

**UNIVERSIDAD NACIONAL
JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS**



**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA CON MENCIÓN EN
BIOTECNOLOGIA**

TESIS

Embriogénesis somática a partir del cultivo *in vitro* de anteras en
rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.)

PRESENTADO POR:

Angel David Hernández Amasifuen

Para optar el Título de Biólogo con mención en Biotecnología

ASESOR:

Mg. Hermila Belba Díaz Pillasca

HUACHO – PERÚ

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL
JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS**



**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA CON MENCIÓN EN
BIOTECNOLOGIA
TESIS**

Embriogénesis somática a partir del cultivo *in vitro* de anteras en rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.)

MIEMBROS DEL JURADO EVALUADOR:

Dr. William Andres Guzmán Sánchez

PRESIDENTE

Mg. Carlos Roberto Pesantes Rojas

SECRETARIO

Mg. Miguel Angel Aguilar Luna Victoria

VOCAL

Mg. Hermila Belba Díaz Pillasca

ASESORA

HUACHO – PERÚ

2019

DEDICATORIA

A Dios, por bendecir a mi familia, brindándonos fuerza, unión y perseverancia.

A mis amados padres, Angel Abel Hernández Cotrina y Lastenia Amasifuen Ochavano, por su invaluable cariño, amor, apoyo, principios, valores, sabios consejos y ser los motivos de inspiración en mi vida.

A mi amada segunda madre, Lay Amacifuen Vda. de Iwahana, a quien admiro por su ejemplo de vida, superación y enseñarme que todo es posible.

Y en memoria a mi querido tío, José Elmer Amasifuen Ochavano, por sus constantes consejos, entusiasmo y ánimos de superación.

AGRADECIMIENTO

A mi asesora Mg. Hermila Belba Díaz Pillasca, por la confianza en mi persona para formar parte del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por su apoyo en la realización de la presente tesis, por su amistad y consejos de su experiencia en investigación.

A mis profesores Mg. Marinoli Rivas Chamorro y Dr. Miguel Machahua González, por la orientación de mi persona a la línea de investigación en biotecnología vegetal, por su vocación y amistad.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Alexandra Pineda, Alexis Argüelles, Anthony Cortez, Paolo Santa Cruz, Julio Rojas y Brayan Lugo, por su compañerismo, amistad y ganas de continuar con la investigación en la línea del laboratorio.

INDICE

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTO.....	4
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	11
Capítulo I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
1.1. Descripción de la realidad problemática	12
1.2. Formulación de problema.....	13
1.2.1. Problema general.....	13
1.2.2. Problemas específicos	13
1.3. Objetivos de investigación	14
1.3.1. Objetivo General	14
1.3.2. Objetivos Específicos.....	14
1.4. Justificación de la investigación.....	14
1.5. Delimitación del estudio.....	15
1.6. Viabilidad del estudio.....	15
Capítulo II: MARCO TEORICO	16
2.1. Antecedentes de la investigación	16
2.1.1. Investigaciones Internacionales.....	16
2.1.2. Investigaciones nacionales	19
2.2. Bases teóricas	20
2.2.1. Rocoto	20
2.2.2. Importancia del rocoto	22
2.2.3. Problemas que afectan al rocoto.....	23
2.2.4. Cultivo de tejidos vegetales.....	24
2.2.5. Aplicaciones del cultivo de anteras	27
2.3. Definiciones conceptuales.....	29
2.3.1. Cultivo de anteras <i>in vitro</i>	29
2.3.2. Embriogénesis somática	30
2.4. Formulación de la Hipótesis.....	30
2.4.1. Hipótesis General	30

2.4.2.	Hipótesis Especificas.....	30
Capítulo III:	METODOLOGIA	31
3.1.	Diseño metodológico.....	31
3.1.1.	Tipo de investigación	31
3.1.2.	Nivel de investigación.....	31
3.1.3.	Diseño	31
3.1.4.	Enfoque	31
3.2.	Población y muestra	32
3.3.	Operacionalización de variables e indicadores	32
3.4.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	32
3.4.1.	Técnicas a emplear	32
3.4.1.1.	Material vegetal.....	32
3.4.1.2.	Botones florales con microsporas uninucleadas.....	32
3.4.1.4.	Inducción de embriones somáticos.....	34
3.4.2.	Descripción de los instrumentos.....	35
3.5.	Técnicas para el procesamiento de la información.....	36
Capítulo IV:	RESULTADOS	37
4.2.	Desinfección de material vegetal	39
4.3.	Inducción de embriones somáticos.....	40
Capítulo V:	DISCUSIÓN	43
Capítulo VI:	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
4.1.	Conclusiones	46
4.2.	Recomendaciones.....	46
Capítulo VII:	FUENTES DE INFORMACIÓN	47
5.1.	Fuentes Bibliográficas.....	47
5.2.	Fuentes Electrónicas.....	51
Anexos.....		52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 . Tratamientos con soluciones desinfectantes de botones florales de rocoto.....	33
Tabla 2. Tratamientos para la inducción de embriones somáticos en anteras de rocoto.	34
Tabla 3. Clasificación de botones florales de rocoto por relación morfológica.	37
Tabla 4. Comparación en la desinfección y necrosis de botones florales de rocoto a los siete días del establecimiento <i>in vitro</i>	39
Tabla 5. Comparación en la desinfección y necrosis de botones florales de rocoto a los 14 días del establecimiento <i>in vitro</i>	40
Tabla 6. Respuesta de formación de callos en anteras de rocoto.	41
Tabla 7. Respuesta de formación de embriones somáticos en anteras de rocoto.	42
Tabla 8. Componentes y concentración de sales para la preparación del medio Murashige y Skoog (MS).	52
Tabla 9. Preparación de stock de kinetina (KIN).	52
Tabla 10. Preparación de stock de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).	53
Tabla 11. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para porcentaje de microsporas en estado uninucleado.	55
Tabla 12. Análisis de varianza para porcentaje de microsporas en estado uninucleado.	55
Tabla 13. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para porcentaje de desinfección de botones florales de rocoto a los siete días del establecimiento <i>in vitro</i>	55
Tabla 14. Análisis de varianza para porcentaje de desinfección de botones florales de rocoto a los siete días del establecimiento <i>in vitro</i>	55
Tabla 15. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para porcentaje de desinfección de botones florales de rocoto a los 14 días del establecimiento <i>in vitro</i>	56
Tabla 16. Análisis de varianza para porcentaje de desinfección de botones florales de rocoto a los 14 días del establecimiento <i>in vitro</i>	56
Tabla 17. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para porcentaje de respuesta de formación de callos en anteras de rocoto.	56
Tabla 18. Análisis de varianza para porcentaje de respuesta de formación de callos en anteras de rocoto.....	56
Tabla 19. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para porcentaje de respuesta de formación de embriones somáticos en anteras de rocoto.	57
Tabla 20. Análisis de varianza para porcentaje de respuesta de formación de embriones somáticos en anteras de rocoto.....	57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales métodos empleados en el cultivo de tejidos vegetales (Camarena <i>et al.</i> , 2014).	24
Figura 2. Potencial morfogénico de los callos (George <i>et al.</i> , 2008).	26
Figura 3. Proceso de embriogénesis somática indirecta (Gómez, 2016).	27
Figura 4. Botones florales de rocoto clasificados por tamaño.	38
Figura 5. Porcentaje de microsporas en estado uninucleado por grupos de índice de relación en botones florales de rocoto	38
Figura 6. Respuesta de cultivo de anteras de rocoto <i>in vitro</i> . A. Antera de rocoto sin respuesta. B. Antera de rocoto con respuesta de formación de callos.	40
Figura 7. Formación de embriones somáticos en anteras de rocoto en condiciones <i>in vitro</i> (flechas).	42
Figura 8. Generación de botones florales de rocoto ecotipo Serrano.	53
Figura 9. Crecimiento de los botones florales de rocoto ecotipo Serrano, incrementando el tamaño de los pétalos con el característico color purpura.	54
Figura 10. Microsporas de rocoto en estadio uninucleado.	54

RESUMEN

El rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.) es un cultivo de gran importancia en Perú, por presentar gran demanda dentro de la gastronomía nacional para salsas y en platos tradicionales como el rocoto relleno. Este cultivo no presenta variedades o cultivares definidos, pero es representado por dos grandes ecotipos que son el Serrano y de Monte, el primero presenta un tamaño menor pero mayor picor, muy utilizado en las salsas; el segundo es de mayor tamaño y menor picor, características por las cuales es empleada para la preparación del rocoto relleno. Para lograr definir un cultivar es necesario la obtención de líneas homocigotas, por esta razón se presenta la alternativa del uso de las herramientas biotecnológicas mediante el cultivo de anteras en condiciones *in vitro*, para obtener generación de individuos homocigotas. Pero la respuesta del cultivo de anteras depende de cada genotipo en estudio, y es necesario establecer una base de establecimiento y generación de embriones somáticos a partir de anteras de rocoto. Por lo previamente descrito, la presente investigación se planteó el objetivo de inducir embriones somáticos en anteras de rocoto en condiciones *in vitro*. Se emplearon botones florales de rocoto del ecotipo Serrano para la determinación del estadio de botón floral con mayor porcentaje de microsporas uninucleadas, determinar el tratamiento con mayor porcentaje de desinfección en botones florales de rocoto y determinar el tratamiento que permita inducir embriones somáticos a partir de anteras de rocoto. El grupo IR4 de botón floral presentó mayor porcentaje de microsporas en estadio uninucleado con 81.3%. El tratamiento D4 logró la mayor desinfección de botones florales con 89.01%. Se obtuvo 18.27% de anteras con formación de embriones somáticas empleando el tratamiento T2.

Palabras claves: Ecotipos, microsporas, uninucleado, embriones somáticos, botón floral.

ABSTRACT

Rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.) Is a crop of great importance in Peru, as it is in great demand within the national gastronomy for sauces and in traditional dishes such as stuffed hot pepper. This crop does not present defined varieties or cultivars, but it is represented by two large ecotypes that are the Serrano and Monte, the first one is smaller but more hot, widely used in sauces; the second is larger and less hot, characteristics for which it is used to prepare the stuffed hot pepper. In order to define a cultivar, it is necessary to obtain homozygous lines, for this reason the alternative of using biotechnological tools is presented by cultivating anthers under *in vitro* conditions, to obtain generation of homozygous individuals. But the response of the anther culture depends on each genotype under study, and it is necessary to establish a base for the establishment and generation of somatic embryos from rocoto anthers. Due to what has been previously described, the present investigation set the objective of inducing somatic embryos in rocoto anthers under *in vitro* conditions. Rocoto flower buds of the Serrano ecotype were used to determine the flower bud stage with the highest percentage of uninucleated microspores, determine the treatment with the highest percentage of disinfection in hot pepper flower buds and determine the treatment that allows inducing somatic embryos from anthers. of rocoto. The IR4 group of flower buds presented a higher percentage of microspores in the uninucleated stage with 81.3%. Treatment D4 achieved the highest disinfection of flower buds with 89.01%. 18.27% of anthers with somatic embryo formation were obtained using T2 treatment.

Keywords: Ecotypes, microspores, uninucleate, somatic embryos, flower bud.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad Perú presenta gran variedad de especies del género *Capsicum* con gran importancia en la productividad y exportación, resaltando el ají amarillo, paprika, rocoto y ají limo. La demanda de este cultivo ha logrado colocar al país como el octavo exportador mundial de frutos y productos del género *Capsicum* y en el puesto veintisiete en producción mundial (AgrodataPerú, 2019).

El rocoto es un cultivo de importancia gastronómica nacional, presentando dos grandes ecotipos (Serrano y Monte), los cuales difieren en tamaño y picor, pero ambos de gran demanda en los mercados para salsas y platos típicos nacionales, como el rocoto relleno arequipeño. Dentro de la industria farmacéutica es importante también por presentar alcaloides capsaicinoides y carotenoides (Valdez, 2017).

El cultivo de rocoto presenta problemas de estreses bióticos como son enfermedades y plagas, que afectan la producción y economía de agricultores dedicados a este cultivo. Para poder hacer frente a estos problemas es necesario la identificación de genotipos que presenten resistencia a este tipo de estreses para formar parte de programas de mejoramiento genético de rocoto (Lucana, 2012).

Pero no se presentan programas de mejoramiento genético de rocoto, sobre todo para la obtención de líneas puras con resistencia a enfermedades y con alta producción. La razón que dificulta la obtención de líneas homocigotas es que el tipo de polinización que presenta el rocoto, presentan polinización cruzada y ser autoincompatible, debido a esto no se han presentado cultivares definidos de rocoto ni semillas certificadas, empleándose solamente las semillas a partir de producción anteriores (Valdez, 2017).

Como alternativa se presentan los métodos de biotecnológicos para el mejoramiento genético por cultivo de tejidos vegetales en condiciones *in vitro* con la técnica del cultivo de anteras, que permiten obtener líneas homocigotas en menor ciclos que por métodos tradicionales, así acortar el tiempo de liberación de una variedad definida (Gómez, 2016).

De tal manera, la presente investigación está enfocada en sentar las bases en la formación de embriones somáticos inducidas en de anteras de rocoto en condiciones *in vitro*, presentando un antecedente para la obtención a futuro de plantas homocigotas de gran potencial agronómico en programas de mejoramiento genético de rocoto.

Capítulo I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática

En Perú se presenta gran variedad de especies de *Capsicum* que vienen siendo cultivadas a nivel nacional, de los cuales cuatro son las más comercializadas: paprika (*C. annuum* L.), ají amarillo (*C. baccatum*), rocoto (*C. pubescens*) y arnaucho (*C. chinense*). Debido a la gran variedad y productividad de ajíes y pimientos en el Perú, este ocupa el puesto veintisiete a nivel mundial como productor de *Capsicum*. De tal manera Perú se ha convertido en el octavo exportador a nivel mundial de *Capsicum* (AgrodataPerú, 2019).

El rocoto es un cultivo de buena producción a nivel nacional, esta especie presenta dos ecotipos más conocidos, el rocoto Serrano y el rocoto de Monte que es de mayor tamaño, muy demandado en la gastronomía nacional para la preparación del rocoto relleno. Además, el rocoto también es importante en la industria farmacéutica, por presentar componentes alcaloides naturales (capsaicinoides y carotenoides) (Valdez, 2017).

Los cultivos de rocoto vienen presentando problemas fitopatológicos y entomológicos de importancia económica que en ciertos sectores limitan su producción. La enfermedad de pudrición en las raíces es causada por *Phytophthora capsici* L., se reporta serios daños por esta enfermedad en varias partes del mundo, de no presentar métodos contra el patógeno este puede afectar a la planta hasta llevarla a muerte en un período de cinco días posterior al inicio de la infección. Los síntomas que causa *Phytophthora capsici* L. en las plantas de rocoto se asocian a la pudrición de la raíz con lesiones marrones oscuras del tallo y también con la marchitez de la planta. La infección y daño en las plantas dependerá de cada genotipo de rocoto, algunos pueden presentar cierto grado de resistencia y en genotipos susceptibles puede conducir al colapso de las plantas (Lucana, 2012).

Con la gran importancia nacional del cultivo del rocoto aún no se han obtenido cultivares o variedades definidas por programas de mejoramiento genético, con resistencia y/o tolerancia a factores abióticos y bióticos, simplemente los agricultores emplean las semillas de cosechas anteriores. Tomando en consideración que el rocoto presenta polinización cruzada, se podría estar teniendo gran variación genética en los campos de cultivo. También que no se ha llegado a presentar cultivares definidas de este cultivo (Valdez, 2017).

La alternativa para encontrar eficiencia en los métodos de mejoramiento convencionales cuya principal desventaja es la numerosa cantidad de ciclos de autopolinización o cruza hasta lograr la homocigosidad. Las herramientas biotecnológicas dentro de sus aplicaciones constituyen una alternativa para superar estos tipos de inconvenientes, como la técnica de dobles haploides a partir de anteras, la cual permite obtener líneas puras o bien definidas a partir de una sola generación, por lo que se podría tener éxito en la obtención de genotipos homocigotos de rocoto en un corto periodo. Lo que permitirá obtener progenitores de alto rendimiento y menor susceptibilidad o resistencia a fitopatógenos para la producción de nuevas variedades (Gómez, 2016).

Siendo un cultivo con pocos estudios relacionados a la aplicación de cultivos de tejidos, es necesario ir sentando las bases para futuros programas de mejoramiento genético empleando herramientas biotecnológicas, por lo que la formación de embriones a partir de anteras será el punto inicial para la obtención de cultivares definidos en corto tiempo (Germaná, 2011).

1.2. Formulación de problema

1.2.1. Problema general

¿Es posible inducir embriones somáticos a partir del cultivo *in vitro* de anteras de rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.)?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuál será el estadio óptimo de los botones florales de rocoto que presente mayor porcentaje de microsporas uninucleadas?
- ¿Cuál será el tratamiento que permita obtener mayor porcentaje de desinfección de los botones florales de rocoto?
- ¿Cuál será el tratamiento que permita inducir embriones somáticos a partir de anteras de rocoto?

1.3. Objetivos de investigación

1.3.1. Objetivo General

Inducir embriones somáticos a partir del cultivo *in vitro* de anteras de rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.).

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el estadio óptimo de los botones florales de rocoto que presente mayor porcentaje de microsporas uninucleadas.
- Determinar el tratamiento con mayor porcentaje de desinfección de los botones florales de rocoto.
- Determinar el tratamiento con mayor porcentaje de inducción de embriones somáticos a partir de anteras de rocoto.

1.4. Justificación de la investigación

En la actualidad se han ido reportando mayor número de casos de enfermedades relacionados al uso de agroquímicos en los cultivos tratan solucionar o detener problemas causados por plagas y/o enfermedades por lo que es necesario el uso del germoplasma de genotipos que presenten estén resistencias a estos problemas. Así como también se están presentando un mayor efecto del cambio climático, siendo necesario identificar genotipos con tolerancia a estrés abióticos.

De esta manera es necesario obtener genotipos homocigotos con las mejores o buenas características agronómicas, y poder emplear estos genotipos como progenitores en la búsqueda de nuevos híbridos, líneas o variedades que sean requeridas para las necesidades que se presenten. Pero en estos procesos existen inconvenientes en la búsqueda de homocigosis en varios genotipos, dentro de ellas el gran número de generaciones necesarios, más aún cuando un cultivo presenta autoincompatibilidad. Por lo que obtener líneas homocigotas mediante el cultivo de anteras se presenta como una buena alternativa para disminuir el número de generaciones requeridas para llegar a la homocigosis.

Por lo tanto, la presente investigación se enfoca en sentar las bases en el tema de cultivo de tejido en rocoto a partir del cultivo de anteras, al no existir trabajos enfocados al mejoramiento genético de esta especie empleando técnicas biotecnológicas. La investigación permitirá brindar conocimiento a partir de protocolos que permitan la formación de embriones de rocoto a partir de anteras en condiciones *in vitro*, para en un futuro próximo regenerar plantas con gran potencial agronómico y dar inicio a programas de mejoramiento en rocoto a partir de líneas puras para obtener cultivares con características dependiendo de la demanda tanto de los agricultores como los consumidores.

1.5. Delimitación del estudio

La presente investigación se realizará en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la escuela profesional de Biología con mención en Biotecnología, Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, por presentar una óptima infraestructura para el desarrollo de la investigación, de esta manera se aprovechará al máximo los equipos y reactivos, así mismo como el asesoramiento constante del jefe de laboratorio que a la vez es asesora del presente trabajo de investigación. Todo esto permite centrar la tesis en una línea bien definida de investigación dentro del laboratorio, que se desarrollara durante cuatro meses.

1.6. Viabilidad del estudio

La tesis estará centrada en la aplicación de herramientas biotecnológicas mediante métodos de cultivo de tejidos de plantas en condiciones *in vitro*, empleando botones florales de rocoto. La información sobre temas de cultivos de anteras se encuentra disponibles en tesis, artículos científicos y libros en repositorios institucionales nacionales e internacionales. La investigación será solventada por el tesista con respecto a materiales y reactivos, mientras que el laboratorio de Biotecnología Vegetal brindará acceso a los equipos requeridos durante la investigación.

Capítulo II: MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes de la investigación

En la actualidad existe un gran número de investigaciones relacionadas al cultivo de tejidos de plantas en condiciones *in vitro* en el género *Capsicum*, siendo *C. annuum* la principal especie investigada, mientras que en rocoto solo se ha reportado una investigación:

Hernández *et al* (2020), determinaron la influencia de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en la inducción de callos *in vitro* a partir de cotiledones de semillas de rocoto germinadas en estas mismas condiciones. En su metodología emplearon segmentos de cotiledones de rocoto en cinco diferentes concentraciones de 2,4-D. En sus resultados obtuvieron los mayores porcentajes de inducción de callos al adicionar 0.75 y 1 mg/L de 2,4-D a medios de cultivo MS con 70% y 72% de inducción de callos respectivamente. Concluyeron que no hubo significancia entre tratamientos con 0.75 y 1 mg/L de 2,4-D, lograron 72% de inducción de callos a los 21 días.

Dentro de las investigaciones que se han desarrollado en el género *Capsicum* están presentes propagaciones a partir de yemas (germinadas tradicionalmente o *in vitro*), inducciones de callos, embriogénesis somática directa e indirecta, fusión de protoplastos, entre otros. El cultivo de anteras se ha ido constituyendo como una de las técnicas dentro de las herramientas biotecnológicas que son necesarias para programas de mejoramiento, de ahí que se tengan reportes a nivel internacional y nacional donde muestran experiencias que a la larga son aplicadas al mejoramiento genético de plantas (Liu *et al.*, 2007; Kothari, *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2019a; Pineda *et al.*, 2021).

2.1.1. Investigaciones Internacionales

Dumas de Vaulx *et al.* (1981), evaluaron factores en la temperatura, tiempo de exposición a la luz y combinación de hormonas vegetales en las anteras de pimiento (*Capsicum annuum* L.) para elevar la inducción de embriones somáticos en diferentes genotipos. En su metodología emplearon tratamientos con combinaciones de medio MS más 2,4-D y Kinetina, posteriormente fueron mantenidas entre 2 a 8 días entre 25°C y 35°C, y posteriormente en un periodo estable de 25°C. En sus resultados obtuvieron 40% de plantas regeneradas de anteras cultivadas tanto en líneas como en híbridos empleando 0.1 mg/L

kinetina (KIN) y 0.1 mg/L 2,4-D durante 8 días a 35°C en completa oscuridad, y luego en medio sin 2,4-D a 25°C con fotoperiodo de 12 horas luz. Concluyeron que las plantas regeneradas a partir de las anteras presentaban altas frecuencias de diploides o quimera haploide-diploide.

Koleva-Gudeva *et al* (2007), determinaron el efecto de tratamientos de incubación y diferentes medios de cultivo en pimiento (*C. annuum* L.). En su metodología emplearon temperaturas de incubación de 7°C, 25°C y 34°C, así como fotoperiodos diferentes y medios de cultivo MS, N, LS, NN y CP. Los resultados que obtuvieron fueron inducción de callos y embriones somáticos, pero los cuales estaban influenciados por las temperaturas y medios de cultivo; con 7° y 25° C en fotoperiodos de 12 horas de luz en los medios LS, NN, MS y N indujeron callos, mientras que a 35° C en completa oscuridad y en el medio CP lograron la formación de embriones. Concluyeron que presentaron respuestas de hasta el 58% en la inducción de callos, mientras que en respuestas androgénicas hasta 33%.

Vélez *et al* (2010), tuvieron como objetivo establecer una metodología para regenerar pimientos (*C. annuum* L.) cv. Miahuateco haploides. En su metodología evaluaron el tamaño de los botones florales para relacionarlos con el porcentaje de microsporas uninucleadas, así mismo evaluaron los efectos de 6-bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA), AIA y 2,4-D en la inducción de callos y embriones. En sus resultados mostraron que seleccionar botones florales de 3 mm de diámetro, y obtuvieron 2.23% de embriones somáticos a partir de las anteras cultivadas en medio MS con adición de 0.1 mg/L BAP y 1 mg/L 2,4-D. Concluyeron que establecieron la metodología de regeneración en anteras, además que llegaron a regenerar plántulas haploides a partir del análisis cromosómico.

Seguí-Simarro *et al* (2011), evaluaron la respuesta de anteras de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.) y pimiento (*C. annuum* L.), cultivos muy importantes en todo el mundo, pero presentan respuesta recalcitrante en condiciones *in vitro*. En su metodología emplearon variantes de shocks térmicos para cada especie y diferentes concentraciones de hormonas para inducir la formación de callos y/o embriones. En los resultados que obtuvieron se presenta diferente en la respuesta de cada especie, en el caso de la berenjena fue necesario emplear shock termino de 33° C, mientras que en pimiento y tomate de 35°, en todos los casos se necesario cambiar la temperatura a 25° para la segunda semana. En el caso de las hormonas emplearon combinaciones de AIA, 2,4-D y kinetina permitieron obtener de manera eficiente 20 a 65 callos por anteras.

Parra-Vega *et al* (2012), emplearon dos protocolos para el cultivo de anteras, con el fin de evaluar el desarrollo de callos y embriones en cuatro cultivares de pimiento (*C. annuum* L.). En su metodología emplearon choque térmico inductivo de 35° C durante 4, 8, 12 y 16 días, antes del cultivo a 25° C. En sus resultados obtuvieron que la duración del choque térmico tuvo efectos significativos en la producción de embriones, pero también en la generación de callos, este último aumentando con exposiciones prolongadas a 35° C. Mientras que determinaron y concluyeron que el protocolo de Dumas de Vault promueve tanto el desarrollo embrionario como el crecimiento de callos, mientras que el protocolo de Supena no produce callos sino solo embriones.

Parra-Vega *et al* (2013), evaluaron las etapas de desarrollo de microsporogénesis para identificar los botones florales óptimos para el propósitos básicos y aplicados de cultivo de anteras en pimiento (*C. annuum* L.). En su metodología correlacionaron rasgos visibles y medibles del desarrollo de anteras en cada una de las etapas individuales de la microsporogénesis, para ello emplearon tres híbridos españoles de pimiento dulce F1 (Herminio, Gacela y Águila). En sus resultados obtuvieron una relación entre la longitud del cáliz y la longitud del brote, así como que no debería estar presente el color púrpura en las anteras. Concluyeron que el estado del botón floral como mayor porcentaje de microsporas uninucleadas con las características mencionadas como un criterio fácil, rápido y preciso potencialmente aplicable a los cultivares de pimiento.

Gómez (2016), tuvo como objetivo determinar la metodología óptima para inducir embriones somáticos en *C. chinense* Jacq. Para lo cual empleo en su metodología botones florales, los cuales primeramente fueron evaluados para determinar el estadio óptimo, posteriormente continuó evaluando protocolos de desinfección y finalmente los medios de cultivo con diferentes combinaciones de hormonas vegetales. Los resultados que obtuvo presentan al estado botones R2 y R3 con mayor porcentaje de meiocito-microspora. El protocolo de desinfección con NaClO al 1.25% durante 25 minutos, le permitió mantener el tejido viable y, pero presentando contaminación menor al 33%. En cuanto a inducción de androgénesis el medio de cultivo adicionados con 1.04 mg/L AIA, 0.04 mg l⁻¹ zeatina, 0.9 mg l⁻¹ 2,4-D y 0.9 mg l⁻¹ kinetina, genero callos embriogénicos de forma constante y regular.

2.1.2. Investigaciones nacionales

Jiménez (1999), tuvo como objetivo obtener líneas dobles haploides de híbridos mutantes con mayor rendimiento. En su metodología empleo el cultivo de anteras de mutantes de híbridos interespecíficos de cebada (*Hordeum vulgare* L.). En sus resultados llegó a regenerar 25% de las anteras sembradas (100 anteras por medio de cultivo), las cuales mostraron duplicación cromosómica espontánea. Posteriormente estas plantas regeneradas fueron llevadas a campo, llegando a presentar mayores rendimientos que los cultivos testigos. Concluye que la inducción de mutaciones le permitió incrementar el rendimiento por hectárea, por lo que se debería emplear las técnicas de dobles haploides e inducción de mutaciones en programas de mejoramiento genético.

Chico-Ruiz y Gonzales-Zavaleta (2018), determinaron la influencia de ANA y BAP para inducir callos con respuesta embriogénica a partir de anteras de papaya (*Carica papaya* L.). Donde primeramente establecieron los pimpollos por medidas y estado de las microsporas, continuando con pretratamiento en frío por cuatro días para luego ser cultivados en medio Murashige y Skoog adicionado con ANA y BAP en diferentes concentraciones. Obtuvieron 40% de inducción de callos en las anteras en medio MS con 1 mg l⁻¹ ANA y 0.5 mg l⁻¹ BAP, además los callos presentaron aumento de tamaño y variación de color, pero no llegaron a presenciar embriones.

Porras (2019), evaluó la inducción callos en *Amaranthus caudatus* L. var. Centenario empleando anteras y ovarios en condiciones *in vitro*. Donde primero determino el estado óptimo de las microsporas para colectar las inflorescencias, posteriormente determino un protocolo de desinfección para su material vegetal y luego los introdujo en medios de cultivo N6 agregando diferentes concentraciones de Bencilaminopurina, ANA y 2,4-D. Obteniendo mayor respuesta de formación de callos (79.2%) en el medio con 2, 1.5 y 0.5 mg/L de Bencilaminopurina, ANA y 2,4-D respectivamente a partir de ovarios, mientras que de anteras solo 7.2 %. Concluyendo que mediante su evaluación logro establecer el primer protocolo del cultivo *in vitro* en anteras y ovarios de kiwicha para obtener callos haploides.

Hernández y Díaz (2019), investigaron sobre la formación inducida de callos embriogénicos en anteras de *Solanum goniocalyx* Juz. & Bukasov en condiciones *in vitro*. Comenzaron determinando el tamaño idóneo de los botones florales (5 mm) con microsporas en estado uninucleado. Los medios de cultivo que emplearon estuvieron divididos en tratamientos con diferentes concentraciones de 2,4-D y Zeatina (ZEA). Obtuvieron mejores

resultados con el tratamiento que presentaba 0.5 mg/L ZEA y 0.5 mg/L 2,4-D. Concluyeron que la combinación de Zeatina y 2,4-D permitió inducir hasta 2.3 callos embriogénicos por medio de cultivo.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Rocoto

El rocoto lleva por nombre científico *Capsicum pubescens*, descrito en 1799 por Ruiz y Pavón. Su nombre común corresponde a los países que presenta mayor diversidad como son: Rocoto (Perú), Rukutu y Locoto (Bolivia), Chile de cera o Manzano (México). Las diferencias más representativas del rocoto con otras especies del mismo género son el color de su flor y semillas, así como por su pubescencia, razón de su nombre científico (Valdez, 2017).

El rocoto según la clasificación filogenética de angiospermas presenta la siguiente clasificación taxonómica (APG IV, 2016):

Reino: Plantae

División: Traqueofita

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Capsicum*

Especie: *Capsicum pubescens* Ruiz & Pavón

El centro de origen del rocoto se ubica en la región Andina, perteneciente a los países de Bolivia y Perú. Pero algunos autores consideran al Perú como único centro de origen por presentar la mayor cantidad de especies del género *Capsicum*. Investigaciones han comprobado que este cultivo ha estado presente desde la época pre inca, además de presentarse aún rocotos de manera silvestre en la zona de la sierra y la selva alta. Posteriormente fue introducida en América Central y México a partir de la década de los 30 (Lucana, 2012; Valdez, 2017).

El Perú presenta dos ecotipos de rocoto, los cuales difieren en tamaño y picor. El primero es el rocoto De Monte, es cuál es el más representativo a nivel nacional e

internacional por su uso en la gastronomía peruana, sobre todo en el rocoto relleno, debido a su gran tamaño y menor picor. Mientras que el segundo es el rocoto Serrano o De Huerto, que presenta un menor tamaño, pero mayor picor, razón por la cual es muy empleada como salsa en muchos platos nacionales; además esta variedad presenta mayor adaptabilidad ya que se reportan en varias regiones del país, pero teniendo mayor producción en los valles interandinos y andes (Espinoza, 2017; Valdez, 2017; Alania y Ascano, 2019).

Dentro de las características morfológicas del rocoto se puede apreciar que es de tipo arbustiva, con altura que dependerá del genotipo, condiciones del suelo, así como las condiciones climáticas y del manejo que se le dé en campo. Así como el follaje que presenta tonalidades oscuras pero suaves densamente pubescentes (Palacios, 2007).

Presenta una raíz pivotante, que puede alcanzar profundidades menores a 70 centímetros, pero presenta mayor crecimiento lateral, con ramificaciones radiculares que abarcan diámetros de hasta 1.2 metros. La forma del tallo es cilíndrica erecta con ramificación dicotómica, con hojas simples y alternas, las cuales varían de tamaño por la posición que se encuentran, sostenidas por peciolo pubescentes (Valdez, 2017).

En su etapa de floración presenta de una a dos flores axilares actinomorfas y hermafroditas de corola color violeta a púrpura en forma tumbada y solitaria. Dentro de ellas se encuentran seis estambres con una antera cada uno de color púrpura a violetas, a la altura de las anteras se encuentra el estigma facilitando la polinización. Mientras que su ovario presenta posición superior (Lucana, 2012).

El fruto del rocoto es de tipo baya carnosa con formas que varían entre esférica, globosa y ovalada, con dos a cuatro lóbulos y una cavidad. La coloración del fruto también presenta variaciones entre amarillo, anaranjado, rojo y verde. Dentro de ellas se encuentran de 20 a 25 semillas adheridas a la placenta con un característico color negro, y de superficie rugosa. Las semillas son viables hasta cinco años en buenas condiciones de conservación (Paita y Guevara, 2003; Vera-Guzmán *et al.*, 2011).

La mayoría de flores de las especies pertenecientes al género *Capsicum* presentan autopolinización debido a la posición de su pistilo, el cual se sitúa entre las anteras, lo que permite al menor movimiento se descargue el polen. Pero también se ha identificado que presentan polinización cruzada en bajo porcentaje, llegando en algunos casos hasta el 15%. Este comportamiento está muy relacionado con la hibridación y variabilidad que presentan estas especies (Salazar y López, 2012; Gómez, 2016).

Pero en el caso del rocoto mediante investigaciones para determinar el porcentaje de autopolinización y polinización cruzada, se descubrió que ningún genotipo presentaba autocompatibilidad, por lo que se le relaciona con un caso de autoincompatibilidad gametofítica. Así mismo, se le identificó el control genético de la autoincompatibilidad en rocoto, medido por el locus S, que está conformado por alelos múltiples. Por lo tanto, el polen o en algunos genotipos el tubo polínico puede expresar productos a partir de los alelos S que se observan en el estigma que se representan en pistilo del polen (Saborío y De Costa, 1992; Bo *et al.*, 2011).

Las cinco especies más cultivadas de *Capsicum* en el Perú son diploides, pero de las cuales cuatro presentan un número cromosómico $n=12$, mientras se han reportado especies silvestres de *Capsicum* que llegan a presentar 13 pares cromosómicos ($2n=26$). Esta diferencia en número de cromosomas está relacionada también a la diferencia en la morfología, presentando una mayor variabilidad en las especies silvestres. En el caso del rocoto se ha determina que presenta 12 pares de cromosomas ($2n=24$), además presenta un par de cromosomas sub-metacéntrico y los 11 restantes son metacéntricos (Guevara *et al.*, 2000; Alcorcés, 2001).

2.2.2. Importancia del rocoto

En la actualidad el rocoto se ha ido posicionando como uno de los alimentos con mayor importancia en el Perú, tanto para los agricultores, en la industria alimenticia y farmacéutica, pero sobre todo en la gastronomía. Por ser la base de uno de los platos representativos del país, formando parte del boom gastronómico nacional que ha originado en los últimos años. Esto ha permitido elevar la demanda de producción nacional de rocoto, aumentando el alcance y beneficio económico a los agricultores (Caballero *et al.*, 2017; Flores, 2019).

El picor del rocoto presenta un atractivo en los comensales, iniciando con un contacto con la lengua seguido de un estímulo de placer y dolor en la boca, por lo que el cerebro reacciona liberando endorfinas y adrenalina por todo el cuerpo. Dilatando también los vasos sanguíneos, y poco a poco incrementando el ritmo cardíaco. Permite a la persona sentir sensaciones de bienestar y euforia, por lo que se relaciona como una sustancia analgésica. Pero a la vez también es la razón de porque algunas personas reaccionan con lágrimas y sudor (APEGA, 2009; Sardón, 2015).

El sabor y picor característico del rocoto e incluido otras especies del género *Capsicum* es debido a la presencia de capsaicinoides, que son compuestos o mezclas de alcaloides y/o protoalcaloides con característica aceitosa. Dentro de los cuales se encuentran la capsaicina, dihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina. Siendo la capsaicina la de mayor importancia por estar relacionada a propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antioxidantes, de esta manera se realizan estudios fitoquímicos para la industria farmacéutica (Verá-Guzmán *et al.*, 2011; Villavicencio, 2016).

La capsaicina también está relacionada con la germinación de las semillas de rocoto, al tener un efecto de dormición en ellas, muy aparte de efectos ambientales, esto podría explicar la baja tasa de germinación de las semillas de rocoto. La capsaicina presenta mayor contenido en la placenta del fruto, debido a que es el lugar donde se sintetizan los capsaicinoides, por lo tanto, es ahí donde se van acumulando en gran medida (Salazar y López, 2012; Meckelmann *et al.*, 2015).

La acumulación y porcentaje de capsaicina en rocoto u otra especie del género *Capsicum* dependerá del genotipo de, sumado al efecto ambiente e interacción genotipo-ambiente. También se considera a la edad de los frutos y también al estado de su desarrollo las que afectan los valores de capsaicinoides. Mientras que el contenido de carotenoides en el fruto forma parte de los factores que influyen en menor consideración en la cantidad de capsaicinoides (Moreno *et al.*, 2003; Sánchez, 2015).

2.2.3. Problemas que afectan al rocoto

Los problemas con mayores reportes en el cultivo de rocoto están relacionados a enfermedades y plagas comunes entre el género *Capsicum*. Siendo la marchitez y pudrición radicular el principal problema, el cual es causado por *Phytophthora capsici*. También se presenta problemas en la germinación y necrosis en los tallos causado por *Fusarium oxysporum*, *Phytium* spp y *Rhizoctonia solani*. La mancha negra causada por al *Alternaria solani* afectan a las hojas y frutos causando manchas necróticas de forma circular. *Botrytis cinerea* ataca a las flores y frutos, causando la pudrición de estas (Lucana, 2012; Valdez, 2017; Hernández *et al.*, 2019b).

El rocoto también presenta enfermedades por virosis, entre las más reportadas se encuentran los virus: marchitez del tomate, moteado suave del ají y entre otros. Los cuales

tienen diferentes efectos o síntomas en la planta, desde la falta de vigor en las plantas, amarillento, deformación y caída de las hojas y frutos. La mayoría de estos virus tienden a ser diseminados por semillas de planta enfermas y por contacto de planta a planta, pero también son transmitidos por vectores mecánicos (Lucana, 2012; Hernández *et al.*, 2019a).

Las semillas además se presentan una vía de diseminación de plantas enfermas, también representa en varias zonas del Perú un medio de variabilidad genética negativa en el cultivo de rocoto, debido a que las semillas de rocoto muy aparte de no presentar cultivares definidos, tampoco presentan certificación de semillas de calidad, por lo cual los agricultores frecuentemente utilizan semillas de mercados o sobrantes de cosechas anteriores (Sardón, 2015; Valdez, 2017).

2.2.4. Cultivo de tejidos vegetales

Es el conocimiento del crecimiento de células de plantas en medios artificiales a partir de una planta donante, pero también se pueden emplear tejidos órganos. Incluye técnicas y métodos utilizados para investigar muchas disciplinas botánicas y tiene varios objetivos prácticos. Los métodos de cultivo de tejidos se basan en el cultivo y manipulación en "*in vitro*". Por lo tanto, se han desarrollado técnicas para el aislamiento y el cultivo *in vitro* de material vegetal (Figura 1). Tanto el crecimiento organizado como el desorganizado son posibles *in vitro* (Hussain *et al.*, 2012).

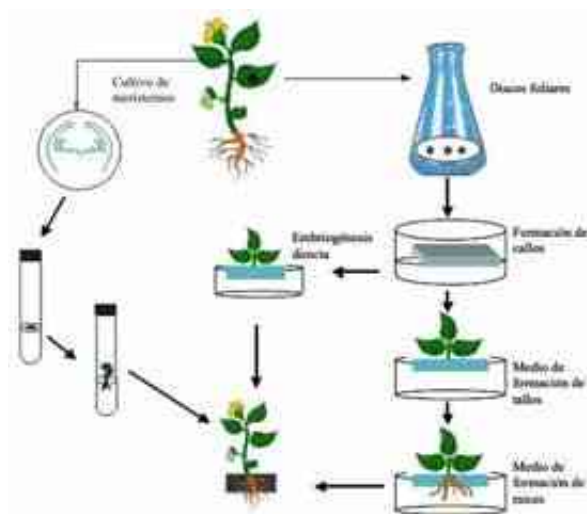


Figura 1. Principales métodos empleados en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Camarena *et al.*, 2014).

Mantener estructuras definidas o en algunos casos la inducción a la creación de estas estructuras está basada en el crecimiento celular organizado. Se da inicio a partir de los órganos de las plantas, como los puntos de crecimiento de los brotes o raíces (meristemos apicales), las iniciales de las hojas, los brotes de flores jóvenes o las frutas pequeñas, se transfieren al cultivo y continúan creciendo con su estructura preservada. Esto puede ocurrir *in vitro* ya sea directamente sobre un órgano o sobre un pedazo de tejido colocado en cultivo (explante), o durante el cultivo de tejidos previamente no organizados. El proceso de formación de órganos se llama organogénesis o morfogénesis (el desarrollo de la forma) (Thorpe, 2007).

El crecimiento desorganizado rara vez se encuentra en la naturaleza, pero ocurre con bastante frecuencia cuando se cultivan en condiciones controladas *in vitro* a partir de los medios artificiales. Los agregados celulares generalmente no presentan estructuras definidas e implican un número determinado de tipos de células especializadas y diferenciadas que se encuentran en una planta intacta. Una célula definida, o también denominada diferenciada, es la célula que ha logrado desarrollar una forma especializada y función, relacionadas con la morfología y fisiología de la planta respectivamente. Un tejido diferenciado (por ejemplo, xilema o epidermis) es una agregación de células diferenciadas (Thorpe, 2007; Ramos *et al.*, 2010).

Los tejidos no organizados pueden incrementarse en volumen por subcultivo y pueden mantenerse en medios semisólidos o líquidos durante largos períodos. A menudo también se pueden usar para comenzar los cultivos en suspensión celular. La diferenciación también se usa botánicamente para describir la formación de órganos distintos a través de la morfogénesis (Hussain *et al.*, 2012).

El “cultivo de tejidos” se usa comúnmente como un término colectivo para describir todo tipo de cultivos de plantas *in vitro*, aunque estrictamente debería referirse solo a cultivos de agregados de células no organizadas. En la práctica, los siguientes tipos de culturas son generalmente más reconocidos (Soriano y Boitilier, 2013; Hernández y Díaz, 2019):

- Cultivos de callos (o tejidos). El crecimiento y mantenimiento de masas celulares en gran parte desorganizadas, que surgen del crecimiento desorganizado y descoordinado de pequeños órganos vegetales, trozos de tejido vegetal o células previamente cultivadas (Figura 2).

- Cultivos en suspensión (o células). Poblaciones de células vegetales y grupos de células pequeñas, dispersas en un medio líquido agitado, aireado y líquido.
- Cultivos de protoplastos. El cultivo de células vegetales que se han aislado sin una pared celular.
- Cultivos de anteras. El cultivo de anteras completas que contienen microsporas de polen inmaduras. El objetivo generalmente es obtener plantas haploides mediante la formación de embriones somáticos directamente del polen, o algunas veces por organogénesis a través de los callos.

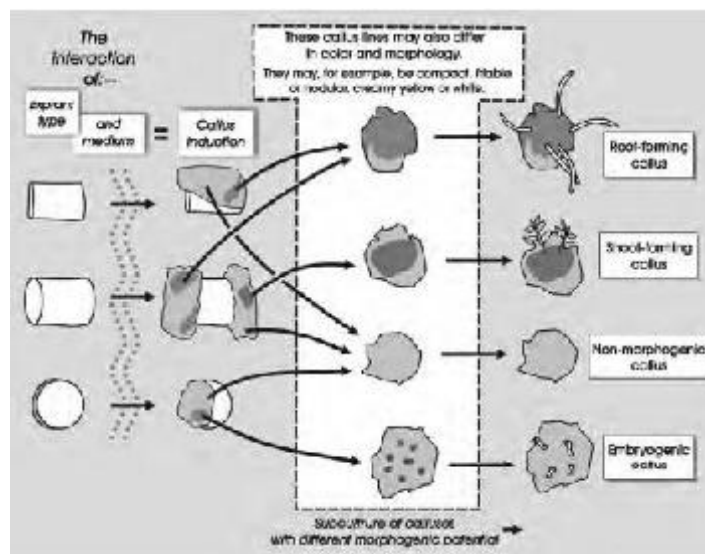


Figura 2. Potencial morfogénico de callos (estructuras celulares no definidas) (George *et al.*, 2008).

La multiplicación masiva de plántulas empleando del cultivo *in vitro* de tejidos, es la propagación de plántulas verdaderas e idénticas al individuo donador, es decir, como clones (micropropagación). Las plántulas obtenidas del cultivo *in vitro* se denominan microplantas y pueden derivarse de cultivos de tejidos de tres maneras (Hussain *et al.*, 2012):

- De brotes de brotes preexistentes o brotes primordiales (meristemos) que se estimulan a crecer y proliferar.
- Después de la morfogénesis del brote cuando se induce la formación de nuevos brotes en tejidos no organizados o directamente sobre tejidos de la planta madre.
- Mediante la formación de embriones somáticos que se asemejan a embriones naturales de semillas de plantas intactas y que pueden convertirse en plántulas de la misma manera. Este proceso se llama embriogénesis somática (Figura 3).

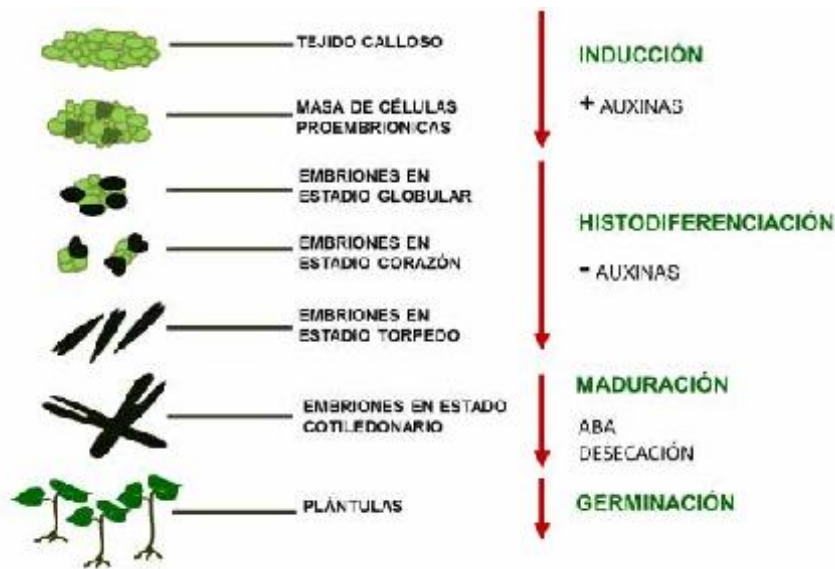


Figura 3. Proceso de embriogénesis somática indirecta (Gómez, 2016).

Teóricamente, las células vegetales, los órganos o las plantas pueden clonarse, es decir, producirse en grandes cantidades individuos con constitución genética idéntica al progenitor. Las técnicas actuales de cultivo de tejidos no permiten esto en todos los casos y a veces ocurren irregularidades, lo que resulta en "variaciones somaclonales". Sin embargo, se puede lograr una gran cantidad de éxito y se pueden usar cultivos de diversos tipos para propagar plantas (Montero, 2001; George *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2021).

2.2.5. Aplicaciones del cultivo *in vitro* de anteras

En el área del mejoramiento genético de plantas siempre está en constante desarrollo de nuevos métodos que permitan enfrentar a los problemas que se está atravesando o se están por presentar en los cultivos vegetales. Por lo que en las últimas décadas se ha ampliado el uso de las herramientas biotecnológicas, permitiendo obtener beneficios en menor tiempo que por métodos tradicionales. Siendo una de ellas superar los procesos de endogamia a través de la obtención de líneas homocigotas a partir de plantas haploides y doble haploides (duplicación cromosómica de individuos haploides) empleando el cultivo de anteras *in vitro* (Dunwell, 2010; Camarena *et al.*, 2014).

El termino haploide en las plantas (esporofitos) es referente al contenido del número de cromosomas. En una especie esporofítica diploide, también se puede denominar monoploide a un haploide, debido a que presenta solo un juego cromosómico.

En las especies que presentan mayor número de juego de cromosomas (poliploides), en su fase haploide presentan más de un juego de cromosomas y son denominados poli-haploides. En el caso de las plantas autotetraploides, en la fase haploide inicialmente era denominado dihaploide.

En el caso de las plantas haploides que se duplica (natural o inducida) sus cromosomas, son denominadas plantas dobles haploides (DH). La diferencia de las plantas dobles haploides con las dihaploides, es que la segunda es heterocigota por presentar dos juegos cromosómicos a partir de cuatro juegos en el autotetraploide, pero en el caso de los dobles haploides se trata de plantas homocigotas debido a la ser la duplicación de un mismo cromosoma (Page y Hawley, 2003; Germaná, 2011).

El potencial para frecuencias de haploides del cultivo de anteras ha atraído investigaciones extensas y algunos han presentado éxito. Hoy en día, el cultivo de anteras se está utilizando en programas de mejoramiento en muchas especies de interés agronómico, así como también en hibridaciones amplias. Una ventaja es que una alta frecuencia de duplicación de cromosomas puede tener lugar temprano en la fase de cultivo, lo que da como resultado plantas haploides duplicadas completamente fértiles. Además, en algunas especies la duplicación del número de cromosomas ocurre por fusión nuclear después de la primera división nuclear cuando se usan pretratamientos (Indrianto *et al.*, 2001; Germaná, 2006; Shariatpanahi *et al.*, 2006).

Los cultivos de anteras, no parece haber mucha diferencia en el costo de producción haploide o en el tiempo y la cantidad de trabajo necesarios para producirlos. La limitación de la hibridación amplia es que, hasta ahora, está restringido a los cereales o papa donde parece funcionar el sistema de eliminación de cromosomas. El cultivo de anteras no debería presentar inconvenientes en casi todas las especies, pero ha llevado mucho tiempo desarrollar un sistema eficiente en un número limitado de cultivos. Cada cultivo tiene diferentes requisitos y, por lo tanto, la necesidad de una investigación exhaustiva para desarrollar un sistema. Sin embargo, el cultivo de anteras tiene más potencial en vista del gran número de microsporas frente a una o unas pocas células reproductivas (Seguí-Simarro y Nuez, 2008b; Valle-Gough, 2015).

Los sistemas de cultivo de anteras han ido mejorando con el pasar de los años y se han desarrollado en los cultivos las plantas que derivan de embriogénesis en lugar de callos y esto debería reducir la variabilidad inducida por el cultivo extenso. Con la mejora de las frecuencias de las microsporas, la variabilidad del genotipo en respuesta también se ha reducido, de modo que el sistema se está utilizando en programas de mejoramiento. La característica de una alta frecuencia de duplicación cromosómica espontánea en algunos cultivos que da como resultado plantas duplicadas completamente fértiles sin tratamientos de duplicación posteriores es otra ventaja del cultivo de anteras y microsporas (Foster *et al.*, 2007; Seguí-Simarro *et al.*, 2011).

En la reproducción, la producción instantánea de líneas de reproducción verdaderas en especies diploides o aloploidos ahorra varias generaciones en los programas de mejoramiento. De esta manera la selección es mucho más efectiva en líneas puras que en líneas de segregación de generación anterior y la evaluación cuantitativa de rasgos también puede comenzar más temprano en el programa, ahorrando tiempo y espacio (Farrie y Caswell, 2011; Islam y Tuteja, 2012).

Los cultivos haploides han sido ventajosos en áreas de investigación como estudios de mutación, mapeo de genes, genómica y como objetivos para la transformación y edición genética. En la transformación, los embriones haploides pueden ser producidos y utilizados como objetivos para los procedimientos de bombardeo o mediante el uso de *Agrobacterium*. Es de gran interés la focalización del polen inmaduro haploide (microsporas) para la edición genética o transformación en la búsqueda de obtener plantas haploides directamente duplicadas homocigotas para el(los) transgen(es) (Kothari *et al.*, 2010; Soriano y Boutilier, 2013; Florez *et al.*, 2015).

2.3. Definiciones conceptuales

2.3.1. Cultivo de anteras *in vitro*

Es la técnica para producir tejido haploide, a partir de células que presentan solo la mitad del conjunto cromosómico característico de una especie). La base del cultivo de anteras es que, en un medio apropiado, se puede inducir los gametos (microsporas) a la formación de tejido en lugar de continuar con el proceso de maduración en polen. Dando

como resultado la capacidad de las microsporas de formar proembriones haploides (embriones somáticos formados directamente a partir de las microsporas), o tejido calloso.

Las plantas haploides se pueden obtener con menor dificultad trabajando con las anteras que directamente con microsporas aisladas, esto es debido a que la pared de la antera le permite brindar la estimulación necesaria para la formación y desarrollo esporofítico (Germaná, 2011).

2.3.2. Embriogénesis somática

Es el suceso por la cual células somáticas y/o germinales son inducidas a diferenciarse en embriones somáticos, con semejanza morfológica a los embriones cigóticos. Pero se diferencian por que presentan diferentes vías de desarrollo. Los embriones somáticos tienen la capacidad de diferenciarse directamente sin fase previa de callo o indirectamente después de una fase de callo. Se considera a las células germinales y embriones con mayor porcentaje de éxito en la inducción de embriogénesis directa (Seguí-Simarro y Nuez, 2008a).

2.4. Formulación de la Hipótesis

2.4.1. Hipótesis General

El cultivo *in vitro* de anteras de rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.) inducirá la formación de embriones somáticos.

2.4.2. Hipótesis Especificas

- El estadio óptimo de los botones florales de rocoto presentará mayor porcentaje de microsporas uninucleadas.
- El mejor tratamiento permitirá obtener el mayor porcentaje de desinfección de los botones florales de rocoto.
- El mejor tratamiento permitirá inducir a la formación de embriones somáticos en las anteras de rocoto.

Capítulo III: METODOLOGIA

3.1. Diseño metodológico

3.1.1. Tipo de investigación

Es de tipo básica, debido a la generación de embriones somáticos que pueden ser aplicados a futuro en otras investigaciones relacionadas en inducciones a estreses en busca de variación somaclonal, transformación genética y edición genética, mientras las plántulas regeneradas podrían emplearse en programas de mejoramiento genético.

3.1.2. Nivel de investigación

Es de nivel explicativa, debido a que está dirigida a encontrar los factores necesarios para lograr inducir la formación de embriones somáticos en anteras de rocoto. De esta manera evaluar, determinar y explicar las condiciones que deben estar presentes para que logre darse la formación de los embriones somáticos.

3.1.3. Diseño

Es de diseño experimental, debido a manipulación de los componentes en la búsqueda de definir tratamientos óptimos en la inducción de embriones somáticos determinando los que presenten mejores resultados dependiendo de las variables, en las cuales se medirán o evaluarán diversos aspectos, dimensiones o componentes.

3.1.4. Enfoque

Es de enfoque cuantitativa por qué es fundamental para este procedimiento la utilización de magnitudes numéricas que serán tratadas mediante instrumentos estadísticos teniendo en cuenta la causa y efecto de la variable independiente en la variable dependiente, de tal manera, la investigación se enmarca con este tipo de enfoque.

3.2. Población y muestra

La población fue definida por las plantas de rocoto del ecotipo de la zona agrícola de Santa Elena Norte, y la muestra estuvo representada por 275 botones florales que presentaron estadio con mayor porcentaje de microsporas uninucleada.

3.3. Operacionalización de variables e indicadores

Variables	Dimensiones	Indicadores	Escala de dimensión
Variable independiente: Anteras de rocoto	Estadio de botones florales Desinfección de botones florales	Microsporas uninucleadas Anteras libres de patógenos en el medio de cultivo	% %
Variable dependiente: Embriogénesis somática	Inducción de embriones	Formación de embriones en las anteras de rocoto	%

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4.1. Técnicas a emplear

3.4.1.1. Material vegetal

Se emplearon botones florales de rocoto del ecotipo Serrano. Las cuales se obtuvieron a partir de plántulas de rocoto en zona agrícola de Santa Elena Norte, Barranca. Posteriormente los botones florales fueron trasladados a las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Huacho.

3.4.1.2. Botones florales con microsporas uninucleadas

Se evaluó el porcentaje de microsporas en estado uninucleado a partir de anteras de botones florales de rocoto, los cuales se agruparon por diferencia de tamaños y buscar una relación morfológica de los botones florales (relación pétalo y sépalo) con presencia de

microsporas en estado uninucleado. Por lo cual cada muestra por grupo colectado se extrajeron las anteras, a partir de las cuales se obtuvieron las microsporas que fueron teñidas con orceína acética y observadas en el microscopio óptico a 100X de aumento, con la finalidad de determinar qué grupo presenta el mayor porcentaje del estadio indicado.

3.4.1.3. Desinfección de material vegetal

Los botones florales de rocoto seleccionados fueron colectados y transferidos al laboratorio para realizar el proceso de desinfección en diferentes tratamientos. Los botones florales primeramente se sumergieron en alcohol al 70% durante un minuto, luego se transfirieron a soluciones desinfectantes de diferentes tratamientos (Tabla 1) por 10 minutos en constante agitación. Cumplido el tiempo establecido se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril durante cinco minutos cada enjuague, y posteriormente se extrajeron las anteras para ser colocadas en placas con medio de cultivo de MS (Murashige y Skoog, 1962) a media concentración, adicionado con sacarosa (60 g/L) y agar (5 g/L) con 5.7 de pH.

Tabla 1 . Tratamientos con soluciones desinfectantes de botones florales de rocoto.

Tratamiento	Solución desinfectante
D1	NaClO 1%
D2	NaClO 2%
D3	NaClO 3%
D4	NaClO 4%

Todos los explantes se colocaron en cámara de crecimiento, con las condiciones de 25° C, con fotoperiodo de doce horas luz, durante 14 días en los cuales se realizó evaluaciones en los días 7 y 14 posterior a la introducción en los medios cultivo. Se evaluó el porcentaje de desinfección de las anteras de rocoto y el porcentaje de anteras necrosas parcialmente o en su totalidad.

3.4.1.4. Inducción de embriones somáticos

Las anteras de rocotos previamente desinfectadas se introdujeron en diferentes medios de cultivos de inducción (Tabla 2), para determinar el medio de cultivo que presente mayor porcentaje de inducción a partir de las anteras de rocoto. Los medios de cultivo estuvieron constituidos por macronutrientes y micronutrientes descritas por Murashige y Skoog (1962) a media concentración, adicionado con mioinositol (100 mg/L), glicina (2 mg/L), ácido nicotínico (0.5 mg/L), piridoxina HCL (0.5 mg/L), tiamina HCL (0.1 mg/L) y sacarosa (60 g/L), antes de agregar el agar (5 g/L) se ajustó el pH a 5.7. Posteriormente se trasladaron los medios a la autoclave para ser esterilizados a 1.2 Bar de presión y 121° C durante 20 minutos.

Tabla 2. Tratamientos para la inducción de embriones somáticos en anteras de rocoto.

Tratamiento	2,4-D (mg/L)	KIN (mg/L)
T1	0	0
T2	0.1	0.1
T3	0.1	1
T4	1	0.1
T5	1	1

2,4-D = Ácido 2,4-dicloro fenoxiacético; KIN = Kinetina.

Todos los medios de cultivo se colocaron en cámara de crecimiento en total oscuridad a 35° C de temperatura, durante los primeros cuatro días. Posteriormente modificaron las condiciones de la cámara de crecimiento con 12 horas luz y 12 horas oscuridad, y con 25° C durante ocho semanas, la evaluación de inducción de embriones somáticos se realizó transcurrida los ochos semanas, además se renovó los medios de cultivo transcurrida cada dos semanas.

3.4.2. Descripción de los instrumentos

- **Tinción orceína acética:** instrumento para la coloración de núcleos de las microsporas en estudio, permitiendo determinar el estado uninucleado necesarios para la investigación.
- **Microscopio óptico Boeco Germany BM-800/T/I/PL:** permitirá la observación de las microsporas y su identificación, para determinar el estadio de botones florales con mayor porcentaje de microsporas uninucleadas.
- **Balanza analítica Ohaus PX84:** equipo necesario para realizar la medición del peso de los componentes del medio de cultivo para cada tratamiento.
- **Potenciómetro SI Analytics Lab 850:** será empleado para determinar el pH correspondiente a cada medio de cultivo y modificar el valor indicado en la metodología.
- **Autoclave Biobase BKM-Z18N:** equipo que permitirá esterilizar los materiales y medios de cultivos; eliminando y evitando la presencia de microorganismo que puedan afectar la investigación.
- **Cabina de flujo laminar vertica Biobase BBS-H1300:** será empleado en la fase de desinfección del material vegetal y la introducción en los medios de cultivo correspondientes, debido permite tener zonas libres de partículas contaminantes, por lo que mantendrá el trabajo en esterilidad y asepsia.
- **Cámara de crecimiento LabTech Plant Growth Chamber LGC5201 G:** permitirá mantener a los explantes estar en condiciones necesarias de temperatura, humedad y luz con total precisión y fiabilidad.
- **Estereoscopio Leica EZ4:** equipo que permitirá aumentar la magnitud de visión, de esta manera se podrá observar con mayor calidad de imagen la respuesta embriogénica de las anteras de rocoto.

3.5. Técnicas para el procesamiento de la información

El diseño empleado fue completamente al azar (DCA) en los tratamientos de desinfección de botones florales de rocoto e inducción de embriones somáticos en anteras de rocoto. En cada caso se presentaron 10 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental estuvo constituida por una placa Petri con 30 anteras de rocoto.

Se empleo el modelo estadístico que se muestra continuación:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : Es el comportamiento observado en la unidad experimental, con el i-ésimo tratamiento con la j-ésima repetición.

μ : Efecto de la media general.

α_i : Efecto del i-ésimo tratamiento.

ϵ_{ijk} : Efecto del error experimental.

Los datos fueron procesados empleando los paquetes estadísticos agricolae y car en la interfaz gráfica RStudio (Desktop versión 1.4.1103) del software libre R (versión 4.0.3), se realizaron Análisis de Varianza (ANVA) para determinar el tratamiento de mayor desinfección y formación de embriones somáticos, para los resultados con significancia se realizó comparación entre las medias con prueba Tukey ($p < 0.05$).

Capítulo IV: RESULTADOS

4.1. Botones florales con microsporas uninucleadas

Se agruparon los botones florales de rocoto ecotipo Serrano por relación morfológica entre pétalos y sépalos, formando cinco grupos (Tabla 3). Este punto es crucial debido a que la maduración de las microsporas presenta cambios paralelos al crecimiento de los botones florales (Figura 4). La correlación del cambio de tamaño y maduración permiten clasificar los botones florales que puedan indicar un mayor porcentaje de microsporas en la fase de desarrollo deseada sin dañar de forma invasiva a las anteras. Los botones florales que presentaron aperturas, daño físico y oxidación fueron descartados tanto para esta parte de la investigación como para las posteriores secciones.

Tabla 3. Clasificación de botones florales de rocoto por relación morfológica.

Índice de relación	Botón Floral (BF)	Sépalo (S)	Pétalo (P)	S/P	P/BF
IR1	2.35 mm	2.12 mm	0.23 mm	9.22	0.09
IR2	2.82 mm	2.14 mm	0.68 mm	3.15	0.24
IR3	4.14 mm	2.52 mm	1.62 mm	1.56	0.37
IR4	4.89 mm	2.56 mm	2.34 mm	1.09	0.48
IR5	6.65 mm	3.04 mm	3.61 mm	0.84	0.54



Figura 4. Botones florales de rocoto clasificados por tamaño.

A partir de estos grupos de botones florales, se evaluó el porcentaje de microsporas en estado uninucleado, determinando que grupo basado en su índice de relación (IR) presentaba el mayor porcentaje de microsporas en estado uninucleado. El grupo IR4 presentó el mayor porcentaje de microsporas en estadio uninucleado con 81.3% (Figura 5), seguido de IR3 con 59.6%, mientras que IR1, IR2 y IR5 fueron los grupos de menor porcentaje de microsporas en estado uninucleado con 5.7%, 14.9% y 11.8% respectivamente, entre los dos últimos grupos no se presentó diferencia significativa. Este resultado nos permite determinar que el grupo IR4 de botones florales son óptimos para la inducción de embriones somáticos por presentar mayor porcentaje de microsporas en estado uninucleado.

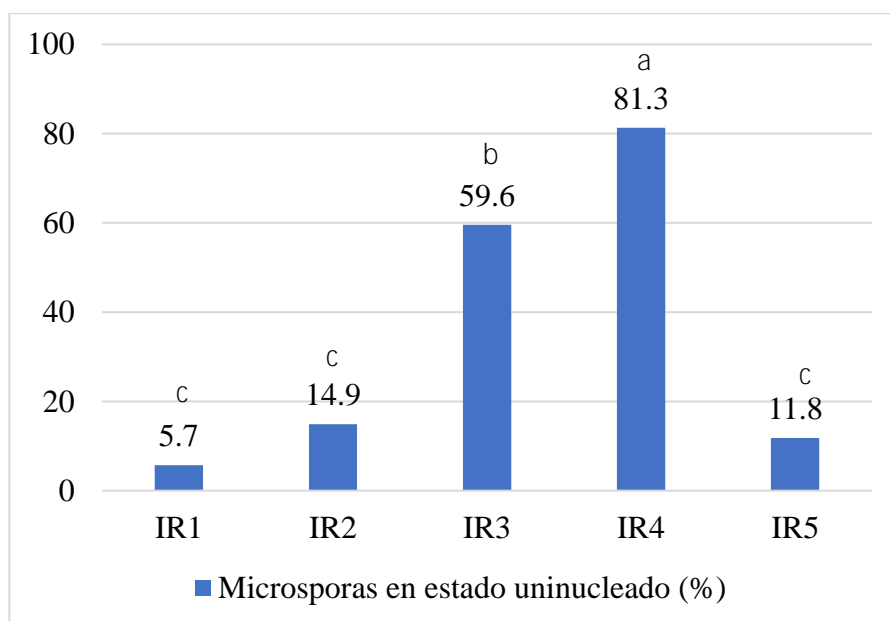


Figura 5. Porcentaje de microsporas en estado uninucleado por grupos de índice de relación en botones florales de rocoto. Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey para $p < 0.05$

4.2. Desinfección de material vegetal

Es fundamental en cultivo de tejidos vegetales en condiciones *in vitro* establecer los explantes en asepsia, evitando cualquiera contaminante bacteriano o fúngico, de esta manera es necesario determinar un método de desinfección que permita el menor porcentaje de contaminación, menor porcentaje de necrosis y mayor porcentaje de explantes sobrevivientes.

Se realizó la evaluación de los explantes en 7 y 14 días posteriores a la introducción *in vitro*. La primera evaluación (siete días de la introducción *in vitro*) presentó diferencia significativa entre tratamientos en el porcentaje de desinfección de los botones florales. Respecto al porcentaje de necrosis, se determinó mediante ANVA que no se obtuvo diferencia significativa (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación en la desinfección y necrosis de botones florales de rocoto a los siete días del establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	Solución desinfectante	Desinfección (%)	Necrosis (%)
D1	NaClO 1%	63.66 b	0 a
D2	NaClO 2%	91.33 a	0 a
D3	NaClO 3%	95.01 a	0 a
D4	NaClO 4%	100 a	0 a

Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey para $p < 0.05$

En la segunda evaluación correspondiente a 14 días del establecimiento *in vitro*, los resultados analizados mediante análisis de varianza permitieron determinar que por lo menos un tratamiento difirió de los demás en porcentaje de desinfección, mientras que en el porcentaje de necrosis no hubo significancia entre tratamientos. Obteniéndose mejores resultados con los tratamientos D3 y D4 con respecto al porcentaje de desinfección, con 83.68% y 89.01% respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación en la desinfección y necrosis de botones florales de rocoto a los 14 días del establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	Solución desinfectante	Desinfección (%)	Necrosis (%)
D1	NaClO 1%	27.34 c	0 a
D2	NaClO 2%	52.67 b	0 a
D3	NaClO 3%	83.68 a	0 a
D4	NaClO 4%	89.01 a	0 a

Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey para $p < 0.05$

4.3. Inducción de embriones somáticos

Se indujo formación de callos y embriones somáticos en anteras de rocoto al agregar los reguladores de crecimiento 2,4-D y KIN a los medios de cultivo, el tratamiento sin adición de reguladores de crecimiento las anteras de rocoto no mostraron respuesta (Figura 6A). Se observó en las anteras de rocoto la presencia de regiones friables en los callos, y estas regiones fueron generalmente blancas y translúcidas, lo que las caracterizó como callos embriogénicos (Figura B).

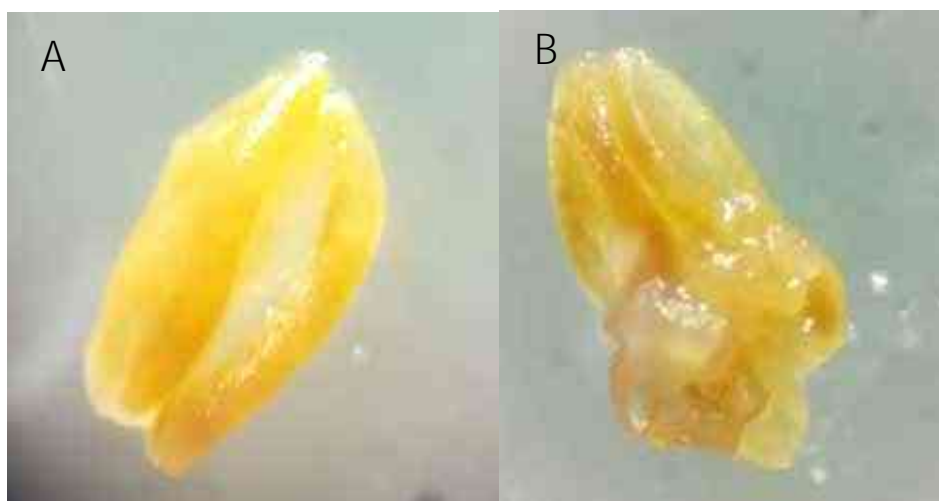


Figura 6. Respuesta de cultivo de anteras de rocoto *in vitro*. **A.** Antera de rocoto sin respuesta. **B.** Antera de rocoto con respuesta de formación de callos.

Se presento diferencia significativa entre los tratamientos, se presentaron mayores porcentajes de inducción de callos en los tratamientos T4 y T5. En las anteras de rocoto se logró presenciar hasta el 52.65% de las anteras indujeron callos en el medio T4. Este medio contenía mayor concentración de auxina (2,4-D 1 mg/L) y menor concentración de citoquinina (Kinetina 0.1 mg/L), entre los cuatro medios utilizados (Tabla 6).

Tabla 6. Respuesta de formación de callos en anteras de rocoto.

Tratamiento	2,4-D (mg/L)	KIN (mg/L)	Formación de callos (%)
T1	0	0	0 c
T2	0.1	0.1	11.06 b
T3	0.1	1	8.76 b
T4	1	0.1	52.65 a
T5	1	1	45.75 a

Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey para $p < 0.05$

El cultivo de anteras de anteras de rocoto se realizó en medio MS adicionando reguladores de crecimiento. El efecto de cada tratamiento en inducir formación de embriones somáticos en anteras de rocoto se logró determinar primeramente la necesidad de adición de fitohormonas que regulen el crecimiento o influyan en los medios de cultivo, en segundo punto que se presentó una mayor respuesta de inducción de embriones somáticos en los tratamientos con equilibrio entre 2,4-D y KIN. En la Tabla 7 se muestra al tratamiento T2 como el de mayor formación de embriones somáticos con 18.27%, que representa de cinco a seis embriones somáticos por placa. El segundo mejor tratamiento fue T5, se presentó en el medio de cultivo equilibrio hormonal de 2,4-D (1 mg/L) y KIN (1 mg/L), obteniéndose 11.19% de anteras con formación de embriones somáticos, lo que corresponde entre tres a cuatro anteras con presencia de embriones somáticos por placa. En el tratamiento T1 que era medio de cultivo sin adicionar reguladores de crecimiento no se presentó inducción de embriones somáticos en ninguna antera de rocoto.

Tabla 7. Respuesta de formación de embriones somáticos en anteras de rocoto.

Tratamiento	2,4-D (mg/L)	KIN (mg/L)	Formación de embriones somáticos (%)
T1	0	0	0 d
T2	0.1	0.1	18.27 a
T3	0.1	1	5.28 c
T4	1	0.1	3.39 c
T5	1	1	11.19 b

Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey para $p < 0.05$

La formación de embriones somáticos en las anteras de rocoto (Figura 7) se logró observar a partir de la sexta semana en el tratamiento T2, mientras que los demás tratamientos que presentaron formación de embriones somáticos se evidencio la formación desde la séptima semana posterior al establecimiento en los medios de cultivo. Los embriones somáticos se identificaron de coloración blanquecina al emerger de las anteras de rocoto, en el transcurso de los días se notaba un crecimiento en los embriones emergidos formando la característica de embriones cotiledonarios, globulares y torpedos.



Figura 7. Formación de embriones somáticos en anteras de rocoto en condiciones *in vitro* (flechas).

Capítulo V: DISCUSIÓN

El agrupamiento de botones florales de rocoto ecotipo Serrano con relación a su morfología entre pétalos y sépalos, permitió seleccionar el grupo indicado por presentar mayor porcentaje de microsporas en estado uninucleada de gran importancia para la investigación. Esta relación morfológica permite trabajar con un grupo establecido de botones florales, sin la necesidad de dañar cada antera previo introducción. La agrupación de botones florales se considera un buen indicador del estado de desarrollo de las microsporas, debido a la presente relación que existe entre la morfología de los botones florales con la maduración de las anteras y por consiguiente la etapa de desarrollo de las microsporas en rocoto (Hegde *et al.*, 2017).

El grupo IR4 fue el grupo seleccionado para la investigación por presentar mayor porcentaje de microsporas en estadio uninucleado (81.3%), estos resultados son similares a los mostrados por Hegde *et al.* (2017), quienes agruparon en tres diferentes grupos anteras de *Capsicum annuum* L., determinando que el grupo 2 estaba conformado por botones florales de misma longitud de sépalos y pétalos, este grupo presentaba 80% de microsporas en estadio uninucleado. Alves *et al.* (2015), agruparon en tres grupos anteras de *Capsicum* spp., en la cual el grupo 2 se caracterizó por presentar longitudes similares entre sépalos y pétalos con 1.50 mm y 1.45 mm respectivamente, representando una relación sépalo/pétalo y pétalo/botón floral de 1.03 y 0.76 respectivamente, en este grupo presento microsporas en estadio uninucleado mayores al 95%. Esto concuerda con el resultado obtenido por Dumas de Vaultx *et al.* (1981), quienes utilizaron anteras en *Capsicum annuum* L., donde las microsporas estaban en la etapa uninucleada tardía, es decir, equivalente a un tamaño con sépalos y pétalos de igual longitud.

El tratamiento D4 que consistió en solución de hipoclorito de sodio al 4%, permitió obtener el mayor porcentaje de desinfección de los botones florales sin dañar el tejido de las anteras. Este resultado es superior al empleado por Gómez (2016), quien utilizo solución de NaClO (2%) por 25 minutos para obtener 86% de desinfección de anteras de *Capsicum chinense* Jacq., pero debido al tiempo que expuso los botones florales, las anteras presentaron daños causados por la solución desinfectante como necrosis. Comlekcioglu (2021), obtuvieron resultados positivos de desinfección y sin daños en anteras de *Capsicum annuum* L. empleando solución de Ca(ClO)₂ (15%) durante 15 minutos. Ozsan y Naci

(2017), realizaron desinfección de botones florales de *Capsicum annuum* L. con solución de alcohol (70%) durante sesenta segundos, seguido de 15 minutos en solución de hipoclorito de sodio (10%), obteniendo resultados semejantes a que se han logrado obtener en la presente investigación.

La formación de callos en las anteras de rocoto estuvo relacionada con la respuesta por la adición de 2,4-D y Kinetina en los medios de cultivo, sobre todo por la característica de la auxina 2,4-D, la cual al encontrarse de manera exógena en el medio de cultivo induce la proliferación celular en los explantes, así mismo la desorganización celular, lo que se observa característicamente como callos en relación a la concentración del regulador de crecimiento y al genotipo del explante en estudio (Argüelles *et al.*, 2020; Hernández-Amasifuen *et al.*, 2021).

Los resultados que obtenidos en formación de callos en anteras de rocoto presentan similitud con los resultados demostrados por Alves *et al.* (2015), quienes indujeron formación de callos *Capsicum* spp., presentando los mejores resultados de 36% y 24% de callos formados empleando medios de cultivo adicionados con 4.65 mg/L KIN más 4.52 mg/L 2,4-D y 23.25 mg/L KIN más 22.6 mg/L 2,4-D, respectivamente. Hegde *et al.* (2017), obtuvo 53.33% de formación de callos en anteras de *Capsicum annuum* L. variedad Indra y 51.11% en el cultivar Bharat, adicionando 7.5 mg/L KIN y 0.2 mg/L de NAA. Luitel y Kang (2013), indujeron callos en anteras de minipaprika (*Capsicum annuum* L.) empleando medio de cultivo MS adicionado con 2,4-D (0.1 mg/L) y KIN (0.1 mg/L), obteniendo hasta 53.2% en el cultivar Vine Sweet – Red, pero en el misma cultivar lograron inducir hasta 78.5% de callos al cambiar el medio de cultivo por CP. Ozsan y Naci (2017), empleando medio de cultivo MS adicionado con NAA (5 mg/L) y BAP (0.5 mg/L), indujeron 12.05% de formación de callos en anteras de *Capsicum annuum* L. cultivar Belissa, mientras con el mismo medio de cultivo en los cultivares Benino y Kanyon obtuvieron 0% y 2.29% de formación de callos respectivamente.

Para la inducción de embriones somáticos en anteras de rocoto fue importante la incubación a 35° C por los primeros días, esto es considerado un pretratamiento que dependerá de la especie y genotipo que se esté investigando, algunos pueden necesitar estos pretratamientos con altas temperaturas o bajas temperaturas por días que pueden variar (Koleva-Gudeva *et al.*, 2007). En el género *Capsicum* Dumas de Vaulx *et al.* (1981), determinaron que es necesario realizar un pretratamiento entre dos a ocho días de

incubación a 35° C en total oscuridad y posteriormente modificar la temperatura a 25° C de manera estable con fotoperiodo de 12 horas. Parra-Vega *et al.* (2012), determinaron que el pimiento (*Capsicum annuum* L.) necesita choque térmico inductivo de 35° C durante los primeros cuatro a ocho días en oscuridad, previa a la incubación de 25° C.

La inducción de embriones somáticos en anteras de rocoto se logró con la adición de 2,4-D y KIN, auxina y citoquinina (reguladores de crecimiento) respectivamente, presentando el tratamiento T2 (0.1 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN) los resultados superiores con 18.27% de anteras en la formación de embriones somáticos. Los resultados son cercanos a los obtenidos por Comlekcioglu (2021), con 18% de embriones somáticos en anteras de *Capsicum annuum* L. cultivar Diyar, empleando medios de cultivo MS adicionado con NAA (4 mg/L) y BAP (0.5 mg/L). Grozeva y Nankar (2020), obtuvieron resultados superiores a la presente investigación con la formación de 54 embriones somáticos (correspondiente al 27% de embriogénesis somática) en anteras de *Capsicum annuum* L. cultivar Stryama empleando medios de cultivo MS adicionado con 2,4-D (0.1 mg/L) y Kinetina (0.1 mg/L); en la misma investigación empleando el mismo medio de cultivo pero no lograron formar embriones somáticos a partir de anteras de *Capsicum annuum* L. cultivar Zlaten Medal 7 (0% de embriones somáticos por anteras), esto demuestra que la inducción de embriones somáticos es genotipo dependiente, es decir que cada genotipo necesita la estandarización previa del medio de cultivo con los nutrientes y reguladores de crecimiento necesarios para la generación de organogénesis o inducción de embriogénesis somática. Alves *et al.* (2015), obtuvieron resultados inferiores empleando con 4.65 mg/L KIN más 4.52 mg/L 2,4-D y 23.25 mg/L KIN más 22.6 mg/L 2,4-D con 12% y 2% de formación de embriones somáticos respectivamente en anteras de *Capsicum annuum* L. Parra-Vega *et al.* (2012), empleados medio de cultivo similares a la presente investigación obtuvieron resultados superiores en el cultivar Herminio de *Capsicum annuum* L. con 22% cultivares, pero inferiores en los cultivares Coyote, Quito y Vélez, con 10%, 4% y 4% de embriones somáticos respectivamente.

Vélez *et al.* (2010), obtuvieron resultados inferiores a la presente investigación con 2.23% de embriones somáticos en anteras de *Capsicum annuum* L. cultivar Miahuateco, empleando medio de cultivo MS adicionado con BAP (0.1 mg/L) y 2,4-D (1 mg/L). Koleva-Gudeva *et al.* (2007), obtuvieron resultados superiores con 33% de embriones somáticos en anteras de en pimiento (*Capsicum annuum* L.).

Capítulo VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Se logró determinar el estadio óptimo de los botones florales de rocoto con mayor porcentaje de microsporas uninucleadas era el grupo IR4 con características morfológicas de 4.89 mm de longitud de botón floral, 2.56 mm longitud de sépalo, 2.34 mm longitud de pétalo, 1.09 relación sépalo/pétalo y 0.48 relación pétalo/botón floral, presentando 81.3% de microsporas en estadio uninucleado.

Se determinó que el tratamiento D3 (NaClO 3%) y D4 (NaClO 4%) permiten obtener el mayor porcentaje de desinfección de los botones florales de rocoto con 83.68% y 89.01% respectivamente, así mismo, ni uno de los tratamientos dañó las anteras.

Se determinó que el tratamiento T2 (0.1 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN) es el tratamiento óptimo para inducir embriones somáticos en anteras de rocoto con 18.27% de anteras con formación de embriones somáticos, además el tratamiento T4 (1 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L KIN) permite la formación de callos en las anteras de rocoto con 52.65% de anteras con presencia de callos.

4.2. Recomendaciones

Emplear otros genotipos de rocoto para poder a futuro realizar hibridaciones y a partir de estos emplear anteras *in vitro* para obtener genotipos doblehaploides.

Realizar nuevas combinaciones de reguladores de crecimiento para incrementar el porcentaje de inducción de embriones somáticos en anteras de rocoto.

Realizar investigación de embriogénesis somática a partir de las microsporas uninucleadas presentes en las anteras de rocoto.

Determinar combinaciones de reguladores de crecimiento para la maduración de embriones somáticos formados en anteras de rocoto para la regeneración de plántulas y determinar la ploidía de los nuevos individuos regenerados.

Capítulo VII: FUENTES DE INFORMACIÓN

5.1. Fuentes Bibliográficas

- Alcorcés, N. (2001). Estudios cromosómicos de cuatro selecciones de *Capsicum chinense* Jacq. Revista UDO Agrícola 1(1): 34 - 41.
- Alves, P., Rêgo, M., Rêgo, E., Soares, W. (2015). Embryogenesis in the anthers of different ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes. Genetics and molecular research 14(4):13349-13363.
- APEGA, (2009). Ajíes Peruanos: sazón para el mundo. Editorial El Comercio. En colaboración con: INIA, UNALM y USMP. 121p.
- Angiosperm Phylogeny Group. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society 181(1): 1–20.
- Argüelles, A., Hernández, A., Cortez, A. y Díaz, H. (2020). Callogénesis *in vitro* de paprika (*Capsicum annuum* L.) cv. Papri King a partir de tallos. Big Bang Faustiniiano 9(1): 4-7.
- Bo, M., Cosa, M. y Carrizo, C. (2011). Autoincompatibilidad y funciones sexuales en *Capsicum pubescens*. XXXIII Jornadas Argentinas de Botánica: 34 pp.
- Caballero, B., Márquez, C. y Alberto, B. (2017). Efecto de la liofilización sobre las propiedades funcionales del ají rocoto (*Capsicum pubescens*). Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 111-119 p.
- Camarena, F., Chura J. y Blas R. (2014). Mejoramiento genético y biotecnológico de plantas. Promotora Lima. Perú. 286 p.
- Comlekcioglu, N. (2021). Effect of colchicine addition to culture medium on induction of androgenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). Pakistan Journal of Botany 53(3): 1-5.
- Dunwell, J.M. (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnology Journal 8(4): 377 – 424.
- Espinoza, D. (2017). Caracterización morfológica de los ajíes de la costa del Perú. Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú.
- Farrie, A. y Caswell, K. (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid planta production. Plant Cell Tissue Org Cult 104: 31 – 309.
- Flores, N. (2019). Elaboración de una salsa a base de huacatay (*Tagetes minuta*) y rocoto (*Capsicum pubescens*) evaluando sus características fisicoquímicas y

sensoriales. Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú.

- Foster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J. y Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci* 12:368–375.
- George, E., Hall, M. y Klek, G. (2008). *Plant propagation by tissue culture. Volumen 1: The background*, Springer-Verlag GmbH. 552 p.
- Germaná, M.A. (2006). Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell Tiss Org Cult* 86: 131 – 146.
- Germaná, M.A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 104:283–300.
- Gómez, L. (2016). Establecimiento de un protocolo para la inducción de la androgénesis en *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- Grozeva, S. y Nankar, A. (2020). Effect of incubation period and culture medium on pepper anther culture. *Indian Journal of Biotechnology* 19: 53-59.
- Guevara, M., Siles, M. y Bracamonte, O. (2000). Análisis cariotípico de *Capsicum pubescens* R&P (Solanaceae) “rocoto”. *Revista Peruana de Biología* 7(2): 134 – 141.
- Hegde, V., Partap, P., Yadav, R., Baswana, K. (2017). In vitro Androgenesis in *Capsicum* (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(5): 925-933.
- Hernández, A., Argüelles, A., Cortez, A. y Díaz, H. (2020). Efecto de la concentración de 2,4-diclorofenoxiacético en la inducción de callos *in vitro* utilizando cotiledones de rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.). *The Biologist* 17(2): 327-334.
- Hernández, A., Pineda, A., Rojas, J. y Díaz, H. (2021). Regeneración *in vitro* de arnaucho (*Capsicum chinense* Jacq.) a partir de yemas apicales. *Manglar* 18(1): 71-75.
- Hernández, A., Pineda, A. y Díaz, H. (2019a). Efecto de la luz y del ácido giberélico en la germinación *in vitro* de *Capsicum annuum* L. cv. ‘Papri King’. *Bioteología Vegetal* 19(3): 165-170.
- Hernández, A., Pineda, A. y Noriega, H. (2019b). Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* obtenidos de zonas productoras de “ají paprika” *Capsicum annuum* L. (Solanaceae) en el distrito de Barranca, Perú. *Arnaldoa* 26(2): 689-698.

- Hernández-Amasifuen, A.D., Argüelles-Curaca, A., Cortez-Lázaro, A.A. y Díaz-Pillasca, H.B. (2021). *In vitro* induction of callus from foliar explants in rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.). *La granja* 32(2): 327-334.
- Hussain, A., Qarshi, A.I., Nazir, H. y Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: Leva A, Rinaldi MRL (eds) Recent Advances in Plant *in vitro* Culture InTech, pp 1-28.
- Indrianto, A., Barinova, I., Touraev, A. y Heberle-Bors, E. (2001). Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta* 212: 163 – 174.
- Islam, S. y Tuteja, N. (2012). Enhancement of androgénesis by abiotic stresses and other pretreatments in major crop species. *Planta Sci* 182: 134 – 140.
- Koleva-Gudeva, L., Spasenovski, M. y Trajkova, F. (2007). Somatic embryogenesis in pepper anther culture: the effect of incubation treatments and different media. *Sci Hort* 11: 114 – 119.
- Kothari, S., Joshi, A., Kachhwaha, S. y Ochoa-Alejo, N. (2010). Chilli peppers – A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances* 28(1): 35 – 48.
- Liu, F., Zha, H., Chen, B. y Zhang, Y. (2007). Embryogenesis of microspore derive multicells in *Capsicum annuum* L. *Fen Zi Xi Bao Cheng Wu Xue Bao* 40:371 – 379.
- Luitel, B. y Kang, W. (2013). In Vitro Androgenic Response of Minipaprika (*Capsicum annuum* L.) Genotypes in Different Culture Media. *Hort. Environ. Biotechnol.* 54(2):162-171.
- Meckelmann, S.W., Jansen, C., Riegel, D.W., van Zonneveld, M.J., Ríos, Ll., Peña, K., Mueller-Seitz, E. y Petz, M. (2015). Phytochemicals in Native Peruvian *Capsicum pubescens* (Rocoto). *European Food Research and Technology*, 241, 817-825.
- Montero, W. (2001). Estudio morfogénico e histológico de *Equinacea purpurea in vitro* (*Equinacea* sp). Vicerrectoría de Investigación y extensión. ITCR. Cartago, Costa Rica. 60 p.
- Moreno, D., Vállora, G. y Romero, L. (2003). Variations in fruit micronutrient contents associated with fertilization of cucumber with macronutrients. *Scientia Horticulturae* 97: 121–127.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473–497.
- Ozsan, T. y Naci, A. (2017). In vitro Pepper (*Capsicum annuum* L.) Anther Culture: Can be Affected Via Vitamins B?. *Biotechnology Journal International* 20(1): 1-13.

- Page, S. y Hawley, R. (2003). Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301: 785 – 789.
- Paita, E. y Guevara, A. (2003). Efecto del tiempo de escaldado y temperatura de deshidratación en la retención de color y picantes en rocoto (*Capsicum pubescens* R. y P.) amarillo en polvo. *Anales Científicos UNALM* 56: 211 – 232.
- Palacios, S. (2007). Caracterización Morfológica de Acciones de *Capsicum* spp. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.
- Parra-Vega, V., González-García, B. y Seguí-Simarro, J.M. (2013). Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Physiol Plant* 35: 627–633.
- Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A. y Seguí-Simarro, J. (2012). Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 112(3): 353–360.
- Pineda, A., Argüelles, A., Rojas, J. y Díaz, H. (2021). Respuesta en el establecimiento y regeneración *in vitro* de rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.). *Aporte Santiaguino* 14(1): 31-42.
- Ramos, L., Nahuath, S., Andrade, A., Barredo, F.; González, T. y Castaño, E. (2010). Indirect somatic embryogenesis and morphohistological analysis in *Capsicum chinense*. *Biologia*, 65 (3): 504-511.
- Saborío, M. y Da Costa, C. (1992). Autoincompatibilidad en *Capsicum pubescens*. *Agronomía Costarricense* 16(2): 279 – 286.
- Salazar, F. y López, J. (2012). Requerimiento macronutricional en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Biociencias* 2(2): 27-34.
- Sánchez, J. (2015). Relación de color y características fisiológicas y fisicoquímicas del rocoto (*Capsicum pubescens*). Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Sardón, E. (2015). Fortalecimiento de la cadena de valor del rocoto fresco (*Capsicum pubescens*) de la selva central para el mercado de Lima. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Seguí-Simarro, J. Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V. y González-García, B. (2011). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports* 30(5): 765 – 778.

- Seguí-Simarro, J.M. y Nuez, F. (2008a). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiol Plant* 134:1–12.
- Seguí-Simarro, J.M. y Nuez, F. (2008b). Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. *Cytogenet Genome Res* 120:358–369.
- Shariatpanahi, M., Bal, U., Heberle-Bors, E. y Touraev, A. (2006). Stresses applied for the re-programming of planta microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiol Plant* 127: 519 – 534.
- Soriano, M., Li, H. y Boutilier, K. (2013). Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reprod* 26:181–196.
- Thorpe, T.A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37(2):169-180.
- Valdez, I. (2017). Caracterización fenotípica de quince accesiones de germoplasma de rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pavón.) en la estación INIA Santa Rita Arequipa. Tesis de Ingeniera. Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa. Perú.
- Valle-Gough, R.E. (2015). Polyamines and WOX genes in the recalcitrance to plat conversión of somatic embryos of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *African Journal of Biotechnology* 14(7): 569 – 581.
- Vélez, M., Robledo, A., Corona, T., Aguilar, V., Ramírez, P. y Suárez, J. (2010). Obtención de plantas haploides en chile Miahuateco (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1(2): 189-201.
- Vera-Guzmán, A.M., Chávez-Servia, J.L., Carrillo-Rodríguez, J.C. y López, M.G. (2011). Phytochemical evaluation of wild and cultivated pepper (*C. annuum* and *C. pubescens*) from Oaxaca, Mexico. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71, 578- 585
- Villavicencio, B. (2016). Caracterización químico-nutricional y actividad antioxidante de dos muestras de *Capsicum pubescens* (“Rocoto rojo y amarillo”) provenientes de Villa Rica (Pasco). Tesis de pregrado. Universidad Cayetano Heredia, Lima, Perú.

5.2. Fuentes Electrónicas

- AgrodataPerú (2019) Plan de desarrollo sostenible de las especies del género *Capsicum* 2018. Consultado 07/09/2019. Disponible en: <https://www.agrodataperu.com/2019/01/paprika-entera-peru-exportacion-2018-diciembre.html>

Anexos

Tabla 8. Componentes y concentración de sales para la preparación del medio Murashige y Skoog (MS).

Componentes	Concentración (mg/L)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂	332.2
MgSO ₄	180.7
KH ₂ P O ₄	170
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ . 2H ₂ O	37.26
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
MnSO ₄ . H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025

Tabla 9. Preparación de stock de kinetina (KIN).

Componente	Concentración
Kinetina *	0.2 g
Agua destilada	200 mL

Nota: Conservar el stock a 0° C.

*Disolver primero en unas gotas de NaOH 1N.

Tabla 10. Preparación de stock de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Componente	Concentración
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético*	0.2 g
Agua destilada	200 mL

Nota: Conservar el stock a 0° C.

*Disolver primero en unas gotas de alcohol.



Figura 8. Generación de botones florales de rocoto ecotipo Serrano.



Figura 9. Crecimiento de los botones florales de roco ecotipo Serrano, incrementando el tamaño de los pétalos con el característico color purpura.

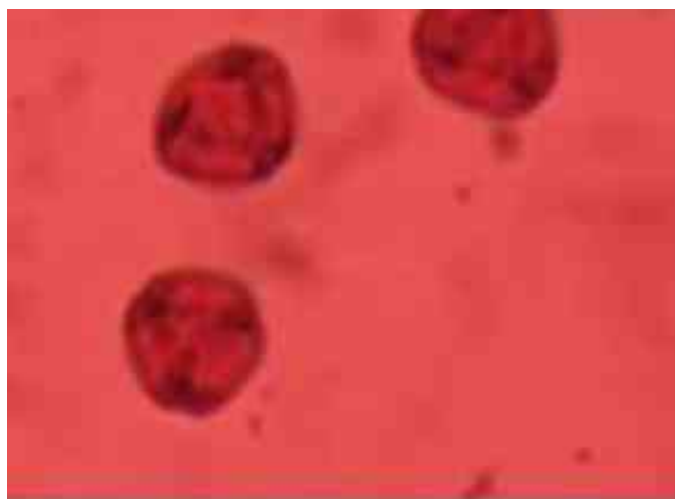


Figura 10. Microsporas de roco en estadio uninucleado.

Tabla 11. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para porcentaje de microsporas en estado uninucleado.

Prueba	Test	Alfa	P valor	Estado
Normalidad	Shapiro	0.05	0.073	Si cumple
Homogeneidad de varianza	Bartlett	0.05	0.064	Si cumple

Tabla 12. Análisis de varianza para porcentaje de microsporas en estado uninucleado.

Fuentes de variación	G. L	S. C	C. M	F cal.	P valor	Significancia
Tratamiento	4	45490	11373	207.9	0.0000	***
Error	45	2461	55			

Tabla 13. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para porcentaje de desinfección de botones florales de rocoto a los siete días del establecimiento *in vitro*.

Prueba	Test	Alfa	P valor	Estado
Normalidad	Shapiro	0.05	0.061	Si cumple
Homogeneidad de varianza	Bartlett	0.05	0.087	Si cumple

Tabla 14. Análisis de varianza para porcentaje de desinfección de botones florales de rocoto a los siete días del establecimiento *in vitro*.

Fuentes de variación	G. L	S. C	C. M	F cal.	P valor	Significancia
Tratamiento	3	7957	2652.6	79.78	0.0000	***
Error	36	1197	33.2			

Tabla 15. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para porcentaje de desinfección de botones florales de rocoto a los 14 días del establecimiento *in vitro*.

Prueba	Test	Alfa	P valor	Estado
Normalidad	Shapiro	0.05	0.097	Si cumple
Homogeneidad de varianza	Bartlett	0.05	0.338	Si cumple

Tabla 16. Análisis de varianza para porcentaje de desinfección de botones florales de rocoto a los 14 días del establecimiento *in vitro*.

Fuentes de variación	G. L	S. C	C. M	F cal.	P valor	Significancia
Tratamiento	3	24824	8275	98.54	0.0000	***
Error	36	3023	84			

Tabla 17. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para porcentaje de respuesta de formación de callos en anteras de rocoto.

Prueba	Test	Alfa	P valor	Estado
Normalidad	Shapiro	0.05	0.272	Si cumple
Homogeneidad de varianza	Bartlett	0.05	0.079	Si cumple

Tabla 18. Análisis de varianza para porcentaje de respuesta de formación de callos en anteras de rocoto.

Fuentes de variación	G. L	S. C	C. M	F cal.	P valor	Significancia
Tratamiento	4	22690	5672	130.2	0.0002	***
Error	45	1961	44			

Tabla 19. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para porcentaje de respuesta de formación de embriones somáticos en anteras de rocoto.

Prueba	Test	Alfa	P valor	Estado
Normalidad	Shapiro	0.05	0.434	Si cumple
Homogeneidad de varianza	Bartlett	0.05	0.081	Si cumple

Tabla 20. Análisis de varianza para porcentaje de respuesta de formación de embriones somáticos en anteras de rocoto.

Fuentes de variación	G. L	S. C	C. M	F cal.	P valor	Significancia
Tratamiento	4	2076	519	37.85	0.0007	***
Error	45	617	13.7			