para el porcentaje de regeneración de raíces que fluctuó de 23.7 a 47.5 por ciento (Figura 29). En los 41 medios restantes no hubo formación de raíces.

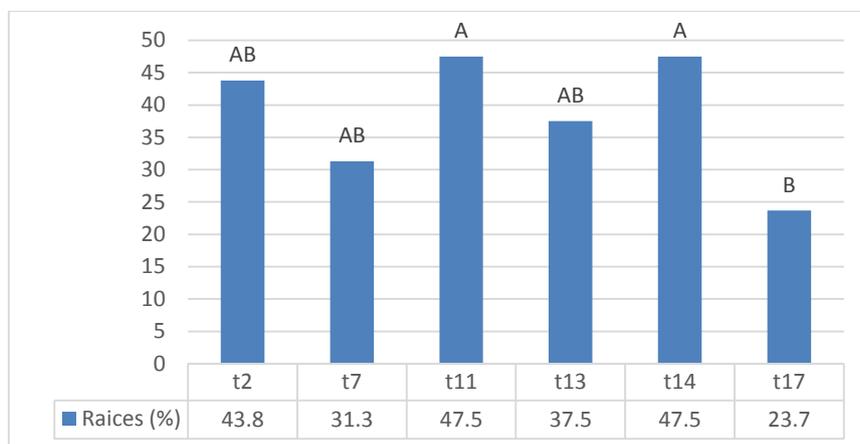


Figura 29: Efecto de los tratamientos de regeneración en la formación de raíces. Barras que no comparten una letra son significativamente diferentes.

De los 47 medios de cultivo evaluados en la regeneración se obtuvieron callos que mostraron una variación de colores de tonalidades crema, amarillo y verde con intensidad de color clara intensa y oscura (Figura 30) los cuales se evaluaron a través del cuadro de color (Anexo 9). La textura de los callos fue blanda friable para todos los medios excepto para el t9 y t10 que incrementaron su dureza después de 128 después de estar expuestas en el medio de cultivo.

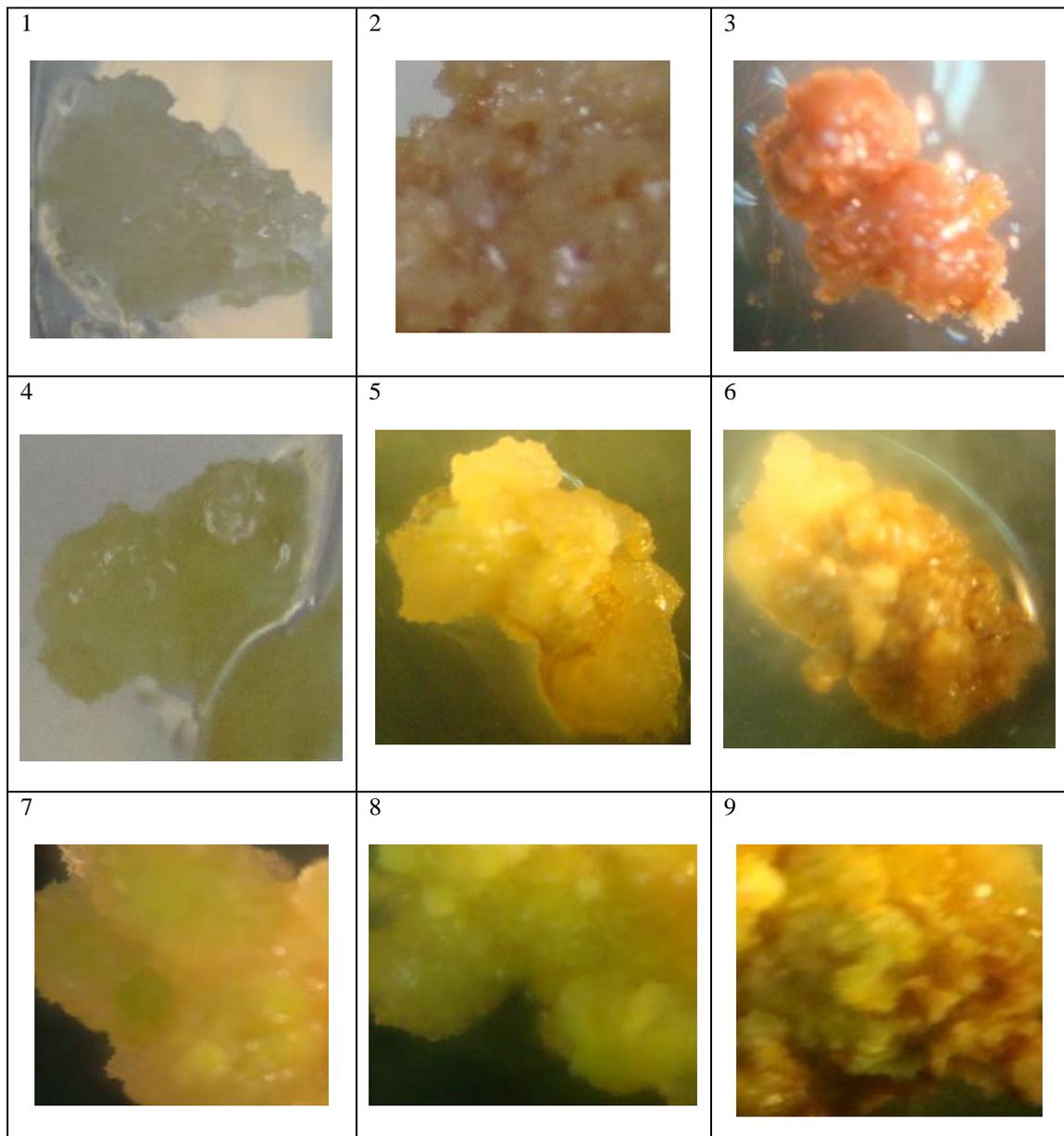


Figura 30: Coloración de callos. Crema, amarillo y verde (de arriba hacia abajo) con intensidad de color clara intensa y oscura (de izquierda a derecha).

Con los medios t1 y t3 los cuales contenían como medio basal MS se obtuvieron callos de una coloración heterogénea de verde claro con crema, que se necroso a los 120 días, pero en el caso de t1 fue el tratamiento en que regenero la única planta verde, esto hace suponer que la coloración u oscurecimiento de los callos nos son determinantes en la regeneración de las plantas.

Por el tipo de explante no hubo variación de color como se observa en la Figura 31, donde el tratamiento t3 mantenía a los callos embriogénicos de una coloración verdosa tanto para los que provenían de anteras o co-cultivo como explante.

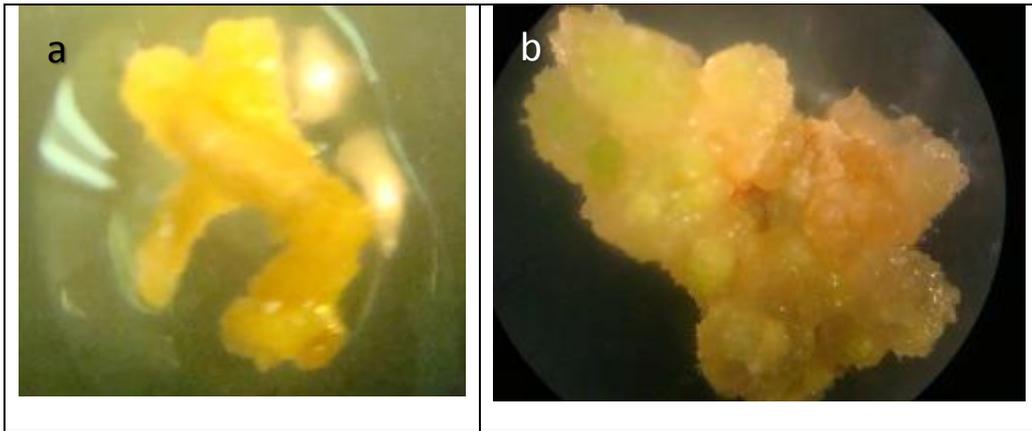


Figura 31: Embriones gaméticos observados en el tratamiento t3 con medio basal MS y las hormonas KIN y 2,4-D (0.2 y 1 mg/L respectivamente) luego de 96 días desde la siembra a partir de antera ^a y co-cultivo ^b

Los tratamientos que contenían 50 g/L de sucrosa y las hormonas AIA y KIN (t4 y t6) tuvieron una coloración crema claro. En los demás tratamientos se observó una coloración heterogénea amarilla (clasificación 4,5 y 6) y fueron estas tonalidades las más frecuente representando casi el 70 por ciento del total de callos. En general los callos mantenían su coloración en el tiempo solo se oscurecían al pasar más de 15 días después del subcultivo en un medio fresco como se observa en la Figura 32.

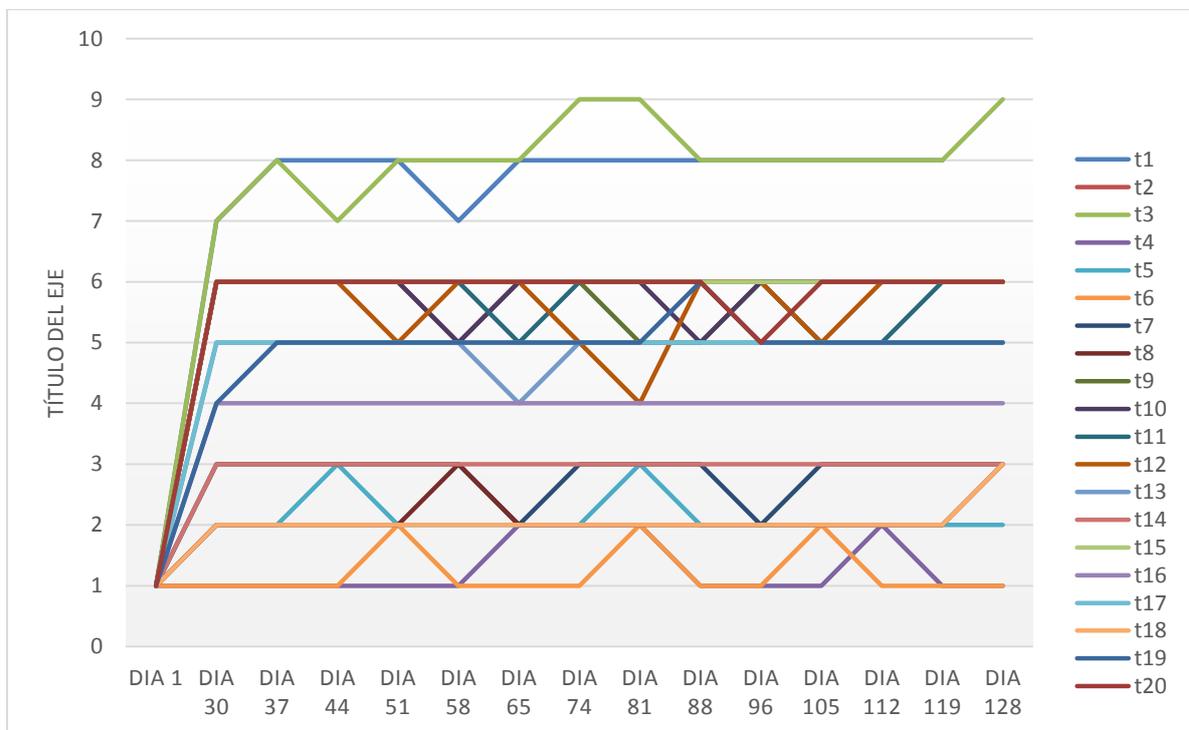


Figura 32: Evolución del color de los callos en el tiempo colocados en diferentes medios de regeneración

Trejo-Tapia *et al.* en el 2008, obtuvieron dos tipos de callos en *B. vulgaris* callos de color homogéneo (amarillos, rojos y blancos) y callos heterogéneos mostrando diferentes colores (verde, amarillo, rojo y blanco) se observó que la proporción de 2,4-D y kinetina en combinación con la fuente de explante fueron determinantes en la inducción de los callos amarillos. En el presente estudio se obtuvo callos de una tonalidad verdosa con el medio basal MS.

(Soplín 2009) obtuvo callos blancos a partir del cultivo de anteras en las dos variedades de quinua, y sólo un callo verde en la variedad "Rosada de Huancayo".

4.5.3. Regeneración de brotes verdes

El callo proveniente del co-cultivo llegó a regenerar solo una planta verde en el medio t1 (Figura 33) compuesto por el medio basal MS, 30 g/L sucrosa, 0.5 mg/L de AIA y 0.5 mg/L de KIN. La tasa de regeneración podría incrementarse al renovar periódicamente los ovarios, debido que solo cuatro no fue suficiente para la regeneración de plantas, los cuales actúan como sustancias similares al ácido fenilacético (PAA). (Patel *et al.* 2004) afirma que condiciones de co-cultivo con ovarios no pueden sustituir altas concentraciones de PAA en el cultivo de microsporas en trigo. Lo contrario a lo obtenido por Li y Devaux (2001), quien incrementó el porcentaje de embriones y plantas regeneradas cuando introdujo ovarios inmaduros al cultivo *in vitro* de microsporas de cebada.

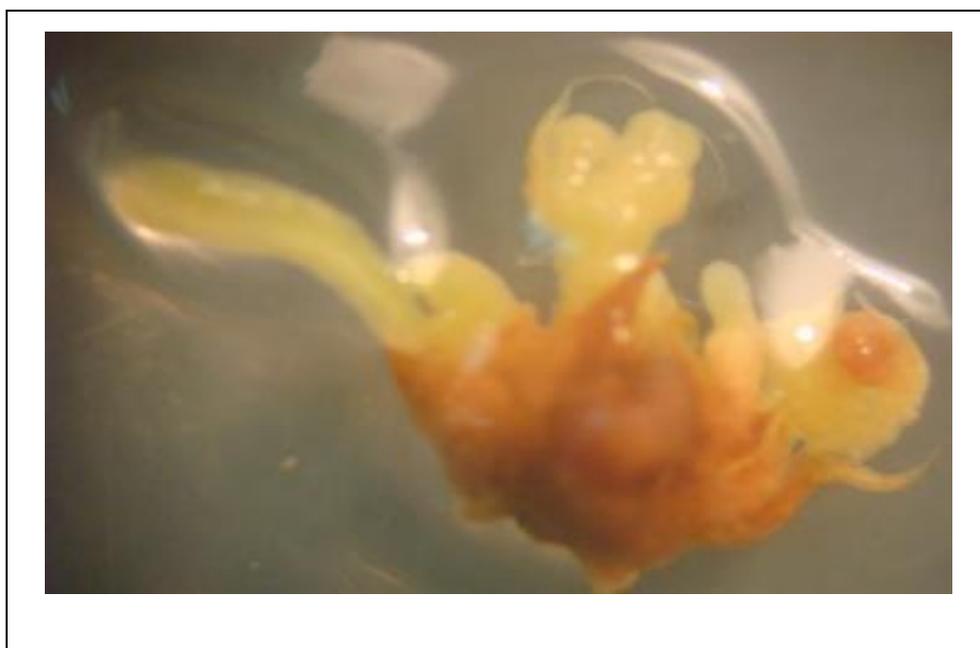


Figura 33: Regeneración de brotes verdes en el medio MS1 con las hormonas IAA y KIN (0.5 mg/L). Callo con 128 días de subcultivos donde se observa hojas verdes (flechas), embrioides en estadios cotiledonar y torpedo. Fue inicialmente obtenido a partir de co-cultivo en el medio de inducción N6'4.

La respuesta al cultivo *in vitro* podría estar influenciada por el aspecto genético, además la formulación el medio de cultivo es muy importante para la respuesta en la regeneración de plantas verdes, muchos autores han evaluado diferentes concentraciones y tipos de azúcares, hormonas, aminoácidos, entre otros buscando la mejor combinación (Patel *et al.* 2004) obtuvo una mejor respuesta al combinar el medio CHB con 0.5 mg/l de 2,4 D y 9 por ciento de maltosa en presencia de ovarios, con aditivos otros orgánicos como MET y agente gelificante Gelrite. (Castillo *et al.* 2000) produjo plantas a partir de anteras y microsporas de cebada, con alto número de hojas y raíces en los medios de regeneración reduciendo la concentración de maltosa, eliminando el nitrógeno orgánico en la regeneración y el uso de auxinas IAA o NAA.

En este estudio a pesar de evaluar 41 combinaciones diferentes de medios de cultivo con aditivos en concentraciones diferentes no se obtuvo una respuesta favorable podríamos afirmar que esta especie es recalcitrante al cultivo *in vitro*.

La fase de aclimatación no se pudo realizar porque la única planta regenerada no enraizó y murió a los 7 días de aparecer las hojas verdes. El medio de cultivo para el enraizamiento utilizado tuvo el mismo contenido de nutrientes solo que se le adicionó carbón activado 4 g /L para reducir el oscurecimiento de los tejidos pensando que podría ser beneficiosa para el cultivo, lo cual no sucedió; algunos autores mencionan que el carbón activado altera el medio de muchas maneras, absorbiendo el auxinas (ANA) y citoquininas, vitaminas como tiamina y ácido nicotínico y quelatos de hierro.

VII. CONCLUSIONES

1. Se logró la inducción de callos haploides a partir del cultivo *in vitro* de anteras y ovarios de kiwicha.
2. Se determinó que el estado fenológico óptimo para colectar las inflorescencias con microsporas uninucleadas es el inicio de piramidación para la variedad Centenario de kiwicha, lo que corresponde a los 90 a 100 días después de la siembra cuando las anteras no son visibles.
3. Se determinó que el método de desinfección eficiente para las inflorescencias de kiwicha, consiste en sumergir las inflorescencias en alcohol al 96 por ciento durante 1 minuto, luego en lejía comercial disuelta al 25 por ciento durante 5 minutos y finalmente enjuagar tres veces con agua destilada estéril, se eligió este método debido a su menor tiempo de ejecución, ausencia de explantes necrosados y libre de contaminación.
4. El medio óptimo para la inducción de callos a partir del cultivo *in vitro* de anteras, ovarios y co-cultivo estuvo compuesto por el medio basal N6 con la combinación hormonal del tratamiento t3 (2 mg/L BAP, 1.5 mg/L ANA y 0.5 mg/L 2,4-D) cuya respuesta se observó después de 15 días de colocar el explante en el medio de cultivo.
5. La formación de callos se incrementa por el co-cultivo de anteras con ovarios como explantes en la variedad Centenario de kiwicha.

VIII. RECOMENDACIONES

- Para incrementar el porcentaje de regeneración evaluar diferentes temperaturas de incubación y compuestos derivados de urea con actividad citoquinina como el TDZ (N-fenil-N7-1,2,3-thidiazol-5-ylurea) y CPPU (N-(2-chloro-4-pyridil)-N7-fenilurea) que fue utilizado en otros trabajos para la regeneración de plantas recalcitrantes.
- Utilizar la técnica para inducir y regenerar plantas en otros progenitores con el fin de obtener una mayor respuesta y puedan ser incluidos en los programas de mejoramiento genético y acelerar la obtención de líneas mejoradas

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alan, A; Mutschler, M; Brants, A; Cobb, E; Earle, E. 2003. Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn. *Plant Science* 165(6): 1201–1211. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00327-3.

APG (Angiosperm Phylogeny Group). 2016. Classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181(1): 1-20. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x.

Bruni, R; Medici, A; Guerrini, A; Scalia, S; Poli, F; Muzzoli, M; Sacchetti, G. 2001. Wild *Amaranthus caudatus* Seed Oil, a Nutraceutical Resource from Ecuadorian Flora. *Journal of agricultural and food chemistry* 49(11): 5455-5460. DOI: 10.1021/jf010385k.

Callohuari, Y. 2013. Cultivo de anteras in vitro para la producción de individuos haploides de maíz (*Zea mays* L.). Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 71p

Camarena, F; Chura, J; Blas, R. 2008. Mejoramiento genético y biotecnológico de plantas 1ra edición. Universidad Nacional Agraria La Molina- Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica. Lima-Perú. 241p

Castillo, A; Vallés, M; Cistué, L. 2000. Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. *Euphytica* 113(1): 1–8. DOI: 10.1023/A:1003937530907.

Chengalrayan, K; Mhaske, V; Hazra, S. 1997. High-frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos. *Plant Cell Reports* 16(11): 783–786. DOI: 10.1007/s002990050320.

Chu, C. 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: Proceedings of Symposium on Plant tissue culture, 25.30 May 1978. Science Press, Peking, 45–50.

Chu, C; Hill, R; Brule-Babel, L. 1990. High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. Plant Science 66(2): 255-262. DOI: 10.1016/0168-9452(90)90211-6.

Coronel, R. 2000. Caracterización de líneas Dobles Haploides de Cebada (*Hordeum vulgare*) bajo condición de La Molina. Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 90 p.

Dunwell, J. 2010. Haploids in flowering plants: Origins and exploitation. Plant Biotechnology Journal 8(4): 377–424. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x.

Dwivedi, S; Britt, A; Tripathi, L; Sharma, S; Upadhyaya, H; Ortiz, R. 2015. Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. Biotechnology Advances 33(6): 812–829. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.001

Ferrie, A. 2017. Doubled Haploid Production in Higher Plants Editors: Brian Thomas, Brian G Murray, Denis J Murphy. Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition) 147-151. DOI: 10.1016/B978-0-12-394807-6.00189-1

Fritsche-Neto, R; Borém, A. 2014. Double Haploids. Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars (Vol. 88). Elsevier Inc. DOI: 10.1016/B978-0-12-418672-9.00009-X

Gelinas, B; y Seguin, P. 2007. Oxalate in Grain Amaranth. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(12): 4789-4794. DOI: 10.1021/jf070384d

Germanà, M. 2011. Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 104(3): 283-300. DOI:10.1007/s11240-010-9852-z

Jiménez, J. 1997. Desarrollo de líneas mutantes dobles haploides de cebada (*Hordeum vulgare* L.) mediante el cultivo “*in vitro*” de anteras y su evaluación en condiciones de campo. Tesis para optar el grado de Magister of Scientiae en Mejoramiento genético de plantas. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 87 p.

Kasha, K. 2005. Chromosome Doubling and Recovery of Doubled Haploid Plants. In: Don Palmer C., Keller W.A., Kasha K.J. (eds) Haploids in Crop Improvement II. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 56. Springer, Berlin, Heidelberg.

Kasha, K. y Kao, K. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature 225(5235): 874-876. DOI:10.1038/225874a0.

Kayim, M. y Koc, N. 2006. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. Scientia Horticulturae 109(1): 29-34. DOI: 10.1016/j.scienta.2006.01.040

Kiviharju, E; Moisander, S; Laurila, J. 2005. Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81(1): 1-9. DOI: 10.1007/s11240-004-1560-0

Lentini, Z; Martínez, C; Roca, W. 1997. Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. Centro internacional de agricultura tropical, Cali-Colombia. 57 p.

Li, H; y Devaux, P. 2001. Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. Plant Cell Reports 20(6): 475-481. DOI: 10.1007/s002990100368

Li, H. y Devaux, P. 2005. Isolated microspore culture overperforms anther culture for green plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.). Acta Physiologiae Plantarum 27(1): 611-619. DOI:10.1007/s11738-005-0065-8.

Li, J; Wang, Y; Lin, L; Zhou, L; Luo, N; Deng, Q; Qiu, Y. 2008. Embryogenesis and plant regeneration from anther culture in loquat (*Eriobotrya japonica* L.). Scientia Horticulturae 115(4): 329–336. DOI: 10.1016/j.scienta.2007.10.007

Liu, W; Zheng, M; Polle, E; Konzak, C. 2002. Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via Induced microspore embryogenesis. *Crop Science* 42(3): 686–692. DOI: 10.2135/cropsci2002.0686

Maluszynski, M; Kasha, K; Forster, B; Szarejko, I. 2003. Doubled haploid production in crop plants: A manual. Springer, Dordrecht - The Netherlands. p 309-335. DOI: 10.1007/978-94-017-1293-4_46.

Maluszynski, M; Szarejko, I; Barriga, P. y Balcerzyk, A. 2001. Heterosis in crop mutant crosses and production of high yielding lines using doubled haploid systems. *Euphytica* 120(3): 387–398. DOI: 10.1023/A:1017569617715.

Mujica, A. 1997. El cultivo del Amaranto (*Amaranthus* spp.): producción, mejoramiento genético y utilización. Santiago: FAO/Puno. 145p.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15(1) 473-497.

National Research Council. 1984. Amaranth: Modern prospects for an ancient crop. (National Academy Press, Ed.). Washington, DC. 81 p.

Nitsch, J. y Nitsch, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163(3862): 85-87. DOI: 10.1126/science.163.3862.85.

Patel, M; Darvey, N; Marshall, D; Berry, J. 2004. Optimization of culture conditions for improved plant regeneration efficiency from wheat microspore culture. *Euphytica* 140(3): 197-204. DOI: 10.1007/s10681-004-3036-z

Peter, K. y Gandhi, P. 2017. Rediscovering the therapeutic potential of *Amaranthus* species : A review. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 4(3):196-205. DOI: 10.1016/j.ejbas.2017.05.001

Prado, M; Grueiro, M; Gonzales, M; Testillano, P; Domínguez, C; López, M; Rey, M. 2010. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from anthers and ovaries of six

autochthonous grapevine cultivars from Galicia (Spain). *Scientia Horticulturae* 125(3): 342-352. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.04.019

Puoumatka, M. y Pauk, J. 1999. Impact of Explant Type, Duration and Initiation Time on the Co-Culture Effect in Isolated Microspore Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of plant physiology* 154(3): 367–373. DOI: 10.1016/S0176-1617(99)80182-5

Roca, W; Nuñez, V; Mornán, K. 1991. Cultivo de anteras y mejoramiento de plantas. En: Capítulo 11. Cultivo de Tejidos En La Agricultura. p 271-294

Rose, R. y Song, Y. 2017. Somatic Embryogenesis. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-394807-6.00147-7

Shariatpanahi, M; Belogradova, K; Hessamvaziri, L; Heberle-Bors, E; Touraev, A. 2006. Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. *Plant Cell Reports* 25(12): 1294-1299. DOI: 10.1007/s00299-006-0205-7

Solano, C. 2002. Evaluación de líneas dobles haploides de cebada (*Hordeum vulgare*) provenientes de la cruce de UNA La Molina 94 con fuentes de calidad en condiciones de la Molina. Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 157 p.

Soplín, B. 2009. Estudios preliminares para la inducción de callos a partir del cultivo in vitro de anteras de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd). Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú. 58 p.

Stetter, M. y Schmid, K. 2017. Analysis of phylogenetic relationships and genome size evolution of the Amaranthus genus using GBS indicates the ancestors of an ancient crop. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 109(1): 80–92. DOI: 10.1016/j.ympev.2016.12.029

Tapia, M; Gomez, L; Romero, M. 1998. Adaptación de la Metodología de producción de dobles haploides vía cultivo de anteras en trigo (*Triticum aestivum* ssp *aestivum*). *Anales Científicos UNALM* 34: 25–33.

Villanueva, O. y Arnao, I. 2007. Purificación de una proteína de 35 kDa rica en lisina, de la fracción albúmina de *Amaranthus caudatus* (kiwicha). *Anales de La Facultad de Medicina* 68(4): 344-350.

Wojnarowicz, G; Caredda, S; Devaux, P; Sangwan, R; Clément, C. 2004. Barley anther culture: assessment of carbohydrate effects on embryo yield, green plant production and differential plastid development in relation with albinism. *Journal of Plant Physiology* 161(6): 747-755. DOI: 10.1078/0176-1617-01061.

Zhang, G; Tang, G; Song, W; Zhou, W. 2004. Resynthesizing *Brassica napus* from interspecific hybridization between *Brassica rapa* and *B. oleracea* through ovary culture. *Euphytica* 140(3): 181-187. DOI: 10.1007/s10681-004-3034-1.

Zhu, F; Cai, Y; Sun, M; Corke, H. 2008. Influence of amaranthus betacyanin pigments on the Physical Properties and Color of Wheat Flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(17): 8212-8217. DOI: 10.1021/jf801579c.

X. ANEXOS

Anexo 1: Código decimal desarrollado por Darwinkel, A, y Stolen, O. para quinua y kiwicha

AG - 4005 Cereales Menores y Granos Nativos

ESTADO DE CRECIMIENTO (EC) DE QUINUA / KIWICHA

El estado de crecimiento se puede indicar empleando el código decimal desarrollado por Darwinkel, A, y Stolen O. en Understanding the quinoa crop EU-proyect (AIR PROYECT 931426).

Cod.	Estado	Cod.	Estado
0	Germinación	5	Defloración
00	Semilla seca	50	(Marchitez de anteras)
01	Inicio de germinación	51	Anteras de 1° glomérulo marchitas
-		53	25 % glomérulos - anteras marchitas
-		55	50 % glomérulos - anteras marchitas
-		57	75 % glomérulos - anteras marchitas
09	Fin de germinación	59	Casi todas las anteras marchitas
1	Emergencia	6	Llenado semilla /coloración panoja
10		60	Estado acuoso/panoja verde
11	Inicio de germinación	61	Estado lechoso/inicio coloración panoja
13	25 % de plántulas observables	63	25 % coloración de panojas
17	75 % de plántulas observables	65	Estado pastoso/50% de coloración
19	Emergencia completa	67	75 % de coloración de panojas
2	Desarrollo vegetativo	69	Mad. Fisiológica/100% de coloración
20	Primeras hojas verdaderas visibles	7	Maduración de Panojas
21	1° par de hojas desplegadas	71	Inicio de decoloración de panojas
23	3° par de hojas desplegadas	73	25 % de panojas decoloradas
-		75	50 % de panojas decoloradas
29	9° par de hojas desplegadas	77	75 % panojas decoloradas
3	Desarrollo de la inflorescencia	79	Panojas casi marchitas
30	Botón floral detectable	8	Senescencia o marchitez de hojas
31	Botón floral visible	81	Inicio de marchitez de hojas
33	Botón floral de 0.5 cm	-	
35	Botón floral de 1.0 cm	83	25 % de hojas marchitas
37	Inicio de piramidación de flores	85	50 % de hojas marchitas
-		87	75 % de hojas marchitas
39	Pirámide de flores distinguible	89	Hojas casi marchitas
4	Inicio de floración	9	Madurez del Tallo
41	1° glomérulo con anteras	91	Amarillamiento inicial del tallo
-		93	25 % de tallos amarillos
43	25 % de glomérulo con anteras	95	50 % de tallos amarillos
45	50 % de glomérulo con anteras	97	75 % de tallos amarillos
47	75 % de glomérulo con anteras	-	
49	Plena floración	99	Tallos decolorados



Anexo 2: ANVA de la influencia del tipo de explante, tiempo exposición y concentración de lejía comercial en el porcentaje de contaminación (etapa de desinfección)

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
Modelo	17	488.208	28.71	21.36	<0.0001	**
Error	90	121.025	1.34			
Total	107	609.234				

CV: 20.93

Anexo 3: Análisis factorial de la influencia del tipo de explante, tiempo exposición y concentración de lejía comercial en el porcentaje de contaminación (etapa de desinfección)

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
a	2	1.379	0.689	0.51	0.6004	NS
b	2	400.102	200.051	148.77	<0.0001	***
c	1	72.981	72.981	54.27	<0.0001	***
a*b	4	2.162	0.54	0.4	0.8067	NS
b*c	2	8.04	4.02	2.99	0.0553	**
a*c	2	1.379	0.689	0.51	0.6004	NS
a*b*c	4	2.162	0.54	0.4	0.8067	NS

Factores fijos: factor a (tipo de explante) con tres niveles (antera, co-cultivo y ovario), factor b (tiempo de exposición a la lejía comercial) con tres niveles (2 min, 5 min y 8 min), factor c (concentración de la lejía comercial) con dos niveles (10 y 25 por ciento).

Anexo 4: ANVA de la influencia del tipo de explante, medio basal y tratamiento hormonal en el porcentaje de inducción de callos

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
Modelo	29	911.058	31.415	59.44	<0.0001	***
Error	150	79.276	0.528			
Total	179	990.335				

CV: 11.624

Anexo 5: Análisis factorial de la influencia del tipo de explante, medio basal y tratamiento hormonal en el porcentaje de inducción de callos

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
a	2	757.263	378.631	716.41	<0.0001	***
b	1	3.986	3.986	7.54	0.0068	**
c	4	58.743	14.685	27.79	<0.0001	***
a*b	2	3.171	1.585	3.0	0.0527	NS
b*c	4	18.023	4.505	8.53	<0.0001	***
a*c	8	55.772	6.971	13.19	<0.0001	***
a*b*c	8	14.097	1.762	3.33	0.0015	***

Factores fijos: factor a (tipo de explante) con tres niveles (antera, co-cultivo y ovario), factor b (medio basal) con dos niveles (N6 y NN), factor c (tratamiento hormonal) con cinco niveles (t1, t2, t3, t4 y t5).

Anexo 6: ANVA de la influencia los medios de cultivo en el porcentaje de formación de embrioides

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
Modelo	19	353540.9375	18607.4178	64.42	<0.0001	***
Error	60	173331.2500	288.8542			
Total	79	370872.1875				

CV: 12.156

Factor fijo: medios de cultivo (t1, t10, t11, t12, t13, t14, t15, t16, t17, t18, t19, t2, t20, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9).

Anexo 7: ANVA de la influencia los medios de cultivo en el porcentaje de formación de brotes

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
Modelo	19	34253.43750	1802.81250	43.38	<0.0001	***
Error	60	2493.75000	41.56250			
Total	79	36747.18750				

CV: 23.28451

Factor fijo: medios de cultivo (t1, t10, t11, t12, t13, t14, t15, t16, t17, t18, t19, t2, t20, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9).

Anexo 8: ANVA de la influencia los medios de cultivo en el porcentaje de formación de raíces

FV	GL	SC	CM	F-CAL	P-VALOR	SIGN
Modelo	5	10.18279113	2.03655823	3.99	0.0131	NS
Error	18	9.19889276	0.51104960			
Total	23	19.38168389				

CV: 10.34706

Factor fijo: medios de cultivo (t11, t13, t14, t17, t2, t7)

Anexo 9: Cuadro para la caracterización de color de los callos embriogénicos

COLOR	CODIGO
Crema claro	1
Crema intenso	2
Crema oscuro - marrón	3
Amarillo claro	4
Amarillo intenso	5
Amarillo oscuro - marrón	6
Verde claro	7
Verde claro intenso	8
Verde oscuro - marrón	9
Marrón (necrosado)	10