

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Evaluación de fitorreguladores del crecimiento en
la inducción de callo embriogénico en *Gossypium
barbadense* L. 1753
“algodón nativo” color pardo**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología
Milagros Sanae Teruya Kamiyama

Lima, Perú

2016

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por brindarme siempre su apoyo incondicional.

Al Dr. Mauro Quiñones, por haberme asesorado y brindado la oportunidad de realizar la presente investigación en el Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Vegetal.

Al profesor César Puicón, por su tiempo y apoyo.

A los jurados evaluadores, por sus críticas y sugerencias para pulir esta tesis.

A mis amigos y colegas del laboratorio, por su apoyo y compañía durante el desarrollo de mi tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE	3
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	6
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES.....	12
2.1 Clasificación taxonómica	12
2.2 Origen y distribución de la especie	12
2.3 El algodón nativo	13
2.4 Embriogénesis somática indirecta.....	14
2.4.1 Formación de callo o callogénesis.....	15
2.4.2 Callo embriogénico	16
2.4.3 Factores que estimulan la callogénesis y embriogénesis somática.....	17
2.4.4 Variación somaclonal	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Obtención del material biológico.....	24
3.2 Preparación de los medios de cultivo	24
3.2.1 Medio de cultivo para germinación de semillas	25
3.2.2 Medios de cultivo para iniciación e inducción de callo embriogénico	25
3.3 Desinfección y germinación de semillas	25
3.4 Iniciación y proliferación de callo	26
3.5 Inducción de callo embriogénico	28
3.6 Diseño experimental y análisis estadístico	28
3.6.1 Desinfección y germinación de semillas.....	28
3.6.2 Iniciación y proliferación de callo	28
3.6.3 Inducción de callo embriogénico.....	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Desinfección y germinación de semillas	30
4.2 Iniciación y proliferación de callo	30
4.2.1 Iniciación de callo.....	30
4.2.2 Intensidad de proliferación de callo	31

4.2.3 Características y viabilidad del callo.....	32
4.2.4 Subcultivo y proliferación del callo	33
4.3 Inducción de callo embriogénico	34
5. DISCUSIÓN	36
5.1 Desinfección de semillas	36
5.2 Iniciación y proliferación del callo	36
5.3 Inducción de callo embriogénico	38
6. CONCLUSIONES	40
7. RECOMENDACIONES.....	41
8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	42
9. ANEXOS	51
9.1 Figuras	51
9.2 Tablas.....	69

TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

2,4-D Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Kin Kinetina

IBA Ácido indol-3-butírico

Callo Masa de células vegetales no diferenciadas

Explante Segmento de órgano o tejido de la planta utilizado en el cultivo *in vitro*

Friable Característica disgregable de las células del callo

MS Medio de cultivo Murashige-Skoog

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Figura 1. Semillas de algodón nativo. a) Con fibras. b) Desmotadas.</i>	51
<i>Figura 2. Semillas conservadas en bolsas de polietileno con cierre hermético.</i>	51
<i>Figura 3. Desinfección de semillas en solución de hipoclorito de sodio 2.5%.</i>	52
<i>Figura 4. Plántulas de algodón nativo germinadas in vitro.</i>	52
<i>Figura 5. Corte de explantes de hipocotilo en condiciones asépticas.</i>	53
<i>Figura 6. Introducción de explantes de hipocotilo en medio de cultivo para iniciación de callo.</i>	53
<i>Figura 7. Lámina portaobjetos preparada con muestra de callo coloreada con Azul de Evans al 0.5%.</i>	54
<i>Figura 8. Incubación de callos en condiciones de: a) fotoperiodo y b) oscuridad continua.</i>	54
<i>Figura 9. Transferencia en cámara de flujo laminar de callos friables incubados en: a) fotoperiodo y b) oscuridad continua.</i>	55
<i>Figura 10. Explantes de hipocotilo: a) Al primer día de cultivo. b) Al sexto día de cultivo.</i>	55
<i>Figura 11. Formación de callo en explantes de hipocotilo cultivados en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D, Kin y agua de coco, incubados en fotoperiodo.</i>	56
<i>Figura 12. Formación de callo en explantes de hipocotilo cultivados en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D, Kin y agua de coco, incubados en oscuridad continua.</i>	57
<i>Figura 13. Porcentaje de explantes de hipocotilo que formaron callo en condiciones de fotoperiodo y oscuridad continua.</i>	58
<i>Figura 14. Proliferación abundante de callo friable (T3). a) Callos incubados en fotoperiodo. b) Callos incubados en oscuridad continua.</i>	59
<i>Figura 15. Células de callo friable (400X) incubado en fotoperiodo. a) Sin colorante. b) Con solución de Lugol.</i>	59
<i>Figura 16. Células de callo compacto (400X) incubado en fotoperiodo. a) Sin colorante. b) Con solución de Lugol.</i>	60
<i>Figura 17. Células de callo friable (400X) incubado en oscuridad. a) Sin colorante. b) Con solución de Lugol.</i>	60
<i>Figura 18. Células de callo compacto (400X) incubado en oscuridad. a) Sin colorante. b) Con solución de Lugol.</i>	61
<i>Figura 19. Evaluación de la viabilidad del callo (400X). a y b) Callos incubados en fotoperiodo. c y d) Callos incubados en oscuridad continua. v: células viables; nv: células no viables.</i>	61
<i>Figura 20. Número de subcultivos de callo en condiciones de fotoperiodo y oscuridad continua.</i>	62

<i>Figura 21. Proliferación de callo friable (T3) en fotoperiodo. a) Callos recién subcultivados. b) Callos proliferados luego de 21 días de incubación.</i>	63
<i>Figura 22. Proliferación de callo friable (T3) en oscuridad continua. a) Callos recién subcultivados. b) Callos proliferados luego de 21 días de incubación.</i>	63
<i>Figura 23. Callos subcultivados (T3) e incubados en fotoperiodo (10X). a) Primer subcultivo. b) Segundo subcultivo. c) Tercer subcultivo.</i>	64
<i>Figura 24. Callos subcultivados (T3) e incubados en oscuridad continua (10X). a) Primer subcultivo. b) Segundo subcultivo. c) Tercer subcultivo.</i>	65
<i>Figura 25. Necrosamiento de callos subcultivados. a) Callos (T1) incubados en fotoperiodo. b) Callos (T2) incubados en oscuridad continua.</i>	66
<i>Figura 26. Porción de callo color cristalino incubado en fotoperiodo visto bajo el estereoscopio (30X). a) Células alargadas. b) Células esféricas.</i>	66
<i>Figura 28. Callo de color marrón incubado en fotoperiodo visto bajo el estereoscopio (10X).</i>	67
<i>Figura 29. Callo de color marrón incubado en oscuridad continua visto bajo el estereoscopio (10X).</i>	68
<i>Figura 30. Presencia de organogénesis radical (10X) en tratamientos de inducción de callo embriogénico. a) Tratamiento 1. b) Tratamiento 6. r: inicio de formación de raíz.</i>	68
<i>Tabla 1. Composición del medio Murashige-Skoog (1962).</i>	69
<i>Tabla 2. Tratamientos de fitorreguladores del crecimiento y agua de coco evaluados en la iniciación de callo.</i>	70
<i>Tabla 3. Tratamientos de fitorreguladores del crecimiento evaluados en la inducción de callo embriogénico.</i>	70
<i>Tabla 4. Tratamientos de desinfección de semillas de algodón nativo pardo.</i>	71
<i>Tabla 5. Intensidad de la proliferación de callo.</i>	71
<i>Tabla 6. Número de semillas germinadas y no germinadas según el tiempo de exposición a hipoclorito de sodio (NaOCl) 2.5% (valores entre paréntesis indican porcentajes).</i>	72
<i>Tabla 7. Tiempo de germinación de semillas según el tiempo de exposición a hipoclorito de sodio (NaOCl) 2.5%.</i>	72
<i>Tabla 8. Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, kinetina y agua de coco en la iniciación de callo en explantes de hipocotilo incubados en condiciones de fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad.</i>	73
<i>Tabla 9. Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, kinetina y agua de coco en la iniciación de callo en explantes de hipocotilo incubados en condiciones de oscuridad continua.</i>	74
<i>Tabla 10. Intensidad de proliferación de callo en condiciones de fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad, según tratamientos de iniciación de callo.</i>	75
<i>Tabla 11. Intensidad de proliferación de callo en condiciones de oscuridad continua, según tratamientos de iniciación de callo.</i>	76

RESUMEN

Gossypium barbadense L. “algodón nativo” es oriundo de la costa norte del Perú y se caracteriza por presentar fibras de colores naturales. La evaluación del efecto de diferentes concentraciones de fitorreguladores de crecimiento en la inducción de callo embriogénico se realizó en explantes de hipocotilo de *G. barbadense* L. “algodón nativo” color pardo, bajo dos condiciones lumínicas distintas. La desinfección de semillas se llevó a cabo utilizando NaOCl al 2.5% en distintos tiempos de exposición (5-20 min) para obtener plántulas *in vitro*. Para la iniciación y proliferación de callos, se introdujeron explantes de hipocotilo (con 5 réplicas) en medios Murashige-Skoog (MS) suplementados con diferentes concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), kinetina (Kin) y agua de coco. Los callos friables de mayor proliferación fueron transferidos a medios MS con distintas concentraciones de Kin, 2,4-D y ácido indol-3-butírico (IBA) para la inducción de callo embriogénico. Los cultivos fueron mantenidos en condiciones de fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad y oscuridad continua. Se logró el 100% de desinfección de semillas en 10 min de exposición al desinfectante. En 85% a 100% de explantes de hipocotilo se obtuvo la formación de callo en todos los tratamientos de iniciación de callo incubados en ambas condiciones lumínicas durante 21 días. La mayor proliferación de callo friable se obtuvo en 82.5% de explantes cultivados en medio MS enriquecido con 0.1 mg/l de 2,4-D y 100 ml/l de agua de coco e incubados en fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad. En los medios MS suplementados con distintas concentraciones de Kin, 2,4-D e IBA no se logró la inducción de callo embriogénico. Sin embargo, en el medio MS sin reguladores de crecimiento y en el suplementado con 0.05 mg/l de Kin y 0.3 mg/l de IBA, en fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad, se inició la organogénesis radical.

Palabras clave: Fitorreguladores del crecimiento, algodón nativo, callo friable, callo embriogénico.

ABSTRACT

Gossypium barbadense L. “native cotton” is originally from the northern coast of Peru and is characterized by its naturally colored fibers. The evaluation of the effect of different concentrations of plant growth regulators on embryogenic callus induction was performed in hypocotyl explants of *Gossypium barbadense* L. “native cotton” brown, under two different lighting conditions. Seed disinfection was carried out using 2.5% NaOCl in different exposure times (5-20 min) in order to obtain *in vitro* plants. For initiation and proliferation of callus, hypocotyl explants (with 5 replicates) were placed in Murashige-Skoog (MS) medium supplemented with different concentrations of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), kinetin (Kin) and coconut water. Friable calli with the highest proliferation were transferred to MS medium with different concentrations of Kin, 2,4-D and indole-3-butyric acid (IBA) for induction of embryogenic callus. The cultures were maintained under conditions of 16 h light/ 8 h dark photoperiod and continuous darkness. 100% of seed disinfection was achieved at 10 min of exposure to disinfectant. In 85% to 100% of hypocotyl explants, callus formation was obtained in all callus induction treatments, incubated in both lighting conditions during 21 days. The highest proliferation of friable callus was obtained in 82.5% of hypocotyl explants cultivated in MS medium enriched with 0.1 mg/l 2,4-D and 100 ml/l coconut water, in 16 h light/ 8 h dark photoperiod. In MS medium supplemented with different concentrations of Kin, 2,4-D and IBA, induction of embryogenic callus was not achieved. However, in MS medium without growth regulators and supplemented with 0.05 mg/l Kin and 0.3 mg/l IBA, in 16 h light/ 8 h dark photoperiod, root organogenesis was initiated.

Key words: Plant growth regulators, native cotton, friable callus, embryogenic callus.

1. INTRODUCCIÓN

El algodón nativo, también llamado “algodón país”, “algodón criollo” o “algodón de colores”, pertenece a la especie *Gossypium barbadense* L., familia Malvaceae. Esta planta ha sido utilizada desde hace más de 5 mil años en la costa norte del Perú y se caracteriza por presentar fibras de colores naturales: blanco, beige, lila, marrón, pardo, rojizo, anaranjado.

La planta del algodón nativo crece en huertos y jardines, así como en pequeñas parcelas de cultivo. Es manejado y aprovechado por la población rural, permitiendo su conservación tradicional en la costa norte del Perú. Su fibra es utilizada en la elaboración de prendas de vestir y artesanías, y es cultivado también como planta ornamental.

El algodón nativo presenta características que le confieren un alto valor económico y alto potencial para ser aprovechado de manera industrial. Esta planta presenta resistencia a condiciones de sequía y salinidad del suelo, así como a plagas y enfermedades algodoneras, comunes en algodones híbridos comerciales. Asimismo, produce fibras de colores, lo cual evita el uso de tintes sintéticos para el teñido. Sin embargo, la desventaja de esta planta es que presenta un periodo vegetativo largo y su fibra es gruesa y de longitud corta.

Hoy en día, el empleo de la biotecnología permite obtener plantas por embriogénesis somática mediante el cultivo de callo y con ello aumentar la variabilidad genética de las especies, sentando las bases para la obtención de variedades con características que podrían ser de importancia económica, como por ejemplo, menor periodo vegetativo, mejor calidad de fibra, entre otros.

A pesar de ser un recurso genético con alto potencial económico, el algodón nativo es una especie que ha sido poco investigada en el campo del cultivo de tejidos *in vitro*. Por este motivo, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar diferentes concentraciones de fitorreguladores del crecimiento en la inducción de callo embriogénico en *G. barbadense* L. “algodón nativo” color pardo, lo cual contribuirá al conocimiento científico actual para futuras investigaciones en el mejoramiento genético de esta especie.

2. ANTECEDENTES

2.1 Clasificación taxonómica

La especie *Gossypium barbadense* fue descrita por el botánico Carl von Linnaeus en 1753. Su clasificación taxonómica es la siguiente (Roskov *et al.*, 2016):

Reino:	Plantae
División:	Tracheophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Malvales
Familia:	Malvaceae
Género:	<i>Gossypium</i>
Especie:	<i>Gossypium barbadense</i> L. 1753

2.2 Origen y distribución de la especie

Gossypium barbadense L. se originó en América del Sur y su domesticación se dio a lo largo de la costa, entre el noroeste de Perú y el sur de Ecuador, lo cual es respaldado por las evidencias de redes de pescar confeccionadas con algodón por las antiguas civilizaciones (Westengen *et al.*, 2005). Los restos de fibra más antiguos que se han encontrado datan de 3100 – 1300 a. C., en Huaca Prieta, departamento de La Libertad (Cáritas del Perú, 2011) lugar desde donde *G. barbadense* L. se dispersó a otras zonas de América del sur, las Indias Occidentales y las islas Galápagos, llevado por acción humana o por corrientes marítimas (Smith, 1995).

Gossypium barbadense L. es una especie alotetraploide y presenta número cromosomal $2n=4x=52$, con dos complementos cromosomales AADD (MINAM, 2013; Stewart *et al.*, 2009). Los datos moleculares indican que todos los alopoliploides en *Gossypium* comparten un ancestro común, lo cual apoya la hipótesis de que la formación de poliploides ocurrió una única vez. Asimismo, todos los alopoliploides contienen un genoma cloroplástico (genoma A) del Viejo

Mundo, indicando que el progenitor femenino en la hibridación inicial perteneció a un taxón con genoma-A de África o Asia (Wendel, 1989).

Gossypium barbadense L. es la especie de algodón más distribuida en la costa norte del Perú, encontrándose en el 71% de los distritos que la comprenden. Esta especie está presente en el Perú como algodón nativo o como sus variedades comerciales Pima, Tangüis e IPA (MINAM, 2013).

2.3 El algodón nativo

El algodónero es un cultivo tradicional del Perú y produce una de las fibras vegetales más valiosas (INIA, 2009), la cual tiene una gran importancia económica como materia prima para la elaboración de hilos, tejidos y prendas de vestir.

El algodón nativo es oriundo de la costa norte del Perú y ha sido cultivado por más de 5 mil años por la población rural de acuerdo a sus conocimientos y costumbres ancestrales, contribuyendo en su conservación tradicional. Su fibra es utilizada en la elaboración de artesanías de tejidos en el departamento de Lambayeque, mientras que en otras zonas del país, las plantas son conservadas como ornamentales (MINAM, 2013).

El algodón nativo se caracteriza por presentar fibras gruesas y de longitud corta, cuyos colores naturales (blanco, beige, lila, marrón, pardo, rojizo, anaranjado) le dan un valor agregado al prescindir de colorantes de origen químico (Vreeland, 1985; Cáritas del Perú, 2011). Asimismo, la planta posee un sistema radicular muy eficiente que le permite crecer en suelos salitrosos, con poca materia orgánica y poca humedad (Basurto, 2005), aunque presenta periodo vegetativo largo (MINAM, 2013). Por otro lado, el cultivo del algodón nativo evita el empleo de pesticidas gracias a que presenta mecanismos de resistencia y tolerancia a diversas plagas y enfermedades, principalmente las causadas por *Fusarium* sp. y *Verticillium* sp. (Vreeland, 1985; Basurto, 2005).

La planta del algodón nativo es hospedera de insectos como *Dysdercus peruvianus* “arrebriado”, *Aphis gossypii* “pulgón”, *Heliothis virescens* “perforador de la bellota” y *Pectinophora gossypiella* “gusano rosado de la india”, considerados plagas para cultivares comerciales de algodón (MINAM, 2013), razón por la cual, a partir de los años 30, se promulgaron disposiciones de sanidad vegetal para el valle de Piura y Lambayeque, así como por toda la costa, para que los agricultores cortaran y quemaran sus cultivos de algodón nativo (Vreeland, 1985; Cáritas del Perú, 2011). Asimismo, en 1994, se aprobó la Resolución Ministerial N° 0251-94-AG que prohibió su cultivo en los valles de la costa peruana donde se cultivaran algodones comerciales, así como la conservación de cualquier planta aislada. Estas medidas ocasionaron la erradicación de los cultivos de algodón nativo y con ello, la pérdida de variabilidad genética. Sin embargo, los campesinos y pobladores rurales continuaron cultivando el algodón nativo de manera clandestina, protegiéndolo de su extinción (Cáritas del Perú, 2011).

En el 2008, la Ley N° 29224 derogó la RM N° 0251-94-AG y declaró al algodón nativo peruano, también denominado “País”, Patrimonio Genético Étnico-Cultural de la Nación, disponiendo su rescate, recuperación, conservación y promoción en el ámbito nacional.

2.4 Embriogénesis somática indirecta

La embriogénesis somática es una técnica de la biotecnología que permite la obtención de embriones a partir de células somáticas vegetales, sin que exista la unión de gametos. Esta técnica y, en general, el cultivo de tejidos vegetales, se basan en el principio de totipotencialidad celular, propuesto por Haberlandt en 1902 (citado por Radice, 2010), que consiste en que todas las células vegetales tienen la capacidad de regenerar plantas completas.

La formación de embriones somáticos fue observada por primera vez, y de manera independiente, por Reinert (1958) y Steward *et al.* (1958) en *Daucus carota* (citados por Litz y Jarret, 1991). Desde entonces, se ha reportado el potencial de

embriogénesis somática en un amplio rango de especies, como *Datura innoxia*, *Nicotiana tabacum*, *Santalum album* (Litz y Jarret, 1991).

Existen dos tipos de embriogénesis somática: directa e indirecta. La primera involucra la formación de embriones directamente a partir de un segmento del explante sin la formación previa del callo. La vía indirecta, materia de estudio de esta investigación, se da a través de una fase intermedia de callo (Bedoya y Ríos, 2010), y es observada con mayor frecuencia que la embriogénesis directa (George *et al.*, 2008). En ambos casos, los embriones somáticos pasan a través de etapas similares a las observadas en un embrión cigótico: globular, acorazonado, torpedo, cotiledonar y embrión maduro (Kamle *et al.*, 2011).

2.4.1 Formación de callo o callogénesis

La embriogénesis somática indirecta requiere, en primera instancia, la formación del callo, el cual es un tejido amorfo compuesto por una masa no organizada de células desdiferenciadas.

La formación de callo se da frecuentemente en las plantas cuando presentan una herida, por la presencia de insectos o microorganismos, o como resultado de estrés. Por otro lado, en condiciones *in vitro*, el callo puede ser iniciado colocando asépticamente pequeñas partes de la planta (explantes) en un medio de cultivo (George *et al.*, 2008).

La desinfección del material biológico, del que se obtienen los explantes, se realiza utilizando desinfectantes químicos que eliminan los microorganismos superficiales. Por ejemplo, la solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) inhibe, de manera irreversible, la actividad enzimática esencial para el metabolismo celular y la integridad de la membrana citoplasmática de los microorganismos (Fukuzaki, 2006; Estrela *et al.*, 2002).

Bajo la presencia de reguladores de crecimiento endógenos o exógenos, el metabolismo de las células del tejido del explante cambia y comienza la división celular, durante la cual, la diferenciación y especialización de éstas son revertidas

y se da lugar a la desdiferenciación celular, formando un tejido de células no especializadas (George *et al.*, 2008).

Las células del callo se mantienen desorganizadas mientras el callo crece, sin embargo, pueden comenzar a formarse, de manera aleatoria, algunas células especializadas que podrían formar órganos como raíces y brotes (organogénesis), o embriones (embriogénesis), y potencialmente lograr la regeneración de la planta (George *et al.*, 2008).

El primer reporte de la formación de callo en algodón fue realizado por Beasley en 1971 (citado por George *et al.*, 2008), quien observó que éste se extendía del micrópilo de óvulos cultivados en medio Murashige-Skoog (MS). Años más tarde, en 1979, Price y Smith lograron, por primera vez, la formación de embriones somáticos en *G. klotzschianum* a partir de callos obtenidos previamente en explantes de hipocotilo.

2.4.2 Callo embriogénico

El callo embriogénico es aquel que tiene capacidad de producir embriones somáticos (George *et al.*, 2008), y generalmente es de apariencia friable, granular, de color crema o verde amarillento (Sakhanokho *et al.*, 2001, Landaverde *et al.*, 2002).

La identificación y selección del callo con potencial embriogénico es un paso importante en la regeneración del algodón. El fracaso en separar los callos embriogénicos de los no embriogénicos usualmente resulta en la conversión de callos con potencial embriogénico en no embriogénicos (Sakhanokho *et al.*, 2001). Gómez *et al.* (2006) reportaron que las células con capacidad embriogénica son de tamaño pequeño, presentan citoplasma denso, núcleo y nucléolo grande, vacuolas pequeñas y gran cantidad de gránulos de almidón. Éstos últimos, presentes en los plastidios, son producidos a partir de la sacarosa incluida en el medio de cultivo y su acumulación podría ser un pre-requisito de la morfogénesis (Thorpe *et al.*, 1986).

El callo embriogénico está compuesto por estructuras nodulares o masas proembriogénicas. Si las condiciones de cultivo son favorables, estas estructuras continúan su desarrollo embrionario y pasan al estado globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar (George *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012).

La expresión de la competencia embriogénica en el callo depende del uso de un medio de cultivo adecuado, con la concentración correcta de reguladores de crecimiento. Dudits *et al.* (1995, citados en George *et al.*, 2008) mencionan que los reguladores de crecimiento y el estrés juegan un rol importante en la mediación de la cascada de transducción de señales que conducen a la reprogramación de los genes, resultando en una serie de divisiones celulares que inducen el crecimiento polarizado y con ello la formación de embriones somáticos. Los callos iniciados en un explante usualmente no muestran capacidad morfogénica, pero al ser subcultivados en un medio inductivo, pueden formar tejido embriogénico. Sin embargo, existen algunos pocos tejidos con alta capacidad embriogénica que no requieren la adición de auxinas para el desarrollo de callo embriogénico (George *et al.*, 2008).

La inducción de callo embriogénico requiere de varios factores: el genotipo de la planta debe tener capacidad embriogénica; deben haber auxinas presentes en el medio de cultivo; luego del inicio de la embriogénesis, usualmente se debe transferir los callos a un medio con una concentración reducida o ausente de auxinas, e incluso a veces se agrega una citoquinina; el tiempo entre subcultivos no debe ser prolongado; y una fuente de nitrógeno reducido en forma de ión NH_4^+ o aminoácido como glutamina o alanina debe estar presente en el medio (George *et al.*, 2008).

2.4.3 Factores que estimulan la callogénesis y embriogénesis somática

La iniciación e inducción de callo embriogénico es influenciada por la especie, el cultivar, el tipo de explante, los reguladores de crecimiento, la luz, entre otros.

a) Reguladores del crecimiento

Dentro de los reguladores de crecimiento, las auxinas y citoquininas son comúnmente utilizadas para la iniciación de callo y formación de embriones somáticos.

Las auxinas parecen ser capaces de reprogramar genéticamente a las células diferenciadas. Lo Schiavo *et al.* (1989) sugieren que las auxinas promueven la hipermetilación del ADN, necesaria para el inicio de la división y desdiferenciación celular. Las auxinas comúnmente usadas para la inducción del callo son: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA). Las citoquininas, por otro lado, parecen ser necesarias en la división celular, debido a que regulan la síntesis de proteínas implicadas en la formación y función del huso mitótico. Algunas citoquininas utilizadas ampliamente en el cultivo de tejidos son: benciladenina (BA), bencilaminopurina (BAP), zeatina, kinetina (Kin), tidiazurón (TDZ) (George *et al.*, 2008; Tavakkol *et al.*, 2011).

Rao *et al.* (2006), Zouzou *et al.* (2008) y Rajeswari *et al.* (2010) obtuvieron buenos resultados en la formación de callo en diferentes variedades de *Gossypium* spp. utilizando el medio de cultivo MS suplementado con 0.1 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l Kin. Además, lograron la inducción de embriogénesis somática transfiriendo los callos en MS sin reguladores de crecimiento y luego en MS enriquecido con 1.9 g/l KNO₃ (Rajeswari *et al.*, 2010).

Sun *et al.* (2003) obtuvieron cultivos de callo friable y verde en *Gossypium klotzschianum*, a partir de hipocotilos cultivados en medio MSB (Sales MS + Vitaminas Gamborg B5) suplementado con 0.9 µM 2,4-D y 2.32 µM Kin. Asimismo, lograron el desarrollo y proliferación de embriones en medio MSB suplementado con 0.045 µM 2,4-D, 0.93 µM Kin, 2.46 µM IBA (ácido indol-3-butírico). Por otro lado, la diferenciación de embriones se realizó en medio líquido

MSB con 0.226 μ M 2,4-D y 0.93 μ M Kin; y lograron obtener los diferentes estados: globular, corazón, torpedo y embrión cotiledonar maduro.

Han *et al.* (2009) desarrollaron un protocolo para la embriogénesis somática y regeneración de plantas de cinco cultivares recalcitrantes de algodón (*G. hirsutum*), permitiendo ampliar la gama de genotipos para la manipulación *in vitro* para el mejoramiento genético. Observaron que el mejor medio de cultivo para la inducción de callo fue el MSB (medio MS y vitaminas Gamborg B5) suplementado con 0.1 mg/l IBA, 0.1 mg/l Kin y 0.1 mg/l 2,4-D. Asimismo, obtuvieron callos embriogénicos utilizando el medio MSB suplementado con 0.3 mg/l IBA y 0.05 mg/l Kin; y lograron la formación de embriones somáticos y la regeneración de plantas en el medio MSB cuya concentración de NH_4NO_3 fue modificada a 825 mg/l, y KNO_3 a 3800 mg/l, y fue suplementado con 2.0 g/l glutamina y 0.5 g/l asparagina.

Sakhanokho *et al.* (2001) observaron la formación de callos pre-embriogénicos de *G. hirsutum* y *G. barbadense* en medio compuesto por sales MS suplementado con 0.4 mg/l tiamina, 100 mg/l myo-inositol, 30 g/l glucosa, 2 g/l Gelrite, 0.75 g/l MgCl_2 , 2.0 mg/l ANA, 1.0 mg/l Kin (pH 5.8). Los callos friables con pequeñas células y citoplasma muy denso fueron transferidos a medio de selección/maduración, en el cual se varió la concentración de las hormonas con 0.5 mg/l ANA y 0.1 mg/l Kin.

Abdellatef y Khalafallah (2008) observaron que los mayores índices de formación de callo se dieron en los explantes de hipocotilo de *G. hirsutum* cultivados en medio basal Gamborg B5 suplementado con 1.0 mg/l ANA en combinación de 0.1 mg/l de Kin o BA. El medio conteniendo Kin resultó en la formación de callo compacto con gran número de raíces emergiendo de éste.

Hirimburegama y Gamage (1994) lograron la formación de callo en semillas maduras y hojas primarias de *Gossypium hirsutum* en medio MS suplementado con dos combinaciones de reguladores de crecimiento: 0.22 mg/l de 2,4-D + 0.2 mg/l de BAP, y 1.10 mg/l de 2,4-D + 0.2 mg/l de BAP en oscuridad y luz,

obteniendo mayor proliferación de callo en presencia de luz y con mayor concentración de 2,4-D en presencia de BAP.

González-Benito *et al.* (1997) lograron la formación de callo granular, parcialmente friable y de color marrón claro en medio MS enriquecido con diferentes combinaciones de 2iP y 2,4-D. Sin embargo, al aumentar las concentraciones del 2,4-D y 2iP, los callos presentaron color marrón oscuro y porciones necróticas.

b) Suplementos orgánicos no definidos

Existen sustancias orgánicas de naturaleza química indefinida que han sido evaluadas en la formación de callo en distintas especies vegetales. Entre estas sustancias se pueden mencionar el agua de coco, la pulpa de plátano, la caseína hidrolizada y el extracto de levadura. La caseína hidrolizada, por ejemplo, incrementa la iniciación de callo en *Oryza sativa* (Khaleda y Al-Forkan, 2006; Rattana *et al.*, 2012). Por otro lado, el extracto de levadura así como la caseína hidrolizada aumentan el crecimiento del callo y la formación de embriones somáticos en *Phoenix dactylifera* L. (Al-Khayri, 2010). Asimismo, la pulpa de plátano permite la obtención de callo embriogénico y la regeneración de plantas completas de *Miscanthus x giganteus* (Płazek y Dubert, 2010).

El agua de coco es el endospermo líquido del fruto de coco, y entre sus componentes se encuentran aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, purinas, azúcares, polialcoholes, vitaminas, minerales y reguladores del crecimiento, cuyas concentraciones pueden variar (George *et al.*, 2008).

Algunos autores han evaluado el uso del agua de coco en la inducción de callo, en combinación o ausencia de otros suplementos. Por ejemplo, Efe (2005) obtuvo callos a partir de óvulos de *Gossypium hirsutum* y *G. barbadense*, utilizando medio MS enriquecido con 100 – 120 ml de agua de coco, 1 g/l de caseína hidrolizada, 1 g/l de extracto de levadura y distintas concentraciones de fitoreguladores de crecimiento. Asimismo, Islam y Bari (2012) obtuvieron callos

friables de color verde claro a partir de hipocotilos de *Jatropha curcas* en 7 días de cultivo en medio MS suplementado con 0.5 mg/l de 2,4-D y 20 ml/l de agua de coco. Por otro lado, Nazneen *et al.* (2014) estudiaron la callogénesis en explantes nodales de *Tinospora cordifolia* y obtuvieron un incremento en la respuesta del callo utilizando medio MS enriquecido con 50 o 100 ml/l de agua de coco y diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas.

Michael (2012) obtuvo gran cantidad de callo embriogénico en explantes de *Ipomoea batatas* L. cultivados en MS modificado suplementado con 3 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BAP y 100 ml/l de agua de coco, y observó que la iniciación del callo se dio en 50% a 85% de los explantes, dependiendo del cultivar. Por otro lado, Khierallah y Husien (2013) observaron que la adición de agua de coco en el medio de cultivo incrementó significativamente el peso fresco y seco de callos embriogénicos, así como el número de embriones globulares en *Phoenix dactylifera* L.

c) Tipo de explante

En *Gossypium* spp. se han obtenido cultivos de callos a partir de casi todas las partes de la planta, como ovarios, óvulos, embriones cigóticos, anteras, raíces, hojas y segmentos de plántulas jóvenes (cotiledones, hipocotilos) (Wu *et al.*, 1998). Sin embargo, los hipocotilos son los explantes que presentan mayor respuesta a la callogénesis. Varios investigadores compararon la formación de callo en distintos explantes, y obtuvieron mayor porcentaje de iniciación en hipocotilos, seguido por cotiledones y raíces (Zhang *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2006; Zouzou *et al.*, 2008; Sanghera *et al.*, 2009; Rajeswari *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2013).

d) Condición lumínica

La luz es uno de los factores ambientales necesarios en la fotosíntesis y la fotomorfogénesis, los cuales son facilitados por los pigmentos presentes en los tejidos, los cuales absorben la radiación de determinadas longitudes de onda. La fotosíntesis llevada a cabo en la mayoría de tejidos vegetales cultivados *in vitro* es relativamente baja, por lo que los cultivos dependen de una fuente externa de sacarosa. En estas circunstancias, la luz es importante por su efecto en la fotomorfogénesis, debido a que induce el rápido cambio en la expresión genética que conduce al patrón normal de desarrollo (George *et al.*, 2008).

La iniciación y proliferación de callo puede darse en condiciones de oscuridad, luz continua o en fotoperiodo regular, dependiendo de la especie. Aunque la luz sea esencial para el crecimiento de brotes y plántulas verdes, los cultivos de callo generalmente se inician sin la presencia de ésta, y la oscuridad puede beneficiar su proliferación y morfogénesis (George *et al.*, 2008).

Sin embargo, en *Gossypium* spp. se ha logrado la formación e inducción de callo embriogénico tanto en condiciones de oscuridad continua como de fotoperiodo, siendo éste último el más común. Por ejemplo, Sakhanokho *et al.* (2001), Khan *et al.* (2006), Rao *et al.* (2006), Ghaemi *et al.* (2013), Surgun *et al.* (2014) iniciaron la formación y proliferación de callo en fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, mientras que Sanghera *et al.* (2009) lo hicieron en oscuridad continua.

2.4.4 Variación somaclonal

La variación somaclonal es aquella variación originada en cultivos celulares o de tejidos, la cual puede ser influenciada por distintos factores, como: el método de propagación, tipo de explante, tipo y concentración de regulador de crecimiento vegetal, número y duración de subcultivos, estrés y genotipo (Bairu *et al.*, 2011).

La variación somaclonal permite obtener variabilidad genética, por lo que representa una fuente importante de germoplasma potencial para el mejoramiento vegetal (Kamle *et al.*, 2011). Tafvizi *et al.* (2010) obtuvieron diferencias

morfológicas en plantas de *Gossypium hirsutum* L. regeneradas de diferentes subcultivos, evidenciando el posible uso del cultivo de tejidos para inducir nuevos caracteres agronómicos en el algodón con fines de mejoramiento.

La ventaja de la variación somaclonal es que la presencia de mosaicos en las plantas regeneradas es mínima, en comparación al mejoramiento por mutaciones inducidas, y por lo tanto, pueden estabilizarse en una generación. La regeneración de plantas actúa como filtro al eliminar casi todos los cambios deletéreos (Tabares *et al.*, 1991).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención del material biológico

Las semillas de *Gossypium barbadense* L. “algodón nativo” color pardo fueron obtenidas de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Piura, ubicada en la región Piura, y de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, ubicada en la región Lambayeque. Éstas fueron colocadas en bolsas de polietileno y enviadas por vía terrestre al Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma (Distrito de Surco, Lima).

En el laboratorio, las semillas fueron desmotadas de forma manual (Figura 1). Luego, éstas fueron evaluadas visualmente y, las que presentaban buena apariencia, fueron conservadas en bolsas de polietileno con cierre hermético, debidamente rotuladas, a temperatura ambiente hasta su utilización (Figura 2).

3.2 Preparación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo consistieron en sales MS (Murashige-Skoog, 1962) (Tabla 1) y fueron preparados a partir de soluciones stock de macroelementos, microelementos, vitaminas y quelato de hierro. Para cada medio de cultivo se sacaron las alícuotas correspondientes de cada una de las soluciones y se depositaron en un vaso de precipitado; se adicionaron diferentes concentraciones de fitoreguladores de crecimiento y agua de coco, dependiendo del tipo de medio; se agregó 30 g/l de sacarosa y se enrazó con agua destilada al volumen a preparar. Se ajustó el pH a 5.8 utilizando NaOH 1M y HCl 1M, y luego se adicionó el agente gelificante Gelrite, el cual se diluyó en microondas hasta obtener una solución homogénea. Se sirvieron los medios en frascos de vidrio, los cuales fueron sellados con papel aluminio, rotulados y esterilizados en autoclave a 121 °C por 15 min a 103.4 kPa de presión. Los medios esterilizados fueron

conservados a temperatura ambiente en la sala de operaciones del laboratorio hasta su uso.

3.2.1 Medio de cultivo para germinación de semillas

El medio de cultivo para la germinación de semillas consistió en sales MS a mitad de concentración y fue gelificado con 2.5 g/l de Gelrite. Se sirvió 25 ml del medio en frascos de vidrio de 63 mm de diámetro y 119 mm de alto.

3.2.2 Medios de cultivo para iniciación e inducción de callo embriogénico

Los medios de cultivo para iniciación de callo e inducción de callo embriogénico consistieron en sales MS (Tabla 1) a concentración completa y fueron suplementados con 100 ml/l de agua de coco fresca, previamente filtrada en papel filtro Whatman No. 1, y diferentes concentraciones de 2,4-D, Kin, IBA, según el tratamiento (Tabla 2 y 3). Los medios para iniciación de callo fueron gelificados con 3 g/l de Gelrite, y para inducción de callo embriogénico, con 2.5 g/l. Se sirvió 20 ml del medio en frascos de vidrio de 58 - 69 mm de diámetro y 54 - 68 mm de alto.

3.3 Desinfección y germinación de semillas

Se germinaron las semillas de las regiones Piura y Lambayeque, aplicando la siguiente metodología:

Las semillas fueron lavadas con agua y detergente durante 1 a 2 min y enjuagadas 4 a 5 veces con agua destilada hasta eliminar los restos del detergente. En la cámara de flujo laminar, éstas fueron sumergidas durante 30 s en alcohol 96° y luego en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl, Clorox®) al 2.5% por 20 min (Figura 3). Transcurrido el tiempo de exposición, las semillas fueron

enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril (a intervalos de 4 min de reposo) para eliminar los restos de la solución desinfectante.

Una vez desinfectadas, las semillas fueron sembradas de forma aséptica en medio de cultivo para germinación e incubadas a 26 ± 2 °C en oscuridad hasta su germinación, luego de la cual fueron transferidas a condiciones de fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Se utilizaron 20 semillas por cada localidad.

Las semillas de Piura presentaron 85% de capacidad germinativa, mientras que las de Lambayeque, 50%, razón por la cual los siguientes ensayos fueron realizados con las semillas provenientes de Piura.

En el sistema de desinfección antes mencionado, con 20 min de exposición a NaOCl al 2.5%, se obtuvo 100% de semillas desinfectadas. Para mejorar la eficiencia del método se evaluaron menores tiempos de exposición al NaOCl 2.5%: 5, 10 y 15 min (Tabla 4). Las semillas fueron sembradas en el mismo medio de germinación e incubadas bajo las mismas condiciones de cultivo. Se determinó el porcentaje de contaminación y germinación de las semillas, así como el tiempo de germinación en cada uno de los tratamientos de desinfección.

3.4 Iniciación y proliferación de callo

A partir de plántulas *in vitro* de 7 a 10 días de haber germinado y 7 a 10 cm de longitud (Figura 4), se cortaron longitudinalmente, con ayuda del bisturí, explantes de hipocotilos de 5 a 10 mm de longitud aproximadamente (Figura 5). Estos fueron sembrados en medio de cultivo para iniciación de callo (Figura 6, Tabla 2), e incubados a 26 ± 2 °C en dos condiciones lumínicas distintas: fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad y oscuridad continua. Transcurridos 21 días de cultivo, se determinó el porcentaje de explantes que iniciaron la formación del callo, así como su intensidad de proliferación.

La intensidad de proliferación del callo se determinó utilizando una clasificación visual del 0 al 3, donde: 0=Ausencia de formación de callo, 1=escasa proliferación, 2=moderada proliferación y 3=abundante proliferación (Tabla 5).

Se evaluó la textura y el color del callo visualmente y con ayuda del estereoscopio binocular Leica (modelo EZ2). Por otro lado, se analizó la viabilidad del callo mediante la tinción con Azul de Evans al 0.5%, para lo cual se tomó una pequeña muestra del callo y se colocó sobre una lámina portaobjetos. Seguidamente, se agregó una gota del colorante y se disgregaron las células del callo con ayuda de un alfiler. Luego, se cubrió con el cubreobjetos y se observó a través del microscopio óptico Leica (modelo CM E) (Figura 7).

Los callos viables de característica friable e intensidad de proliferación moderada a abundante, fueron subcultivados cada 21 días, por un máximo de 63 días, en medios frescos conservando las concentraciones de fitorreguladores de crecimiento y agua de coco (Tabla 2), e incubados en las mismas condiciones de cultivo (Figura 8). Se realizaron hasta tres subcultivos por tratamiento para obtener mayor biomasa para el ensayo de inducción de callo embriogénico.

3.5 Inducción de callo embriogénico

Los callos friables de mayor intensidad de proliferación y mayor cantidad de subcultivos, obtenidos en el acápite 3.4, fueron transferidos a medios de inducción de callo embriogénico enriquecidos con diferentes concentraciones de Kin, 2,4-D e IBA (Tabla 3, Figura 9) e incubados en las mismas condiciones lumínicas (fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad y oscuridad continua). Estos callos fueron subcultivados en medios frescos cada 21 días, por un lapso de 63 días, y fueron analizados en el estereoscopio binocular, donde se determinó la presencia o ausencia de estructuras embriogénicas.

3.6 Diseño experimental y análisis estadístico

3.6.1 Desinfección y germinación de semillas

Se evaluaron 4 tratamientos de desinfección de semillas de algodón nativo pardo (Tabla 4) utilizando 20 semillas por tratamiento. Cada semilla representó una unidad experimental y se evaluó la presencia o ausencia de contaminación. Asimismo, se determinó el porcentaje de semillas germinadas y el tiempo de germinación. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 21. Se aplicó el Test de Kruskal-Wallis para determinar la existencia de diferencias significativas en el tiempo de germinación entre tratamientos de desinfección ($P < 0.05$).

3.6.2 Iniciación y proliferación de callo

Se realizó un experimento bifactorial, siendo los factores: la condición lumínica con 2 niveles (fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad y oscuridad continua), y el tratamiento con reguladores de crecimiento y agua de coco con 10 niveles, incluyendo el control (Tabla 2); se utilizaron 5 repeticiones por cada nivel. La unidad experimental consistió en un frasco con 8 explantes.

Se determinó el porcentaje de explantes que formaron callo en cada tratamiento, en condiciones de fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad y oscuridad continua. Mediante el paquete estadístico SPSS, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó el Test de Tukey para comparaciones múltiples entre medias de tratamientos ($P < 0.05$). Asimismo, se utilizó el programa Microsoft® Excel® 2013 para elaborar las gráficas correspondientes. Por otro lado, se determinó el porcentaje de explantes, dentro de cada tratamiento, según la intensidad de proliferación de callo.

3.6.3 Inducción de callo embriogénico

Se realizó un experimento bifactorial, siendo los factores: la condición lumínica con 2 niveles (fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad y oscuridad continua), y el tratamiento con reguladores de crecimiento con 6 niveles (Tabla 3), y se emplearon 3 repeticiones por cada nivel. La unidad experimental estuvo representada por un frasco conteniendo 2 g aproximadamente de callo friable. Se determinó la presencia o ausencia de estructuras embriogénicas en cada tratamiento.

4. RESULTADOS

4.1 Desinfección y germinación de semillas

En el ensayo de desinfección y germinación de semillas se obtuvo 100% de ausencia de agentes contaminantes (bacterias y hongos) en los tratamientos de 10, 15 y 20 min de exposición a hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2.5%. Sin embargo, en el tratamiento de 5 minutos de exposición, el 5% de las semillas presentó contaminación con *Aspergillus* sp. Por otro lado, el porcentaje de germinación de las semillas varió entre 80% y 90% (Tabla 6), mientras que el tiempo de germinación (promedio \pm desviación estándar) fue de 2.35 ± 0.70 a 2.94 ± 1.3 días, no encontrándose diferencias significativas entre tratamientos (Test de Kruskal-Wallis, $P=0.335$) (Tabla 7).

Para los sucesivos ensayos, se eligió como mejor tratamiento de desinfección el de 10 min de exposición a NaOCl al 2.5%.

4.2 Iniciación y proliferación de callo

4.2.1 Iniciación de callo

En este ensayo los explantes de hipocotilo, introducidos en medio de iniciación de callo (Figura 10a), mostraron un aumento de volumen y turgencia en la primera semana de cultivo (Figura 10b), previo a la formación de callo, la cual se observó entre 6 y 11 días después de la introducción. Sin embargo, en el tratamiento control (MS sin reguladores de crecimiento y agua de coco) incubado en oscuridad continua, no se evidenció el aumento del volumen de los explantes.

En todos los tratamientos se observó la formación de callo en los explantes de hipocotilo. Sin embargo, el porcentaje de explantes que iniciaron la formación de

callo, la intensidad de proliferación, la textura y el color del callo variaron de acuerdo a los tratamientos y condiciones lumínicas expuestas (Tablas 8 y 9, Figuras 11 y 12).

El porcentaje de explantes que iniciaron la formación de callo (promedio \pm error estándar) varió entre $87.5 \pm 3.95\%$ y 100% entre los diferentes tratamientos cultivados en condiciones de fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad (Tabla 8), mientras que en los tratamientos cultivados en oscuridad continua fue de $85 \pm 4.7\%$ a 100% (Tabla 9).

En los tratamientos control de ambas condiciones lumínicas se obtuvo el menor porcentaje de formación de callo, de $87.5 \pm 3.95\%$ en fotoperiodo 16h luz/ 8h oscuridad, siendo significativamente diferente a la mayoría de tratamientos (ANOVA, $P=0.001$), y $85 \pm 4.7\%$ en oscuridad continua.

Estos resultados muestran que el cultivo en condiciones de fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad aumenta el porcentaje de explantes que forman callo en cada tratamiento, aunque las diferencias con el cultivo en oscuridad continua no sean estadísticamente significativas (Figura 13).

4.2.2 Intensidad de proliferación de callo

En el ensayo de iniciación de callo se observó que, a los 21 días de cultivo, la intensidad de proliferación de callo fue distinta entre tratamientos y condiciones lumínicas (Tablas 10 y 11). Entre los tratamientos cultivados en condiciones de fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, el tratamiento 3 (MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 100 ml/l agua de coco) evidenció que, de los 40 explantes introducidos, 33 formaron callo de intensidad abundante (Figura 14a), lo que representa el 82.5% de explantes, seguido por el tratamiento 2 (MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin), con 60% de explantes (Tabla 10). Por otro lado, los tratamientos con menor intensidad de proliferación de callo fueron: el tratamiento 4 (MS + 0.5 mg/l 2,4-D) y tratamiento 7 (MS + 1 mg/l 2,4-D), con 100% y 92.5% de explantes con formación de callo escaso, respectivamente. Los tratamientos con mayor

porcentaje de explantes con intensidad moderada de proliferación de callo fueron: tratamiento 1 (MS + 0.1 mg/l 2,4-D), con 90% de los explantes; tratamiento 6 (MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 100 ml/l agua de coco), con 82.5%; tratamiento control (MS), con 77.5%; tratamiento 8 (MS + 1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin), con 67.5%; tratamiento 9 (MS + 1 mg/l 2,4-D + 100 ml/l agua de coco), con 67.5%; y tratamiento 5 (MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin), con 60%.

En los tratamientos que se cultivaron en oscuridad continua, el tratamiento 3 (MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 100 ml/l agua de coco) mostró un 55% de explantes con formación de callo abundante (Figura 14b), seguido del tratamiento 2 (MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin), con 42.5% de explantes (Tabla 11). En todos los tratamientos se observó que los explantes formaron callo de intensidad moderada en distintos porcentajes. Por otro lado, el mayor porcentaje de explantes que formaron callo escaso se dio en el tratamiento 7 (MS + 1 mg/l 2,4-D), con 82.5%, seguido del tratamiento 8 (MS + 1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin), con 75%. Asimismo, se observaron algunos explantes que no presentaron formación de callo en seis tratamientos, tal como se muestra en la tabla 11.

Los resultados indican que, en condiciones de fotoperiodo de 16h luz/ 8h oscuridad y oscuridad continua, la presencia de 2,4-D a una concentración de 0.1 mg/l promueve la iniciación y proliferación de callo. Sin embargo, la combinación de este fitorregulador del crecimiento con 0.5 mg/l de Kin o 100 ml/l de agua de coco aumenta la intensidad de proliferación, obteniéndose mayor cantidad de explantes con formación de callo abundante en combinación con el agua de coco.

4.2.3 Características y viabilidad del callo

Los medios de cultivo MS enriquecidos con 0.1 mg/l de 2,4-D (tratamientos 1,2 y 3), incubados en condiciones de fotoperiodo 16h luz/ 8h oscuridad, originaron la formación de callo de textura friable cuyo color varió entre amarillo-verdoso, verde, verde-grisáceo y cristalino (Tabla 8, Figura 14a), mientras que en condiciones de oscuridad continua, el color de los callos friables varió entre beige y cristalino (Tabla 9, Figura 14b).

Al aumentar las concentraciones de 2,4-D, de 0.1 mg/l a 0.5 mg/l y 1 mg/l, en combinación o en ausencia de Kin y agua de coco (tratamientos 4 - 9), y en ambas condiciones lumínicas, se observó el cambio de color de los explantes, de verde claro a marrón, que se asume que fue causado por la oxidación de compuestos fenólicos, lo cual no influyó en la iniciación del callo (Figuras 11 y 12).

Los callos friables observados bajo el microscopio, presentaron células de forma alargada, ovalada o esférica, predominando esta última, y plastidios en el citoplasma que fueron coloreados con solución de Lugol por la presencia de gránulos de almidón (Figuras 15 - 18). Los plastidios de las células de callos friables incubados en fotoperiodo (Figura 15) tenían menor tamaño que los plastidios de los callos de apariencia compacta (Figura 16) y que los de las células de callos incubados en oscuridad continua (Figuras 17 y 18).

La viabilidad de los callos obtenidos se evaluó utilizando la tinción con Azul de Evans al 0.5%. Los callos de característica friable y color amarillo, amarillo-verdoso, verde, verde-grisáceo, beige o cristalino, presentaron mayormente células que no mostraron coloración, lo que indica que los callos son viables y tienen potencial para formar embriones somáticos en condiciones favorables (Figura 19). Por otro lado, los callos compactos y marrones presentaron, en su mayoría, células cuyo citoplasma se coloreó con Azul de Evans, lo que indica que no son viables (Figura 19).

4.2.4 Subcultivo y proliferación del callo

Los callos friables fueron subcultivados cada 21 días, respetando los tratamientos y las condiciones lumínicas. Luego de 63 días, se observó que los callos del tratamiento 3 (MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 100 ml/l agua de coco), en ambas condiciones lumínicas, fueron los únicos que sobrevivieron tres subcultivos (Figura 20). Los callos proliferados en este tratamiento conservaron su intensidad de proliferación y apariencia friable hasta el segundo subcultivo (Figuras 21, 22, 23ab y 24ab). Sin embargo, en el tercer subcultivo, los callos incubados en condiciones de fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad presentaron porciones de color

verde intenso y apariencia un poco compacta (Figura 23c), mientras que los callos que fueron cultivados en oscuridad continua mostraron porciones cristalinas, zonas necrosadas de color marrón y de apariencia compacta (Figura 24c).

Los callos obtenidos en los tratamientos control, 1, 5, 6, 8 y 9 cultivados en fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad, y los tratamientos 1, 2, 5, 6 y 9 cultivados en oscuridad continua, fueron subcultivados una sola vez debido a que no presentaron capacidad de proliferación y mostraron necrosamiento (Figura 25). En los callos subcultivados no se observó la formación de estructuras embriogénicas en ningún tratamiento.

4.3 Inducción de callo embriogénico

Los callos friables proliferados en el segundo subcultivo en medio MS enriquecido con 0.1 mg/l 2,4-D y 100 ml/l agua de coco, fueron transferidos en medios de inducción de callo embriogénico (Tabla 3) e incubados respetando las condiciones lumínicas. Estos callos fueron subcultivados cada 21 días en medio fresco.

En el transcurso de los subcultivos, los callos que fueron cultivados en medio MS suplementado con distintas concentraciones de Kin, 2,4-D e IBA, e incubados en fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad, continuaron proliferando con menor intensidad y presentaron variación en cuanto al color, de amarillo-verde a verde brillante con algunas porciones de la superficie de color cristalino (Figura 26) y rojo-guinda (Figura 27). Con el paso del tiempo, estos callos fueron tomando apariencia compacta y presentaron necrosamiento evidenciado por el color marrón (Figura 28).

Por otra parte, en los sucesivos subcultivos, los callos incubados en condiciones de oscuridad continua presentaron disminución en la intensidad de proliferación. En cuanto al color, se observó que los callos tomaron, progresivamente, un color marrón y su textura cambió de friable a compacta (Figura 29).

En esta etapa del experimento, los callos presentaron inicio de organogénesis. En el tratamiento 1 (MS sin reguladores de crecimiento) y tratamiento 6 (MS + 0.05 mg/l Kin + 0.3 mg/l IBA), incubados en condiciones de fotoperiodo, se observó el inicio de la formación de raíz en el segundo y primer subcultivo, respectivamente (Figura 30). Sin embargo, no se logró la formación completa del órgano.

5. DISCUSIÓN

5.1 Desinfección de semillas

En esta investigación se obtuvo 100% de semillas de *Gossypium barbadense* L. “algodón nativo” color pardo desinfectadas usando hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2.5% por un tiempo de exposición de 10 min, el cual fue menor al utilizado por otros autores. Asimismo, no fue necesario deslinter las semillas (retirar las fibras) químicamente previo a la desinfección. Zouzou *et al.* (2008) emplearon ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 98% para deslinter semillas de *G. hirsutum* y luego NaOCl al 2.5% durante 20 min para desinfectarlas, mas no reportaron presencia o ausencia de contaminación. Por otro lado, Surgun *et al.* (2014) desinfectaron semillas de *G. hirsutum*, previamente deslinteradas con H₂SO₄, utilizando solución comercial de NaOCl (4.5%) diluida al 50% por 30 min.

La capacidad antimicrobiana de la solución de NaOCl se debe a que inhibe, de manera irreversible, la actividad enzimática esencial para el metabolismo celular, la integridad de la membrana citoplasmática de los microorganismos (Fukuzaki, 2006; Estrela *et al.*, 2002).

Alternativamente al uso de NaOCl, otros autores han empleado cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0.1% durante 5 a 15 min para desinfectar semillas de algodón (Khan *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2009; Rajeswari *et al.*, 2010). En esta investigación no se utilizó este agente químico debido a su alta toxicidad.

5.2 Iniciación y proliferación del callo

Los resultados del ensayo de iniciación de callo indican que la auxina 2,4-D, a una concentración de 0.1 mg/l, induce la formación de callo friable, y la combinación de 0.5 mg/l de Kin incrementa la intensidad de proliferación. Esto es corroborado con los resultados de Rao *et al.* (2006), Zouzou *et al.* (2008) y Rajeswari *et al.*

(2010) quienes obtuvieron callos friables y vigorosos en distintos cultivares de algodón, utilizando medio MS suplementado con 0.1 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de Kin.

Sin embargo, al aumentar la concentración de 2,4-D a 0.5 y 1 mg/l en el medio de cultivo, se observó que los callos se tornaron de color marrón (Tablas 8 y 9), lo cual concuerda con lo reportado por González-Benito *et al.* (1997), quienes también obtuvieron callos oscuros con porciones necróticas al aumentar la concentración de esta auxina. Los callos de color marrón obtenidos en esta investigación presentaron apariencia compacta y, la tinción con Azul de Evans 0.5% evidenció que la mayoría de células del tejido del callo eran no viables al ser observadas en el microscopio óptico.

Por otro lado, los resultados muestran que la adición de 100 ml/l de agua de coco al medio MS suplementado con 0.1 mg/l de 2,4-D, incrementa aun más la intensidad de proliferación de los callos friables, en comparación con la adición de 0.5 mg/l de Kin. Sin embargo, al momento no existen estudios similares sobre el efecto de la adición de agua de coco al medio de cultivo en la iniciación y proliferación de callo utilizando, como explantes, hipocotilos de *Gossypium barbadense*, mas sí se han reportado estudios en otros explantes y/o especies.

Efe (2005) reportó el uso de agua de coco en el medio de inducción de callo a partir de óvulos en *G. hirsutum* y *G. barbadense*. Por otro lado, Islam y Bari (2012) estudiaron el efecto del 2,4-D y agua de coco en la inducción de callo en *Jatropha curcas*, y observaron que el medio MS suplementado con 0.5 mg/l de 2,4-D y 20 ml/l de agua de coco permite obtener callos friables de color verde claro a partir de hipocotilos en 7 días de cultivo.

Michael (2012) mencionó que el mayor porcentaje de iniciación y proliferación de callo en *Ipomoea batatas* L. fue observado cuando se adicionó 100 ml/l de agua de coco al medio de cultivo. El autor considera que el agua de coco presenta factores de crecimiento que promueven la proliferación del callo. Asimismo, Nazneen *et al.* (2014) observaron que el agua de coco incrementa la respuesta del callo en explantes nodales de *Tinospora cordifolia* cultivados en medio MS

enriquecido con 50 o 100 ml/l de este suplemento orgánico y diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas.

La intensidad de proliferación de los callos fue constante en la mayoría de los tratamientos, aunque varió en porcentajes ante la exposición a determinada condición lumínica. Se logró mayores porcentajes de callo de proliferación abundante en los explantes incubados en condiciones de fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad en comparación con los cultivados en oscuridad continua. Hirimburegama y Gamage (1994) observaron que la iniciación y proliferación de callo en semillas maduras y hojas primarias jóvenes de plántulas de *G. hirsutum* fueron mayores al ser cultivados en presencia de luz (24 h) que en oscuridad (24 h).

La variación en las características de color y textura en los callos puede deberse a diferencias epigenéticas. Esta variabilidad es más probable cuando el callo proviene de un explante compuesto por más de un tipo de células (George *et al.*, 2008). No obstante, en esta investigación, el color verde de los callos incubados en condiciones de fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad se debe a que están compuestos, en su mayoría, por células que contienen cloroplastos, cuya formación puede estar vinculada con la capacidad del callo para llevar a cabo la morfogénesis, tal como menciona George *et al.* (2008).

Por otro lado, Thorpe *et al.* (1986) sugieren que los gránulos de almidón, presentes en los plastidios de las células del callo, son producidos a partir de la sacarosa incluida en el medio de cultivo, y la acumulación de éstos podría ser un pre-requisito de la morfogénesis.

5.3 Inducción de callo embriogénico

En esta investigación, las combinaciones y concentraciones de fitorreguladores de crecimiento evaluados no estimularon la formación de embriones somáticos a partir de callos friables. Sin embargo, el medio MS sin reguladores de crecimiento, así como enriquecido con 0.05 mg/l de Kin y 0.3 mg/l de IBA,

permitió la organogénesis, obteniéndose el inicio de formación de raíz. A pesar de que se realizaron subcultivos en medio fresco cada 21 días, no se obtuvo el desarrollo completo de las raíces en ninguno de los medios mencionados.

Estos resultados difieren con los de Han *et al.* (2009), quienes reportaron la formación de callo embriogénico en *Gossypium hirsutum* utilizando el medio MSB enriquecido con 0.05 mg/l de Kin y 0.3 mg/l de IBA. Asimismo, Sun *et al.* (2003) obtuvieron el desarrollo y proliferación de embriones de *G. klotzschianum* a partir de callos en medio MSB suplementado con 0.045 μ M 2,4-D, 0.93 μ M Kin y 2.46 μ M IBA.

La diferencia en la capacidad morfogénica puede reflejar el potencial epigenético de las células; ser causada por la variabilidad genética entre ellas; y/o deberse a que no se dieron las condiciones apropiadas de cultivo para favorecer la embriogénesis somática a partir de callos. La capacidad morfogénica generalmente disminuye con el tiempo a medida que los callos son subcultivados, aunque algunos pueden mantener su habilidad regenerativa por largos periodos (George *et al.*, 2008).

6. CONCLUSIONES

La formación de callo a partir de explantes de hipocotilo de *Gossypium barbadense* L. “algodón nativo” fue de 85 a 100% en medio de cultivo MS enriquecido con ácido 2,4-diclorofenoxiacético en combinación o en ausencia de kinetina y agua de coco, incubados en fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad y oscuridad continua.

La mayor proliferación de callo friable se obtuvo en 82.5% de explantes de hipocotilo de *Gossypium barbadense* L. “algodón nativo” cultivados en medio MS enriquecido con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (0.1 mg/l) y agua de coco (100 ml/l) e incubados en condiciones de fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad.

La iniciación de organogénesis radical en callos cultivados de *Gossypium barbadense* L. “algodón nativo” fue obtenida en medio MS sin reguladores de crecimiento y suplementado con kinetina (0.05 mg/l) y ácido indol-3-butírico (0.3 mg/l).

La inducción de callo embriogénico a partir de callo friable de *Gossypium barbadense* L. “algodón nativo” no se produjo en los medios MS evaluados, los cuales fueron enriquecidos con distintas concentraciones de kinetina, ácido 2,4-diclorofenoxiacético y ácido indol-3-butírico.

La desinfección de semillas de *Gossypium barbadense* L. “algodón nativo” color pardo fue de 100% utilizando hipoclorito de sodio al 2.5% a un tiempo de exposición de 10 min.

7. RECOMENDACIONES

Evaluar la utilización de otros explantes de *Gossypium barbadense* L. “algodón nativo” en la iniciación e inducción de callo embriogénico.

Evaluar otras combinaciones y concentraciones de fitorreguladores de crecimiento en la inducción de callo embriogénico en *Gossypium barbadense* L. “algodón nativo”.

Evaluar la adición de agua de coco y otros suplementos orgánicos en la inducción de callo embriogénico en *Gossypium barbadense* L. “algodón nativo”.

8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Abdellatef E, Khalafallah M. Influence of growth regulators on callus induction from hypocotyls of medium staple cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Cultivar barac B-67. J. Soil Nature. 2008;2(1):17–22.

Al-Khayri J. Somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) improved by coconut water. Biotechnology. 2010;9(4):477–484.

Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regul. 2011;63:147–173.

Basurto A. Magnitud e impacto potencial de la liberación de los organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales. Caso: Algodón. En: Hidalgo O, Roca W y Fernández-Northcote EN, editores. Magnitud e impacto potencial de la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales: Casos Algodón, Leguminosas de grano, Maíz y Papa. Lima: Consejo Nacional del Ambiente; 2005. pp. 1–17.

Bedoya C, Ríos A. Inducción de la embriogénesis somática en *Crinum x powellii* “album” (Amaryllidaceae) [Tesis de pregrado]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2010.

Cáritas del Perú. Revalorando un cultivo ancestral. Algodón nativo fibra de calidad para la industria. Lima: Cáritas del Perú; 2011.

Efe L. Callus formation and plant regeneration from two cotton species (*Gossypium hirsutum* L., and *G. barbadense* L.). Pak J Bot. 2005;37(2):227–236.

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J. 2002;13(2):113–117.

Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. Biocontrol science. 2006;11(4):147–157.

George EF, Hall MA, De Klerk G-J, eds. Plant propagation by tissue culture. 3rd ed. Vol. 1. Dordrecht: Springer; 2008.

Ghaemi M, Majd A, Fallahian F, Bezdi G. Comparison of callus induction and somatic embryogenesis of some Iranian cottons (*Gossypium* Spp.) with Coker 312 and histology of somatic embryogenesis. African Journal of Biotechnology. 2013;10(15):2915–2922.

Gómez C, Uribe M, Ríos D, Sánchez-Olate M. Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill. Interciencia. 2006;31(10):734–738.

González-Benito M, Carvalho J, Pérez C. Somatic embryogenesis of an early cotton cultivar. Pesq agropec bras. 1997;32(5):485–488.

Han G, Wang X, Zhang G, Ma Z. Somatic embryogenesis and plant regeneration of recalcitrant cottons (*Gossypium hirsutum*). Afr J Biotechnol. 2009;8(3):432–437.

Hirimburegama K, Gamage N. *In vitro* callus and cell cultures of *Gossypium hirsutum* L. (cotton). J Natn Sci Coun Sri Lanka. 1994;22(4):305–312.

INIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria). Segundo informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Lima: INIA; 2009.

Islam M, Bari M. Immature embryo is the potential source for *in vitro* plant regeneration in *Jatropha curcas*. J bio-sci. 2012;20:125–134.

Kamle M, Bajpai A, Chandra R, Kalim S, Kumar R. Somatic embryogenesis for crop improvement. GEF Bull Biosci. 2011;2(1):54–59.

Khaleda L, Al-Forkan M. Stimulatory effects of casein hydrolysate and proline in *in vitro* callus induction and plant regeneration from five deepwater rice (*Oryza sativa* L.). Biotechnology. 2006;5(3):379–384.

Khan T, Singh AK, Pant R. Regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis in different cultivars of cotton (*Gossypium* spp.). In Vitro Cell Dev Biol-Plant. 2006;42:498–501.

Khierallah H, Husien N. The role of coconut water and casein hydrolysate in somatic embryogenesis of date palm and genetic stability detection using RAPD markers. *Res Biotechnol.* 2013;4(3):20–28.

Kumar M, Singh H, Shukla AK, Verma PC, Singh PK. Induction and establishment of somatic embryogenesis in elite Indian cotton cultivar (*Gossypium hirsutum* L. cv Khandwa-2). *Plant Signal Behav.* 2013;8(10):e26762.

Landaverde VL, López AS, Vásquez T del C. Estudio de inducción a callo embriogénico en variedades comerciales de café (*Coffea arabica*) de El Salvador [Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo]. San Salvador: Universidad de El Salvador; 2002.

Ley N° 29224 que declara Patrimonio Genético Étnico-Cultural de la Nación al Algodonero Nativo Peruano. (*El Peruano*, 06 de Mayo, 2008).

Linnaeus C. *Species Plantarum*. Impensis Laurentii Salvii: 1753;2:693.

Litz RE, Jarret RL. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca WM, Mroginski LA, eds. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Cali: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical); 1991. pp. 143–171.

Lo Schiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet.* 1989;77(3):325–331.

Michael PS. Effects of coconut water on callus initiation and plant regeneration potentials of sweetpotato. J. Proc R Soc New South Wales. 2012; 144(3&4):91–101.

MINAM (Ministerio del Ambiente). Distribución y concentración de las razas locales de algodón nativo en la Costa Norte del Perú. Consultoría - Informe del producto final. Lima: MINAM; 2013.

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

Nazneen F, Naik A, Shankar C, Madhusudhan A. Comparative studies of effect of some plant growth regulators and coconut water on callus induction in *Tinospora cordifolia* (willd)–a medicinal plant. *Int J Recent Sci Res*. 2014;5(11):2072–2077.

Plažek A, Dubert F. Improvement of medium for *Miscanthus x giganteus* callus induction and plant regeneration. *Acta Biol Cracov Ser Bot*. 2010;52(1):105–110.

Price HJ, Smith RH. Somatic embryogenesis in suspension cultures of *Gossypium klotzschianum* Anderss. *Planta*. 1979;145:305–307.

Radice S. Morfogénesis. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L, eds. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Buenos Aires: INTA; 2010. pp. 26–33.

Rajeswari S, Muthuramu S, Chandirakala R, Thiruvengadam V, Raveendran T. Callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Electronic Journal of Plant Breeding*. 2010;1(4):1186–1190.

Rao AQ, Hussain SS, Shahzad MS, Bokhari SYA, Raza MH, Rakha A, *et al.* Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium* spp.). *J Zhejiang Univ-SCI B*. 2006;7(4):291–298.

Rattana K, Theerakulpisut P, Bunnag S. The effect of plant growth regulators and organic supplements on callus induction and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *Asian J Plant Sci*. 2012;11(4):182–189.

Resolucion Ministerial N° 0251-94-AG. (26 de mayo, 1994)

Roskov Y, Abucay L, Orrell T, Nicolson D, Flann C, Bailly N, Kirk P, Bourgoin T, DeWalt RE, Decock W, De Wever A, eds. *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2016 Annual Checklist*. Available from: www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2016 [Accessed 9th October 2016].

Sakhanokho HF, Zipf A, Rajasekaran K, Saha S, Sharma GC. Induction of highly embryogenic calli and plant regeneration in Upland (*Gossypium hirsutum* L.) and Pima (*Gossypium barbadense* L.) cottons. *Crop Sci*. 2001;41:1235–1240.

Sanghera GS, Gill MS, Sandhu JS, Gosal SS. Effects of genotype, plant growth regulators and explant source on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Asian Australas J Plant Sci Biotechnol. 2009;3:37–42.

Silva LC, Paiva R, Silva DPC, Barbosa S, Herrera RC, Davide LC, Paiva PDO. Characterization of Pro-embryogenic calli and somatic embryogenesis of *Byrsonima intermedia* A. Juss. J Agric Sci Technol. 2012;2:962–970.

Smith CW. Crop production: evolution, history, and technology. New York: John Wiley & Sons; 1995.

Stewart JM, Oosterhuis DM, Heitholt JJ, Mauney JR, editores. Physiology of cotton. New York: Springer; 2009.

Sun Y, Zhang X, Jin S, Liang S, Nie Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton (*Gossypium klotzschianum*). Plant cell tiss org. 2003;75:247–253.

Surgun Y, Yilmaz E, Çöl B, Bürün B. Callus induction, *In vitro* shoot development and somaclonal variations in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). J Appl Biol Sci. 2014;8(2):62–68.

Tabares E, Pachón J, Roca W. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. En: Roca WM, Mroginski LA, eds. Cultivo de tejidos

en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical); 1991. pp. 339–359.

Tafvizi F, Sheidai M, Farahanei F, Nourmohammadi Z, Alishah O. Somaclonal variation in three tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. *Gene Conserve*. 2010;(37):136–151.

Tavakkol R, Angoshtari R, Kalantari S. Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. *Plant Omics Journal*. 2011;4(2):60–67.

Thorpe TA, Joy RW, Leung DW. Starch turnover in shoot-forming tobacco callus. *Physiol Plant*. 1986;66:58–62.

Vreeland JM. Recuperando el algodón nativo: una tecnología nativa para la agricultura del desierto peruano. Lima; 1985;307–334.

Wendel JF. New World tetraploid cottons contain Old World cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(11):4132–4136.

Westengen OT, Huaman Z, Heun M. Genetic diversity and geographic pattern in early South American cotton domestication. *Theor Appl Genet*. 2005;110(2):392–402.

Wu JY, She JM, Cai XN, Bajaj YPS. Establishment of callus culture, somatic embryogenesis, and the regeneration of cotton plants. In: Bajaj YPS. (ed.) Cotton. Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 42. Berlin: Springer; 1998. p. 37-47.

Zhang B-H, Feng R, Liu F, Wang Q. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. Bot Bull Acad Sin. 2001;42:9–16.

Zouzou M, Kouakou TH, Koné M, Georges AN, Justin KY. Effect of genotype, explants, growth regulators and sugars on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Aust J Crop Sci. 2008;2(1):1–9.

9. ANEXOS

9.1 Figuras

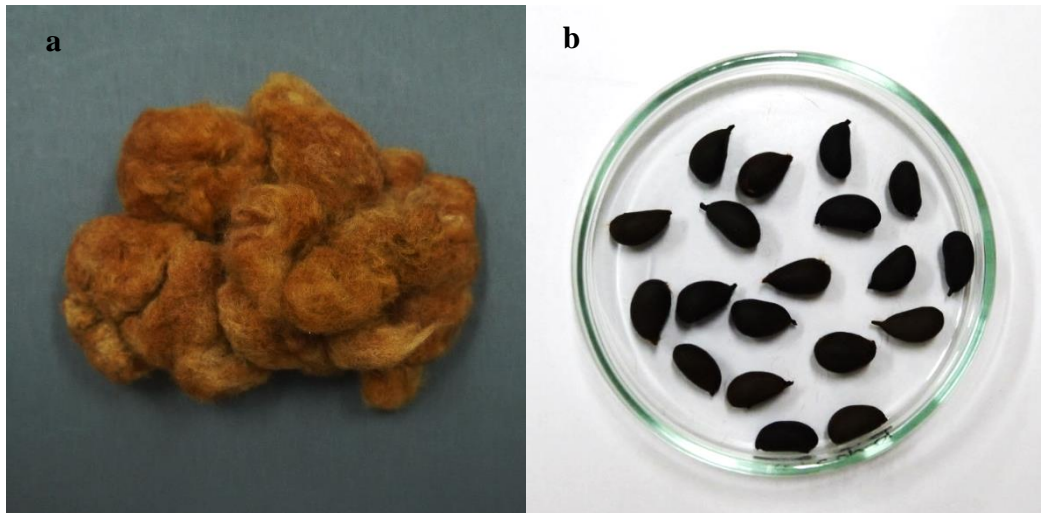


Figura 1. Semillas de algodón nativo. a) Con fibras. b) Desmotadas.



Figura 2. Semillas conservadas en bolsas de polietileno con cierre hermético.



Figura 3. Desinfección de semillas en solución de hipoclorito de sodio 2.5%.



Figura 4. Plántulas de algodón nativo germinadas *in vitro*.

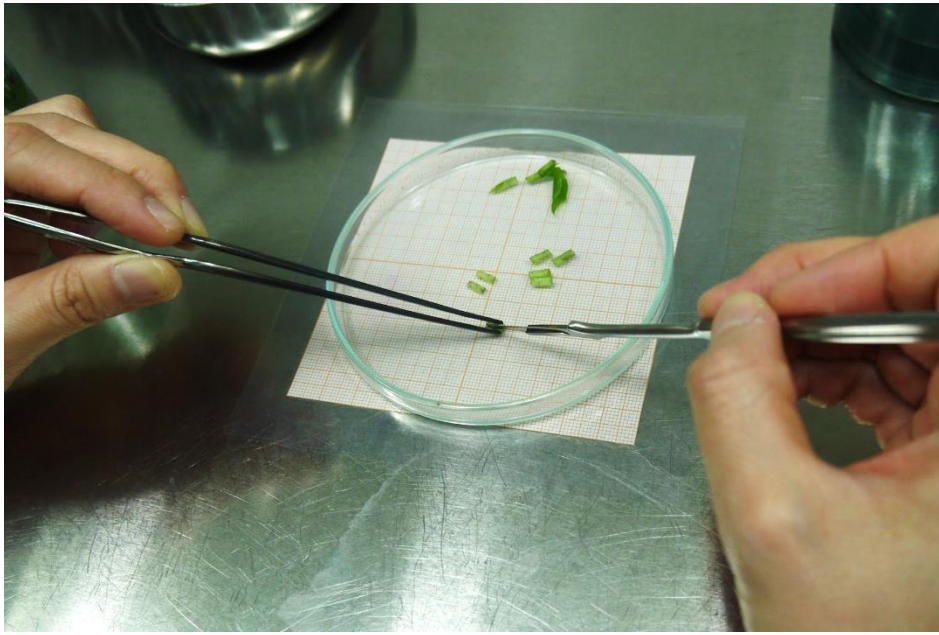


Figura 5. Corte de explantes de hipocotilo en condiciones asépticas.



Figura 6. Introducción de explantes de hipocotilo en medio de cultivo para iniciación de callo.

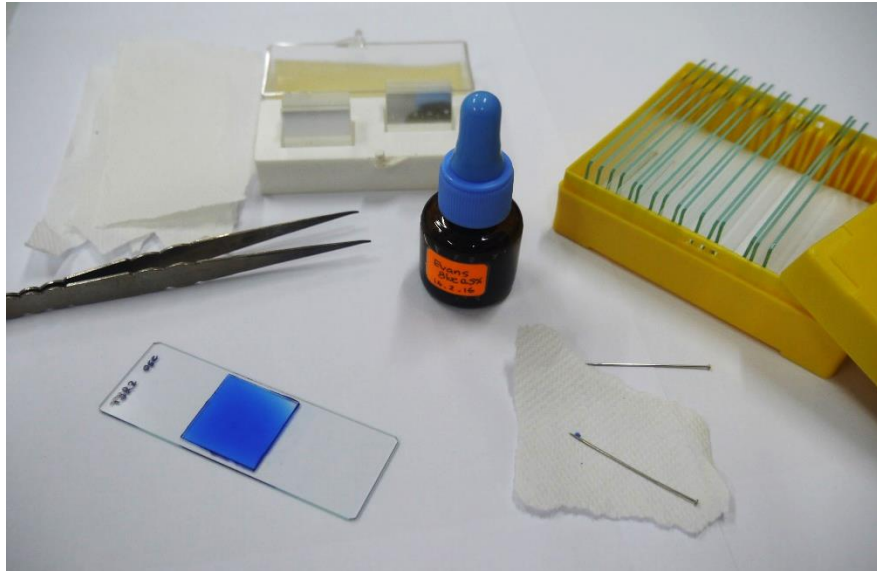


Figura 7. Lámina portaobjetos preparada con muestra de callo coloreada con Azul de Evans al 0.5%.

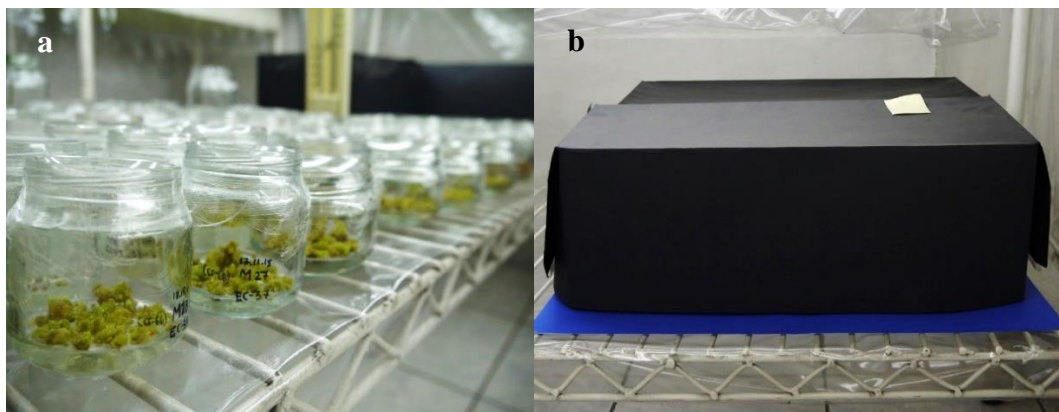


Figura 8. Incubación de callos en condiciones de: a) fotoperiodo y b) oscuridad continua.

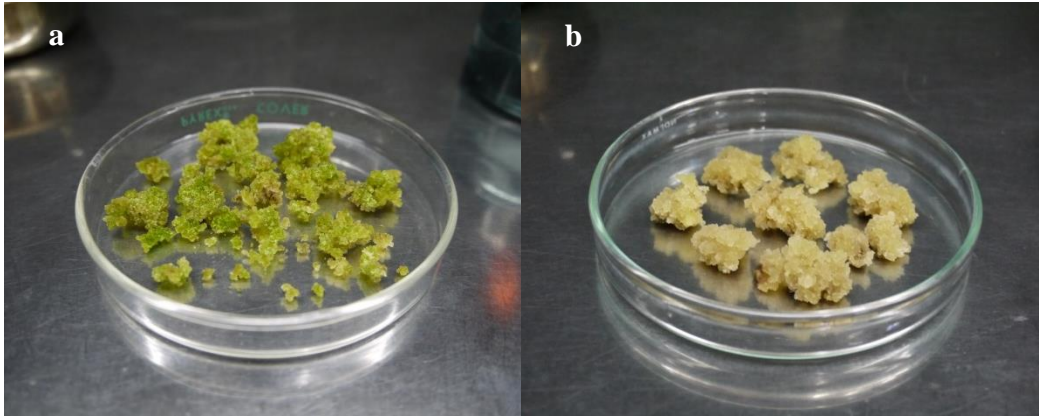


Figura 9. Transferencia en cámara de flujo laminar de callos friables incubados en: a) fotoperiodo y b) oscuridad continua.

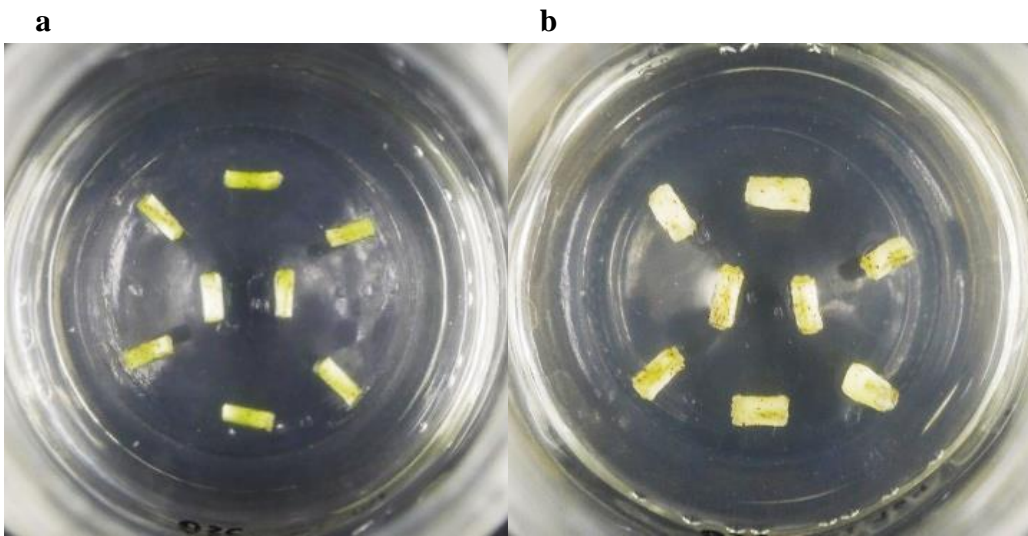


Figura 10. Explantes de hipocotilo: a) Al primer día de cultivo. b) Al sexto día de cultivo.

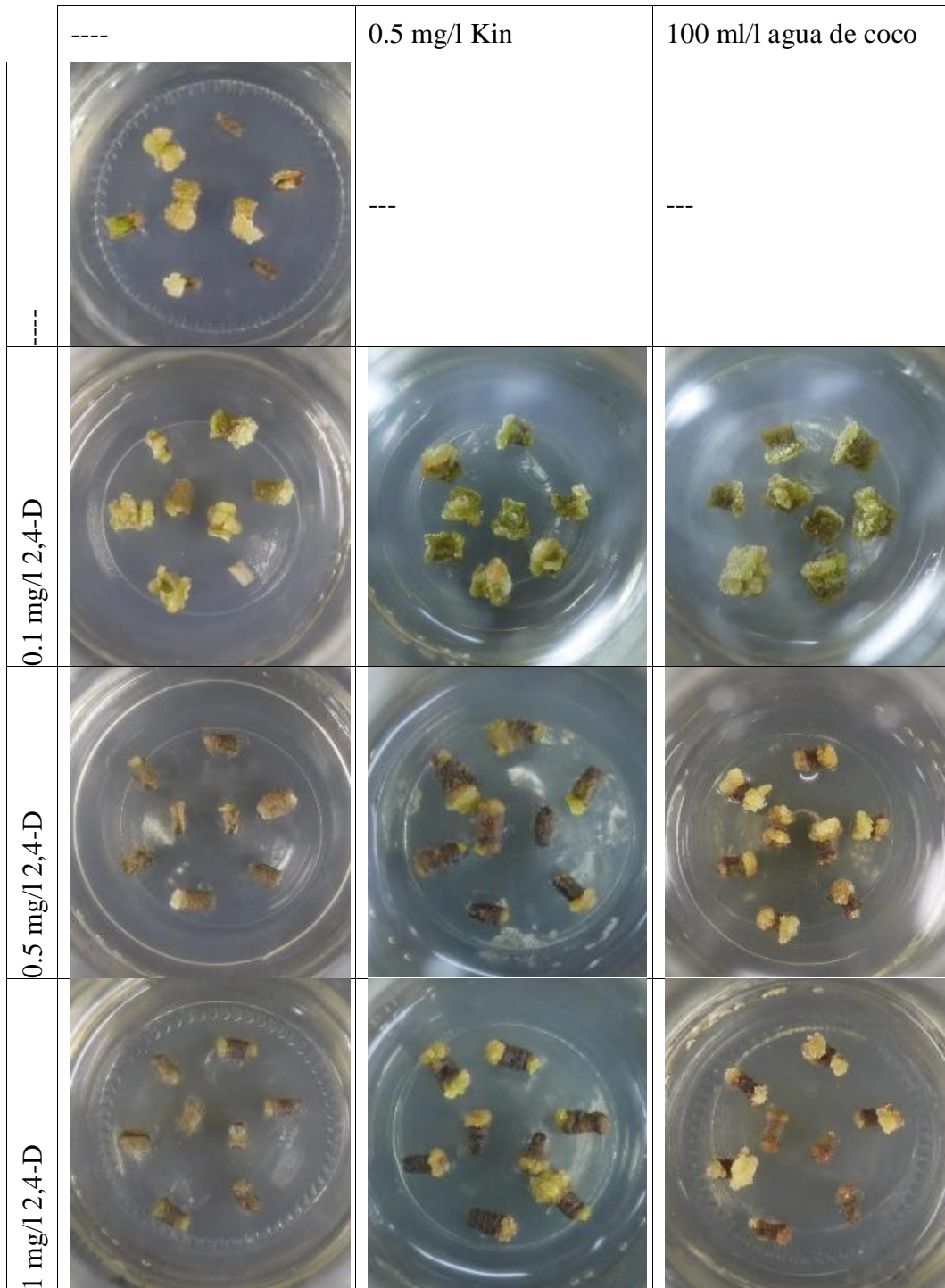


Figura 11. Formación de callo en explantes de hipocotilo cultivados en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D, Kin y agua de coco, incubados en fotoperiodo.

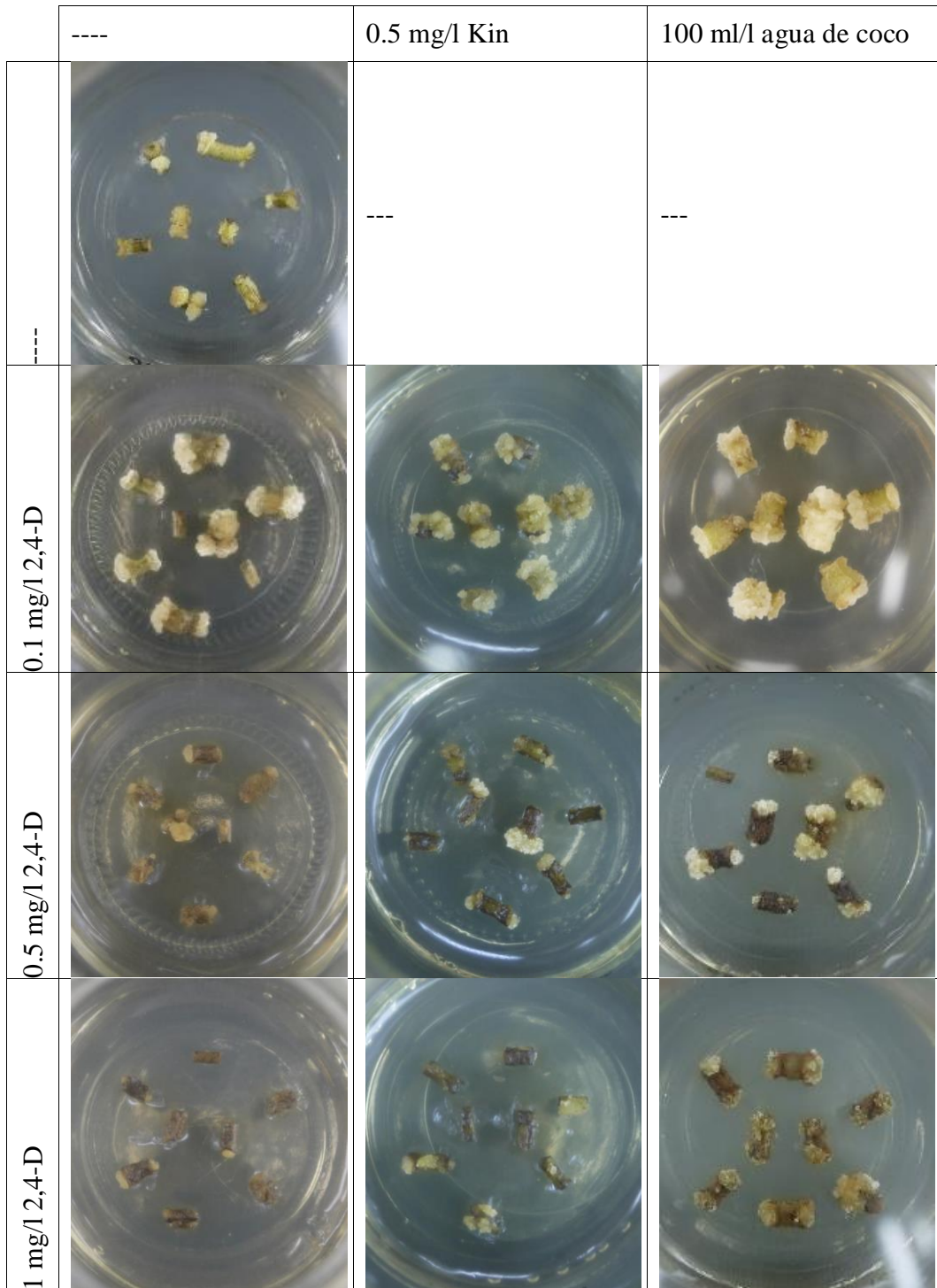


Figura 12. Formación de callo en explantes de hipocotilo cultivados en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D, Kin y agua de coco, incubados en oscuridad continua.

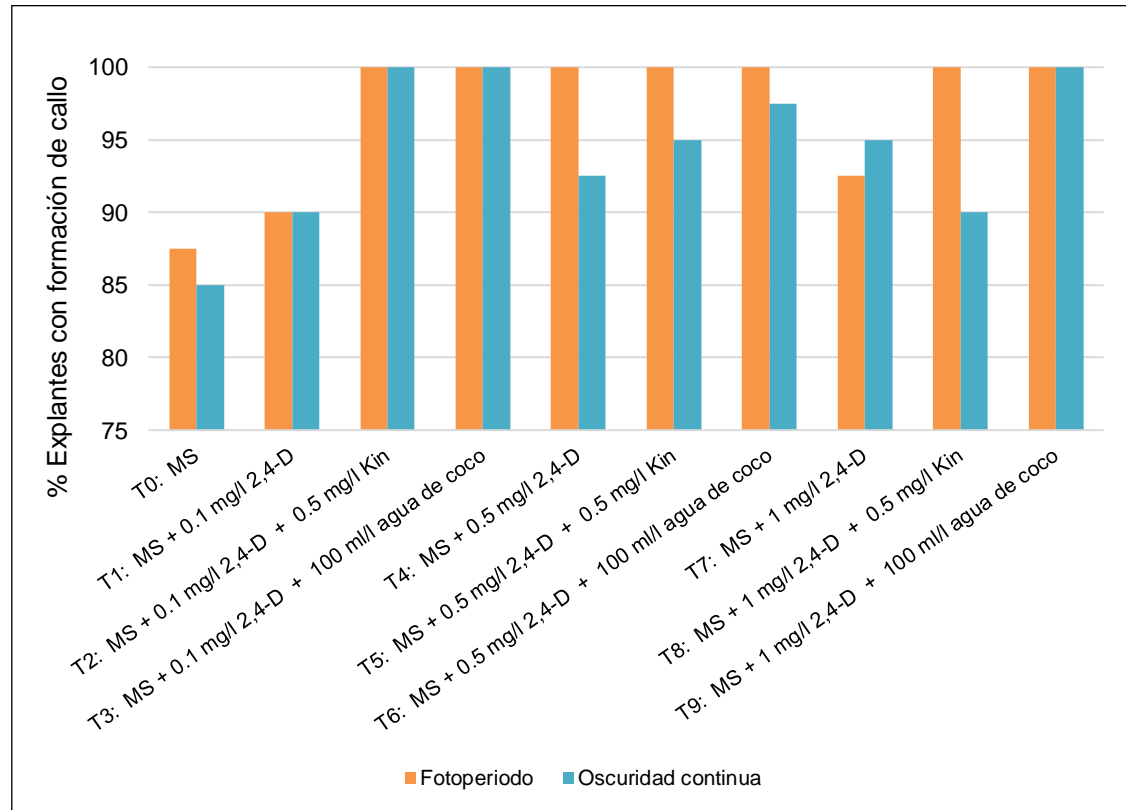


Figura 13. Porcentaje de explantes de hipocotilo que formaron callo en condiciones de fotoperiodo y oscuridad continua.

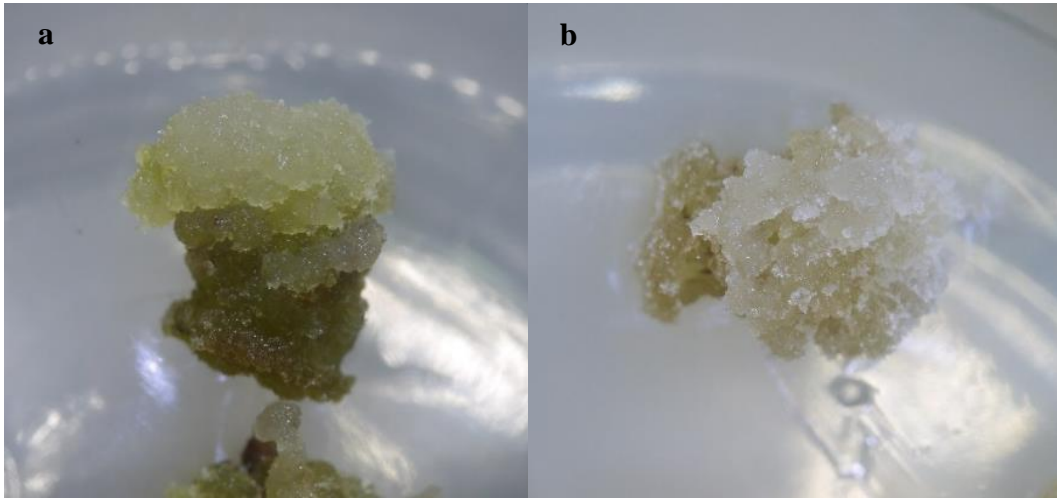


Figura 14. Proliferación abundante de callo friable (T3). a) Callos incubados en fotoperiodo. b) Callos incubados en oscuridad continua.

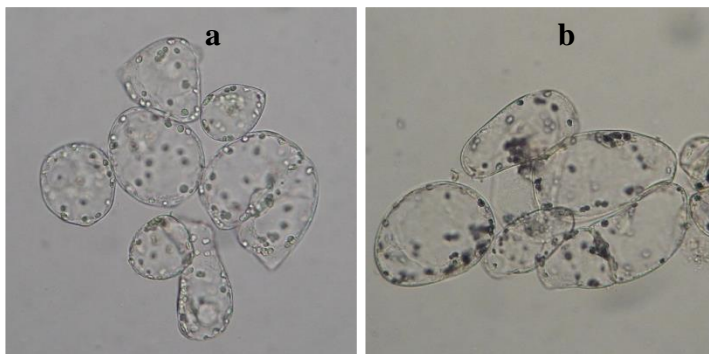


Figura 15. Células de callo friable (400X) incubado en fotoperiodo. a) Sin colorante. b) Con solución de Lugol.

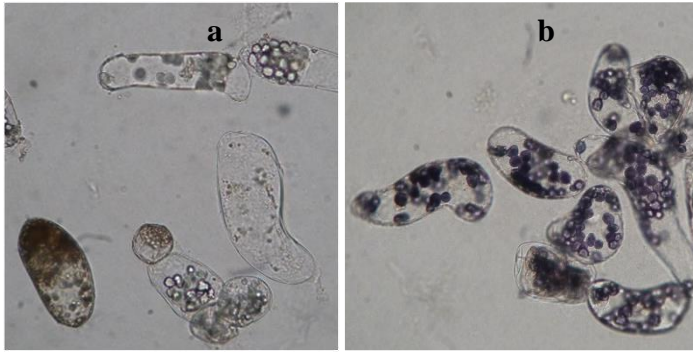


Figura 16. Células de callo compacto (400X) incubado en fotoperiodo. a) Sin colorante. b) Con solución de Lugol.

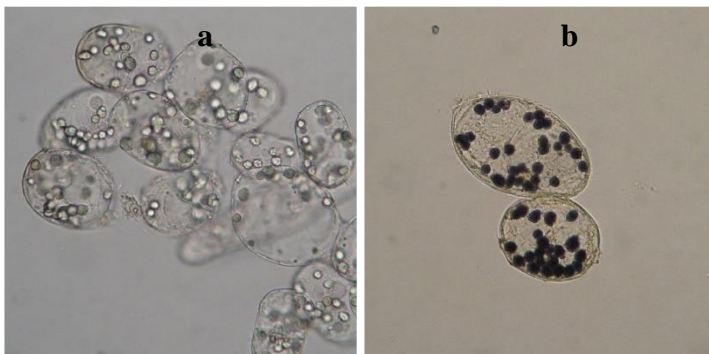


Figura 17. Células de callo friable (400X) incubado en oscuridad. a) Sin colorante. b) Con solución de Lugol.

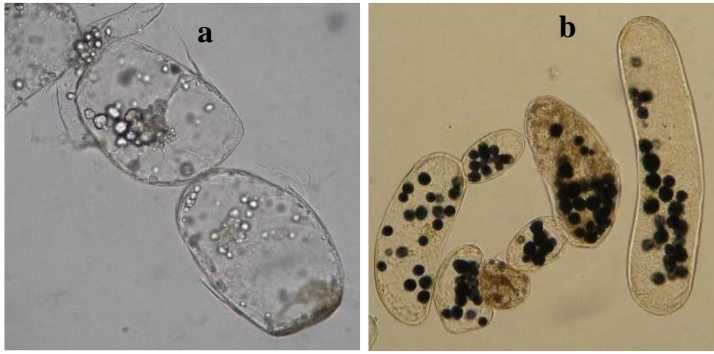


Figura 18. Células de callo compacto (400X) incubado en oscuridad. a) Sin colorante. b) Con solución de Lugol.

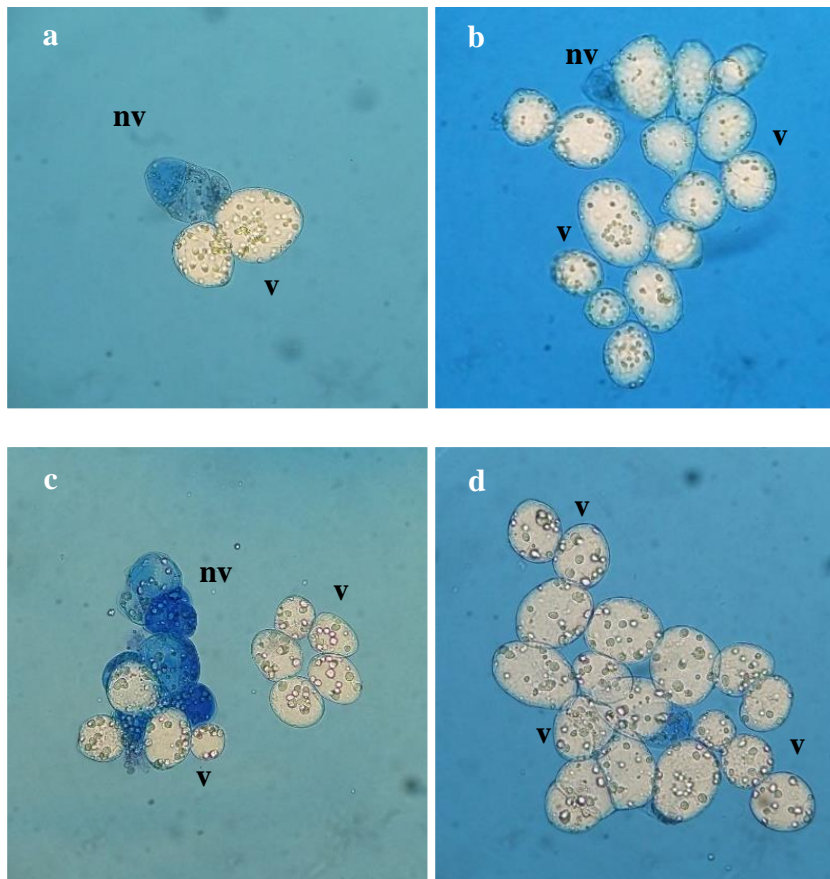


Figura 19. Evaluación de la viabilidad del callo (400X). a y b) Callos incubados en fotoperiodo. c y d) Callos incubados en oscuridad continua. v: células viables; nv: células no viables.

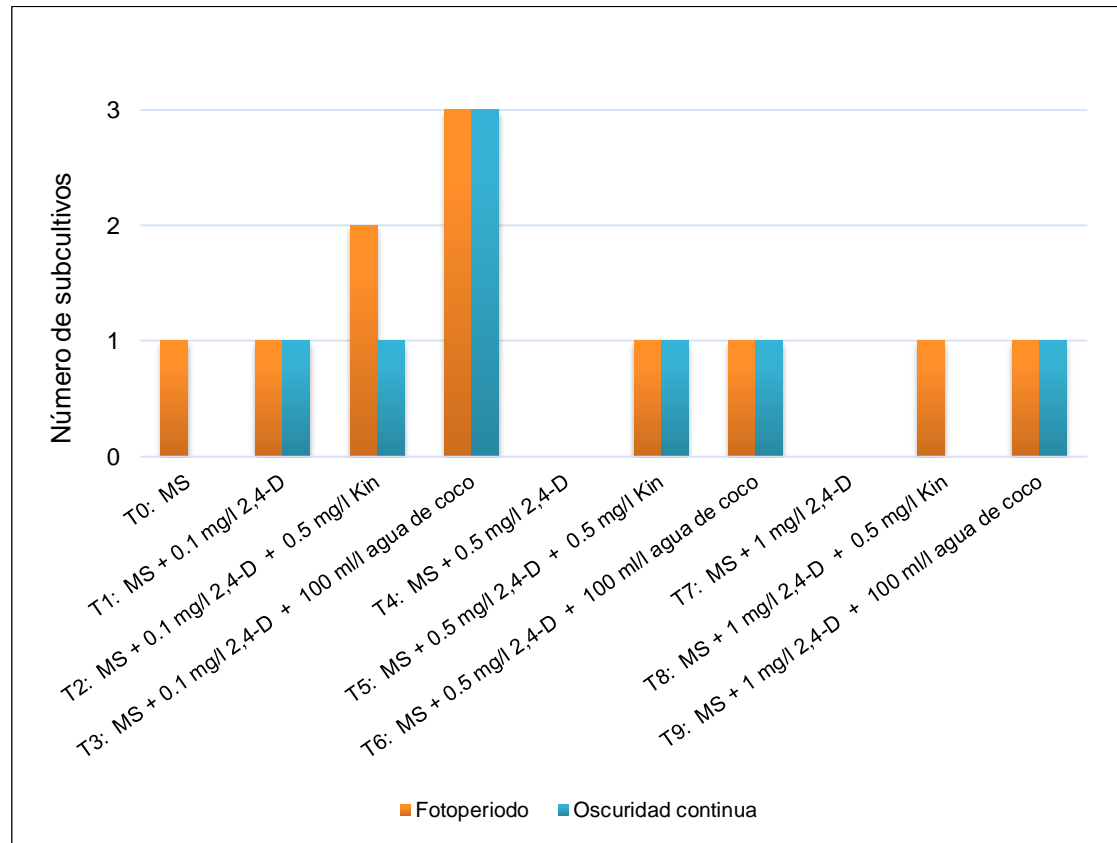


Figura 20. Número de subcultivos de callo en condiciones de fotoperiodo y oscuridad continua.

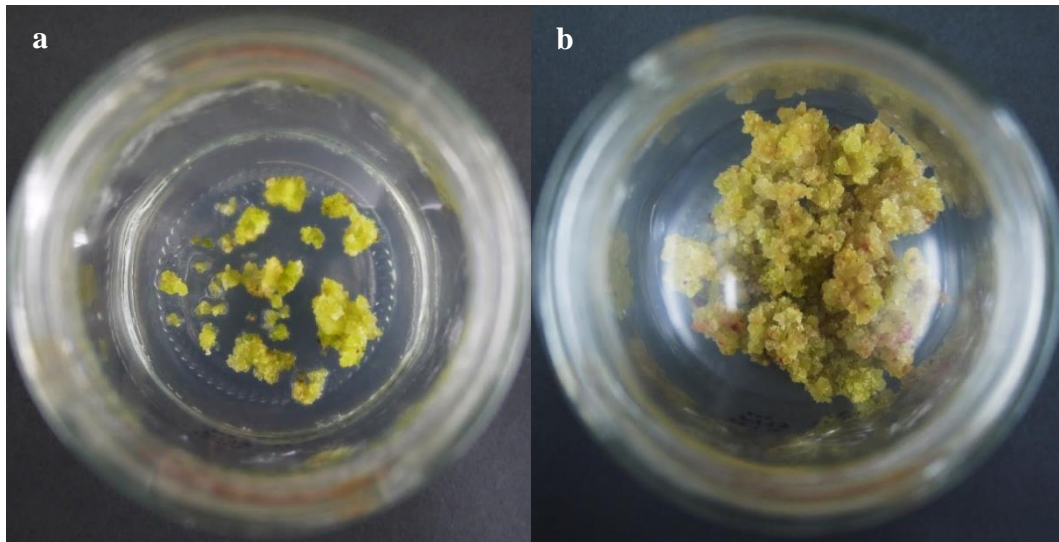


Figura 21. Proliferación de callo friable (T3) en fotoperiodo. a) Callos recién subcultivados. b) Callos proliferados luego de 21 días de incubación.

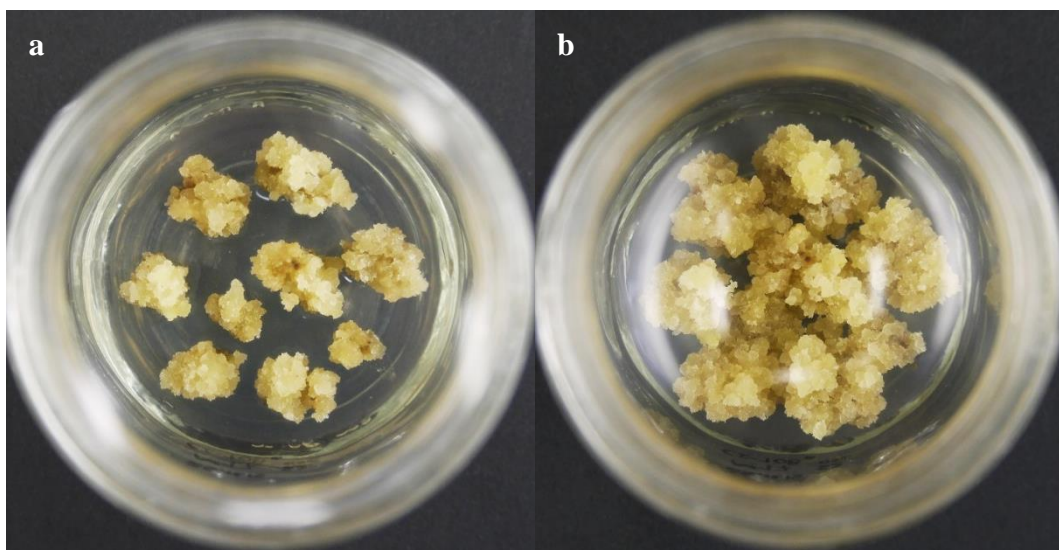


Figura 22. Proliferación de callo friable (T3) en oscuridad continua. a) Callos recién subcultivados. b) Callos proliferados luego de 21 días de incubación.

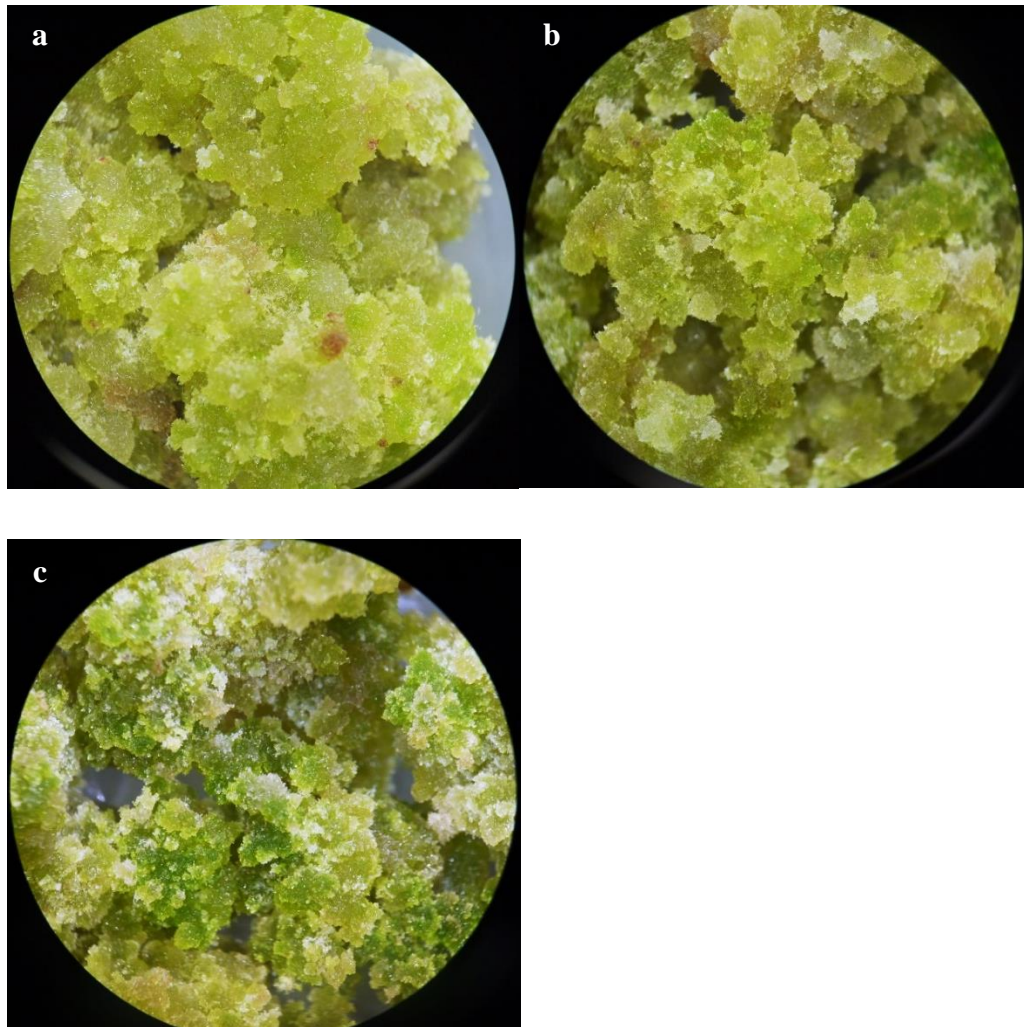


Figura 23. Callos subcultivados (T3) e incubados en fotoperiodo (10X). a) Primer subcultivo. b) Segundo subcultivo. c) Tercer subcultivo.

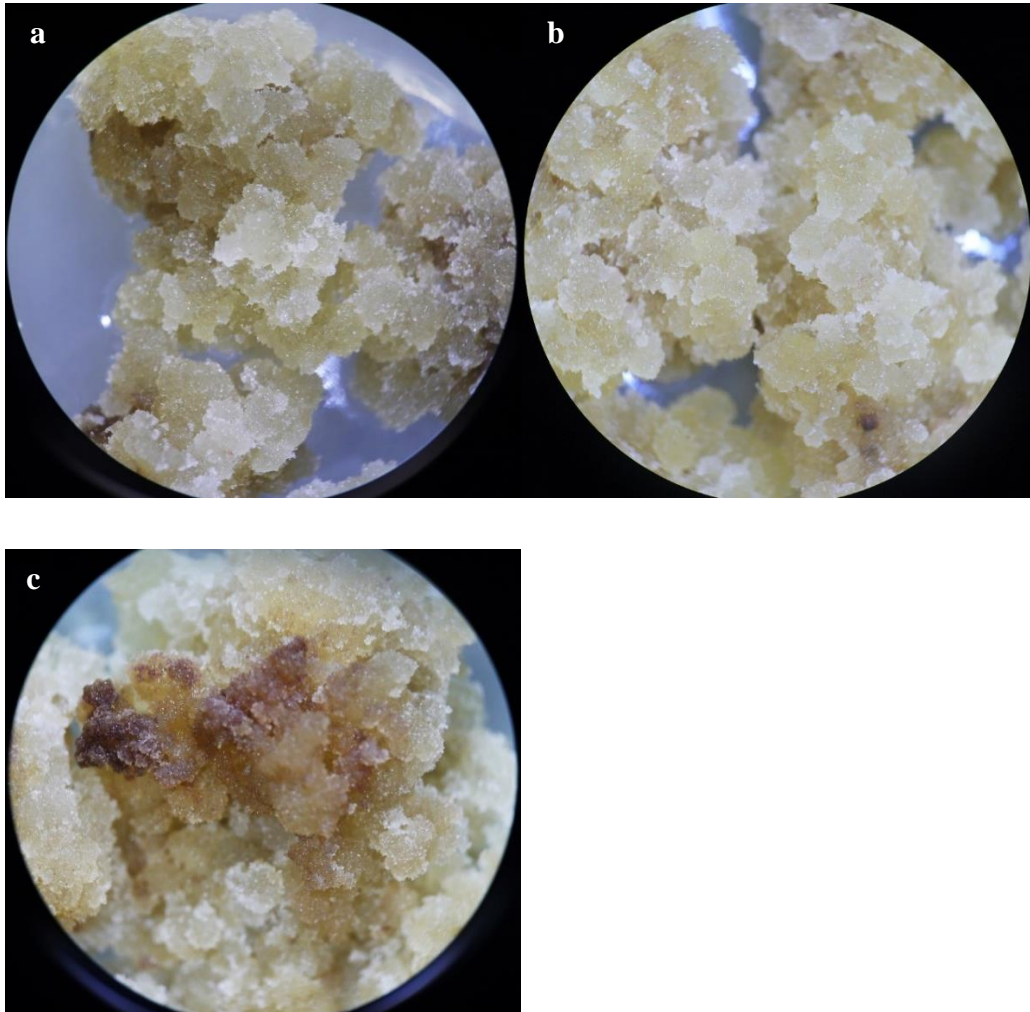


Figura 24. Callos subcultivados (T3) e incubados en oscuridad continua (10X). a) Primer subcultivo. b) Segundo subcultivo. c) Tercer subcultivo.

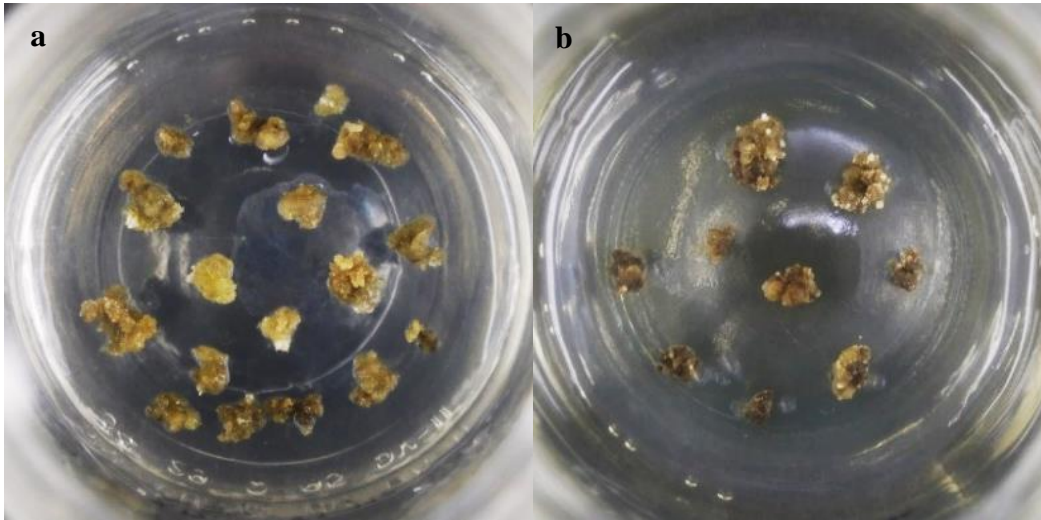


Figura 25. Necrosamiento de callos subcultivados. a) Callos (T1) incubados en fotoperiodo. b) Callos (T2) incubados en oscuridad continua.

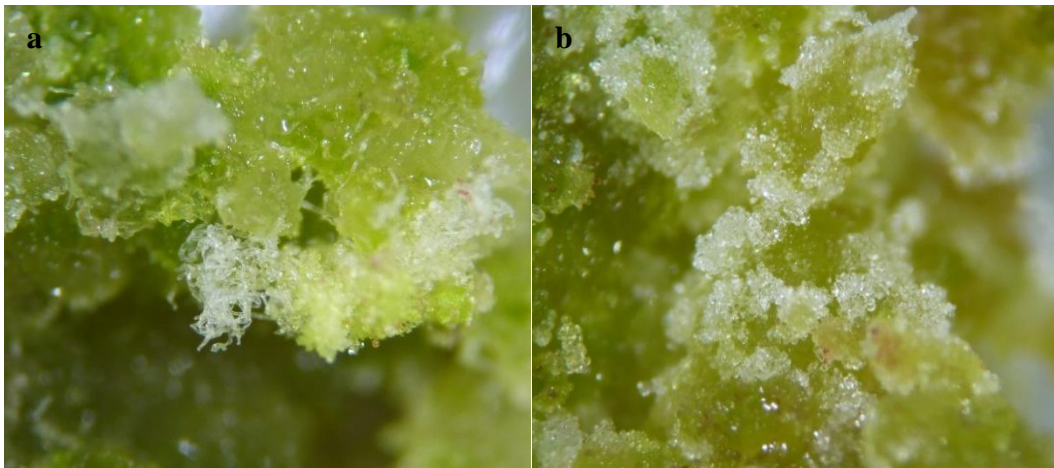


Figura 26. Porción de callo color cristalino incubado en fotoperiodo visto bajo el estereoscopio (30X). a) Células alargadas. b) Células esféricas.

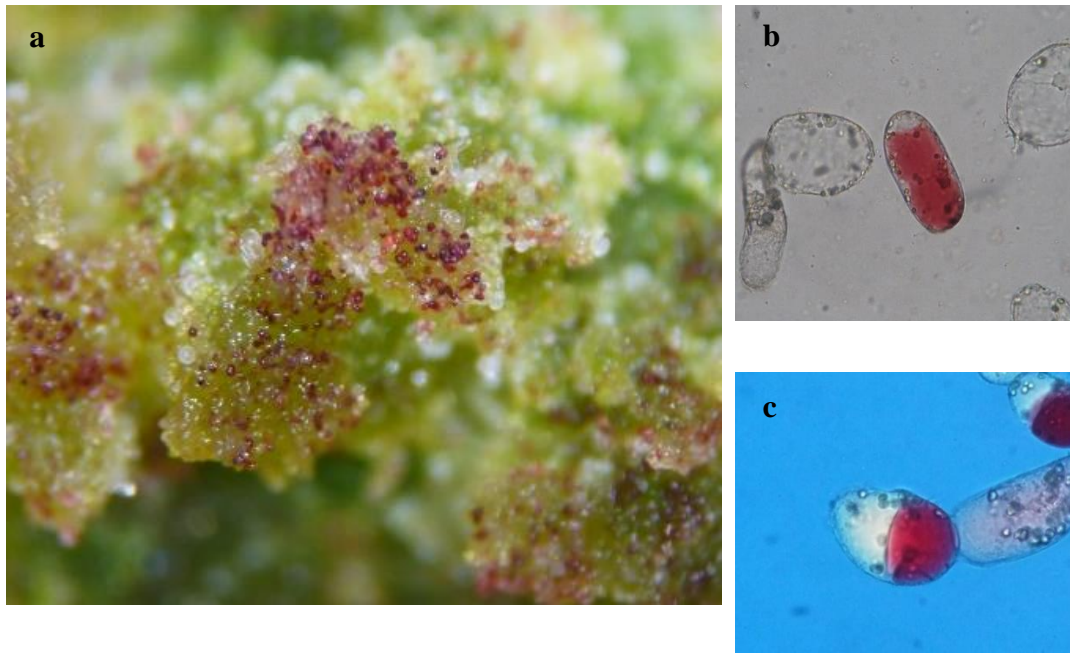


Figura 27. Células de callo con pigmentación rojo-guinda incubadas en fotoperiodo. a) Vista al estereoscopio (30X). b) Vista al microscopio sin colorante (400X). c) Vista al microscopio con tinción de Azul de Evans (400X).

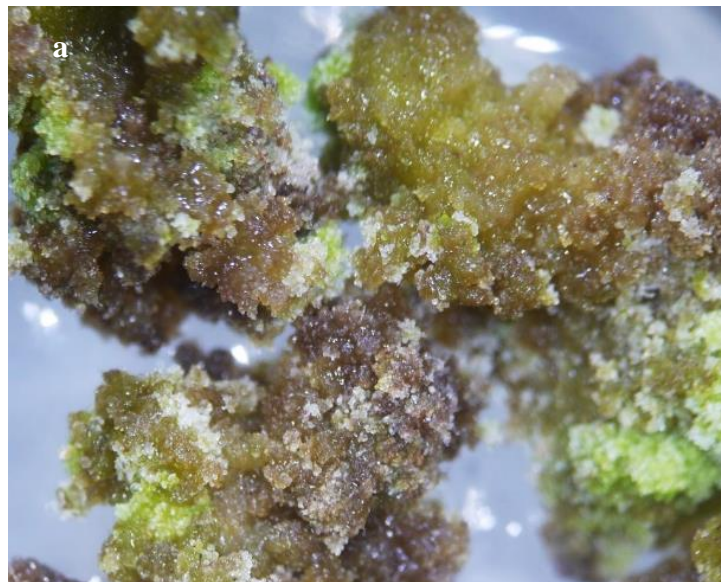


Figura 28. Callo de color marrón incubado en fotoperiodo visto bajo el estereoscopio (10X).



Figura 29. Callo de color marrón incubado en oscuridad continua visto bajo el estereoscopio (10X).

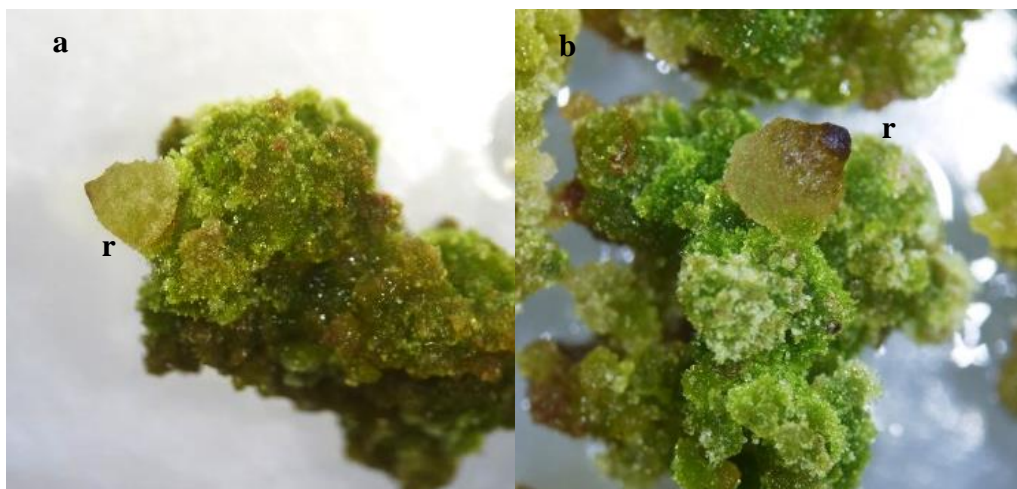


Figura 30. Presencia de organogénesis radical (10X) en tratamientos de inducción de callo embriogénico. a) Tratamiento 1. b) Tratamiento 6. r: inicio de formación de raíz.

9.2 Tablas

Tabla 1. Composición del medio Murashige-Skoog (1962).

Componentes	Concentración (mg/l)
Macroelementos	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microelementos	
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
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
Vitaminas	
Tiamina-HCl	0.1
Niacina	0.5
Glicina	2
Piridoxina-HCl	0.5
Mio-inositol	100
Quelato de hierro	
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8

Tabla 2. Tratamientos de fitorreguladores del crecimiento y agua de coco evaluados en la iniciación de callo.

Tratamiento	Composición del medio de cultivo
0	MS
1	MS + 0.1 mg/l 2,4-D
2	MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin
3	MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 100 ml/l agua de coco
4	MS + 0.5 mg/l 2,4-D
5	MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin
6	MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 100 ml/l agua de coco
7	MS + 1 mg/l 2,4-D
8	MS + 1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin
9	MS + 1 mg/l 2,4-D + 100 ml/l agua de coco

Tabla 3. Tratamientos de fitorreguladores del crecimiento evaluados en la inducción de callo embriogénico.

Tratamiento	Composición del medio de cultivo
1	MS
2	MS + 0.1 mg/l Kin
3	MS + 0.5 mg/l Kin
4	MS + 1 mg/l Kin
5	MS + 0.5 mg/l Kin + 0.1 mg/l 2,4-D
6	MS + 0.05 mg/l Kin + 0.3 mg/l IBA

Tabla 4. Tratamientos de desinfección de semillas de algodón nativo pardo.

Tratamiento	Solución desinfectante	Tiempo de exposición
1		5 min
2	Hipoclorito de sodio 2.5%	10 min
3		15 min
4		20 min

Tabla 5. Intensidad de la proliferación de callo.

Codificación	Intensidad	Descripción
0	Ausente	Sin formación de callo.
1	Escasa	Explante hinchado y callo evidente que cubre $\leq 25\%$ del tamaño del explante.
2	Moderada	Callo cubre $>25\%$ y $\leq 100\%$ del tamaño del explante.
3	Abundante	Callo cubre $>100\%$ del tamaño del explante.

Tabla 6. Número de semillas germinadas y no germinadas según el tiempo de exposición a hipoclorito de sodio (NaOCl) 2.5% (valores entre paréntesis indican porcentajes).

Tiempo de exposición a NaOCl 2.5% (min)	Número de semillas germinadas	de (%)	Número de semillas germinadas	de no (%)	N*
5	18	(90)	2	(10)	20
10	17	(85)	3	(15)	20
15	16	(80)	4	(20)	20
20	17	(85)	3	(15)	20

* Número de repeticiones.

Tabla 7. Tiempo de germinación de semillas según el tiempo de exposición a hipoclorito de sodio (NaOCl) 2.5%.

Tiempo de exposición a NaOCl 2.5% (min)	Tiempo de germinación (días) *	N**
5	2.50 ± 0.92	18
10	2.35 ± 0.70	17
15	2.38 ± 0.72	16
20	2.94 ± 1.30	17

* Valores no son significativamente diferentes (Test de Kruskal-Wallis, P=0.335). Cada valor representa el promedio de N repeticiones ± desviación estándar.

** Número de repeticiones.

Tabla 8. Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, kinetina y agua de coco en la iniciación de callo en explantes de hipocotilo incubados en condiciones de fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad.

Tratamientos (composición del medio de cultivo)	% Explantes que iniciaron la formación de callo *	Textura **	Color **
T0: MS	87.5 ± 3.95 b	Friable, compacto	Amarillo claro, marrón claro
T1: MS + 0.1 mg/l 2,4-D	90 ± 4.68 ab	Friable, compacto	Amarillo-verde
T2: MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin	100 a	Friable, compacto	Verde-gris, verde, amarillo-verde, marrón claro, cristalino
T3: MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 100 ml/l agua de coco	100 a	Friable	Amarillo-verde, verde, verde-gris, cristalino
T4: MS + 0.5 mg/l 2,4-D	100 a	Compacto, friable	Marrón claro, beige
T5: MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin	100 a	Compacto, friable	Marrón claro, marrón, amarillo-verde, amarillo
T6: MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 100 ml/l agua de coco	100 a	Friable, compacto	Amarillo, marrón claro, marrón
T7: MS + 1 mg/l 2,4-D	92.5 ± 5 ab	Compacto	Marrón claro, marrón, verde-gris
T8: MS + 1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin	100 a	Friable, compacto	Amarillo-verde, marrón claro, marrón, amarillo
T9: MS + 1 mg/l 2,4-D + 100 ml/l agua de coco	100 a	Compacto, friable	Marrón claro, marrón, amarillo claro

* Letras diferentes denotan diferencias significativas entre valores, Test HSD de Tukey (P<0.05). Cada valor representa el promedio de 5 repeticiones ± error estándar. Cada unidad experimental está formada por 8 explantes. ** Las características del callo se mencionan en orden decreciente de acuerdo a la cantidad presente.

Tabla 9. Efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, kinetina y agua de coco en la iniciación de callo en explantes de hipocotilo incubados en condiciones de oscuridad continua.

Tratamientos (composición del medio de cultivo)	% Explantes que iniciaron la formación de callo*	Textura **	Color **
T0: MS	85 ± 4.7	Compacto, friable	Amarillo claro, beige
T1: MS + 0.1 mg/l 2,4-D	90 ± 4.7	Friable	Beige, cristalino
T2: MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin	100	Friable, compacto	Beige, cristalino
T3: MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 100 ml/l agua de coco	100	Friable	Beige, cristalino
T4: MS + 0.5 mg/l 2,4-D	92.5 ± 3.1	Compacto	Marrón claro, marrón
T5: MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin	95 ± 3.1	Compacto, friable	Beige, cristalino
T6: MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 100 ml/l agua de coco	97.5 ± 2.5	Friable, compacto	Beige, marrón claro, cristalino
T7: MS + 1 mg/l 2,4-D	95 ± 3.1	Compacto	Beige, marrón
T8: MS + 1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin	90 ± 4.7	Compacto	Beige, marrón
T9: MS + 1 mg/l 2,4-D + 100 ml/l agua de coco	100	Compacto, friable	Marrón claro, marrón, beige

* Cada valor representa el promedio de 5 repeticiones ± error estándar. Cada unidad experimental está formada por 8 explantes.

** Las características del callo se mencionan en orden decreciente de acuerdo a la cantidad presente.

Tabla 10. Intensidad de proliferación de callo en condiciones de fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad, según tratamientos de iniciación de callo.

		Tratamientos de iniciación de callo **										
Codificación	Intensidad de proliferación de callo	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
		MS	MS + 0.1 mg/l 2,4-D	MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin	MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 100 ml/l AC	MS + 0.5 mg/l 2,4-D	MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin	MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 100 ml/l AC	MS + 1 mg/l 2,4-D	MS + 1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin	MS + 1 mg/l 2,4-D + 100 ml/l AC	
0	Ausente	5 (12.5)*	4 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (7.5)	0 (0)	0 (0)	
1	Escasa	4 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	40 (100)	16 (40)	3 (7.5)	37 (92.5)	12 (30)	12 (30)	
2	Moderada	31 (77.5)	36 (90)	16 (40)	7 (17.5)	0 (0)	24 (60)	33 (82.5)	0 (0)	27 (67.5)	27 (67.5)	
3	Abundante	0 (0)	0 (0)	24 (60)	33 (82.5)	0 (0)	0 (0)	4 (10)	0 (0)	1 (2.5)	1 (2.5)	
Total		40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	

* Cada casilla indica el número de explantes y, entre paréntesis, el porcentaje de explantes que representa dentro del tratamiento.

** 2,4: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; Kin: Kinetina; AC: Agua de coco.

Tabla 11. Intensidad de proliferación de callo en condiciones de oscuridad continua, según tratamientos de iniciación de callo.

		Tratamientos de iniciación de callo **										
Codificación	Intensidad de proliferación de callo	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
		MS	MS + 0.1 mg/l 2,4-D	MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin	MS + 0.1 mg/l 2,4-D + 100 ml/l AC	MS + 0.5 mg/l 2,4-D	MS + 0.5 mg/l 2,4-D	MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin	MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 100 ml/l AC	MS + 1 mg/l 2,4-D	MS + 0.5 mg/l Kin	MS + 1 mg/l 2,4-D + 100 ml/l AC
0	Ausente	6 (15)*	4 (10)	0 (0)	0 (0)	3 (7.5)	0 (0)	1 (2.5)	2 (5)	2 (5)	0 (0)	
1	Escasa	24 (60)	18 (45)	0 (0)	0 (0)	27 (67.5)	22 (55)	21 (52.5)	33 (82.5)	30 (75)	26 (65)	
2	Moderada	10 (25)	18 (45)	23 (57.5)	18 (45)	10 (25)	18 (45)	18 (45)	5 (12.5)	8 (20)	14 (35)	
3	Abundante	0 (0)	0 (0)	17 (42.5)	22 (55)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Total		40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	40 (100)	

* Cada casilla indica el número de explantes y, entre paréntesis, el porcentaje de explantes que representa dentro del tratamiento.

** 2,4: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; Kin: Kinetina; AC: Agua de coco.