



**INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA**

FECHA DE PRESENTACIÓN: Octubre 2009

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMA/DEPARTAMENTO: Departamento Nacional de Biotecnología/
Programa de Cereales

PROYECTO: "Mutation breeding in Agriculture/Mutaciones Genéticas en Agricultura Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA)

ACTIVIDAD: **Evaluación de la capacidad androgénica de cinco variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.) mediante la técnica de cultivo *in vitro* de anteras.**

UBICACIÓN: Provincia : Pichincha
Cantón : Mejía
Parroquia : Cutuglagua

AUTORA: Egda. Parra Gallardo Paola Viviana

COAUTORES: Ing. Jacqueline Benítez (Departamento Nacional de Biotecnología)
Ing. Esteban Falconí (Programa de Cereales)

DURACIÓN: 12 meses

FECHA DE INICIO: Octubre 2009

FECHA DE TERMINACIÓN: Octubre 2010

PRESUPUESTO: USD 6638.00

FINANCIAMIENTO: AIEA 2%
INIAP 40%
TESISTA 58%

1. ANTECEDENTES

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es uno de los cultivos de mayor uso y explotación en el mundo. Actualmente ocupa el cuarto lugar en importancia entre los cereales, después del trigo, maíz y arroz, esto obedece a su extensa superficie de cultivo de 56.400.000 hectáreas (Prontuario de Agricultura, 2005), amplia adaptación ecológica pudiendo desarrollarse desde el nivel del mar hasta 4260 msnm (Galeon, 2003) y a su diversidad de aplicaciones en alimentos y bebidas de consumo humano y en mínima proporción, como forraje para el ganado (Mendez, 2004).

La cebada fue una de las primeras especies cultivadas por el hombre con más de 10 000 años de antigüedad, de acuerdo a evidencias arqueológicas (Zohary y Hopf 1988). Para la década de los noventa, la superficie sembrada a nivel mundial fue alrededor de 76 millones de hectáreas y la producción de grano se ubicó entre las 150 y 160 millones de toneladas (Giménez y Tomaso, 2002). Durante el periodo 2003-2004, la superficie mundial cultivada fue de 57.2 millones de hectáreas, obteniendo una producción de 141.5 millones de toneladas con un rendimiento promedio de 2.5 toneladas por hectárea, ubicando a Europa como el principal productor con el 43% de la producción mundial (Méndez, 2004).

En Ecuador, según los datos del Tercer Censo Nacional Agropecuario (INEC, 2002), la superficie dedicada al cultivo de cebada fue de 48.874 hectáreas, distribuidas en todas las provincias de la Sierra. Las provincias con mayor área sembrada fueron Chimborazo, Cotopaxi, Cañar y Pichincha. Esta superficie supero a la ocupada por otros cultivos básicos como papa (47.494 ha) y trigo (21.945 ha), y a excepción de la reversión de las áreas cebaderas a pasturas formadas o artificiales, no existe otro cultivo o sistema competitivo que elimine al cultivo de la cebada sobre los 3000 metros de altitud (Chicaiza *et al.*, 2003).

Desde el punto de vista social, Villacrés (1996), menciona a la cebada como un cultivo de gran importancia en todos los países andinos, al considerarse como una fuente de subsistencia para un gran número de agricultores pequeños y medianos. En nuestro país se estima que el 40% de la producción nacional se dedica para el consumo humano, 40% para la industria cervecera y el 20% restante como forraje y disponibilidad de semilla (INEC, 2002). En base a estas estadísticas, en los últimos tiempos se ha dedicado muchos esfuerzos para su mejoramiento, a través de métodos convencionales.

El desarrollo de líneas de alto rendimiento y calidad que satisfagan la demanda de la población que vive de la agricultura puede darse gracias al desarrollo de técnicas biotecnológicas, como el cultivo *in vitro* con fines de fitomejoramiento, herramienta que puede servir de apoyo a los métodos convencionales de mejoramiento (Polci *et al.*, 2000).

En los programas de mejoramiento mediante métodos convencionales la liberación de una variedad comercial de cebada tarda alrededor de ocho años, debido a que se requiere de 4 a 7 ciclos sucesivos de autofecundaciones y pruebas de características complejas y cuantitativas, que garanticen su estabilidad varietal y cumpla con los requerimientos del agricultor (Chahal y Gosal, 2002; Chávez, 1995). Una manera de reducir el tiempo necesario para la obtención de nuevas líneas, es la implementación del cultivo *in-vitro* de anteras. Mediante esta técnica, se pueden llegar a obtener plantas haploides (Dodds y Roberts, 1985) las mismas que mediante doblaje de cromosomas pueden generar líneas puras u homocigóticas (fértiles), normalmente llamadas doble haploides (Thomas *et al.*, 2003). Las plantas doble haploides presentan un alto porcentaje de homocigocidad, por lo que pueden ser usadas como base para la creación de nuevas variedades comerciales (Kasha y Maluszynski, 2003). Todo este proceso, una vez estandarizado, ahorra tiempo y recursos a los programas de fitomejoramiento (Thomas *et al.*, 2003).

Los métodos que son más usados para la obtención de haploides y dobles haploides pueden basarse en la fertilización interespecífica o intergenérica (vía partenogénesis o mediante reducción cromosómica), en el cultivo de esporas masculinas, esto es, de anteras o polen (androgénesis), o en el cultivo de esporas femeninas, o sea, de ovarios u óvulos (ginogénesis). De los métodos señalados, el más rápido y aplicable a un mayor número de especies para la producción de dobles haploides es el cultivo de anteras o polen aislado (Lentini *et al.*, 1997).

Cabe recalcar también, que la obtención de plántulas haploides está sujeta a una serie de factores que influyen sobre el cultivo *in vitro* de anteras, estos factores son: el genotipo, el estado de desarrollo del polen al iniciarse el cultivo, las condiciones ambientales, el estado fisiológico de la planta donante, los tratamientos de las anteras antes del cultivo, el medio de cultivo y las condiciones físicas de cultivo e incubación de las anteras, todos ellos de alguna u otra manera influyen en la respuesta androgénica de cada genotipo (Afza *et al.* 1999).

A pesar de todos los factores limitantes que se presentan, la inducción de dobles haploides a nivel *in vitro* se está utilizando de forma rutinaria en varias especies de elevado interés agronómico, entre ellas las más importantes son el arroz y naranjilla desarrollados en Colombia (CIAT, 1984) y el maíz y trigo en España (Simarro y Nuez, 2002). En estos cuatro cultivos se ha producido 14 cultivares mejorados por el medio del cultivo de anteras y otros cuatro en cuya genealogía interviene un haploide duplicado (Baenzinger *et al.*, 1984; Hu y Yang, 1986; Bollo y Raquin, 1987).

Recientemente se ha incrementado considerablemente la eficiencia del proceso de cultivo *in vitro* de anteras de cebada, mediante cambios en la composición de los medios y condiciones de cultivo. Sin embargo, es importante mencionar que no todos los genotipos se adaptan a las mismas condiciones (Cistué *et al.*, 1994, 1995 y 1999; Castillo *et al.*, 2000) de tal modo que la selección de genotipos androgénicos frente a un conjunto de condiciones específicas de medios y cultivo, representa el punto de partida para el mejoramiento de la cebada a través de técnicas biotecnológicas a nivel *in vitro*.

2. JUSTIFICACIÓN

La disponibilidad de una técnica que reduzca el número de generaciones para obtener líneas puras permitiría lograr una mayor eficiencia en un programa de mejoramiento genético, reduciendo el tiempo y los recursos económicos. En este contexto, la técnica del cultivo *in vitro* de anteras se puede utilizar para duplicar el número cromosómico de granos de polen inmaduros a fin de obtener embriones de plantas dihaploides homocigotas en una sola generación, las cuales contienen un único juego de la dotación cromosómica, por lo que constituyen una valiosa herramienta para la selección de caracteres deseables en los programas de mejoramiento.

No obstante debido a que la capacidad androgénica está sujeta a una serie de factores limitantes de la técnica específicamente el genotipo en estudio, es indispensable evaluar y estandarizar un protocolo de cultivo *in vitro* de anteras de cebada bajo las condiciones del Laboratorio Nacional de Biotecnología del INIAP y probar metodologías encaminadas a determinar los factores específicos que influyen en la regeneración de plantas, como el pretratamiento de las anteras, estado adecuado de desarrollo de las microsporas, así como también la influencia de la concentración de algunos micronutrientes para la formación de callos; y de esta manera llegar a identificar genotipos androgénicos que favorezcan a la producción de plántulas haploides y dobles haploides, las mismas que en futuro inmediato

constituirán un marco de apoyo para el mejoramiento genético y la liberación de nuevas variedades con excelentes características agronómicas y de calidad que puedan ser distribuidas a los agricultores ecuatorianos en menor tiempo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad androgénica de cinco variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.) mediante la técnica de cultivo *in vitro* de anteras.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el tiempo de exposición máximo al pre-tratamiento frío, en el cual el 80% de microsporas permanezcan viables.
- Determinar el estado de desarrollo vegetativo de cada variedad en estudio, en el cual prevalezca el estado de desarrollo uninucleado en fase tardía de las microsporas, indispensable para la inducción de respuesta androgénica.
- Evaluar la capacidad de inducción de androgénesis del medio de cultivo BAC3 suplementado con Ficoll, Polyethylene glycol y Gelrite.

4. HIPÓTESIS:

Ninguno de los cinco genotipos de cebada evaluados presenta capacidad androgénica en el medio BAC3 suplementado con Ficoll, Polyethylene glycol y Gelrite.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1 Materiales de Campo

- Semillas de las cinco variedades de cebada. (ver factores en estudio)
- Macetas
- Urea (fertilizante)

5.1.2 Materiales de Laboratorio

- Material de vidrio de laboratorio
- Cajas Petri 60mm
- Agitador
- Micropipetas
- Recipientes plásticos
- Dispensador de medios
- Papel aluminio
- Papel toalla
- Equipo de disección
- Parafilm

5.1.3 Reactivos para cultivo *in vitro*

- Gelrite
- Medio Murashige y Skoog (MS)
- Ácido ascórbico (C₆H₈O₆)
- Hidróxido de Potasio (KOH)
- Tiamina (B1)
- Ácido nicotínico
- Ficoll (polímero sintético de sacarosa)
- Piridoxina
- Acido Bórico (HBO₃)
- Sulfato de Manganeso Heptahidratado (MnSO₄ x 7H₂O)
- Sulfato de Zinc Heptahidratado (ZnSO₄ x 7H₂O)
- Yoduro de Potasio (KI)
- Molibdato de Sodio Dinidratado (Na₂MoO₄ x 2H₂O)
- Sulfato de Cobre Pentahidratado (CuSO₄.5H₂O)
- Cloruro de Cobalto Hexahidratado (CoCl₂ x 6H₂O)
- Nitrato de Plata (AgNO₃)
- Nitrato de Potasio (KNO₃)
- Nitrato de Amonio (NH₄NO₃)
- Sulfato de Amonio ((NH₄)₂SO₄)
- Fosfato diácido de Potasio (KH₂PO₄)
- Fosfato diácido de Sodio Monohidratado (NaH₂PO₄ x H₂O)
- Cloruro de Calcio heptahidratado (CaCl₂ x 7H₂O)
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado (MgSO₄ x 7H₂O)
- Acido Cítrico (C₆H₈O₆)
- EDTA Sal de Sodio (FeNa₂EDTA)
- Maltosa (C₁₂H₂₂O₁₁)
- Acido Pirúvico (C₃H₄O₃)
- Myo-Inositol
- Ácido naftalenacético (NAA)
- 6-bencilaminopurina (BAP)
- Acido Indol acético (IAA)
- Kinetina
- Acido Acético Glacial (C₂H₄O₂)
- Carmin

5.1.4 Equipos de laboratorio

- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Balanza de precisión
- Estereomicroscopio.
- Refrigeradora
- Destilador de agua
- pHmetro
- Calefactor
- Estufa
- Microscopio óptico

5.1.5 Materiales y equipos de oficina

- Resmas de papel bond
- Computador
- Impresora
- Marcadores y lapiceros
- Cámara de fotos

5.2 Metodología

5.2.1 Características del sitio experimental

5.2.1.1 Ubicación

La investigación se llevará a cabo en los lotes de la EESC, invernadero de cebada del Programa de Cereales y en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP.

5.2.1.2 Características del lugar¹

Provincia	: Pichincha
Cantón	: Mejía
Parroquia	: Cutuglagua
Latitud	: 00°22'00" S
Longitud	: 79° 32'00" W
Altitud	: 3058m
Temperatura promedio Anua	: 12.04°C
Precipitación promedio Anual	: 1487 mm
Humedad relativa	: 79%

5.2.1.3 Condiciones experimentales específicas de laboratorio para el cultivo *in vitro* de anteras de cebada.

Temperatura promedio	: 22-24°C ± 2°C
Humedad relativa	: 70%
Horas Luz	: 16 horas

5.2.1.4 Condiciones del Invernadero

Temperatura promedio	: 26°C ± 2°C
Humedad relativa	: 80%

5.2.2 Evaluación del tiempo de pre-tratamiento frío

5.2.2.1 Factores de Estudio

¹ Datos proporcionados por la Estación Meteorológica Izobamba, perteneciente al Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI), 2007

a) Variedades de cebada (V)

- V₁ = INIAP-Cañicapa 2003
- V₂ = Clipper
- V₃ = INIAP-Quilotoa 2003
- V₄ = variedad diferencial EMIR
- V₅ = variedad diferencial I5

Para el presente estudio se seleccionaron cinco variedades de cebada las cuales se destacan especialmente por sus características agronómicas, demanda en el mercado y niveles de producción.

INIAP-Cañicapa 2003 seleccionada por ser la variedad élite del INIAP debido a sus niveles de resistencia intermedia a enfermedades y productividad.

INIAP-Quilotoa 2003 seleccionada por ser una línea hexástica, característica agronómica de preferencia de los agricultores.

Clipper seleccionada debido a que es una variedad para uso en la industria cervecera por ende de gran interés económico.

I5 y EMIR variedades diferenciales seleccionadas debido a los genes de resistencia a roya amarilla que poseen.

b) Días de Pretratamiento (D)

- D₁ = 4 días
- D₂ = 7 días
- D₃ = 10 días
- D₄ = 14 días

5.2.2.2 Tratamientos

A continuación se detallan los tratamientos que resultan de la combinación de los factores en estudio.

Cuadro 1. Tratamientos resultantes para la evaluación del tiempo de pre-tratamiento a 4°C para las cinco variedades de cebada, INIAP, Cutuglagua -- Pichincha 2009.

SÍMBOLO	INTERACCIÓN	TRATAMIENTO
t ₁	V ₁ D ₁	Anteras de la variedad INIAP-Cañicapa 2003 sometidas a pretratamiento frío 4°C por 4 días.
t ₂	V ₁ D ₂	Anteras de la variedad INIAP- Cañicapa 2003 sometidas a pretratamiento frío 4°C por 7 días.
t ₃	V ₁ D ₃	Anteras de la variedad INIAP- Cañicapa 2003 sometidas a pretratamiento frío 4°C por 10 días.
t ₄	V ₁ D ₄	Anteras de la variedad INIAP- Cañicapa 2003 sometidas a pretratamiento frío 4°C por 14 días.
t ₅	V ₂ D ₁	Anteras de la variedad Clipper sometidas a pretratamiento frío 4°C por 4 días.

t_6	$V_2 D_2$	Anteras de la variedad Clipper sometidas a pretratamiento frío 4°C por 7 días.
t_7	$V_2 D_3$	Anteras de la variedad Clipper sometidas a pretratamiento frío 4°C por 10 días.
t_8	$V_2 D_4$	Anteras de la variedad Clipper sometidas a pretratamiento frío 4°C por 14 días.
t_9	$V_3 D_1$	Anteras de la variedad INIAP-Quiltoa 2003 sometidas a pretratamiento frío 4°C por 4 días.
t_{10}	$V_3 D_2$	Anteras de la variedad INIAP-Quiltoa 2003 sometidas a pretratamiento frío 4°C por 7 días.
t_{11}	$V_3 D_3$	Anteras de la variedad INIAP-Quiltoa 2003 sometidas a pretratamiento frío 4°C por 10 días.
t_{12}	$V_3 D_4$	Anteras de la variedad INIAP-Quiltoa 2003 sometidas a pretratamiento frío 4°C por 14 días.
t_{13}	$V_4 D_1$	Anteras de la variedad diferencial EMIR sometidas a pretratamiento frío 4°C por 4 días.
t_{14}	$V_4 D_2$	Anteras de la variedad diferencial EMIR sometidas a pretratamiento frío 4°C por 7 días.
t_{15}	$V_4 D_3$	Anteras de la variedad diferencial EMIR sometidas a pretratamiento frío 4°C por 10 días.
t_{16}	$V_4 D_4$	Anteras de la variedad diferencial EMIR sometidas a pretratamiento frío 4°C por 14 días.
t_{17}	$V_5 D_1$	Anteras de la variedad diferencial I5 sometidas a pretratamiento frío 4°C por 4 días.
t_{18}	$V_5 D_2$	Anteras de la variedad diferencial I5 sometidas a pretratamiento frío 4°C por 7 días.
t_{19}	$V_5 D_3$	Anteras de la variedad diferencial I5 sometidas a pretratamiento frío 4°C por 10 días.
t_{20}	$V_5 D_4$	Anteras de la variedad diferencial I5 sometidas a pretratamiento frío 4°C por 14 días.

5.2.2.3 Unidad experimental

La unidad experimental para evaluar el tiempo de pre-tratamiento a 4°C esta conformado por 1 caja Petri que contiene 3 espigas de cebada.

5.2.2.4 Diseño experimental

Para medir el efecto del tiempo máximo de pre-tratamiento frío a 4°C sobre la viabilidad de las microsporas, se utilizará un Diseño Completamente al Azar (DCA) en un arreglo factorial 5x4 con 3 observaciones por tratamiento.

5.2.2.5 Análisis Estadístico

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) se presenta a continuación:

Cuadro 2. ADEVA para la evaluación del tiempo de pre-tratamiento a 4°C, INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2009.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de Libertad (G L)
Total	59
Tratamientos	19
Variedades de Cebada (V)	4
Días de pre-tratamiento (D)	3
V x D	12
Error Experimental	40

5.2.3 Evaluación de la influencia del genotipo y de medios de inducción propuestos para el cultivo *in vitro*, sobre la capacidad androgénica.

5.2.3.1 Factores de Estudio

a). Factor A: Variedades de Cebada

- v_1 = INIAP-Cañicapa 2003
- v_2 = Clipper
- v_3 = INIAP-Quilotoa 2003
- v_4 = variedad diferencial EMIR
- v_5 = variedad diferencial I5

b). Factor B: Medio BAC3 de Cultivo

- m_1 = BAC3+300 g/l Ficoll (Polímero sintético de sacarosa) (Anexo1)
- m_2 = BAC3+600 g/l PEG (Polyethylene glycol) (Anexo2)
- m_3 = BAC3+0.3 g/l Gelrite (Anexo3)

Las concentraciones de Ficoll, PEG y Gelrite respectivamente, que utilizamos son de acuerdo a ensayos previamente realizados.

5.2.3.2 Tratamientos

A continuación se detallan los tratamientos que resultan de la combinación de los factores en estudio.

Cuadro 3. Tratamientos resultantes de la interacción de cinco variedades de cebada con tres medios de cultivo *in vitro* de anteras, INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2009.

SÍMBOLO	INTERACCIÓN	TRATAMIENTO
t_1	$v_1 m_1$	Anteras de la variedad INIAP-Cañicapa 2003 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 300 g/l de Ficoll
t_2	$v_1 m_2$	Anteras de la variedad INIAP-Cañicapa 2003 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 600 g/l de PEG
t_3	$v_1 m_3$	Anteras de la variedad INIAP-Cañicapa 2003 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 900 g/l de Gelrite

t_4	$v_2 m_1$	Anteras de la variedad Clipper cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 300 g/l de Ficoll
t_5	$v_2 m_2$	Anteras de la variedad Clipper cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 600 g/l de PEG
t_6	$v_2 m_3$	Anteras de la variedad Clipper cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 0.3 g/l de Gelrite
t_7	$v_3 m_1$	Anteras de la variedad INIAP-Quilotoa 2003 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 300 g/l de Ficoll
t_8	$v_3 m_2$	Anteras de la variedad INIAP-Quilotoa 2003 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 600 g/l de PEG
t_9	$v_3 m_3$	Anteras de la variedad INIAP-Quilotoa 2003 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 0.3 g/l de Gelrite
t_{10}	$v_4 m_1$	Anteras de la variedad diferencial EMIR cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 300 g/l de Ficoll
t_{11}	$v_4 m_2$	Anteras de la variedad diferencial EMIR cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 900 g/l de PEG
t_{12}	$v_4 m_3$	Anteras de la variedad diferencial EMIR cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 900 g/l de Gelrite
t_{13}	$v_5 m_1$	Anteras de la variedad diferencial I5 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 300 g/l de Ficoll
t_{14}	$v_5 m_2$	Anteras de la variedad diferencial I5 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 900 g/l de PEG
t_{15}	$v_5 m_3$	Anteras de la variedad diferencial I5 cultivadas en el medio BAC3 de inducción adicionado con 900 g/l de Gelrite

5.2.3.3 Unidad experimental

La unidad experimental estará conformada por una caja Petri de 60 mm de diámetro por 15 mm de alto, conteniendo 40 anteras cultivadas en 3 ml de medio líquido de inducción.

5.2.3.4 Diseño experimental

Para determinar la influencia del genotipo y de los medios de inducción propuestos para el cultivo *in vitro*, sobre la capacidad androgénica de cada variedad en estudio, se utilizará un Diseño Completamente al Azar dispuesto bajo un arreglo Factorial con dos factores en estudio genotipo o variedad y medios de cultivo de inducción respectivamente. Se realizarán 10 observaciones por cada tratamiento.

5.2.3.5 Análisis Estadístico

El esquema del Análisis de Varianza (ADEVA) se presenta a continuación:

Cuadro 4. ADEVA para la evaluación de respuestas androgénicas en 15 tratamientos resultantes de la interacción de cinco variedades de cebada con tres medios de cultivo *in vitro* de anteras, INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2009.

Fuente de Variación (F de V)	Grados de Libertad (G L)
Total	149
Variedades de Cebada (V)	4
Medios de cultivo (M)	2
V x M	8
Error Experimental	135

5.3 Análisis Funcional

Las diferencias estadísticas que podrían presentarse en los factores en estudio y su interacción para cada variedad serán determinadas a partir de la comparación de medias a través de la prueba de Tukey al 5%.

5.3.1 Variables y métodos de evaluación.

Para el análisis de los datos que se obtengan durante la investigación se utilizará el paquete estadístico SPSS (versión 15.0). Las variables de respuesta analizadas serán las siguientes:

5.3.1.1 Variables para la evaluación del tiempo de pre-tratamiento frío

5.3.1.1.1 Porcentaje de viabilidad de las microsporas

Para determinar el tiempo máximo de pre-tratamiento frío a 4°C que garantice el 80% de viabilidad de las microsporas presentes en las espigas seleccionadas para medir esta variable de estudio (en cada una de las cinco variedades de cebada), se realizará una observación microscópica de las mismas, a través del aumento del lente 20X, usando un microscopio electrónico. Para esta actividad las anteras deberán ser previamente teñidas con una solución de acetocarmin al 2% que permita diferenciar y contabilizar microsporas viables y no viables, a fin de establecer una relación porcentual entre el tiempo de exposición y viabilidad de las microsporas. El conteo se realizará a los 4, 7, 10 y 14 días de haber iniciado el pre-tratamiento.

Además en base a los resultados analizados a través del software SPSS, se determinará si el tiempo de exposición de cada uno de los pre-tratamientos planteados, son estadísticamente diferentes y a su vez si influyen sobre la viabilidad de las microsporas.

5.3.1.2 Variables para la evaluación de la influencia del genotipo y de medios de inducción propuestos para el cultivo *in vitro*, sobre la capacidad androgénica.

5.3.1.2.1 Número total de respuestas androgénicas (%)

A los 15 días de inducción se cuantificará el número total de anteras con respuesta androgénica (sobre la superficie de la antera). Esto es debido a que teóricamente, las primeras estructuras androgénicas empiezan a surgir durante los primeros días de inducción. De esta manera se establecerá el porcentaje total de respuestas androgénicas en relación al número de anteras sometidas a la inducción, además se podrá identificar la variedad con mayor potencial androgénico.

A través del software SPSS, se realizarán comparaciones múltiples de medias entre los tratamientos evaluados que permitan determinar las diferencias significativas de la capacidad androgénica de cada una de las variedades en estudio, y así establecer si la capacidad androgénica está influenciada por el genotipo.

5.3.1.2.2 Porcentaje de formación de callos

Se contabilizará el número total de callos formados a los 25 días de inducción y se realizará una relación porcentual frente al porcentaje total de respuestas androgénicas por variedad.

5.3.1.2.3 Porcentaje de formación de estructuras embrionarias

Se contabilizará el número de estructuras embrionarias a los 45 días y se estimará una relación porcentual frente al total de respuestas androgénicas por variedad.

5.4 Manejo específico del experimento

La metodología estará dividida en dos etapas, dentro de la Etapa I se incluye la Metodología para la siembra, colecta, determinación del pre-tratamiento frío óptimo para las espigas y estado de desarrollo vegetativo de cada variedad en estudio en el cual prevalezca el estado de desarrollo uninucleado del polen para su introducción *in vitro*. Dentro de la Etapa II se incluye la metodología para el aislamiento de las anteras, Inducción de Androgénesis de las mismas y la Transferencia de microcallos y embriones en un medio de regeneración.

ETAPA I

5.4.1 Siembra del material vegetal

La siembra del material vegetal de las cinco variedades de cebada se realizará cada 15 días en campo e invernadero.

En campo 30 gramos de las semillas de cada variedad serán desinfectadas con Carboxín 20% y Captan 20% y sembradas en parcelas de 1m². En invernadero la siembra se realizará en macetas de plástico de 35 cm, conteniendo 9 semillas por variedad. Tanto el material de campo como el de invernadero recibirán todas las prácticas normales de manejo del cultivo de cebada según Rivadeneira *et al.*, 2003.

5.4.2 Colecta del material vegetal

Inicialmente se recolectaran 8 panículas de cada variedad en estudio en diferentes estados de desarrollo, las mismas que servirán para establecer una correlación entre el estado de desarrollo vegetativo de la planta y el estado de desarrollo uninucleado en fase tardía de la microspora, debido a que este estado es indispensable para el cultivo *in-vitro*. La correlación se la realizará entre la escala Zadocks del estado fenológico de cebada es decir, cuando la lígula de la hoja bandera este visible y la vaina se haya engrosado (PlantPro, 2006), y la observación microscópica de los granos de polen inmaduros teñidos en una solución de acetocarmin al 2% (Szarejko, 2003).

5.4.3 Esterilización superficial de las panículas

Las panículas una vez recolectadas y aún envueltas en la vaina de la hoja bandera, serán llevadas al Laboratorio de Cultivo de Tejidos para empezar la metodología de cultivo *in vitro*.

Se iniciará con la esterilización de las panículas que serán sumergidas en alcohol al 75% durante un minuto; luego serán llevadas a la cámara de flujo laminar donde se extraerán las espigas de la vaina de la hoja (Nuñez *et al.*, 1989).

5.4.4 Determinación del estado de desarrollo del polen

Con el fin de verificar si el estado de desarrollo de la microspora es el adecuado para iniciar las fases del cultivo *in vitro*, se deberá realizar una observación al microscopio mediante

tinción en solución de acetocarmin al 2%, asegurando así que las microsporas se encuentren en estado uninucleado medio y uninucleado tardío.

Se deberá extraer las anteras de cada espiguilla y se las colocará sobre un portaobjeto y se colorearán con una gota del colorante (acetocarmin al 2%) (Rush y Shao Q, 1996). Posteriormente la placa será fijada, haciendo pasar el portaobjetos sobre la llama de un mechero, evitando su ebullición y eliminando el colorante con un papel secante.

Una vez fijada la muestra, se agregará una gota de colorante sobre el portaobjetos, y con ayuda de una varilla de vidrio se presionará las anteras para permitir la salida de las células madre de las microsporas, teniendo cuidado de no dañar el tejido. A continuación con una pinza deberá extraerse los restos de anteras, tratando de dejar sólo la masa de células en la placa (tejido esporógeno), e inmediatamente se añadirá otra gota de colorante.

Después de 20-30 minutos se colocará el cubre objeto en la muestra y deberá ser observada en un microscopio óptico con un aumento de 40x, y se tomarán fotografías a fin de verificar el estado uninucleado medio y tardío del polen, para continuar con el proceso (Brifht S,W; Jones M,G., 1985).

5.4.5 Pre-tratamiento de las espigas a temperatura fría 4°C

Muchos genotipos de cebada requieren de 3 a 4 semanas en pre-tratamiento frío antes del cultivo *in-vitro* de anteras, esto garantiza y beneficia al desarrollo y desarrollo embrionario de las plantas (Szarejko, 2003).

El pre-tratamiento en frío actúa como un estrés de temperatura que favorece al desarrollo de las microsporas en cultivo *in-vitro*. Su importancia prevalece en que no solo baja la frecuencia de albinismo, sino que a su vez, estimula la división mitótica de las microsporas, desviando su curso normal de desarrollo vegetativo (formación de uno generativo y otro vegetativo), hacia un desarrollo esporofítico (formación de dos núcleos idénticos). (Nuñez *et al.*, 1989).

Siendo esta una fase primordial para el cultivo *in vitro*, las espigas extraídas de la panícula esterilizada serán colocadas en cajas Petri de doble compartimento. En el compartimento pequeño se adicionará unas gotas de agua estéril (aproximadamente 1ml), mientras que en el compartimento grande se colocarán de 3 a 4 espigas de cebada. Las cajas de doble compartimento serán selladas con cinta aislante a fin de mantener la humedad; estas deberán ser mantenidas a 4°C durante cuatro, siete, diez y catorce días, previo a introducción de las anteras a cultivo *in-vitro* (Szarejko, 2003).

ETAPA II

5.4.6 Aislamiento de las anteras

Las anteras de las espigas del pretratamiento frío antes de ser inoculadas en los medios de inducción, deberán ser nuevamente teñidas en solución de acetocarmin al 2% para verificar el estado uninucleado de las microsporas. Aquellas espigas que posean más del 20% de microsporas no viables deberán ser descartadas. (Szarejko, 2003)

Con el fin de aislar las anteras de los filamentos, se cortarán las flores por su base, y posteriormente se extraerá una densidad de alrededor de 30-45 anteras con pinzas estériles

utilizando el estereomicroscopio e inmediatamente serán colocadas en la caja petri que contiene 3 ml de medio de cultivo de inducción. (Nuñez *et al.*, 1989).

A su vez, los ovarios inmaduros también podrán ser colocados en conjunto con las anteras en el medio de inducción, aproximadamente en una densidad de 5-6 ovarios. (Weiguo L *et al.*, 2002)

La composición del medio de inducción de callo se detalla en el anexo 1.

5.4.7 Cultivo de microsporas e inducción de Androgénesis

Las anteras inoculadas en las cajas Petri con los medios de cultivo de inducción serán selladas con cinta aislante y envueltas con papel aluminio para finalmente ser colocadas en una estufa donde permanecerán en la oscuridad y a una temperatura entre 22-24 °C en condiciones estériles. Bajo estas condiciones ocurrirá la multiplicación de las microsporas y consecuentemente la formación de microcallos y embriones. Se espera que estos empiecen a aparecer alrededor de los 15 días de cultivo, proliferando entre los 35 y 45 días y alcanzando el tamaño apropiado para ser transferidos al medio de regeneración a los 40 ó 50 días según la metodología de Szarejko (2003).

5.4.8 Transferencia de los microcallos al medio de regeneración

En esta fase los microcallos, que presentan un color amarillento de consistencia compacta serán transferidos a un medio de cultivo especial para la regeneración de plántulas. Esta operación se realizará vaciando un poco del medio que contiene los microcallos, utilizando pinzas estériles y estereomicroscopio. Se colocarán aproximadamente 4 microcallos en cada caja petri con medio de regeneración. (Nuñez *et al.*, 1989).

La incubación de los medios de regeneración será a temperatura de 25 a 27 °C, con iluminación de 2500 lux. El medio de regeneración para obtener plántulas *in-vitro* se detalla en el anexo 4, (Szarejko, 2003).

6. Cronograma de actividades

Actividad	MESES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Siembra de semillas de las variedades de cebada	X	X										
Recolección de panículas			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Pre-tratamiento de espigas a °T. fría			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Determinación del estado del polen			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Cultivo de las anteras en el medio de Inducción de callo			X	X	X							
Cultivo los embriones en el medio de regeneración						X	X	X	X	X	X	
Análisis de datos											X	X
Redacción de tesis						X	X	X			X	X

7. Presupuesto

Reactivos para cultivo in vitro				
Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Sucrosa	g	0.03	90	2.70
Gelrite	g	0.57	1	0.57
Ficoll	g	7.00	300	2.100
Maltosa	g	0.25	180	45.00
Acido Nicotínico	g	0.77	0.1	0.08
Bencilamino purina (BAP)	mg	0.60	5	3.00
Acido naftalenacético (ANA)	mg	0.40	6	2.40
Myo-inositol	g	0.75	6	4.50
Piridoxina HCl	g	9.86	0.1	0.98
Acido ascórbico	g	0.88	1	0.09
Tiamina HCl	g	1.82	0.1	0.18
Acido indolacético (IAA)	g	25.8	0.1	2.58
Acido cítrico	g	0.22	0.1	0.02
Acido pirúvico	ml	100	20	2.86
Kinetina	g	46.32	0.1	4.63
CaCl ₂ ·2H ₂ O	g	0.67	1.8	1.21
Nitrato de Potasio (KNO ₃)	g	0.11	7.8	0.85
NH ₄ NO ₃	g	0.08	0.6	0.05
KH ₂ PO ₄	g	0.70	1	0.70
NaH ₂ PO ₄ ·xH ₂ O	g	0.30	1	0.30
Na ₂ MoO ₄	g	0.48	1	0.48
(NH ₄) SO ₄	g	0.12	2.4	0.30
ZnSO ₄	g	0.12	1	0.12
Mg SO ₄	g	0.16	1	0.16
MnSO ₄	g	0.10	1	0.10
KI	g	1.94	1	1.94
HBO ₃	g	0.15	1	0.15
CuSO ₄	g	0.48	1	0.48
CoCl ₂	g	0.71	1	0.71
KHCO ₃	g	0.05	1	0.05
AgNO ₃	g	4.20	1	4.20
CH ₃ CO ₂ H	ml	0.11	100	11.00
Carmin	g	50	10	5.00
Caseina hidrolizada	g	0.20	1	0.20
Alcohol	g	1.00	10	10.00
Agua destilada	g	0.30	40	12.00
Subtotal				2219.59

Materiales de Laboratorio				
Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Cajas petri	Unidad	0.45	300	135.00
Probeta 1000ml	Unidad	53.00	1	26.50
Probeta 100ml	Unidad	23.00	5	13.80
Pipeta 10ml	Unidad	15.00	5	7.50
Vasos de precipitación 250ml	Unidad	20.00	10	20.00
Mangos de bisturí	Unidad	19.00	6	11.40
Espátulas	Unidad	30.00	4	7.20
Pinzas	Unidad	20.00	6	4.80
Mecheros de alcohol	Unidad	4.00	2	2.00
Tijeras	Unidad	2.00	1	2.00
Marcadores	Unidad	2.00	3	6.00
Mandiles	Unidad	8.00	1	8.00
Barras magnéticas	Unidad	1.00	3	0.12
Desinfectante	l	1.00	4	4.00
Jabón líquido	l	2.50	1	2.50
Mascarilla	unidad	0.20	15	3.00
Guantes	Par	0.65	12	7.80
Hojas de bisturí	unidad	0.20	300	60.00
Papel absorbente	paquete	1.00	5	5.00
Papel aluminio	paquete	4.00	2	8.00
Rolopac	paquete	3.20	2	6.40
Cinta autoclavable	Roll	10.00	1	10.00
Fundas	unidad	0.01	100	1.00
Subtotal				352.02

Materiales de Campo				
Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Semilla Quilotoa	kg	0.90	1	0.90
Semilla Clipper	kg	0.90	1	0.90
Semilla EMIR	kg	0.90	1	0.90
Semilla I5	kg	0.90	1	0.90
Macetas	unidad	2.50	50	125
Urea	kg	0.55	1	0.55
Vitavax 300 ®	kg	23.00	1	23.00
Subtotal				153.05

Materiales de Oficina				
Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Tinta de impresión	Toner	10.00	3	30.00
Material fotográfico	Unidad	20.00	4	80.00
Empastado del texto	Unidad	10.00	8	80.00
Copias	Unidad	0.03	500	15.00
Subtotal				237.00

Rubro	Unidad	Precio Unitario (USD)	Cantidad	Total (USD)
Tesista	Mes	330	12	3960.00
Subtotal				3960.00

SUBTOTAL		6322.00
Imprevistos 5%		316.00
TOTAL		6638.00

RUBRO	COSTO	RESPONSABLE
Tesista	3960.00	Tesista
Reactivos para cultivo <i>in vitro</i>	2219.59	INIAP/AIEA
Materiales de laboratorio	352.02	INIAP
Material de Campo	153.05	
Materiales de oficina	237.00	

8. Bibliografía

Afza, R; Shen, M; Zapata, F; Xie, J; Khamis, H; Lee, K; Bobadilla, E; Kodym, A. 1999. Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency. *Plant Science*. p.153, 155-159.

Baenzinger, P; Kudirka, D; Schaeffer, G. W; Lazar, M. 1984. The significance of doubled haploid variation. En: Gustafson, J. P. (ed.). *Gene manipulation in plant improvement. Memorias de un simposio, Universidad de Missouri. Plenum Press, New York.* p.385-414

Bollon, H; Raquin, C. 1987. Haplomethods: A tool for crop improvement. En: Horisberg, M. (ed.). *Nestlé research news. Lausanne, Suiza.* p.81-91.

Brifht S,W; Jones M,G. 1985. *Cereal Tissue Cell Culture*. En: Martinues Nijhoff (ed.). Kluwer Academia Publishers Group. Boston. p.383

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1984. Cultivo de anteras el camino mas corto para obtener variedades mejoradas. *Arroz en las Américas. Cali, Colombia.* p.1-5

Cistué, L; Ramos, A; Castillo, AM; Rcmagosa, I. 1994. Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. *Plant Cell Rep* 13. p.709-712.

Cistué, L; Ziauddin, A; Simion, E; Kasha, KJ. 1995. Effects of culture conditions on isolated microspore response of barley cultivar Igri. *Plant Cell Tiss Org Cult.* p.42: 163-169.

Cistué, L; Ramos, A; Castillo, AM. 1999. Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. *Plant Cell Tiss Org Cult.* C.55:p.159-166

Chahal, G.S; Gosal, S.S. 2002. *Principles and Procedures of Plant Breeding. Biotechnological and Conventional Approaches.* Alpha Science International Ltd (ed.). Harrow, U.K. p.604.

Chávez, J.L. 1995. *Mejoramiento de plantas 2: Métodos específicos de plantas alogamas.* Trillas.(ed.) UAAAN. México. p.143.

Chicaiza, O; Rivadeneira, M; Coronel, J; Ponce, L; Paredes, F; Abad, S; 2003. *Iniap-Cañari 2003 e Iniap Quilotoa 2003: Nuevas Variedades de Cebada para la Sierra Centro-Norte Ecuatoriana.* INIAP. Quito, Ecuador.

Dodds, J.H; Roberts, LW. 1985. *Experiments in Plant Tissue Culture.* 2ed. Cambridge University Press. London. p.157– 171.

Galeon. 2003. *Botánica: Informe sobre la cebada.* (en línea). Consultado 07 nov. 2009. Disponible en <http://infocebada.galeon.com/botanica.htm>

Giménez, J; Tomaso, J. 2002. *Mejoramiento Genético: Producción de Haploides Duplicados. Cultivares Resistentes en Cebada Cervecera.* Laboratorio de Tejidos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Bordenave, Buenos Aires, Argentina.

- Hu, H. 1986. Variability and gamete expression in pollen-derived plants in wheat. En: Hu, H. y Yang, H. (eds.). Haploids of higher plants in vitro. China Acad. Publishing, Beijing. p. 67-78.
- INEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos). 2002. Encuesta Nacional de Superficie y Producción Agropecuaria. p.63
- Kasha, K.J; Maluszynski, M. 2003. Doubled Haploid Production in Crop Plants: Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. Maluszynski, M. *et al.* (eds.). Kluwer Academic Publishers. London. p. 1-4
- Lentini, Z; Martinez, C; Roca, R. 1997. Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. Ilus. (Publicación CIAT: 293). p.57
- Mendez, H. 2004. Cultivo de Cereales. (en línea). Consultado 13 may 2009. Disponible en [http:// www.sagpya.mec.gov](http://www.sagpya.mec.gov).
- Núñez; Roca; Martínez. 1989. Cultivo de Anteras en el mejoramiento del arroz.: Ed. Colombia S.A. Colombia. p. 33-39.
- Polci, P; Conti, V; Miranda, Rubén 2000. Métodos para acelerar programas de mejoramiento e identificación varietal (en línea). Consultado 30 jun. 2009. Disponible en <http://www.parte4cap1.pdf>
- PlantPro. 2006. Morfología de la Cebada (en línea) Consultado 20 Sep. 2009. Disponible en http://www.plantprotection.hu/.../barley/morf01_bar.htm
- Prontuario de Agricultura. 2005. Cultivos Agrícolas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Mundi-Prensa (Ed.). Madrid,Barcelona.
- Rivadeneira M., Ponce, L., Abad, S., Paredes, F. 2003. Guía practica para los agricultores cebaderos de la sierra ecuatoriana. INIAP. Quito,Ecuador.
- Rush M, C; Shao, Q .1996. Rice improvement through cell and tissue culture. International Rice Research strategies for the further. M.C.Rush and Q..Shao (eds.) International Rice Research Institute. Los Banos, Phillippines. p.31-40.
- Simarro, J; Nuez, F. 2002. Obtención de plantas doble haploides androgénicas mediante cultivo in vitro de anteras de maíz (en línea). Valencia, ES. COMAV. Consultado 30 jun. 2009. Disponible en <http://www.ivia.es/mejora2006/apdf/Solanaceas/019cultivoanterasSeguiSimarro%20v%20Nuez%2002.pdf>
- Szarejko, I. 2003. Anther culture for doubled haploid in barley (*Hordeum vulgare* L.) Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. Maluszynski, M. *et al.* (eds.). Kluwer Academic Publishers. London.

Szarejko, I; Kasha, K.J. 1991. Induction of anther culture derived doubled haploids in barley. An introduction. Maluszynski, M. et al. (eds.). Kluwer Academic Publishers. London. Cereals Res. Commun. 19(1-2): p.219-237.

Thomas, W; Forster B.P; Gertsson, B. 2003. Doubled Haploid Production in Crop Plants: Double haploids in breeding. Maluszynski et al. (eds). Kluwer Academic Publishers. London. p. 337-349.

Villacrés, E. 1996. La cebada un cereal nutritivo. INIAP. Quito, Ecuador.

Weiguo, L; Ming, Y; Polle, E; Konzak, F. 2002. Highly Efficient Doubled-Haploids Production in Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Induced Microspore Embryogenesis. Northwest Plant Breeding Company. Published in Crop Science. Vol2.

Zohary D; Hopf, M. 1988. Domestication of plants in the old world. Clarendon, Oxford.

9. Anexos.

ANEXO 1

Composición del Medio de inducción BAC3 adicionado de Ficoll

Componentes del Medio	Medio de Inducción BAC3 (mg/L)
Macro elementos	
KNO ₃	2600
NH ₄ NO ₃	200
(NH ₄) ₂ SO ₄	400
KH ₂ PO ₄	170
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	150
CaC ₁₂ x 2H ₂ O	600
MgSO ₄ x 7H ₂ O	300
Fuente de Hierro	
FeNa ₂ EDTA	40
Micro sales	
HBO ₃	5
MnSO ₄ x4H ₂ O	5
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2
KI	0.8
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025
Otros componentes Inorgánicos	
KHCO ₃	50
AgNO ₃	10
Vitaminas	
myo-Inositol	2,000
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	1
Acido Nicotínico	0.5
Acido Ascórbico	1
Ácidos Orgánicos	
Ácido cítrico	10
Ácido Piruvico	10
Carbohidratos	
Maltosa	60,000
Reguladores de Crecimiento	
NAA	2
BAP	1
Otros componentes Orgánicos	
Caseína Hidrolizada	300
Ficoll	300,000
pH	6.2

Fuente: (Szarejko, 2003)

ANEXO 2

Composición del Medio de inducción BAC3 adicionado de PEG (polyethylene glycol)

Componentes del Medio	Medio de Inducción BAC3 (mg/L)
Macro elementos	
KNO ₃	2600
NH ₄ NO ₃	200
(NH ₄) ₂ SO ₄	400
KH ₂ PO ₄	170
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	150
CaC ₁₂ x 2H ₂ O	600
MgSO ₄ x 7H ₂ O	300
Fuente de Hierro	
FeNa ₂ EDTA	40
Micro sales	
HBO ₃	5
MnSO ₄ x4H ₂ O	5
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2
KI	0.8
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025
Otros componentes Inorgánicos	
KHCO ₃	50
AgNO ₃	10
Vitaminas	
myo-Inositol	2,000
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	1
Acido Nicotínico	0.5
Acido Ascórbico	1
Ácidos Orgánicos	
Ácido cítrico	10
Ácido Piruvico	10
Carbohidratos	
Maltosa	60,000
Reguladores de Crecimiento	
NAA	2
BAP	1
Otros componentes Orgánicos	
Caseína Hidrolizada	300
PEG	600,000
pH	6.2

ANEXO 3

Composición del Medio de inducción BAC3 adicionado de Gelrite

Componentes del Medio	Medio de Inducción BAC3 (mg/L)
Macro elementos	
KNO ₃	2600
NH ₄ NO ₃	200
(NH ₄) ₂ SO ₄	400
KH ₂ PO ₄	170
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	150
CaCl ₂ x 2H ₂ O	600
MgSO ₄ x 7H ₂ O	300
Fuente de Hierro	
FeNa ₂ EDTA	40
Micro sales	
HBO ₃	5
MnSO ₄ x4H ₂ O	5
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2
KI	0.8
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025
Otros componentes Inorgánicos	
KHCO ₃	50
AgNO ₃	10
Vitaminas	
myo-Inositol	2,000
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	1
Acido Nicotínico	0.5
Acido Ascórbico	1
Ácidos Orgánicos	
Ácido cítrico	10
Ácido Piruvico	10
Carbohidratos	
Maltosa	60,000
Reguladores de Crecimiento	
NAA	2
BAP	1
Otros componentes Orgánicos	
Caseína Hidrolizada	300
Gelrite	300
pH	6.2

ANEXO 4

Composición del Medio de regeneración BAC3

Componentes del Medio	Medio de Regeneración BAC3 (mg/L)
Macro elementos	
KNO ₃	2600
NH ₄ NO ₃	200
(NH ₄) ₂ SO ₄	400
KH ₂ PO ₄	170
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	150
CaC ₁₂ x 2H ₂ O	600
MgSO ₄ x 7H ₂ O	300
Fuente de Hierro	
FeNa ₂ EDTA	40
Micro sales	
HBO ₃	5
MnSO ₄ x4H ₂ O	5
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2
KI	0.8
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025
CoC ₁₂ x 6H ₂ O	0.025
Otros componentes Inorgánicos	
KHCO ₃	50
AgNO ₃	10
Vitaminas	
myo-Inositol	100
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HC1	1
Acido Nicotínico	0.5
Acido Ascórbico	1
Ácidos Orgánicos	
Ácido cítrico	10
Ácido Piruvico	10
Carbohidratos	
Sucrosa	30,000
Reguladores de Crecimiento	
IAA	0.5
Kinetina	0.5
Otros componentes Orgánicos	
Caseína Hidrolizada	300
Gelrite	3,000
pH	6.2

Fuente: (Szarejko, 2003)