



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
Campo Experimental Villarino C.C. N° 14
S2125ZAA | Zavalla | Santa Fe | Argentina
Tel/Fax: +54 0341 497-0080
www.fcagr.unr.edu.ar
agro@unr.edu.ar



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Título

“Evaluación *in vitro* de materiales de algodón *Gossypium hirsutum* L. en relación a la capacidad de regeneración y respuesta a estrés abiótico.

Análisis de variedades comerciales de INTA, líneas avanzadas”

Ariela Judith González

Tesis para optar al título de Magister en Genética Vegetal

Director: Dra. Dalia Lewi

Co-Director: (Ing. Agr. MSc.) Alicia Gonzalez

2015

“Evaluación *in vitro* de materiales de algodón *Gossypium hirsutum* L. en relación a la capacidad de regeneración y respuesta a estrés abiótico.

Análisis de variedades comerciales de INTA, líneas avanzadas”

Ariela Judith González

Licenciada en Biotecnología-Universidad Nacional del Litoral

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Genética Vegetal en el área de Mejoramiento Genético, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en Investigaciones llevadas a cabo en las Estaciones Experimentales INTA Sáenz Peña Chaco, durante el período 2015 bajo la dirección de la Dra. Dalia Lewi.

Maestreado: Ariela Judith González



Director: Dra. Dalia Lewi



Co-director: (Ing. Agr. MSc.) Alicia Gonzalez



AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la institución de INTA por el financiamiento de la maestría permitiéndome el desarrollo personal y profesional, y en nombre de la Institución, al director saliente, Ing. Aldo Wutrich y al entrante, Ing. Fabio Wys por el apoyo recibido en todas las gestiones realizadas.

A la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Agraria de la Universidad Nacional de Rosario y a los excelentes profesores de Maestría en Genética Vegetal por sus enseñanzas y calidad humana, la cual destaco y pretendo, sean mi referencia en la vida.

A la Dra. Dalia Lewi por su orientación, enseñanza y paciencia en la conducción del trabajo de tesis, como así también a sus colaboradoras Mariana Turica y Laura Maskin, por ayudar a dar el puntapié inicial.

A la Ing. Alicia Gonzalez de quien he aprendido enormemente la disciplina estadística y sin cuyos aportes, este trabajo no podría haberse concluido.

A mis compañeros de laboratorio, con quienes he trabajado incansablemente en el desarrollo práctico de esta tesis; Fernando Guarde y Ramón Solís.

A la Ing. Julieta Rojas y a la Lic. Marina Buschiazzo, por ayudarme de forma desinteresada y con un gran gesto amistad al desarrollo de esta maestría y en particular, por sus aportes disciplinares en la construcción de este trabajo de tesis.

A mi compañera de maestría y de la vida, Mónica Spoljaric, quien aportó desde su sabiduría y paciencia a lograr alcanzar las metas.

A quienes nos abrieron las puertas para trabajar en el laboratorio de Fitopatología, con especial atención al conductor del área, el Ing. Agr. Iván Bonacic.

A mis compañeros de la sección de Mejoramiento Genético, con quienes comparto el día a día, de quienes aprendo y con quienes construimos un lugar de contención y desarrollo profesional. Destaco especialmente el accionar de la jefa del

grupo, Silvia Ibaló, con quien podemos contar siempre y de quien recibimos el incentivo para crecer y aprender.

A Graciela Zafra, por su apoyo incondicional y trabajo desinteresado.

A Graciela Guevara, sin cuya lupa no hubiera podido comenzar la investigación, por darle la luz a este trabajo.

Por último, y no menos importante, a mi pequeña familia; Alejandro y Félix que son el motor de mi vida, por acompañarme en este y otros momentos de la vida, por permitirme faltar en momentos importantes, por brindarme amor todos los días y por hacer todo el esfuerzo para que hoy yo pueda concluir con un pequeño sueño personal.

“Esta tesis está dedicada a todos quienes
pensamos al algodón como un modo de
vida”

ABSTRACT

The cotton culture plays a crucial role in the global economy, whether at social level as in the manufacturing industry. Given the need of have high quality genotypes agronomic, able to regenerate *in vitro*, and with the intention of extending available variability for response to various abiotic stresses, INTA cotton genotypes were evaluated. It was found that Guazuncho 2 genotype was highlighted in the number of regenerated plants under Hemphill et al. (1998) protocol conditions. Porá and Guazuncho3 were which obtained the higher number of shoots per explant in Pathi and Tuteja (2013) and Morre et al. (1998) protocols when embryonic apexes were used as explants. Oro Blanco 2 was the most sensitive to stress caused by sodium chloride and Porá Ité was the most affected in water stress essays.

RESUMEN

El algodón juega un rol crucial en la economía global, ya sea a nivel social como en la industria de manufactura. Dado que se necesita contar con genotipos de alta calidad agronómica, capaces de regenerar *in vitro*, y con la intención de ampliar la variabilidad disponible para la respuesta a distintos estreses abióticos, se evaluó los genotipos de algodón de INTA. Se encontró que el genotipo Guazuncho 2 se destacó en el número de plantas regeneradas, bajo las condiciones del protocolo de Hemphill et al. (1998) y Porá y Guazuncho 3 fueron las que tuvieron mayor número de brotes por explante en los protocolos de Pathi y Tuteja (2013) y Morre et al. (1998) cuando se usaron ápices embrionarios como explante. Oro Blanco 2 mostró ser la más sensible a estrés por cloruro de sodio y Porá Ité fue la más afectada en ensayos de estrés hídrico.

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en la revista “Ciencia y Tecnología de los Cultivos Industriales: Algodón” bajo el título “Respuesta in vitro de ápices meristemáticos de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) como alternativa de regeneración”. Colección Investigación, Desarrollo e Innovación. Ediciones INTA. Año 5. N° 8. 2015. ISSN: 1853-7677.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 IMPORTANCIA EN EL TEMA	1
1.2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
1.2.1 Historia del algodón como cultivo	3
1.2.2 Importancia Económica	5
1.2.3 Importancia en Argentina	7
1.2.4 Historia del desarrollo de variedades en Argentina	8
Desarrollo de variedades de INTA	9
1.2.5 Descripción botánica	10
1.2.6 Crecimiento y desarrollo	11
1.2.7 Conceptos generales de fisiología del estrés en plantas	15
La salinidad	19
Respuesta general de las plantas a la salinidad	19
Tolerancia del algodón a la salinidad	20
Limitaciones hídricas	21
Efectos de las altas temperaturas sobre la producción de algodón	21
1.2.8 El algodón transgénico	22
La ingeniería genética	22
El cultivo in vitro	23
Transformación genética en algodón	24
La regeneración de plantas de algodón	24
Explantos y meristemas	26
1.3 OBJETIVOS	28
1.3.1 Objetivo General	28
1.3.2 Objetivos Específicos	28
1.3.3 Hipótesis	28
2. MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1 Material Vegetal	29
2.1.1 Elección del material	29
2.2 Tratamiento sobre las semillas	30
2.2.1 Deslintado de semillas	30

2.2.2 Desinfección	31
2.3 Siembra de las semillas	31
2.4 Protocolos y medios de cultivo para ápices y meristemas	32
2.4.1 Protocolos para ápices embrionarios	34
Protocolo de Hemphill et al. (1998)	37
Protocolo de Morre et al. (1998)	37
Protocolo de Pathi y Tuteja (2013)	38
2.4.2 Protocolos de yemas axilares	39
Protocolo de Agrawal et al. (1997)	39
2.4.3 Protocolos ensayados sobre ápices caulinares	40
Protocolo de Gould y Magallanes- Cedeno (1998)	41
Protocolo de Bazargani et al. (2011)	42
2.5 Evaluación de la respuesta in vitro	42
2.6 Estrés Abiótico	44
Condiciones de cultivo bajo estrés abiótico	44
2.7 Diseño estadístico	46
3. RESULTADOS	47
3.1 Protocolos para ápices embrionarios	47
3.1.1 Protocolo de Hemphill et al. (1998)	47
3.1.2 Protocolo de Morre et al. (1998)	57
3.1.3 Protocolo de Pathi y Tuteja (2013)	67
3.1.4 Comparación entre los protocolos de ápices embrionarios	78
3.2 Protocolos para yemas axilares	96
3.2.1 Protocolo de Agrawal et al. (1997)	96
3.3 Protocolos para ápices caulinares y yemas axilares	97
3.3.1 Protocolo de Gould y Magallanes-Cedeno (1998)	97
3.3.2 Protocolo de Bazargani et al. (2011)	98
3.4 Estrés abiótico	98
3.4.1 Estrés salino impuesto sobre semillas de algodón	99
3.4.2 Estrés salino sobre explantes de hipocótilos	102
3.4.3 Estrés hídrico impuesto sobre semillas de algodón	103
4. DISCUSION	111
4.1 Ensayos de regeneración sobre ápices embrionarios	111
Consideraciones preliminares	111
4.1.1 Protocolo de Hemphill et al. (1998)	112

4.1.2	Protocolo de Morre et al. (1998)	117
4.1.3	Protocolo de Pathi y Tuteja (2013)	122
4.1.4	Comparación entre los protocolos de ápices embrionarios	126
	Consideraciones finales	131
4.2	Ensayos de regeneración sobre ápices caulinares yemas axilares	134
4.3	Estrés abiótico	137
4.3.1	Estrés salino	137
4.3.2	Estrés hídrico	142
5.	CONCLUSIONES	148
	Bibliografía	151
	ANEXO I	164
	ANEXO II	189

Listado de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

AG: ácido giberélico

ANA: ácido naftalen acético

BAP: 6- bencil amino purina

CA: carbón activado

CAA: Cámara Algodonera Argentina

CM: cuadrado medio

CV: coeficiente de variación

DCA: diseño completamente aleatorizado

DDE: días después de la emergencia

DE: desvío estándar

EC: conductividad eléctrica

ECe: conductividad eléctrica del extracto de suelo

EEA: Estación Experimenta Agropecuaria

ELS: extra-long staple (fibra extra larga)

F: estadístico de Fisher

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FV: fuente de variación

GL: grados de libertad

H: estadístico de la prueba de Kruskal Wallis

HAR: *Hirsutum, Arboreum, Raimondii*

Has.: hectáreas

HCl: ácido clorhídrico

IBA: ácido indol butírico

ICAC: International Cotton Advisory Committee

IE: índice económico

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

2iP: N-6-(2-isopentenil) adenina

IRCT: Institute de Reserche du coton et des Textile Exotiques

KIN: kinetina

LSD: least significant difference (diferencia minima significativa)

M*G: medio por genotipo

MS: Murashige and Skoog

NaCl: Cloruro de sodio

NEA: noreste argentino

Ns: no significativa

p: valor de probabilidad

SC: suma de cuadrados

SG: sin glándulas

SIIA: Sistema Integrado de Información Agropecuaria

SP: Sáenz Peña

TDZ: tidiazurón

W*: estadístico Shapiro-Wilks

1. INTRODUCCIÓN

1.1 IMPORTANCIA EN EL TEMA

El algodón juega un rol crucial en la economía global, ya sea a nivel social como en la industria de manufactura. Además de ser la columna vertebral de la industria textil, el algodón y sus productos también son alimento para ganado, aceite derivado de las semillas, fertilizantes y otros productos de consumo. El manejo, el procesamiento y la producción de varios productos derivados del algodón juegan un rol importante en la estructura social e industrial a nivel global.

El algodón se cultiva en un amplio rango de climas, desde zonas húmedas hasta zonas con déficit de agua (Gerik et al., 1996), no escapa a ser altamente susceptible al estrés biótico y abiótico, desde el momento en que se lo cultiva intensivamente. Por varias décadas, uno de los principales problemas de los sistemas agrícolas en ambientes áridos ha sido el incremento de la salinidad en el suelo, lo cual está asociado con la irrigación (Lin et al., 1997). Bajo estas condiciones adversas, si bien este cultivo es moderadamente tolerante a la salinidad, se han observado efectos en el rendimiento (Gerik et al., 1996). Si bien los programas de mejoramiento genético han realizado mejoras estables en las características agronómicas, no se cuenta con suficiente diversidad genética para futuras mejoras. Sin embargo, las técnicas de transformación genética han permitido ampliar la diversidad genética de las plantas a través de la expresión estable de genes foráneos de diversas fuentes, incluyendo bacterias. La introducción de genes foráneos dentro del algodón, mediado por *Agrobacterium* o por biobalística, involucra contar con un sistema eficiente de regeneración del tejido transformado (Haq, 2005).

Para la obtención de plantas transgénicas, la regeneración a través de embriogénesis somática es preferida sobre la organogénesis debido al probable origen en una sola célula del embrión somático (Merkle et al., 1995), reduciendo así los eventos de transformación quiméricos. Sin embargo, las técnicas eficientes para la regeneración *in vitro* de un gran número de plantas de algodón son limitadas cuando se comparan con otros cultivos importantes (Kumria et al., 2003b).

Aunque se han realizado progresos significativos, el algodón ha resultado uno de los cultivos más difíciles de regenerar *in vitro*. La dependencia del genotipo es uno de

los factores importantes que restringen la embriogénesis somática y la regeneración de plantas. Es hasta hoy que sólo un número limitado de cultivares puede ser inducido a producir embriones y regenerar plantas. Los genotipos que mejor responden son variedades modelo, especialmente los cultivares "Coker", que no son ampliamente cultivadas por los agricultores. Por lo tanto, el número de cultivares comerciales y líneas de germoplasma elite con mejores características agronómicas y calidad de fibra que pueden someterse a regeneración, son bajos (Sakhanokho et al., 2001). Además, la regeneración del algodón toma largos tiempos; se ha reportado la regeneración en 6 a 8 meses como el tiempo más corto (Mishra et al., 2003; Wang et al., 2006; Han et al., 2009; Haq, 2005).

Debido a que el éxito en la regeneración de algodón se ha observado en variedades Coker (Kumria et al., 2003a) y sus líneas relacionadas (Kumar et al., 1998; Saeed et al., 1997), el cultivo *in vitro* mediante embriogénesis somática resulta en un método estándar para la introducción de genes dentro de cultivares importantes comercialmente. El método involucra la transformación de cultivares Coker o sus líneas relacionadas para producir plantas homocigotas para los genes insertados y luego estos genes son transferidos a cultivares de importancia comercial a través de retrocruzamientos repetidos (Wilkins et al., 2004). Este procedimiento retrasa la liberación comercial de algodón transgénico varios años. Más aún, los productores se ven forzados a aceptar las pobres características agronómicas de las líneas Coker o sus relacionadas obsoletas, que inevitablemente quedan introgradadas en las variedades transgénicas junto al transgén de interés.

En virtud del incremento del algodón cultivado a nivel mundial, es imperativo encontrar genotipos con alta capacidad regenerativa, especialmente en variedades comerciales y líneas de pronta liberación. Se ha reportado que los cultivares de algodón que se utilizan en Argentina tienen poca o nula capacidad para iniciar el cultivo de células embriogénicas (Schroeder et al., 1994). No obstante, esta característica debe ser revisada con los genotipos actuales. La identificación de estos cultivares comerciales de algodón regenerables aceleraría el desarrollo de algodones transgénicos (Sakhanokho et al., 2001; Chen et al., 2008).

Además de la limitación genotípica, muchas plantas regeneradas a partir de callos de algodón han exhibido extensas anomalías fenotípicas y cambios citogenéticos (Stelly et al., 1989). Los daños genéticos inducidos en los callos se observaron comúnmente entre las plantas regeneradas. Estas anomalías podrían disminuirse si se evita el pasaje por la fase de callo, como es el caso del cultivo de ápices o meristemas. El cultivo de ápices caulinares es un método alternativo de

menor complejidad para obtener plantas, usando técnicas de cultivo *in vitro*, si se lo compara con el cultivo de embriones somáticos (Zhang et al., 2000). Un explante consistente en un ápice caulinar podría desarrollar además múltiples tallos directamente, sin un pasaje por el estado de callo, brindando de este modo la posibilidad de contar con múltiples blancos para la transformación genética y manteniendo la fidelidad del genotipo que podría perderse si mediara el estadio de callo (Srivatanakul et al., 2000). Esta técnica no asegura sin embargo la obtención de plantas enteras no quiméricas.

Planteada la necesidad de contar con genotipos de alta calidad agronómica, capaces de regenerar *in vitro*, y con la intención de ampliar la variabilidad disponible en relación a la respuesta a distintos estreses abióticos, se pretende abordar una evaluación en los materiales provenientes del Programa de Mejoramiento Genético de algodón de INTA.

1.2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.2.1 Historia del algodón como cultivo

El recuento del origen y domesticación del algodón es particularmente fascinante, dado que el “algodón” del mundo simultáneamente se refiere a cuatro especies del género *Gossypium* (Malvaceae) que fueron domesticadas independientemente para el mismo propósito. En cuatro regiones aisladas del denominado “Nuevo Mundo”, cuatro grupos de aborígenes descubrieron que los pelos gruesos que recubren las semillas de *G. arboreum*, *G. barbadense*, *G. herbaceum* y *G. hirsutum* podían ser usados. Aunque no es seguro el uso original de los pelos de estas semillas, sus propiedades mecánicas únicas los hacen ideales como fibra textil. Hoy, proporcionan el cultivo textil más importante en el mundo, y, como subproducto, proveen un recurso importante de aceite y alimentos proteicos a partir de las semillas. Como resultado de la utilización de algodón como fibra textil, las cuatro especies de algodón se han extendido desde el sitio original hacia casi todas las regiones del mundo. *Gossypium hirsutum*, la especie que actualmente domina el cultivo de algodón mundial provee alrededor del 90% del cultivo anual y se ha extendido más allá de sus sitios de origen en Centro América hacia alrededor de 40 países.

La disposición imprevista del algodón, sin embargo, palidece en comparación a los cambios profundos que cada especie experimentó bajo domesticación. La selección humana transformó arbustos o árboles pequeños con pocas semillas pequeñas e impermeables y pelos gruesos, a plantas anuales compactas con pelos largos, semillas que germinan fácilmente, llevando una capa gruesa de fibras largas, fuertes y blancas de algodón. Estos procesos comenzaron con la domesticación original; de esta manera, creció la importancia del algodón como cultivo, lo que, por otra parte, intensificó la selección hecha por el hombre. Consecuentemente, cada especie, como la conocemos hoy, es el producto de la “evolución bajo domesticación” (Stephens, 1967). Aunque cada especie se presentó por medio del proceso natural de evolución, su morfología, composición genética y rasgos indígenas han sido significativamente alterados por la actividad humana. La identidad de los progenitores salvajes de *G. barbadense*, *G. herbaceum* y *G. hirsutum* aún son inciertas y todas son raras en la naturaleza. El antecesor salvaje de *G. arboreum* probablemente ha desaparecido. Las que quedan mayormente son poblaciones salvajes o comensales, las cuales han sido afectadas por la manipulación humana y sus derivados modernos anuales.

La historia del algodón comienza con la evolución del género, quizá entre 10 a 20 millones de años atrás (Stephens, 1967).

Durante el sobrevenir del milenio pasado, esta entidad original irradió en varios centros geográficos de diversidad, incluyendo África, Arabia, Australia y Centro América. Las dos especies de algodón provenientes del considerado “Viejo Mundo”; *G. arboreum* y *G. herbaceum*, se presentaron desde el conjunto de genes de Arabia/África, y las otras dos especies; *G. barbadense* y *G. hirsutum* se desarrollaron en el llamado “Viejo Mundo” (entre los siglos XIV-XV). Entre sus distinciones, las áreas geográficas no son superpuestas y cada especie independientemente atrajo la atención de cuatro grupos diferentes de domesticadores primitivos. Así la historia del algodón se conforma de cuatro historias individuales, pero no independientes.

La historia del algodón debería incluir la mención de las reuniones significativas biológicamente que han tenido lugar. La primera ocurrió anteriormente a la domesticación de alguna de las especies de algodón, cuando un genoma **A** del denominado “Viejo Mundo”, hibridó con la especie de genoma **D** del llamado “Nuevo Mundo”. Estos eventos condujeron a la evolución de una nueva línea tetraploide, que eventualmente dio lugar a cinco taxones, de los cuales dos fueron domesticados. Bajo domesticación, las dos especies de algodón del “Viejo Mundo”, *G. arboreum* y *G. herbaceum* entran en contacto otra vez, al igual que las dos especies de algodón del

considerado “Nuevo Mundo”, *G. barbadense* y *G. hirsutum*, como difusión del germoplasma mediado por el hombre. Durante este período, la introgresión probablemente ocurrió hasta el punto en que alguna discontinuidad morfológica se presentó, así las especies divergentes fueron obscureciendo. Más recientemente, la introgresión ínter específica deliberada, asociada con los modernos cultivares “elite” han alterado la constitución genética de cada una de las cuatro especies (Stephens, 1967).

1.2.2 Importancia Económica

La producción de algodón y la industria textil son de vital importancia para la sustentabilidad económica, tanto de países desarrollados como en vías de desarrollo. Es uno de los cultivos más importantes debido a que es un “commodity” que se encuentra ampliamente distribuido en más de cien países, ocupando el 2% de la tierra arable mundial. Esto lo constituye en el cultivo más significativo, luego de los granos que incluyen el cultivo de soja (Wekelyn y Chaudhry, 2010).

La producción de algodón mundial se ha cuadruplicado en las últimas seis décadas, pasando de 7 millones de toneladas en el 1950/51 a 27 millones de toneladas en el 2004/05, con una tasa de crecimiento promedio de 2,5% por año (290.000 toneladas por año) (Wekelyn y Chaudhry, 2010).

Durante los primeros cinco años del siglo XXI, se observó un proceso acelerado de expansión del cultivo a nivel mundial, lo que coincidió con la rápida adopción de cultivares de algodón genéticamente modificados. Sin embargo, en los últimos años, tanto en la producción como el consumo han ingresado en un período de crecimiento lento. Es destacable consignar que en la campaña 2007/08 se utilizaron variedades de algodón genéticamente modificadas en el 50% del área de siembra mundial.

En las últimas cinco décadas los precios han ido en descenso, debido a los avances tecnológicos y competitivos con las fibras sintéticas como el poliéster. El algodón comparte la industria textil con otras fibras naturales y sintéticas, ocupando un 70% en la década del 50 y 40% en el 2000/01 (ICAC, 2009). El consumo de fibras de algodón está muy relacionado con los aspectos intrínsecos del país en cuestión (I.E., ingresos per cápita, historia y preferencia de consumo de algodón, publicidad, tendencias de moda, etc.). En el caso de los Estados Unidos, el consumo medio anual de algodón per cápita es de 16,1 kg, mientras que la media mundial es de 3,7 kg (Wakelyn y Chaudhry, 2010).

Más de 100 millones de unidades agrícolas familiares están en relación directa con la producción de algodón (FAO, 2002). Teniendo en cuenta la mano de obra familiar, contratada para trabajos en el campo, y los trabajadores en general (transporte, desmote, embalaje y almacenamiento), el número de personas supera los 250 millones a nivel mundial (ICAC, 2009). A esto hay que sumarle las industrias relacionadas con los consumos agrícolas, las maquinarias y equipamiento, los procesos de semilla y la manufactura textil. En el 2009/10 se produjeron 22 millones de toneladas en el mundo, con un precio promedio de USD 1,72 por kilogramo de fibra, haciendo un total de USD 37 mil millones.

En términos generales, la región algodonera mundial es muy extensa. El algodón es principalmente producido entre las latitudes 37° Norte y 32° Sur, pero también se llega a cultivar más al norte hasta 43° N en Asia central y 45° N en China (Wakelyn, 2007).

Alrededor del 80% de todo el algodón es producido en seis países. China es el principal productor del mundo con 6.700.000 toneladas, seguido por la India (6.371.000 toneladas), los Estados Unidos (2.811.000 toneladas), Pakistán (2.076.000 toneladas), Brasil (1.644.000 toneladas) y Uzbekistán (920.000 toneladas) (ICAC, 2014). En 2013/14, China e India representaron poco más de la mitad de la producción mundial de algodón, mientras que Estados Unidos, Pakistán, Brasil y Uzbekistán representó un adicional de 29% (ICAC-FAO, 2015).

Mientras que la superficie mundial dedicada a la producción de algodón se ha mantenido relativamente estable durante los últimos tres decenios, se han producido cambios regionales. Australia, China, África francófona y el sur de Asia han experimentado un aumento significativo de la superficie de cultivo de algodón, mientras que la superficie cultivada se ha reducido en un 40-50% en Brasil y Estados Unidos. El advenimiento de las nuevas tecnologías de producción y mejores prácticas de gestión ha dado lugar a un aumento de casi el 100% de los rendimientos globales promedio en los últimos 30 años, de 411 kg/ha en 1980/81 a 790 kg/ha de fibra de algodón en 2013/14 (ICAC, 2014).

Con respecto a los países consumidores de algodón, China, India y Pakistán mantienen el liderazgo en ese aspecto. Sin embargo, han aparecido nuevos actores que no necesariamente producen la fibra, sino que la importan para la manufactura textil, como el caso de los países del sudeste asiático: Indonesia, Vietnam, Tailandia y Taiwán.

1.2.3 Importancia en Argentina

En Argentina, la mayor producción algodonera del país se concentra en las provincias de Chaco, Santa Fe, Santiago de Estero y Formosa, y en menor medida, en las provincias de Salta, Corrientes, Catamarca, Córdoba, Entre Ríos y San Luis.

Históricamente, la producción de algodón en Argentina ha sido un motor dinamizador del sector primario, el sector industrial y los servicios relacionados. Sin embargo, su tendencia de producción ha variado notablemente durante las diferentes décadas, en la campaña de 1997/98 se logró un record histórico de producción, alcanzando una superficie máxima de 1.133.500 has. a nivel nacional, a partir del cual comenzó un período de disminución acelerada de la superficie sembrada, llegando a una superficie mínima de 160.000 has. en la campaña de 2002/03 (Figura 1).

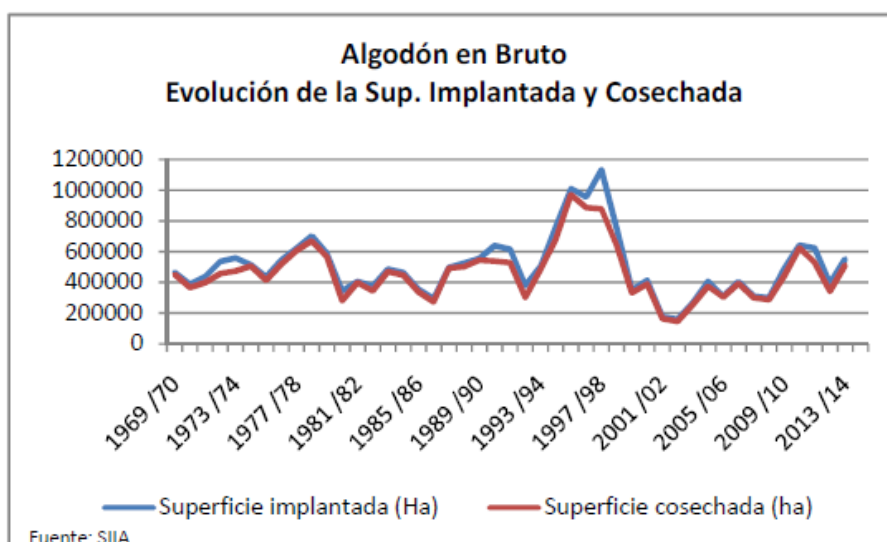


Figura 1. Estadísticas del sector Primario de la Cadena Algodonera Argentina- Centro Regional Chaco Formosa. INTA EEA Sáenz Peña. Fuente: Sistema Integrado de Informatización Agropecuaria (SIIA) del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.

Son varios los motivos que desalentaron la producción de algodón, entre los que se citan: precios desfavorables, competencia con la soja, la producción de eventos climáticos adversos y el avance del picudo del algodonero (*Anthonomus grandis*). Sin embargo, en los últimos cinco años se ha incrementado notablemente el área sembrada. Entre los factores alentadores se citan: la expansión de un nuevo sistema

de siembra denominado de surcos estrechos y altas densidades que logró estabilizar significativamente la producción, el desarrollo de máquinas cosechadoras de tipo “stripper” de bajo costo de adquisición y mantenimiento, y mejores precios (Paytas, 2010).

La principal provincia productora es Chaco, seguida por Santiago del Estero y Santa Fe (Figura 2).

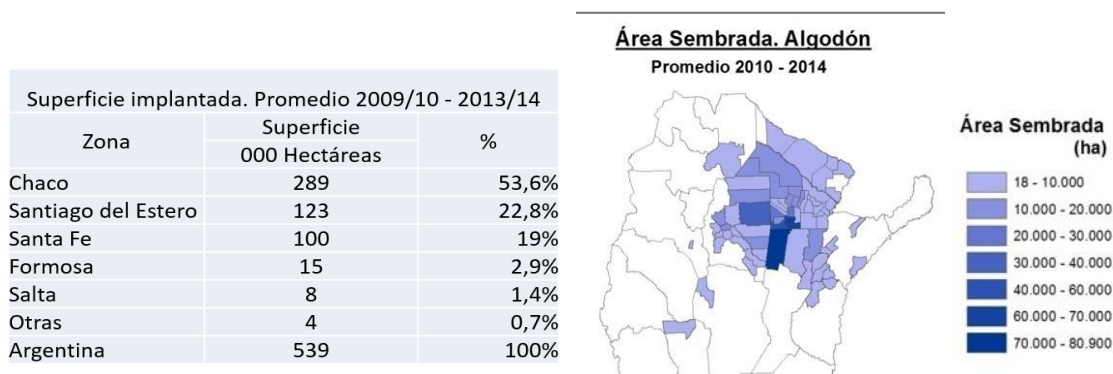


Figura 2. Promedio de siembra en Argentina durante los años 2010 y 2014. Área Sembrada. Quirolo, 2015.

En Argentina, en las últimas campañas algodonereras, los rendimientos medios por hectárea, se incrementaron significativamente. Promedio 2004-2014: Bruto 1568 kg/ha, fibra 481kg/ha. Promedio 2010-2014: Bruto 1723 kg/ha, fibra 510 kg/ha (Datos de la Cámara Algodonera Argentina (CAA) y del Sistema Integrado de Informatización Agropecuaria (SIIA)).

Los rendimientos de algodón en bruto (cosechado sin procesos posteriores de separación de fibras) en la Argentina se encuentran alrededor de 1200 kg/ha. Considerando un rendimiento de desmote de 33%, se obtiene una media de 396 kg/ha; dicho valor se encuentra por debajo de la media mundial (750 kg/ha).

1.2.4 Historia del desarrollo de variedades en Argentina

En 1923 se crea la Chacra Algodonera Oficial en Sáenz Peña, Chaco, por el Ministerio de Agricultura de la Nación (MAGN), recibiendo el nombre de Estación Experimental Algodonera iniciando el programa de Experimentación y Fomento del cultivo en el año 1927. En esta época, las actividades estaban centradas en la captación, selección y ensayos comparativos de variedades introducidas

principalmente de Estados Unidos de América, para determinar los genotipos de mejor adaptación al medio. Como consecuencia, a fines de la década de 1920 se cultivaba el algodón *Tipo Chaco*, que era una población derivada de cruzamientos naturales a campo y mezclas de semillas de desmotadoras de distintas variedades introducidas.

Con la creación de la Junta Nacional del Algodón, en 1935, se da inicio al reemplazo de la ya decadente población *Tipo Chaco* por sucesivas selectas derivadas de materiales *Deltapine*, *Stoneville* y *Coker* en la región de secano (NEA) y *Acala* y *Coker Wilds* en el área de regadío (NOA).

- **Desarrollo de variedades de INTA**

Los trabajos de mejoramiento iniciados a partir de 1924 se tradujeron en una mayor uniformidad de plantas, aumento de rendimiento y porcentaje de fibra en el desmote. A partir de 1956 con la creación y el desarrollo del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), y más precisamente con la puesta en marcha del Programa Algodón del INTA, se pone énfasis en el mejoramiento genético del algodón, etapa que llega hasta nuestros días.

En 1956, la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Sáenz Peña emitió la primera variedad nacional lograda a partir de un cruzamiento inter-varietal: *SP Toba INTA*. Hasta entonces todas las selectas obtenidas provenían de re-selecciones sobre variedades introducidas. Se inició así una etapa de crianza, cruzamientos y selecciones, en la que se logró adaptar diferentes materiales a la región chaqueña y se integraron los mejores genotipos al “*germoplasma base*” para un posterior desarrollo de líneas. Otras variedades liberadas fueron *SP M 58 INTA* (1958) y *Guaycurú INTA* (1967).

A partir de 1969, se utilizó la combinación inter-específica *H.A.R.* (*G. hirsutum* L.; *G. arboreum* L.; *G. raymondi* Ulbrich) desarrolladas por el IRCT (*Institute de Reserche du Coton et des Textiles Exotiques*). La primera variedad obtenida de este material fue *Chaco 510 INTA*, liberando además otras variedades como *Mocoví INTA* (1975) y *Mataco INTA* (1983).

Con la finalidad de combinar la precocidad y la calidad de fibra superior de la variedad *Chaco 510 INTA* con el elevado potencial de producción de la variedad paraguaya *Reba P 279*, se inició a partir de 1974 el desarrollo de nuevo germoplasma que culminó con la obtención y difusión de las variedades *Guazuncho INTA* (1982),

Quebracho INTA (1982) y *Porá INTA* (1982), como así también *Guazuncho 2 INTA* (1989), *Gringo INTA* (1989), *Chaco 520 INTA* (1994), *Cacique INTA* (1994) y *Oro Blanco INTA* (1999). Más reciente se destacan *Guazuncho 3 INTA* (2004), *Chaco 530 INTA* (2004) y *Oro Blanco 2 INTA* (2004) (Poisson, 2002).

1.2.5 Descripción botánica

La planta de algodón es una dicotiledónea que pertenece al orden Malvales, a la familia Malváceas, a la tribu Gossypiae y al género *Gossypium* (Wendel et al., 2010).

Existen actualmente treinta y tres especies reconocidas que pertenecen al género *Gossypium*, de las cuales sólo cuatro han sido domesticadas con interés comercial: *Gossypium hirsutum* L., *Gossypium barbadense* L., *Gossypium arboreum* Vell. y *Gossypium herbaceum* L.

G. hirsutum es una especie tetraploide, desarrollada en Estados Unidos a partir del algodón nativo de México y América Central, e incluye a la mayoría de las variedades comerciales actuales de “*Upland cotton*” o algodón de fibra corta, lo que constituye casi el 99% del algodón bruto producido en el mundo. El largo de fibra de Upland varía desde 22 a 36 mm, y el micronaire (indicador de finura y madurez) varía desde 3,8 a 5,0.

G. barbadense es otra especie tetraploide, con orígenes en Sudamérica, caracterizada por producir las fibras más largas (más de 35 mm) y finas, con valor de micronaire menor a 4. Considerando su carácter extra largo o “*extra-long-staple*” (ELS), forma parte del 8% de la producción mundial. Incluye las variedades comerciales egipcias, americana/ egipcia y Sea Island. Egipto y Sudán son, actualmente, los principales productores de ELS en el mundo. “Pima” (como se llama a las ELS americanas/ egipcias) se produce en el Oeste de los Estados Unidos (principalmente en California y Arizona, sudoeste de Texas y Nuevo México), como también en Sudamérica.

Las otras dos especies de interés comercial, *G. arboreum* y *G. herbaceum* (ambas diploides) son asiática y europea respectivamente. Sus fibras son las más cortas y gruesas con un largo de 9,5 a 19 mm y un micronaire mayor a 6. Se encuentran actualmente cultivadas en países como India, Pakistán, Myanmar, Bangladesh, Tailandia y Vietnam.

El algodón es una planta perenne, pero se lo cultiva como anual en sistemas comerciales a través de prácticas de manejo agronómico. Se caracteriza por tener un hábito de crecimiento indeterminado (Hearn y Constable, 1984), con un desarrollo vegetativo y reproductivo que sigue patrones regulares y ordenados. Morfológicamente, las plantas de algodón presentan una raíz principal pivotante, y raíces secundarias que siguen una dirección más o menos horizontal (McMichel, 1986). Posee un tallo erecto con dos tipos de ramificaciones: i) la ramificación vegetativa, que sigue un patrón de desarrollo monopodial y ii) las reproductivas de carácter simpodial. Las hojas son pecioladas, de un color verde intenso, grandes y con los márgenes lobulados. La primera manifestación reproductiva visible se llama comúnmente pimpollo o botón floral. Las flores son dialipétalas, grandes solitarias y penduladas. El cáliz de la flor está protegido por tres brácteas. El aparato reproductor masculino está formado por un haz de estambres que rodean el pistilo. Se trata de una planta autógama. El fruto es una cápsula en forma ovoide con tres a cinco carpelos, que tiene seis a diez semillas cada uno. Las células epidérmicas de las semillas constituyen la fibra. La longitud de la fibra varía entre 20 y 45 cm, y el calibre, entre 15 y 25 micras, con un peso de 2 a 10 gramos por cápsula.

1.2.6 Crecimiento y desarrollo

El crecimiento del algodónero está asociado con la tasa de acumulación de materia seca. La acumulación de materia seca, en un período determinado, es el producto de la tasa de crecimiento por la duración de la etapa considerada. La duración está determinada por la tasa de desarrollo que puede ser modulada por diversos factores.

El desarrollo del cultivo de algodón está conformado por sucesión de estadios morfológicos y fisiológicos bien diferenciados. Cada etapa de desarrollo tiene objetivos ecofisiológicos diferentes, que deben ser alcanzados para optimizar el rendimiento del cultivo.

Tanto el desarrollo morfológico como la acumulación de biomasa son importantes y contribuyen al rendimiento y madurez (Mason, 1922; Hearn, 1969a; Hearn, 1969b; Guinn, 1982, Hearn y Constable, 1984). Numerosos son los trabajos realizados que analizan el crecimiento y desarrollo del algodón con un enfoque en los procesos fisiológicos (Hearn y Constable, 1984) y en el desarrollo morfológico (Oosterhuis, 1999).

La temperatura es el principal factor ambiental que controla la duración de las diferentes etapas de desarrollo del algodón. El desarrollo temprano es altamente dependiente de las temperaturas (Constable, 1977). La tasa de desarrollo es función directa y lineal de la temperatura desde una temperatura base hasta una óptima. La inversa de la pendiente de dicha relación constituye la estimación de tiempo térmico que la etapa requiere. El concepto de tiempo térmico ha sido ampliamente utilizado para predecir la duración de diferentes estados de desarrollo en distintos cultivos (Constable y Shaw, 1988). En algodón, los factores fotoperíodo y vernalización no juegan un rol significativo debido a la escasa o nula respuesta a los mismos.

En el algodón se pueden diferenciar tres grandes etapas: Vegetativa (0 a 35 días después de la emergencia, DDE), Reproductiva (35 a 90 DDE) y Madurez (90 a 140 DDE).

1. Etapa vegetativa. Comienza con la germinación de la semilla, continúa durante la expansión de los cotiledones, la formación de hojas verdaderas y se prolonga hasta la aparición del primer pimpollo. La prioridad de la planta en esta etapa es el crecimiento de la raíz con una distribución jerarquizada de carbohidratos hacia ese órgano, determinando así una mayor exploración del suelo. Esta etapa dura hasta alrededor de 35 días desde la siembra. Se puede diferenciar a su vez en dos fases:

- **Germinación – emergencia:** la germinación de la semilla ocurre a través de cuatro fases hasta su emergencia: 1- imbibición, 2- movilización de reservas de la semilla (lípidos y proteínas cotiledonares), 3- extensión de la radícula y 4- emergencia de hipocótilo y los cotiledones sobre la superficie del suelo, con el cambio de la dependencia metabólica en componentes de reserva de la semilla a la capacidad fotosintética autótrofa (Bradow y Bauer, 2010). Los factores ambientales que afectan la duración de esta fase son la temperatura, la disponibilidad hídrica, la profundidad de siembra y las condiciones del suelo (compactación, rizósfera, patógenos, entre otros). La temperatura del suelo regula básicamente los procesos de germinación y establecimiento del cultivo (Constable y Shaw, 1988). En esta fase, el algodón es muy sensible a las bajas temperaturas y a la baja disponibilidad de oxígeno. Se observan daños morfológicos desde los 5 a 10 días luego de la siembra cuando las temperaturas son menores a 10 °C. Dependiendo de los factores anteriormente mencionados, esta fase puede tardar entre 4 y 10 días en fechas y condiciones normales de siembra.

• **Emergencia – primer pimpollo:** en esta fase, gran parte de los asimilados son destinados para el crecimiento radical. La temperatura sigue jugando un rol fundamental en el desarrollo de la planta. La temperatura óptima de esta fase está entre 25° y 30 °C. Con las temperaturas registradas en la zona algodonera argentina, durante esta fase se tardan entre 3 y 4 días para desarrollar cada nuevo nudo sobre el tallo principal. Esta fase dura aproximadamente entre 25 y 35 días.

2. Etapa reproductiva. Comienza con la aparición del primer botón floral (también llamado pimpollo), y continúa con la aparición de flores hasta terminar con el corte fisiológico, “Cut Out” o fin de floración efectiva que ocurre cuando la última flor a ser cosechada es fecundada. Esta etapa dura desde los 35 días hasta los 90 después de la siembra aproximadamente.

• **Primer pimpollo – primera flor:** el algodón al inicio de esta etapa posee aproximadamente 8 a 9 nudos. La duración de la etapa es de 25 – 30 días. Las prioridades fisiológicas son la elongación del tallo, el inicio de la expansión de botones y ramas fructíferas.

En esta etapa se produce la elongación de los tallos por incrementos del largo de los entrenudos. La temperatura sigue siendo el factor de mayor incidencia en el crecimiento y desarrollo de la planta, cuyo rango óptimo se encuentra entre 25 y 40 °C mientras que la temperatura base es de 15 °C.

Durante la etapa reproductiva, la formación de órganos fructíferos sigue un patrón definido, ellos se agrupan en intervalos de floración horizontal y vertical (Kerby y Buxton, 1981). A partir del primer pimpollo y cada 3 días ocurre la aparición de una nueva estructura fructífera sobre el tallo principal (intervalo vertical), siempre desde la base hacia el ápice. Estas se denominan “primera posición” sobre el tallo principal. De la misma manera, cada 6-7 días aparecen nuevas estructuras fructíferas sobre una misma rama reproductiva (intervalo horizontal). Estas se denominan sucesivamente segunda posición, tercera posición, etc. (Kerby y Burton, 1981).

La formación de las ramas fructíferas se da a partir del sexto nudo, dependiendo del genotipo. Siempre hay una hoja asociada a la formación de un nuevo nudo, tanto en el tallo principal como en las ramas fructíferas (Constable y Rawson 1980a y b). En términos estrictos, cada rama reproductiva produce un solo nudo que termina con una

hoja y una posición fructífera. Debido a su disposición simpodial, de la yema de esa hoja surge una nueva rama que se desarrolla del mismo modo que la anterior, y así sucesivamente a lo largo de lo que constituye toda la rama fructífera.

La rama vegetativa monopodial de la base tiene la capacidad potencial de generar las mismas estructuras vegetativas y reproductivas que las producidas por el tallo principal. No obstante, la prioridad jerárquica en la planta es muy baja en esta rama, acentuándose aún más en los sistemas de alta densidad y surcos estrechos. Por lo tanto, la contribución de esta rama al rendimiento del cultivo se considera actualmente despreciable.

En esta fase, los productos de la fotosíntesis son destinados en gran medida al crecimiento y formación de tallos, ramas y hojas y una pequeña parte al crecimiento radical.

- **Primera flor – fin de floración efectiva:** al inicio de esta fase, la planta posee alrededor de 15 nudos. Después de la aparición de la primera flor, la velocidad de formación de nuevos nudos sobre el tallo principal se ve afectada por la competencia por asimilados ejercida por las formaciones fructíferas ya formadas, en este estadio ocurre la máxima interceptación de la radiación solar y se maximiza el balance de carbono. El crecimiento vegetativo y reproductivo es simultáneo, lo cual incrementa la competencia entre órganos por los fotoasimilados. Aquí, las primeras posiciones fructíferas cercanas al tallo principal tienen mayor jerarquía y son prioritarias sobre el resto (Constable y Rawson 1980a), determinando de esta manera la estructura piramidal que caracteriza a la planta de algodón. En esta etapa, el 60 % de los fotoasimilados se destina a las cápsulas en crecimiento. Por esta razón, el crecimiento vegetativo se ve reducido, tanto en la elongación de los entrenudos como en la formación de nuevo nudos, ya que gran parte de la energía captada es utilizada para el crecimiento de la cápsula (Constable y Rawson 1980a).

La flor es de color blanco durante el primer día de apertura. En ese momento el polen llega al estigma, se produce la germinación y crecimiento del tubo polínico y la fecundación del óvulo. Una vez producida la fecundación, los pétalos cambian a un color rojo o rosado, para caer tiempo después. En esta etapa comienza el crecimiento de las cápsulas. La floración dura aproximadamente entre 25 y 30 días, y se alcanza el fin de floración efectiva (“cut out”), cuando por encima de la última flor blanca en primera posición sólo hay cinco nudos.

Una vez formadas, las cápsulas en crecimiento tienen prioridad jerárquica en el uso de los asimilados, sobre el resto de las fructificaciones. A medida que la carga de las cápsulas aumenta, la disponibilidad de asimilados para los frutos jóvenes decrece. Se debe tener en cuenta que, durante esta etapa, los asimilados no son utilizados para formar nuevos nudos y hojas, por lo que la ganancia de carbono no se incrementa. Con respecto al porcentaje de abortos (comúnmente llamado derrame) de las fructificaciones por causas del déficit de asimilados, se puede señalar que las pequeñas cápsulas (de no más de 10 días) son los más sensibles al derrame y le siguen en orden decreciente los pimpollos grandes, pimpollos pequeños, y finalmente las cápsulas grandes (de más de 10 días). Este orden de prioridad está principalmente determinado por la posición de la estructura reproductiva en la planta con respecto al tallo principal.

3. Etapa de madurez. Tiene una duración aproximada de 6-7 semanas, desde los 90 días hasta los 140 días desde la siembra.

- **Fin de floración efectiva – cosecha:** comienza con el denominado corte fisiológico o “cut out” o fin de floración efectiva y finaliza al momento de la cosecha. La prioridad de la planta en este momento es el llenado de los últimos frutos o cápsulas. Además, ocurre la apertura de cápsulas, la maduración de la fibra y la senescencia de las hojas.

Para cada cápsula en particular, en esta fase se pueden diferenciar tres sub-fases principales. El crecimiento, la maduración y la apertura de las mismas. El crecimiento de cada cápsula dura aproximadamente de 20 a 25 días. Por otra parte, el activo crecimiento de las semillas actúa como un gran destino de asimilados. Una vez alcanzado el tamaño máximo de las cápsulas, la madurez de las mismas se produce entre 28 y 30 días, luego de los cuales se produce su apertura. En esta fase, es muy importante la disponibilidad de alta radiación asociada con una baja humedad relativa del ambiente para favorecer el quebrado y apertura de los capullos. El rango óptimo de temperaturas es de 27° - 30 °C, con una temperatura base de 12 °C (Paytas y Ploschuk 2013).

1.2.7 Conceptos generales de fisiología del estrés en plantas

El estrés es usualmente definido como un factor externo que ejerce una influencia desventajosa en la planta y juega un rol principal en la determinación de cómo el suelo y el clima limitan la distribución de las especies vegetales en el mundo (Taiz y Zeiger, 2002).

La definición de estrés fisiológico puede ser simplemente las condiciones adecuadas que causan un cambio aberrante en los procesos fisiológicos y resultan eventualmente en daño. Bajo algunas condiciones, esta definición puede ser difícil de usar debido a que los procesos fisiológicos cambian en respuesta a características ambientales sin tener necesariamente un efecto deletéreo sobre la performance de la planta. La marchitez podría provocar un deterioro en la planta a corto plazo debido a que la ganancia de carbono está inhibida. Pero a su vez podría ser crítica para la supervivencia a largo plazo ya que la temperatura foliar puede mantenerse lo suficientemente baja para evitar un daño permanente (una hoja marchita absorbe menor energía lumínica). Por lo tanto, la marchitez es una respuesta dañina y adversa a la baja disponibilidad de agua y alta luminosidad. Esta distinción gris entre mecanismos adaptativos y efectos deletéreos que afectan a la fisiología invitan a considerar el término adicional "tensión" (*strain*) (Levitt, 1980).

La diferencia entre estrés y tensión viene de aplicar términos de ingeniería a los sistemas biológicos. La definición fisiológica de estrés es la fuerza aplicada dividida por el área de la fuerza (Niklas, 1994) o presión. El término estrés fisiológico en plantas es, por lo tanto, un reflejo de la cantidad de presión ambiental necesaria para que se produzca un cambio en la fisiología de un organismo. La tensión (*strain*) puede ser caracterizada como un cambio fisiológico, que puede ocurrir en respuesta al estrés del ambiente, pero que no necesariamente resulta en una reducción significativa del crecimiento o reproducción (Levitt, 1982).

Otros autores definen estrés como un cambio en la fisiología que ocurre cuando las especies son expuestas a condiciones extraordinariamente desfavorables que no necesariamente representan una característica para la vida, pero induciría una "respuesta de alarma" o respuesta adaptativa a los estímulos.

Hay una diversidad de tipos de estresores que pueden afectar los procesos fisiológicos en las plantas. En general, los estresores pueden ser clasificados en 3 grandes grupos (Tabla 1).

Tabla1. Lista parcial de fuentes de estrés ambiental en plantas. Nilsen y Orcutt, 1996.

Físicos	Químicos	Bióticos
Sequía	Polución del aire	Competencia
Temperatura	Metales pesados	Alelopatía
Radiación	Pesticidas Toxinas	Herbívoros
Inundación		
Viento	pH del suelo	Enfermedades
Campo Magnético	Salinidad	Hongos patogénicos
		Virus

Los atributos físicos del ambiente pueden afectar los patrones fisiológicos en una forma positiva o negativa. Por ejemplo, la temperatura incrementa la acción de las enzimas dentro de cierto rango sobre el cual resulta en una fuerte inhibición. Muchos atributos químicos del ambiente pueden actuar como estresores si ellos no están normalmente en el ambiente (por ej. polución, pesticidas) o a relativamente altas concentraciones (salinidad, pH). Los estresores bióticos son aquellos relacionados con los mecanismos de interacción entre poblaciones, algunas de las cuales (enfermedades, herbívoros) son de particular interés para los sistemas agrícolas. Sin embargo, todas las plantas estarían expuestas a un número de estos estresores potenciales al mismo tiempo y las interacciones entre ellos son altamente probables.

Las respuestas fisiológicas a los estresores pueden ser divididas en dos posibilidades. En un caso, tolerancia, las plantas tienen mecanismos que mantienen alta actividad metabólica (similar a la que ocurre en ausencia del estrés) bajo un estrés leve y reducida actividad bajo un estrés severo (Osmond et al., 1987). En contraste, los mecanismos de "evitación" involucran una reducción de la actividad metabólica, resultando en un estado de dormancia, tras la exposición a estrés extremo. En sistemas agrícolas, el cruzamiento y otras tecnologías de domesticación han maximizado los mecanismos de evitación del estrés en plantas. En sistemas naturales, la diversidad de hábitats potenciales ha resultado en el desarrollo de mecanismos de tolerancia y evitación. Comúnmente, una especie de plantas podría tener varios mecanismos de tolerancia o evitación o una combinación de ambos. Las especies que han evolucionado en las mismas condiciones de hábitat podrían no tener el mismo grupo de mecanismos para confrontar con la combinación local de estresores, aún si ellas tienen un aspecto similar (Nilsen et al., 1984).

La fisiología del estrés en plantas también incluye procesos que ocurren a niveles de la planta individual. Por ejemplo, el cambio en la distribución de recursos a órganos específicos dentro de la planta individual puede ser altamente crítico para hacer frente al estrés ambiental. Por supuesto, estudios a escalas celulares sobre segundos de tiempo (fisiología bioquímica) son más familiares para el estudio de la fisiología del estrés en plantas.

La influencia de un estresor sobre los procesos fisiológicos de una especie de planta en particular no es siempre igual. A tiempos diferentes durante el ciclo de vida de una planta sería diferencialmente sensible a un estresor en particular. Una plántula joven que emerge cerca de la superficie, puede ser más sensible a la cantidad de agua en las capas superiores del suelo. Sin embargo, en el siguiente crecimiento a madurez, puede estar totalmente ausente cualquier tipo de sensibilidad a la humedad del suelo. El estrés hídrico puede suceder luego en el desarrollo de un cultivo teniendo poco o ningún impacto en el rendimiento, pero si el mismo nivel de estrés hídrico ocurriera en el desarrollo temprano del cultivo, podría reducir severamente el rendimiento. Por lo tanto, hay “ventanas de sensibilidad” o estados del desarrollo específicos en el ciclo de vida de una planta donde las mismas son particularmente sensibles a las influencias de un estresor. La sensibilidad podría variar también con los patrones estacionales de fisiología. Así, el estatus del desarrollo de las plantas, la edad de los órganos en cuestión y el impacto de los patrones ambientales de estación influyen la sensibilidad de la fisiología de la planta a los estresores.

La intensidad del estrés (presión de cambio ejercida por un estresor) no es fácilmente cuantificable. El estrés podría ocurrir a bajo nivel, creando condiciones que son marginalmente no óptimas, donde se espera poco efecto. Sin embargo, si este tipo de estrés continúa por un largo período, se convierte en crónico y la fisiología de las plantas probablemente se altere. En contraste, las condiciones podrían volverse difíciles rápidamente, resultando en una condición aguda. Este patrón de *shock* de estrés induciría probablemente a cambios significativos en una ventana de tiempo corta. Los toxicólogos han desarrollado el concepto de “dosis”, el cual tiene implicaciones importantes para la fisiología del estrés. El estrés puede ser dramático cuando es aplicado por una corta duración y alta intensidad, o cuando es aplicado a un largo tiempo a baja intensidad (Nilsen y Orcutt, 1996).

- **La salinidad**

La salinidad puede ser definida como la presencia de concentraciones excesivas de sales solubles (U.S. Salinity Lab. Staff, 1954). Los suelos se consideran salinos si contienen sales solubles en cantidades tales que interfieren con el crecimiento de la mayoría de las plantas. Las sales cloruros, sulfatos y bicarbonatos de sodio, calcio y magnesio contribuyen en distinto grado a la salinidad del suelo y el agua.

Millones de hectáreas de tierra del mundo son salinas para producir cultivos con rendimientos económicos y más tierras se convierten en no productivas cada año debido a la acumulación de sal. Los problemas de la salinidad en la agricultura están confinados usualmente a regiones áridas y semiáridas donde la lluvia no es suficiente para transportar sales desde las raíces de la planta hacia capas profundas del suelo.

Los problemas de salinidad pueden ocurrir también sobre tierras no irrigadas, tierras cultivadas y pastizales. Los suelos salinos están interpuestos entre suelos no salinos; así los agricultores pueden sembrar áreas salinas interpuestas entre áreas no salinas, pudiendo cosechar al final un porcentaje menor del área que sembraron. La salinidad del agua de irrigaciones es también un problema y está comenzando a aumentar seriamente ya que hay menos agua y de menor calidad que es explotada para irrigar en grandes cantidades, conduciendo a la degradación. La evaporación del agua de los reservorios concentra las sales y nuevos proyectos de irrigación agravan los problemas de salinidad de los ambientes.

- **Respuesta general de las plantas a la salinidad**

Los principales factores de salinidad que influyen el crecimiento de las plantas son el tipo y concentración de sales en la solución del suelo (o agua de irrigación). La mayoría de las respuestas de las plantas a la salinidad es una función de la concentración total de sales o potencial osmótico del agua de suelo, sin considerar la especie salina presente (Maas y Hoffman, 1977). Donde la relación de iones solubles predominante son extremas, puede ocurrir toxicidad ion específica. Algunas plantas herbáceas y la mayoría de las especies leñosas son susceptibles a la toxicidad ion específica. En algunos casos la salinidad induce desbalance nutricional o deficiencias causando una disminución del crecimiento y daño en las plantas en las que los efectos osmóticos pueden no acontecer. En general los síntomas de estrés salino son

similares a los de estrés hídrico ya que por el bajo potencial osmótico del suelo la planta no puede tomar el agua disponible y esto resulta en disminución del crecimiento y las funciones fisiológicas básicas, con síntomas similares (Taiz y Zieger, 2002).

Aunque la salinidad afecta las plantas en diversos sentidos fisiológicos, raramente ocurren síntomas de lesión abierta, excepto bajo salinización extrema (Mass y Hoffman, 1977), las plantas afectadas por sal usualmente parecen normales, aunque son enanas con partes tales como hojas, tallos y frutos usualmente más chicos de lo normal, pueden tener hojas de color verde oscuro, y este caso son más gruesas y suculentas.

No todas las partes de una planta se ven afectadas por igual. La porción superior del crecimiento, frecuentemente se suprime más que las raíces. La salinidad puede incrementar también la relación hoja: tallo y puede afectar negativamente el crecimiento más que el rendimiento de semillas o fibras. La salinidad frecuentemente restringe el crecimiento de las plantas severamente sin el desarrollo de algún síntoma de daño. Cuando esto ocurre, puede conducir a la pérdida considerable del rendimiento y el agricultor puede no darse cuenta que la salinidad es la responsable.

- **Tolerancia del algodón a la salinidad**

El único criterio agronómico importante para establecer la tolerancia a sal de los cultivos es el efecto sobre el rendimiento económico. La salinidad para propuestas de establecimiento de cultivos tolerantes es medida, por la determinación de la conductividad eléctrica (EC) en mmhos/cm a 25 °C del agua de drenaje de irrigación o extracto de suelo (U.S. Salinity Lab Staff, 1954). Un millimho es el equivalente aproximado de 640 ppm de sal. Se han establecido cuatro divisiones para clasificar la tolerancia a la salinidad de los cultivos, basadas sobre la conductividad eléctrica del extracto de suelo (ECe) y el efecto de la salinidad sobre el rendimiento del cultivo. Estas clasificaciones son sensibles, moderadamente sensibles, moderadamente tolerantes y tolerantes. El algodón es clasificado como uno de los cultivos tolerantes a la salinidad (U. S. Salinity Lab Staff, 1954; Bernstein, 1955; Ayers y Westcot, 1976). Un nivel umbral de salinidad en el cual el rendimiento inicial declina, ha sido observado a 7,7 mmhos/cm, con un 50% de reducción del rendimiento observado a 17,0 mmhos/cm (Ayers y Westcot, 1976).

- **Limitaciones hídricas**

El agua es de suprema importancia para el crecimiento y función de las plantas ya que todo intercambio de recursos entre una planta y su ambiente ocurre por ese medio. La expansión celular y la integridad física/química de la pared celular dependen del agua. La estructura molecular de proteínas y polisacáridos y otras moléculas hidrofílicas dependen de las propiedades del agua. Las fuerzas cohesivas y adhesivas regulan el movimiento del agua a través de los sistemas de transporte. El agua químicamente sirve como un excelente solvente y actúa frecuentemente como un reactivo. Considerando el significado del agua para las plantas, no sorprende que la cantidad de agua obtenible para las mismas constituya un importante potencial de estrés en muchos hábitats naturales en sistemas con manejo.

Todas las plantas experimentan algún tipo de limitación o sobreexposición al agua. En sistemas naturales, la accesibilidad limitada de agua puede deberse a pocas precipitaciones, a un suelo con baja retención de agua, temperaturas de suelo cálidas, presión de vapor atmosférico, alta aireación y temperatura del suelo o una combinación de estos factores u otros factores. En sistemas agrícolas, la accesibilidad al agua puede ser la limitación principal en el rendimiento (Nilsen y Orcut, 1996).

- **Efectos de las altas temperaturas sobre la producción de algodón**

El algodón se está adaptando al aumento de la temperatura, pero la elevación de esta temperatura puede llegar a exceder la tasa de adaptación natural de las plantas de algodón.

Las altas temperaturas podrían elevar la evaporación atmosférica, exacerbando la demanda de agua de los suelos. La tasa de evapotranspiración crea condiciones más secas en las zonas de la radícula y esto sucedería más aceleradamente que lo notado hasta el momento.

Por otro lado, la elevación de la temperatura y la sequía normalmente ocurren simultáneamente, por lo que se dificulta medir sus efectos por separado. Las condiciones de sequía pueden aumentar por la falta de precipitaciones, particularmente en condiciones de secano; sin embargo, la falta de precipitaciones en condiciones de riego, puede resultar en sequía debido a la escasez de agua en las represas.

El impacto sobre el rendimiento de algodón debido al limitado suministro de agua de riego es dos veces más importante que para el algodón sembrado bajo condiciones de secano. Las condiciones de sequía afectan tanto la calidad como la cantidad de fibra. Cuando se dispone de agua en cantidades limitadas, la lucha contra la sequía se convierte en un problema de gran importancia.

En el algodón, el control genético de la tolerancia al estrés abiótico es muy complejo y está influido por otros factores ambientales. El efecto también varía según la etapa del desarrollo de la planta.

Entre las respuestas fisiológicas del algodónero al déficit hídrico se puede encontrar con: marchitez de la hoja, reducción de la superficie foliar, abscisión de las hojas y estimulación del crecimiento radical al dirigir los nutrientes a las porciones subterráneas de la planta. Las plantas son más susceptibles a la sequía durante la floración y durante el desarrollo de las semillas (etapa reproductiva), ya que los recursos de la planta se desvían hacia el desarrollo de raíces. La caída de los frutos aumenta la diferencia entre los puntos de fructificación y de las cápsulas (ICAC, 2014).

1.2.8 El algodón transgénico

- **La ingeniería genética**

El mejoramiento genético vegetal se originó hace aproximadamente 10.000 años, cuando el hombre se hizo agricultor y comenzó la domesticación de las plantas. En el siglo XX, con la incorporación de los cruzamientos sexuales, el conocimiento de la biología floral de las especies, los avances de la genética y de la estadística experimental, entre otros, se desarrollaron los métodos de mejoramiento actualmente utilizados. El mejoramiento genético se basa en la existencia de variabilidad genética para los caracteres que se desea mejorar y la reproducción sexual para la incorporación de los mismos. Este hecho hace que el aprovechamiento de la variabilidad esté restringido por las barreras que impiden el cruzamiento entre especies. El reciente desarrollo de métodos no sexuales para transferir genes como la transformación genética, permite superar esta limitación, abriendo nuevas perspectivas en el mejoramiento de las plantas (Diaz et al., 2004). El hombre ha manipulado durante miles de años el contenido genético de plantas con interés agrícola, por sucesivos cruces y selección de semillas. Lo que ahora puede alterarse

es la velocidad de producción de esos cambios al aplicar nuevas tecnologías que permiten la formación de genomas híbridos de orígenes muy dispares (Izquierdo Rojo, 1999).

Conviene destacar que la transformación de plantas es una tecnología que aporta variabilidad genética conocida sin alterar el fondo genético, por lo que puede ser considerado como una metodología conservativa en el mejoramiento. Este último aspecto es de gran importancia ya que la creación de cultivares es un proceso acumulativo, es decir que se desea introducir características favorables sin perder las mejoras logradas anteriormente.

Las plantas transgénicas se obtienen por diversas metodologías. Los métodos de transformación más utilizados en la actualidad se basan en la obtención de células transgénicas y posterior recuperación de plantas completas y fértiles a partir de las mismas, a través del cultivo *in vitro*.

Además de disponer del transgén (secuencias regulatorias y codificantes clonadas en un vector de transformación) y de una metodología eficiente para transferir ese gen al genoma vegetal, se necesita de un sistema eficiente de cultivo de tejidos que permita regenerar plantas completas y fértiles.

Es importante destacar que para lograr una planta transgénica deben ocurrir tres procesos en una misma célula:

- a) El transgén debe ser transferido al interior de la célula,
- b) El transgén debe integrarse al ADN celular y
- c) Se debe regenerar una planta en la que se verificaron los procesos a) y b).

- **El cultivo *in vitro***

En general, las plantas tienen un poder regenerativo muy superior a los animales y en muchos casos, una sola célula puede regenerar la planta completa. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencialidad expresada por las células vegetales. En la mayoría de las especies se observa una importante influencia del genotipo en la respuesta al cultivo *in vitro*, motivo por el cual es frecuente que se utilicen genotipos modelo (de alta respuesta) con fines experimentales, los cuales no necesariamente presentan interés agronómico. Por ello, cuando se usa esta metodología con fines de mejoramiento genético, es muy importante conocer la respuesta morfogénica de

distintos genotipos con adaptación local, de modo de poder transformar directamente genotipos con valor agronómico. Por otra parte, en el cultivo *in vitro*, un prolongado período de subcultivos puede inducir la aparición de variación somaclonal no deseable, ya que es conveniente introducir sólo las modificaciones que se desean y en forma controlada (Díaz et al., 2004).

- **Transformación genética en algodón**

Si bien el algodón es una planta relativamente tolerante al estrés, existen condiciones sub-óptimas que lo afectan adversamente en cuanto a la retención de cápsulas, el llenado y la calidad de fibra, haciendo bajar su rendimiento potencial en un 50 % (Boyer, 1982). Las plagas del algodón, también limitan la rentabilidad debido al uso de insecticidas químicos, los que, además, provocan ciertos problemas ambientales (Benedict y Altman 2001). Aunque se ha usado mejoramiento genético convencional, para caracteres como el aumento de fibra y la calidad del línter, el rendimiento potencial ha alcanzado una meseta en los últimos 40 años debido al estrechamiento en la base genética a causa de pérdida de variabilidad para caracteres deseables. El limitado pool de genes ha hecho a los cultivos más susceptibles al ataque de patógenos, así como a estreses ambientales. El algodón genéticamente modificado permitió superar esta barrera mediante el uso de genes de interés haciendo los cultivos más sustentables desde el punto de vista económico y ambiental. Pero la transformación y regeneración del algodón obtenido mediante técnicas de ingeniería genética posee problemas asociados a la dependencia de genotipo y la mayoría de los protocolos han sido ajustados para variedades modelos. La mayoría de las variedades elite son recalcitrantes y no amigables a la manipulación genética. Además, la introgresión de transgenes dentro de cultivares elite consume mucho tiempo y conduce a la transferencia de ciertas características indeseables durante las retrocruzas con las variedades regenerables (Kumria et al., 2003a).

- **La regeneración de plantas de algodón**

La regeneración *in vitro* de plantas de algodón ha sido un logro difícil de alcanzar, debido a que la respuesta morfogénica es dependiente de genotipo. La

embriogénesis somática es el método preferido por sobre la organogénesis, debido a que las plantas regeneradas tienen un probable origen unicelular y no existe una conexión vascular entre el embrión somático y el tejido materno (Shoemaker et al., 1986).

La embriogénesis somática fue reportada primero en *G. klotzschianum*, pero las plantas maduras no pudieron ser obtenidas (Price and Smith, 1979). Luego, Davidonis y Hamilton (1983) describieron la regeneración de plántulas luego de observar la embriogénesis somática espontánea que se desarrolló en callos obtenidos a partir de un tejido cotiledonar altamente poliploide (12x) de *G. hirsutum*, variedad Coker 310. Mitten (1985) y Rangan (1993) también describieron la embriogénesis somática y la regeneración de plantas de algodón. Este procedimiento involucró largos períodos de cultivo y fue muy difícil de repetir. Shoemaker et al., (1986) testearon 17 variedades de algodón según su potencial de regeneración sobre tres medios de inducción de callos diferentes que contenían glucosa y los callos embriogénicos maduros dados por las variedades Coker 210 y 315 se llevaron a un medio con sacarosa. Trolinder y Gooding (1988 a y b) han estudiado extensamente el requerimiento de reguladores de crecimiento óptimo y el tipo de explante para la embriogénesis somática y regeneración de plantas de la variedad Coker 312. Zhang et al., 2001 sugieren que la capacidad embriogénica es dependiente del tipo de explante. Varios investigadores han trabajado extensamente en la regeneración mediante embriogénesis somática de variedades Coker (Finner 1988; Firoozabady y DeBoer 1993; Trolinder y Xhixian 1989; Chaudhary et al., 2003), sobre variedades Sicala, Siokara (Cousins et al., 1991; Rangan y Rajasekaran 1996), sobre variedades chinas Simiam-3 (Zhang et al. 2001) y sobre variedades Acala (Rangan 1993; Rangan y Rajasekaran, 1996). Leelavathi et al. (2004) propusieron un método rápido para la transformación genética mediada por *Agrobacterium* para regenerar un gran número de plantas, usando Coker 312 como material vegetal.

Aunque la eficiencia de regeneración mediante embriogénesis somática ha sido mejorada, quedan aún algunos problemas por resolver, en relación a la regeneración de las plantas de algodón. Estas son: variación en la respuesta dependiendo del genotipo, baja tasa de conversión de embriones somáticos en plántulas normales, prolongados períodos de cultivo, alta tasa de desarrollo embriogénico anormal y la falta de elongación de los brotes. A su vez, los largos períodos de cultivo de algodón conducen a la regeneración de plantas morfológicamente anormales y estériles.

Se ha intentado también, la regeneración de plantas de algodón a partir de ejes embriogénicos meristemáticos, con la intención de ganar independencia de genotipo y superar el daño genético causado por períodos prolongados de cultivo *in vitro*. Estos procedimientos han conducido a la inducción de brotes del tejido meristemático transformado. La kinetina (KIN) combinada con ácido naftalen acético (ANA), se han usado para inducir la regeneración desde ápices meristemáticos y ejes embrionarios expuestos (Gould et al., 1991; Saeed et al. 1997; Hemphill et al., 1998; Zapata et al., 1999). El uso de altas concentraciones de bencil amino purina (o benciladenina BA) indujeron múltiples brotes sobre ejes embrionarios (Morre et al., 1998).

- **Explantos y meristemas**

El explante es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo. La selección del explante se puede hacer teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta o el objetivo que se persiga (Roca y Mroginsky, 1991). De esta manera, si las plantas que se van a cultivar tienen reproducción por semillas, las partes embrionarias o de la plántula son las fuentes más comunes de explantes. En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos han sido generalmente la fuente de los explantes (Villalobos, 1980). Sin embargo, estos últimos también son utilizados en especies de reproducción sexual.

Los meristemas son tejidos no diferenciados que llevan a cabo división celular activa y le permiten a la planta crecer. Al tejido meristemático se le considera embrionario porque sus células son totipotenciales, se multiplican de forma continua y conservan la capacidad de diferenciarse. Los meristemas se pueden clasificar en meristema primario o apical y meristema secundario o lateral. De tal manera que los meristemas apicales son responsables del crecimiento primario y de la generación de nuevos meristemas a lo largo del desarrollo de las plantas vasculares (Evans y Barton, 1997) y, por su parte, el meristema lateral o secundario del crecimiento en grosor.

Además, los meristemas se clasifican por su localización en el cuerpo de la planta en:

i) Meristemas apicales: Se encuentran situados en el extremo o ápice de las raíces y los tallos (yemas apicales) y en los brotes de las ramas (yemas laterales). Cuando están en el tallo se llama meristema caulinar apical y en la raíz se llama meristema radical apical. El meristema caulinar apical está formado por células con una gran capacidad de división. A partir de este meristema se forman los tejidos primarios del tallo y durante el crecimiento de la planta aparecen nuevos meristemas apicales, llamados primordios, que dan lugar a ramificaciones laterales, hojas y órganos reproductores. Las yemas axilares son generalmente únicas, es decir que en la axila de cada hoja nace una sola yema; en algunas especies pueden presentarse yemas axilares múltiples o supletorias que originan flores, ramas, espinas o zarcillos. En algunas especies de los géneros *Gossypium* y *Bambusa* hay yemas múltiples que se forman por fragmentación de un meristema axilar único (Lindorf et al., 1991).

ii) Meristemas laterales: localizados en la periferia de los órganos, favoreciendo el crecimiento en grosor (cambium y felógeno).

iii) Meristemas intercalares: Se ubican entre los tejidos ya adultos y están formados por porciones de los meristemas apicales, que se separaron del ápice durante el desarrollo del vástago. Se encargan del alargamiento de los entrenudos y reconstituyen la lámina foliar si ha sido parcialmente destruida (Hipertextos de Botánica Morfológica).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la respuesta *in vitro* de genotipos de algodón provenientes del programa de mejoramiento genético de INTA en relación a la respuesta al estrés abiótico y a la capacidad de regeneración directa.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la respuesta *in vitro* de los meristemas apicales y axilares de los materiales de algodón de INTA como alternativa de sistema de regeneración.
2. Evaluar la respuesta diferencial *in vitro* ante condiciones de estrés abiótico (hídrico y salino) de las variedades comerciales de algodón de INTA.

1.3.3 Hipótesis

En los materiales del plan de mejoramiento de algodón de INTA existe variabilidad para la respuesta al cultivo *in vitro* a la regeneración de tejido meristemático.

Existe variabilidad útil para la respuesta a estrés abiótico expresada ante factores de estrés en cultivo *in vitro* en materiales del programa de mejoramiento genético de INTA.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

2.1.1 Elección del material

Debido al estrechamiento en la base genética del algodón, se hace necesario contar con estrategias que aporten a la variabilidad y que puedan ser usadas en los programas de mejoramiento genético de INTA. Con el fin de encontrar algún material vegetal con características destacadas, se planteó investigar para los caracteres de capacidad de regeneración directa y la tolerancia a estrés abiótico. Para ello, se propuso realizar una investigación sobre los materiales de algodón de INTA, para conocer su performance *in vitro*.

En la tabla 2 se presenta un resumen de las variedades locales (Guazuncho 2, Guazuncho 3, Oro Blanco 2, Porá y Porá Ité), líneas avanzadas de INTA (SP 48114 y SP 44825 (SG)) y la variedad modelo Coker (Coker 312), que se evaluaron en los diferentes ensayos propuestos.

Las variedades Guazuncho 2 y Porá, si bien actualmente no se comercializan, fueron elegidas para ser incluidas en esta investigación debido a que son las más representativas del germoplasma de INTA. Esto hizo que por mucho tiempo fueran ampliamente adoptadas entre los productores locales y elegidas entre las variedades a ser evaluadas en diferentes trabajos científicos (Morre et al., 1998; Meloni et al., 2003). Además, la variedad Porá es un cultivar que exhibe a campo una alta tolerancia a la salinidad, por lo que se optó su uso como referencia en los ensayos de estrés (Meloni et al., 2003). Guazuncho 3, Porá Ité y Oro Blanco 2, se incluyeron por ser las variedades convencionales de INTA que se comercializan actualmente. Éstas no superaron significativamente en rendimiento a sus antecesores, pero sí en caracteres agronómicos destacados tales como largo del ciclo, estructura de planta, etc. La línea avanzada SP 48114 es de ciclo intermedio, lo que podría suponer un aumento en el rendimiento con respecto a las actualmente comercializadas (Tcach et al., 2011), mientras que la línea SP 44825 (SG), al no poseer glándulas productoras de gossypol, representa un material raro, por ello, ambas resultaron de interés para ser incluidas en este estudio. La variedad Coker 312, si bien no forma parte del germoplasma de INTA,

figura entre las variedades seleccionadas para realizar estos ensayos dado que es considerada como el material de referencia para transformación genética.

Tabla 2: Material vegetal ensayado para los protocolos de meristemas apicales y axilares y las pruebas de estrés hídrico y salino.

Ensayo	Material Vegetal
Protocolos de meristemas apicales y yemas axilares	Variedades: Guazuncho 2 – Porá - Guazuncho 3 – Porá Ité – Oro Blanco 2 – Coker 312 Líneas: SP 48114 – SP44825 (SG)
Ensayos de estrés hídrico y salino (semillas y explantes para estrés salino y semillas para estrés hídrico)	Variedades: Guazuncho 2 – Porá - Guazuncho 3 – Porá Ité – Oro Blanco 2 Línea: SP 48114

Las variedades y líneas fueron cedidas por el Programa de Mejoramiento Genético de algodón de INTA EEA Sáenz Peña, Chaco. Las semillas recibidas fueron las cosechadas en la campaña 2014/2015 a excepción de la línea SP44825 (SG), que fue cosechada en la campaña 2012/2013, y se realizó una multiplicación en el invernáculo durante el período de invierno 2015 para usar las semillas cosechadas, en los últimos ensayos realizados (Protocolos de Agrawal et al., 1997; Gould y Magallanes-Cedeno, 1998 y Bazargani et al., 2011). La variedad Coker 312 fue provista para su multiplicación por el Banco de Germoplasma de la EEA INTA Sáenz Peña, la cual se realizó en Invernáculo de la sección de Mejoramiento Genético, durante el período invernal de los años 2014 y 2015.

2.2 Tratamiento sobre las semillas

2.2.1 Deslintado de semillas

Luego de la cosecha, las semillas de algodón se deslitaron mecánicamente, por lo que conservaron pequeñas fibrillas recubriendo su superficie. Éstas debieron ser eliminadas por completo, mediante el deslintado con ácido sulfúrico. La proporción usada para deslitar las semillas fue de 10 ml por cada 30 gramos de semillas. La neutralización de la reacción se realizó mediante el empleo de hidróxido de sodio. El

procedimiento se efectuó bajo campana de gases, debido a la producción de los mismos durante el proceso de disolución de la fibrilla.

2.2.2 Desinfección

Para todos los ensayos en que se sembraron semillas de algodón sobre algún medio de cultivo, las mismas fueron esterilizadas superficialmente. Este paso debió realizarse debido a que los medios de cultivos son ricos en azúcares, óptimos para el desarrollo de los microorganismos que pueden estar presentes en las cubiertas de las semillas. Para realizar esta operación, primero las semillas pasaron por una inmersión en alcohol etílico 70% v/v durante un minuto, luego de lo cual fueron lavadas con agua destilada, seguido de 30 minutos en agitador orbital, sumergidas en solución de hipoclorito de sodio al 2,8% v/v con el agregado de 2 gotas de detergente Tween-20 por cada 100 ml de solución. Para terminar el paso de esterilización, las semillas fueron lavadas tres veces con agua estéril destilada, con la intención de eliminar los restos de la solución de hipoclorito de sodio. La esterilización superficial se realizó bajo campana de flujo laminar, usando materiales estériles para su manipulación.

2.3 Siembra de las semillas

Para los ensayos de estrés, los de regeneración a partir de ápices caulinares y yemas axilares, las semillas de algodón se sembraron sobre un medio de cultivo apropiado indicado para cada protocolo. Para ello requirieron ser esterilizadas superficialmente como se describió previamente (sección 2.2.2). Dado que se observó que algunas contaminaciones persistían luego de la esterilización y debido a que tardaba mayor tiempo la germinación, se decidió realizar un paso adicional con las semillas antes de su siembra en medio de cultivo que consistió en sumergir las semillas, en agua destilada estéril por un lapso de 24 horas y esterilizar nuevamente antes de la siembra. Con este paso se logró el ablandamiento del tegumento y la emergencia de la radícula. En tales ensayos, se eliminó la cubierta de las semillas antes de ser colocadas sobre los correspondientes medios de cultivo, con la intención de reducir las contaminaciones más persistentes (Gould y Magallanes-Cedeno, 1998; Hemphill et al., 1998).

La siembra de semillas para ensayos de estrés y como fuente de explantes para ensayos de ápices caulinares y yemas axilares se realizó bajo condiciones estériles en medio de cultivo basal denominado MS0. Este medio permitió la germinación de las semillas y está compuesto por macronutrientes y micronutrientes del medio basal de Murashige y Skoog (1962), 20 g/l de glucosa y solidificado con 2 g/l de Phytigel o 7 g/l de agar SIGMA®. El pH se ajustó a 5,8, con el agregado de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, a concentración de 1 N según necesidad. La esterilización de los medios se realizó en autoclave durante 20 minutos a 120 °C y 1 atmósfera de presión. Para los ensayos de estrés, se adicionó a este medio basal la correspondiente concentración de la sustancia estresante (cloruro de sodio, sorbitol, manitol). Las cantidades se indican más adelante (sección 2.6).

La incubación se realizó en cámara de cría a una temperatura de 28 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad) bajo luz fluorescente ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodo 16-h) durante el tiempo indicado en cada protocolo.

2.4 Protocolos y medios de cultivo para ápices y meristemas

Para registrar la respuesta de distintos explantes meristemáticos de los cultivares y líneas avanzadas de INTA y de la variedad Coker 312 a medios de cultivo de inducción de brotes, se ensayaron diversos protocolos que involucran tipos de explantes distintos.

Para explantes provenientes de ápice embrionario se ensayaron los medios de inducción de brotes propuestos por Morre et al. (1998), Hemphill et al. (1998), y Pathi y Tuteja (2013). Las yemas axilares cotiledonares, obtenidas de plántulas de 7 días de germinación, se evaluaron sobre los medios de cultivo propuestos por Agrawal et al. (1997). El comportamiento de ápices caulinares se registró luego del paso por los medios propuestos Gould y Magallanes-Cedeno (1998) y Bazargani et al. (2011).

Para cada ensayo, se usaron 50 explantes que se colocaron en placas conteniendo el medio de inducción de brotes y cada ensayo se repitió 3 veces, por lo que al final se tuvieron para cada variedad y cada protocolo, un total de 150 explantes evaluados.

Un resumen de la composición de reguladores de crecimiento de los medios de cultivo para cada protocolo y para cada tipo de explante, así como los tiempos de permanencia figura en la Tabla 3.

Tabla 3. Medios de cultivos para ensayos de ápices y meristemas para los protocolos ensayados y tiempo indicado de permanencia en cada medio.

Explante	Protocolo	Estado	Medio	Composición	Tiempo
Ápices Embrionarios	Hemphill et al., (1998)	Inducción de Brote	MBI	MS+ 0.3 µM BAP	21 días
		Elongación	MEC	MS+ 3% CA (Carbón Activado)	14 – 21 días
		Enraizamiento	ME _n	MS + 1 µM IBA	28 – 42 días
	Morre et al., (1998)	Inducción de Brote	MS-B	MS + 3 mg/l BAP	20 días
		Elongación	MSF	MS	15 – 20 días
		Enraizamiento	MSI2	500 mg/l IBA	Shock de auxina
	Pathi y Tuteja, (2013)	Inducción de Brote	MS-BK	MS + 2 mg/l BAP + 2 mg/l KIN	3 -4 semanas
		Elongación	MSAG3	MS + 1 mg/l GA	2 semanas
		Enraizamiento	MSI3	MS + 1 mg/l IBA	Hasta enraizamiento
Yemas Axilares	Agrawal et al., (1997)	Inducción de Brote	MS9	MS + 2,5 mg/l BAP + 2,5 mg/l KIN	35 días
		Elongación	ME0	MS	25 días
		Enraizamiento	MR	½ MS + 0,1 mg/l ANA	12 – 15 días
Ápices Caulinares	Gould y Magallanes-Cedeno, (1998)	Inducción de Brote/ Elongación	MS+KIN	MS + 0,1 mg/l KIN	3 – 7 días (<i>brotación</i>) 3 semanas (<i>elongación</i>)
		Enraizamiento	MS+CA	MS + 3% Carbón Activado	1 – 4 semanas (si no enraíza, vuelve al medio anterior por 2 semanas)
	Bazargani et al., (2011)	Inducción de Brote	MIB	MS + 0,1 mg/l ANA + 0,1 mg/l BAP	3 - 4 semanas
		Enraizamiento	ME _n	½ MS + 0,1 mg/l IBA	Hasta el desarrollo de raíces

Los protocolos incluyen en el medio de cultivo las sales principales y menores de Murashige y Skoog (MS, 1962), Vitamina B5 y Phytigel o Agar (según protocolo). Los reguladores de crecimiento indicados son: ácido giberélico (GA), ácido naftalen acético (ANA), ácido indolbutírico (IBA), kinetina (KIN) y bencil amino purina (BAP).

En todos los protocolos la concentración de las sales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) se consiguió mediante el agregado de 4,3 g de MS SIGMA® (n° cat. M524) por litro de solución y, además se realizó el agregado de vitaminas de medio B5 (ácido Nicotínico, 1mg/l; tiamina-HCl, 10 mg/l; piridoxina-HCl, 1 mg/l y mioinositol 100 mg/l) (Gamborg et al., 1968)).

2.4.1 Protocolos para ápices embrionarios

De manera general, para todos los protocolos ensayados, la obtención de explantes de ápices embrionarios a partir de semillas se realizó según Pathi y Tuteja (2013). Las semillas de algodón previamente deslintadas fueron desinfectadas superficialmente como se indicó anteriormente (sección 2.2.2) y embebidas en agua destilada estéril por 24-48 horas para lograr el ablandamiento del tegumento y la emergencia de la radícula (Figura 3 A). Bajo campana de flujo laminar y con la ayuda de un microscopio estereoscópico se extrajeron los embriones, eliminando la cubierta de la semilla por disección (Figura 3 B), para luego realizar un corte transversal y otro longitudinal (Figura 3 C, D y E) a fin de eliminar los cotiledones, exponiendo el eje embrionario (Figura 3 F, G). Por último, se realizó el corte y eliminación de la radícula (Figura 3 H) colocando luego los explantes de ápices embrionarios sobre el medio de inducción de brotes correspondiente a cada protocolo (Figura 3 I).

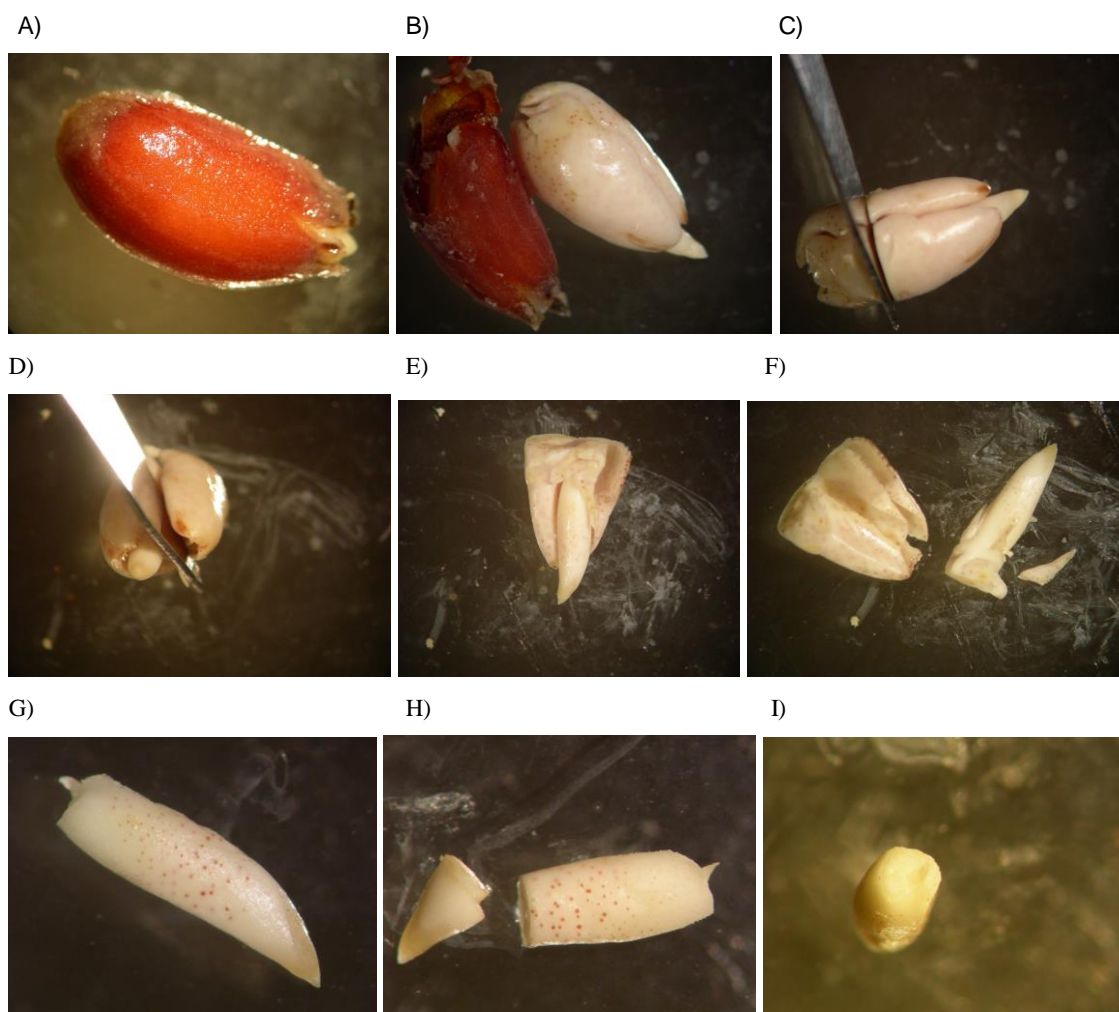


Figura 3: Pasos de disección realizados sobre las semillas de algodón para la obtención de los explantes: ápices embrionarios para los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y Pathi y Tuteja (2013)

Para los tres protocolos evaluados con estos explantes se requirió el paso del material vegetal en crecimiento por medios de cultivo de inducción de brotes, medios que permiten la elongación de los brotes generados y por medios promotores del enraizamiento, salvo para el protocolo de Hemphill et al. (1998), donde los explantes generaron raíces en el medio de inducción de brotes.

El pH de los medios de cultivo de cada protocolo se ajustó a 5,8 mediante el agregado de gotas de hidróxido de sodio 1N o de ácido clorhídrico 1N antes de la esterilización, y luego del agregado de los reguladores de crecimiento. El ácido giberélico es el único regulador de crecimiento que debe esterilizarse por filtración y se agrega al medio de cultivo, una vez que éste se enfría alcanzando los 42°C, bajo campana de flujo laminar (Kumria et al., 2003b).

Para todos los medios de cultivo la esterilización se realizó en autoclave durante 20 minutos, a 1 atmósfera de presión y 120 °C.

Las placas de Petri que contenían los medios de cultivo estériles se prepararon en un paso adicional de carga, bajo campana de flujo laminar (plaqueo) y se guardaron hasta su uso.

En el medio de inducción, los ápices embrionarios que sirvieron de explante, se colocaron en posición horizontal, en placas conteniendo el medio apropiado, y luego se sellaron con papel film. Este papel sellador presenta poros suficientemente grandes como para permitir el paso de oxígeno y suficientemente pequeños para evitar el paso de las bacterias.

De manera general, se colocaron 10 explantes por placa preparada y para una de las tres repeticiones, se usaron 5 placas.

Entre los 7 y 10 días se realizó el primer subcultivo, pasando los explantes que no se contaminaron al mismo medio de inducción, pero contenidos en frascos. Éstos se sellaron también usando papel film y contuvieron más de 3 explantes brotados cada uno. Luego se siguieron los pasos indicados para cada protocolo en particular.

La incubación se realizó para todos los casos en cámara de cría automatizada, a una temperatura de 28 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad), bajo luz fluorescente ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Las plantas obtenidas en estos ensayos que lograron enraizar, se transfirieron a una mezcla de tierra estéril y perlita (50:50), contenidas en vasos plásticos. Este conjunto se conservó dentro de bolsas plásticas, a modo de cámara húmeda para el proceso de aclimatación *ex vitro*, donde se humedeció con agua estéril y se las mantuvo cerradas, para lograr que conservaran las condiciones de humedad. Luego de al menos tres días en la cámara húmeda, las plantas fueron paulatinamente expuestas al ambiente de la cámara de cría y se regaron con agua corriente. Esto se realizó con la intención de lograr la aclimatación de las mismas, para poder ser transferidas a macetas más grandes y trasladadas al invernáculo.

i) Protocolo de Hemphill et al. (1998)

Los ápices embrionarios extraídos de la semilla según Pathi y Tujeta (2013) se colocaron de forma horizontal sobre el medio de inducción de brotes. Este medio contenía 4,3 g del medio de Murashige y Skoog (1962) marca SIGMA®, vitaminas de medio B5 (Gamborg et al., 1968), sacarosa (15 g/l) y Phytigel (2,25 g/l) en placas de Petri estériles. Los reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (BAP) a concentración de 0.3 μ M y 0.1 μ M de ácido indol-3-butírico (IBA) se agregaron a los medios de inducción de brotes y de enraizamiento respectivamente y se adicionaron, antes del autoclavado. Durante el primer subcultivo sobre el medio de inducción de brotes (pasados entre 7 - 10 días), los explantes que se encontraban en placas, se trasladaron a frascos y se colocaron en posición vertical sobre el mismo medio de cultivo. Tanto las placas como los frascos se cerraron por medio de papel film.

Para los ápices elongados que alcanzaron un tamaño de 2-3 cm o más, según el protocolo hubiera sido necesario utilizar un paso de maduración en el medio conteniendo carbón activado (MS3AC) para reducir los niveles endógenos de BAP y para preparar los brotes para enraizar (14-21 días) en otro medio de cultivo que contenga el regulador de crecimiento IBA. Dado que se observó la aparición de raíces dentro de las placas en al menos 7 a 10 días, no se tuvo en cuenta esta indicación y en general los explantes se elongaron bien en el medio basal libre de reguladores de crecimiento y no tuvieron problemas para generar raíces. En cada repique se realizó el registro de las variables mencionadas en la sección 2.5 y las plantas enraizadas pasaron a tierra en cámara de cría hasta la aclimatación y luego al invernáculo.

ii) Protocolo de Morre et al. (1998)

Los ápices embrionarios obtenidos según Pathi y Tuteja (2013), fueron cultivados sobre un medio artificial consistente en concentración estándar de macro y micronutrientes del medio de cultivo de Murashige y Skoog (SIGMA®) (4,3 g/l), vitaminas de medio B5 (Gamborg et al., 1968), 20 g/l de glucosa y suplementado con 3 mg/l de bencil aminopurina (BAP). Como para el protocolo de Hemphill et al. (1998), los explantes en este caso, se colocaron primero en placas de Petri conteniendo el medio estéril, en posición horizontal. Luego del primer subcultivo, se pasaron a frascos preparados en idénticas condiciones, sobre el mismo medio de inducción y se

colocaron en posición vertical, sellando los frascos con papel film. Los ensayos se mantuvieron en cámara de cría por 20 días (con subcultivos cada 10 días). Los explantes que dieron respuesta (brotes), fueron luego transferidos a un medio basal sin reguladores de crecimiento por un período adicional de 15 a 20 días para permitir la elongación. En cada subcultivo se realizó el registro de las variables mencionadas en la sección 2.5. En este medio libre de hormonas, por lo general, se logró el enraizamiento de los explantes brotados.

En los casos en que los explantes brotados no enraizaron, se realizó un shock de auxinas, sumergiendo los brotes en una solución de 500 mg/l de IBA preparado en forma estéril. Luego de este shock se colocó a estos brotes sobre medio libre de reguladores de crecimiento, por un tiempo adicional, realizando los subcultivos necesarios, hasta observar desarrollo de raíz.

Todos los medios fueron solidificados con 7 g/l de agar (Agar, Plant TC; Phyto Technology Laboratories®), los reguladores de crecimiento se agregaron antes del autoclavado de los medios a temperatura y presión indicados anteriormente y la cámara de cría donde permanecieron los ensayos fue la misma que la usada para los demás protocolos probados, por lo que permanecieron con el régimen de temperatura y fotoperíodos indicados con anterioridad. En cada subcultivo se realizó el registro correspondiente para todas las variables analizadas. Los brotes que enraizaron se pasaron a la mezcla de tierra y perlita, como se mencionó anteriormente y se procedió a idéntica aclimatación de las plantas y pasaje a invernáculo.

iii) Protocolo de Pathi y Tuteja (2013)

Se utilizó 4,3 g/l del medio basal comercial conteniendo las sales principales y secundarias de Murashige y Skoog (1962), incluyendo las vitaminas de medio B5 (Gamborg et al., 1968), con el agregado de 30 g/l de sacarosa y 7 g/l de agar (Agar, Plant TC; Phyto Technology Laboratories®). Los reguladores de crecimiento incluidos en el medio de inducción de brotes fueron bencil amino purina (2 mg/l) y kinetina (2 mg/l). Los ápices embrionarios aislados según se indica en este protocolo, conteniendo la región meristemática, se colocaron en placas preparadas con el medio de inducción mencionado anteriormente y se llevaron a oscuridad por 48 horas a la temperatura de la cámara de cría. Luego de este período de oscuridad se transfirieron a cámara de cría a temperatura y fotoperíodo indicado anteriormente.

Los explantes, como en los protocolos anteriormente nombrados, primero se colocaron en forma horizontal sobre el medio de cultivo, hasta el primer subcultivo, donde se orientaron en forma vertical sobre el mismo medio. Se realizó un subcultivo cada semana. Luego de 3-4 semanas en el medio de inducción de brotes se pasaron al medio basal de Murashige y Skoog (1962) libre de reguladores de crecimiento, para producir la elongación de los brotes por dos semanas. Pasado este tiempo se repicaron hacia un medio de enraizamiento conteniendo el mismo medio basal con el agregado del regulador de crecimiento ácido indol butírico (IBA).

En cada subcultivo se realizó el registro de las variables analizadas, registrándose también las particularidades observadas.

Las plantas que lograron enraizar se pasaron a una mezcla de tierra y perlita estériles. Primero permanecieron en la cámara de cría, hasta lograr la rustificación suficiente y necesaria para ser llevadas al invernáculo.

2.4.2 Protocolos de yemas axilares

i) Protocolo de Agrawal et al. (1997)

Las yemas axilares cotiledonares, provinieron de plántulas de 7 días que germinaron bajo condiciones estériles. Estos explantes fueron obtenidos luego de la remoción de los cotiledones y el meristema apical de las plántulas. Así, cada explante tuvo dos nudos o yemas axilares durmientes. Estos explantes se colocaron sobre un medio de cultivo basal que contenía las sales principales y secundarias de Murashige y Skoog (1962), suplementadas con 2,5 mg/l de 6-bencil aminopurina (BAP) y 2,5 mg/l de kinetina (KIN), medio denominado MS9. Además, los medios se suplementaron con 20 g/l de sacarosa y 5,5 g/l de agar agar (Agar, Plant TC; Phyto Technology Laboratories®).

Según el protocolo, los cultivos deberían permanecer en la cámara de incubación durante 35 días y para elongar los brotes se debería transferir a un medio basal MS libre de reguladores de crecimiento conteniendo 5,5 g/l de agar y 20 g/l de sacarosa.

2.4.3 Protocolos ensayados sobre ápices caulinares

Las semillas de algodón se desinfectaron superficialmente, según se indicó anteriormente (sección 2.2.2) y luego se realizó una pre-germinación en agua estéril por 24 horas. Pasado este tiempo se realizó una nueva desinfección para luego sembrar las semillas bajo condiciones estériles y sin el tegumento, sobre el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962). Bajo condiciones de incubación de cámara de cría a una temperatura de 28 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad), bajo luz fluorescente ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se hizo germinar estas semillas durante 7 días hasta la extracción del explante.

De manera general, para los dos protocolos evaluados con estos explantes se requirió el paso del material vegetal en crecimiento por medios de cultivo de inducción de brotes, medios que permiten la elongación de los brotes generados y por medios promotores del enraizamiento.

El pH de los medios de cultivo de cada protocolo, se ajustó a 5,8 por el agregado de 1N de hidróxido de sodio o 1N de ácido clorhídrico antes de la esterilización, y luego del agregado de los reguladores de crecimiento. Para todos los medios de cultivo, la esterilización se realizó en autoclave durante 20 minutos, a 1 atmósfera de presión y 120 °C.

Las placas de Petri que contenían los medios de cultivo estériles se prepararon en un paso adicional de carga, bajo campana de flujo laminar (plaqueo) y se guardaron hasta su uso.

Se colocaron 10 explantes por placa preparada y para cada una de las tres repeticiones, se colocaron 3 placas.

Según el protocolo, las plantas brotadas que enraizaran deberían ser transferidas a una mezcla de tierra estéril y perlita (50:50) y el conjunto, conservarse en bolsas plásticas cerradas (para lograr condiciones de humedad) bajo condiciones de cámara de cría a 28 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad), bajo luz fluorescente ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

i) Protocolo de Gould y Magallanes- Cedeno (1998)

Los ápices caulinares están ubicados en el tallo entre los cotiledones. Para exponerlos es necesario remover empujando de a uno los cotiledones (Figura 4). Para exponer el ápice caulinar se procedió tal como describen Gould et al. (1991). El epicótilo fue eliminado de la porción inferior del ápice caulinar y el explante se cultivó sobre el medio conteniendo las sales principales y secundarias de Murashige y Skoog (1962) (4,3 g/l), suplementado con kinetina (medio denominado MS+KIN) por 3-5 días, colocando 10 ápices por placa. Se removieron, en caso de ser necesario, los explantes que pudieron haberse contaminado. Luego se realizaron subcultivos al mismo medio para permitir la elongación de los vástagos que brotaron durante tres semanas. Pasado ese tiempo, se pasaron al medio basal de Murashige y Skoog suplementado con carbón activado (denominado MS + CA) para permitir que enraícen.

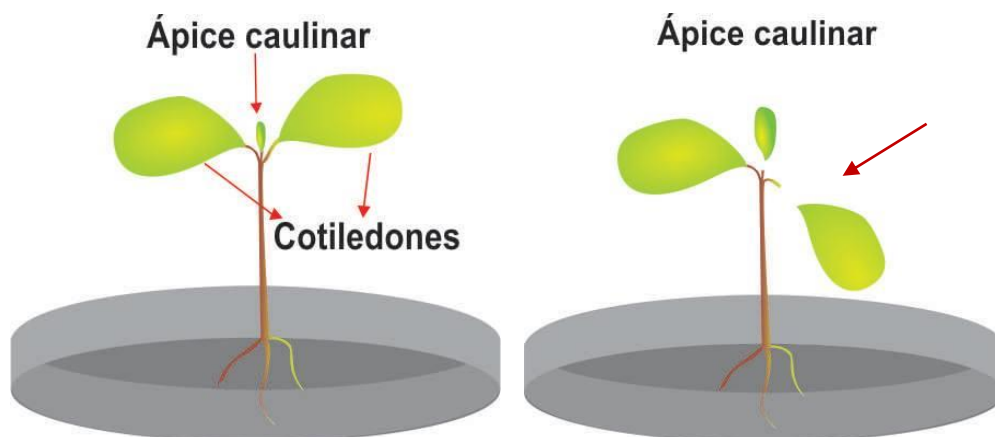


Figura 4: Esquema de obtención de ápices caulinares usados como explante en los protocolos de Gould y Magallanes Cedeno (1998) y Bazargani et al. (2011).

ii) Protocolo de Bazargani et al. (2011)

Como en el caso anterior, el ápice caulinar se obtuvo removiendo un cotiledón presionándolo hacia abajo hasta lograr su desprendimiento. Se consiguió de esta manera exponer el ápice caulinar, el cual se escinde del hipocótilo, cortando en la base. Las hojas no expandidas y primordios fueron colocadas sobre el medio de inducción de brote (denominado MIB). El pH se ajustó a 5,8 antes del autoclavado y todos los medios fueron solidificados con phytigel (2 g/l). Los ensayos se llevaron a la misma cámara de cría y se tuvieron bajo las mismas condiciones que en los casos anteriores a temperatura de 28 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad), bajo luz fluorescente ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2.5 Evaluación de la respuesta *in vitro*

Para determinar una eficiencia de producción de brotes y un porcentaje de respuesta por explante, para cada material evaluado se determinó:

- * **Porcentaje de explantes sin crecimiento (%Sin Crecimiento):** representa el porcentaje de los explantes que, en el tiempo transcurrido en el medio de cultivo hasta el primer subcultivo, no dieron ningún tipo de respuesta, en referencia al número total de explantes en cada repetición.
- * **Porcentaje de explantes que forman callo (%Callo):** es una respuesta no deseada y el valor representa al número de callos contabilizados sobre el total de explantes de cada repetición a lo largo del experimento.
- * **Porcentaje de explantes con brotes (%Brotos):** es la primera respuesta esperada y representa porcentualmente a los explantes que dan respuesta de uno o más brotes con hojas a lo largo del tiempo de experimentación en relación con el número de explantes total en cada repetición.

- * **Porcentaje de explantes con múltiples brotes (%MBrotes):** es el número porcentual explantes que tuvieron más de un brote sobre el total de explantes puestos a prueba.

Aclaración: aquellos explantes con un mínimo de un brote en promedio, fueron considerados como respondedores, mientras que la formación de más de dos brotes a partir de un explante fue considerada como inducción de múltiples brotes.

- * **Número de Brotes por explantes:** cantidad de explantes que tuvieron más de un brote durante el tiempo en que duró la experiencia.
- * **Porcentaje de explantes que enraízan (%Raíz):** la variable representa el número porcentual de explantes que enraízan en referencia al total de explantes puestos a prueba sobre los medios de cultivo de cada protocolo y constituye la segunda respuesta esperada.

$$\%Raíz = [N^{\circ} \text{ de explantes con raíz} / N^{\circ} \text{ Total de explantes}] * 100$$

- * **Relación Raíz por Brote (%Raíz/Brote):** la variable constituye el valor porcentual de los explantes que dieron raíz sobre el total de los explantes que brotaron; mide una eficiencia de enraizamiento.

$$\%Raíz/Brote = [N^{\circ} \text{ de explantes con raíz} / N^{\circ} \text{ explantes que brotan}] * 100$$

- * **Respuesta negativa:** Están representados aquí tanto los explantes que no dan respuesta (sin crecimiento) como los que forman callos. En conjunto, constituyen una respuesta no deseada en la regeneración mediante organogénesis, ya que ninguno de esos explantes dará una planta entera como resultado final de la experiencia. Por ello, se considera a la suma de ambas como una respuesta negativa.
- * **Porcentaje de brotes que se secan (%Secan):** Representa a aquellos brotes, que luego de permanecer un tiempo en los medios de cultivo del protocolo se marchitan sin presentar evidencias de contaminación.

Los recuentos para estas variables se realizaron cada vez que se efectuaron los subcultivos y se tomaron en cuenta además de estos parámetros de respuesta *in vitro*, la cantidad de contaminaciones y el tiempo insumido para el enraizamiento.

2.6 Estrés Abiótico

i) Condiciones de cultivo bajo estrés abiótico

El estrés abiótico se aplicó sobre el material vegetal bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Los materiales ensayados fueron las semillas y explantes de hipocótilo de las variedades de algodón Guazuncho 2, Porá, Guazuncho 3, Porá Ité, Oro Blanco 2 y la línea SP 48114. En las semillas se probó la germinación bajo diferentes concentraciones de los agentes inductores de estrés que se agregaron al medio basal de Murashige y Skoog (1962), mientras que sobre los explantes se evaluó la respuesta celular al estrés mediante la capacidad de formación de callos bajo las mismas condiciones de estrés por el agregado de los diferentes estresores al medio de cultivo denominado P1-AS del protocolo de Sunilkumar y Rathore (2001). El medio de cultivo P1-AS contiene 4,3 g/l del medio basal de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 100 mg/l de mioinositol, 0.4 mg/l de tiamina-HCl, 5 mg/l de N⁶-(2-isopentenil)adenina (2iP), 0.1 mg/l de ANA, 30 g/l de glucosa y 1 g/l de MgCl₂.6H₂O, el pH se ajustó a 5.8 y se solidificó con 2 g/l de Phytigel.

El estrés abiótico se generó mediante las siguientes condiciones de cultivo:

- Estrés hídrico: el medio de cultivo se adicionó con agentes que incrementan el potencial osmótico como manitol y sorbitol en concentraciones de 20 y 80 mM. Como control se utilizó medio sin agente estresante (0 mM de sorbitol o manitol) (Murillo – Amador et al., 2002; Costa et al., 2004; Fanti y Perez, 2004).

- Estrés salino: se adicionaron al medio de cultivo diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0, 50, 100 y 200 mM de NaCl) (Garraat et al., 2002 y Meloni et al., 2003).

Las semillas a ser evaluadas sobre el medio de cultivo *in vitro* de Murashige y Skoog (1962) con distintas concentraciones de agentes estresantes, fueron deslindadas y desinfectadas superficialmente como se describió anteriormente (secciones 2.2.1 y 2.2.2). Además, se dejaron en agua destilada estéril por 24 horas, antes de sembrarlas en los distintos medios y sus tegumentos fueron extraídos, para minimizar las contaminaciones (Gould y Magallanes-Cedeno, 1998; Hemphill et al., 1998). Para cada concentración del estresante se sembraron 50 semillas, por lo que para cada variedad se sembraron 200 semillas por ensayo, en los ensayos de salinidad y 250 en los de estrés hídrico.

Las semillas y explantes de las variedades destinadas a evaluar bajo estas condiciones se colocaron en los medios mencionados en la Tabla 4.

Tabla 4. Medios de cultivos usados para cada genotipo, ensayados bajo condiciones de estrés salino y estrés hídrico.

Condición impuesta	Medio de cultivo para semillas	Composición del medio de cultivo para hipocótilos
Estrés salino	MS + 0, 50, 100 y 200 mM de NaCl	P1 (MS + 5 mg/l 2iP + 0.1 mg/l ANA) + 0, 50, 100 y 200 mM de NaCl
	MS + sorbitol (0, 20 y 80 mM)	
Estrés hídrico	MS + manitol (0, 20 y 80 mM)	

Los protocolos incluyen en el medio de cultivo las sales principales y menores de Murashige y Skoog (MS, 1962), Vitaminas de medio B5 (Gamborg et al. 1968) y Phytigel o Agar (según protocolo). Los reguladores de crecimiento indicados son N⁶-(2-isopentenil) adenina (2iP) y ácido naftalén acético (ANA).

Con el nombre P1 se designa al medio propuesto por Sunilkumar y Rathore (2001), el cual es una modificación del medio de Firoozabady y DeBoer 1993, en el cual se estudió previamente la capacidad de formación de callos para la mayoría de las variedades evaluadas en este trabajo (no ensayadas para Guazuncho 2 y Porá). El medio de cultivo P1 está compuesto por las sales principales del medio basal propuesto por Murashige y Skoog (1962) suplementado con 100 mg/l de mioinositol, 0.4 mg/l de tiamina-ácido clorhídrico, 5 mg/l de N⁶-(2- isopentenil)adenina, 0.1 mg/l de

ácido naftalen acético, 3% de glucosa, 1 g/l de cloruro de magnesio hexahidratado, solidificado con 2 g/l de Phytigel, y el pH se ajustó a 5,8 por el agregado de gotas de ácido clorhídrico 1N o hidróxido de sodio 1N. Los segmentos de hipocótiles se colocaron en posición horizontal, sobre el medio de cultivo y se incubaron en la cámara de cría con idénticas condiciones de luz y temperatura que en los casos de regeneración directa.

2.7 Diseño estadístico

El diseño empleado fue un DCA (Diseño Completamente Aleatorizado). El modelo lineal para la observación del tratamiento i en la parcela j , Y_{ij} es:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$$

donde:

Y_{ij} : observación del tratamiento i en la parcela j

μ : media general

T_i : efecto del tratamiento i

ξ_{ij} : término de error aleatorio asociado a la observación Y_{ij}

Usualmente se asume que el término de error se distribuye normalmente con media cero y varianza constante para toda observación.

Para los ensayos realizados se probaron los supuestos de normalidad de los errores y la homogeneidad de varianza para las variables consideradas en cada ensayo mediante las pruebas de Shapiro Wilks (Mahibbur y Govindarajulu, 1997) y Levene (1960) respectivamente, sobre los cuales se realizó el análisis de la varianza correspondiente. En los casos en los que la variable no cumpliera con alguno de los supuestos (normalidad en la distribución de los errores u homogeneidad de variancia), se la transformó mediante la función $\arcsen\sqrt{x}$ o se efectuó el Análisis de la Varianza no paramétrica de Kruskal Wallis al 5% (Marascuilo y Mcweeney, 1977), con el programa estadístico INFOSTAT/P (Di Renzo et al., 2014).

3. RESULTADOS

3.1 Protocolos para ápices embrionarios

3.1.1 Protocolo de Hemphill et al. (1998)

Se realizaron los análisis para validar los supuestos de normalidad de los errores y la homogeneidad de varianzas, para cada una de las variables estudiadas (Anexo I). En la tabla 5 se observan los test de Levene y Shapiro-Wilks, los cuales evidencian que, de los análisis, los supuestos se cumplen. En aquellas variables (1) en las cuales alguno de los supuestos no se cumplió la variable fue transformada como el arcoseno de la raíz cuadrada.

Tabla 5: Test de Levene y Test de Shapiro-Wilks para las variables estudiadas.

Variable	Test de Levene		Test de Shapiro-Wilks	
	F	p>F	W*	p
Porcentaje de explantes sin crecimiento (1)	2,45	0,0783 ns	0,96	0,7387 ns
Porcentaje de explantes que forman callo	2,04	0,1271 ns	0,91	0,1284 ns
Porcentaje de explantes con brotes	1,66	0,1902 ns	0,95	0,5820 ns
Porcentaje de explantes con múltiples brotes (*)	-	-	-	-
Porcentaje de brotes que enraízan	1,60	0,2046 ns	0,93	0,2046 ns
Relación raíz/brote	1,72	0,1737 ns	0,98	0,9454 ns
Porcentaje de respuesta negativa (1)	1,39	0,2851 ns	0,91	0,1426 ns
Porcentaje de brotes que se secan	1,47	0,2491 ns	0,92	0,1738 ns

ns: no significativo; (*) : no se realizó el análisis estadístico; (1): transformación arcoseno de la raíz cuadrada

Porcentaje de explantes sin crecimiento: el análisis de la varianza evidenció la existencia de diferencias significativas entre los genotipos para la variable transformada mediante la función arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de

explantes sin crecimiento en el medio de inducción de brotes (Tablas 6 y 7). Se desestimó un dato atípico para la variedad Oro Blanco 2.

Tabla 6: Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable: “porcentaje de explantes sin crecimiento” utilizando el protocolo de Hemphill et al. (1998).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	0,24	0,03	3,94*
Error	15	0,13	0,01	
Total	22	0,37		

CV: 97,07% (*): significativo $p < 0,05$

Tabla 7: Medias y desvíos estándares para la variable “porcentaje de explantes sin crecimiento” utilizando el protocolo de Hemphill et al. (1998).

Genotipo	Explantes sin crecimiento (%)
SP 44825 (SG)	0,00 ± 0,00 a
Porá-Ité	0,00 ± 0,00 a
SP 48114	0,67 ± 1,15 ab
Coker 312	0,67 ± 1,15 ab
Guazuncho 2	1,33 ± 1,15 ab
Guazuncho 3	2,00 ± 2,00 ab
Porá	5,33 ± 5,03 bc
Oro Blanco 2	13,00 ± 7,07 c

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher- $p > 0,05$)

El valor máximo para esta variable fue alcanzado por la variedad Oro Blanco 2, donde el 13,0% de los explantes que se colocaron en el medio de inducción, no se desarrollaron. El valor mínimo fue obtenido por los genotipos SP 44825 (SG) y Porá Ité, donde ningún explante mostró este tipo de respuesta (0,0% en ambos casos) (Figura 5).

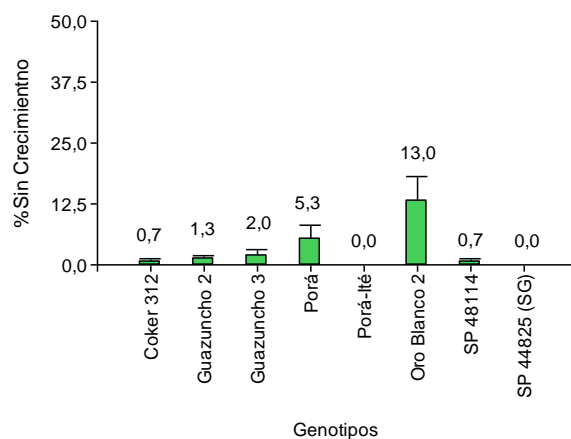


Figura 5: Porcentaje de explantes sin crecimiento para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Hemphill et al. (1998).

Porcentaje de explantes que forman callo: se encontraron diferencias significativas entre los genotipos cuando se realizó el análisis de la varianza (Tablas 8 y 9). Para este análisis se eliminó un valor atípico para la variedad Porá.

Tabla 8. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “porcentaje de explantes que forman callo” utilizando el protocolo de Hemphill et al. (1998).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	3883,83	554,83	13,51**
Error	15	616,00	41,07	
Total	22	4499,83		

CV: 45,49%

(**): significativo $p < 0,01$

Tabla 9. Medias y desvíos estándares para la variable “porcentaje de explantes que forman callo”, utilizando el protocolo de Hemphill et al. (1998).

Genotipo	Explantes que forman callo (%)
Guazuncho 2	0,67 ± 3,70 a
Porá	2,00 ± 4,53 ab
Coker 312	2,67 ± 3,70 ab
Oro Blanco 2	10,67± 3,70 abc
Porá Ité	12,00 ± 3,70 bc
Guazuncho 3	17,33 ± 3,70 c
SP 48114	20,67 ± 3,70 c
SP 44825	42,67 ± 3,70 d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher- $p > 0,05$)

La mayor proporción de callos que se desarrollaron a partir de los explantes colocados en el medio de inducción de brotes, lo presentó la línea SP44825 (SG) (42,7%), mientras que el menor valor de esta respuesta lo presentó la variedad Guazuncho 2 (0.7%) (Figura 6).

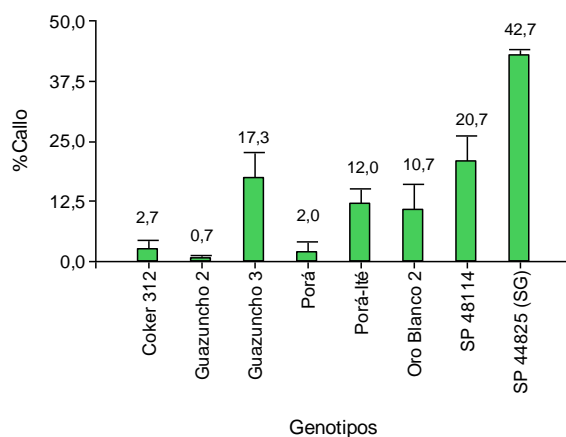


Figura 6. Porcentaje de explantes que forman callo para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Hemphill et al. (1998).

Porcentaje de explantes con brotes: el análisis de la varianza no evidenció diferencias significativas entre los genotipos evaluados (Tabla 10). La mayoría de ellos presentó brotes en más del 50,0% de los explantes salvo la línea SP 44825 (SG) que presentó el 44,0% (Figura 7).

Tabla 10. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “porcentaje de explantes con brotes” utilizando el protocolo de Hemphill et al. (1998).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	1220,67	174,38	0,73 ns
Error	16	3829,33	239,33	
Total	23	5050,00		

CV: 27,87% ns: no significativo

Los valores variaron desde el menor valor de explantes con brotes de 44,0% para la línea SP 44825 (SG) hasta un 66,7% para la variedad Guazuncho 2 (Figura 7). En la Figura 8 se observan los brotes que enraizaron luego de un mes de permanencia en el medio de inducción de este protocolo.

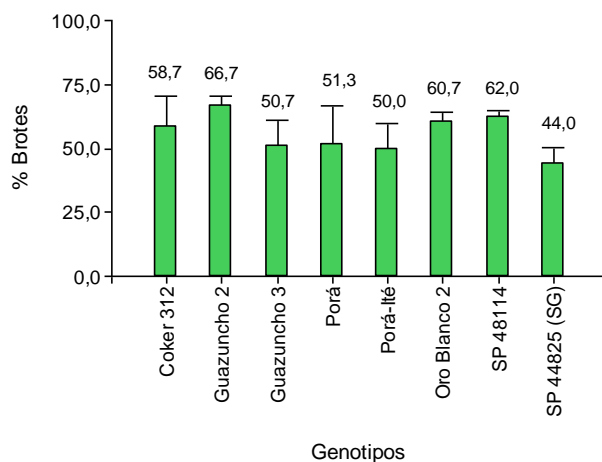


Figura 7. Porcentaje de explantes con brotes para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Hemphill et al. (1998).

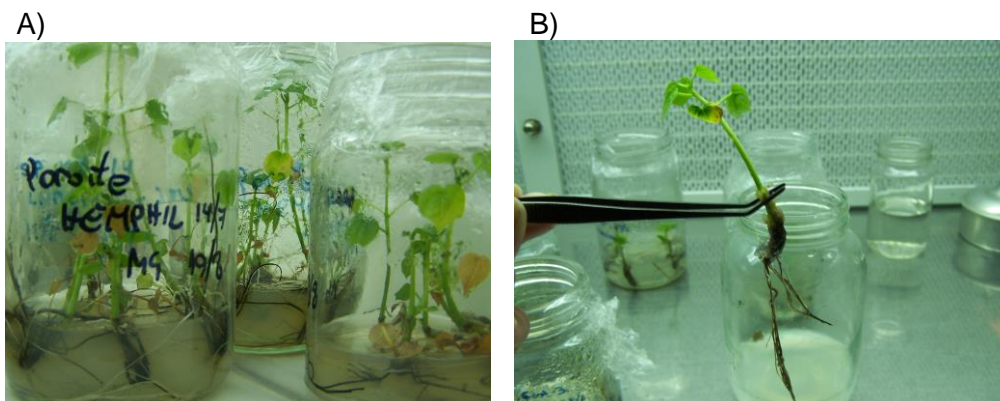


Figura 8. Plantas brotadas bajo el protocolo de Hemphill (1998). A) Variedad Porá Ité luego de un mes de permanencia en el medio de inducción. B) Guazuncho 3, luego de un mes de permanencia en el medio de inducción de brotes.

Porcentaje de explantes con múltiples brotes: no se realizó el análisis de varianza para la variable debido a que Guazuncho 2 fue la única que presentó 2 brotes en una de sus plantas, mientras que el resto solo presentó uno.

Porcentajes de brotes que enraízan: el análisis de la varianza realizado para evaluar la diferencia entre genotipos no mostró diferencias significativas (Tabla 11).

Tabla 11. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de varianza del “porcentaje de brotes que enraízan” utilizando el protocolo de Hemphill (1998).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	3790,50	541,50	2,17 ns
Error	16	3984,00	249,00	
Total	23	7774,50		

CV: 47,46% ns: no significativo

La variedad Coker 312 fue la que presentó el mayor número de raíces (49,3%), observándose un mínimo porcentaje para la línea SP 44825 (SG), con sólo 8,7% de raíces sobre el total de explantes ensayados (Figura 9).

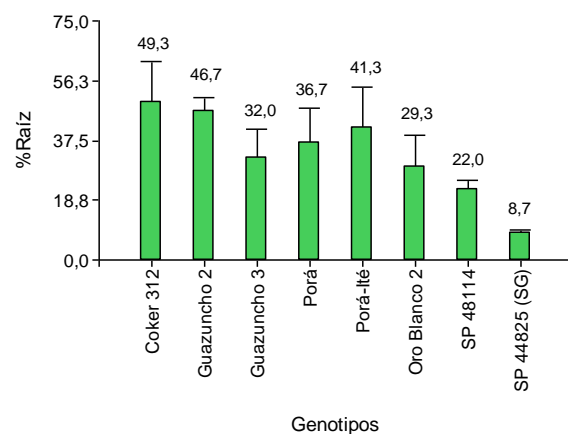


Figura 9: Porcentaje de brotes que enraízan para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Hemphill et al. (1998).

Relación raíz/brote: se encontraron diferencias significativas entre los genotipos, cuando se realizó el análisis de la varianza para los explantes que enraízan en relación con los que brotan durante el experimento (Tablas 12 y 13).

Tabla 12. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “explantes que enraízan en relación a los que brotan” utilizando el protocolo de Hemphill et al. (1998).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	10011,38	1430,20	4,30**
Error	16	5325,36	332,83	
Total	23	15336,73		

CV: 31,09%

(**): significativo $p < 0,01$

Tabla 13. Medias y desvíos estándares para la variable “relación raíz/brote”, utilizando el protocolo de Hemphill et al. (1998).

Genotipo	Relación raíz/brote (%)
SP 44825 (SG)	20,03 ± 10,53 a
SP 48114	35,43± 10,53 ab
Oro Blanco 2	50,50 ± 10,53 abc
Guazuncho 3	61,42 ± 10,53 bc
Guazuncho 2	70,66 ± 10,53 c
Porá	70,85 ± 10,53 c
Porá Ité	78,88 ± 10,53 c
Coker 312	81,67 ± 10,53 c

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher- $p > 0,05$)

La mejor respuesta de explantes que dan raíz, en relación al total de explantes que brotaron para cada genotipo, fue para la Coker 312 (81,7%), seguido por Porá Ité (78,9%), mientras que la menor respuesta la presentó SP 44825 (SG), con solo 20,0% de explantes que enraizaron (Figura 10).

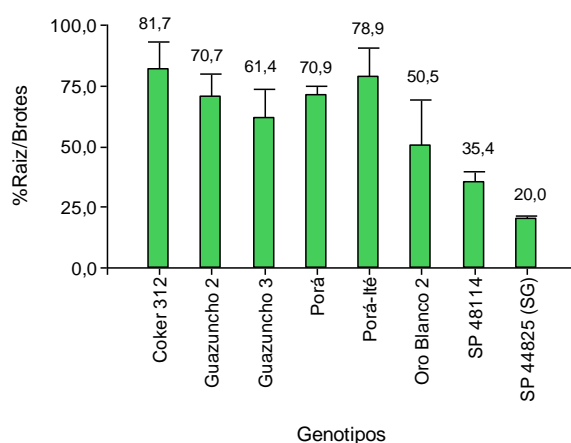


Figura 10: Porcentaje de brotes que enraizaron para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Hemphill et al. (1998).

Para este protocolo, las raíces fueron notadas en el primer repique, cuando se pasaron de las placas a los frascos, entre los 7 a 10 días del inicio de la experiencia y

en ese momento los brotes tenían un tamaño que rondaba los 2,5 centímetros de largo.

Porcentaje de respuesta negativa: Se encontraron diferencias significativas cuando se realizó el análisis de varianza sobre los explantes que dieron respuesta negativa, en relación al total (Tablas 14 y 15). Para cumplir con los supuestos de homogeneidad de varianza, los datos fueron transformados con la función arcoseno de la raíz cuadrada y fue desestimado un dato (valor atípico) obtenido para la variedad Porá.

Tabla 14: Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para el porcentaje de respuesta negativa, utilizando el protocolo de Hemphill et al. (1998).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	0,84	0,12	6,95**
Error	15	0,26	0,02	
Total	22	1,10		

CV: 36,20% (**): significativo $p < 0,01$

Tabla 15. Medias y desvíos estándares para el porcentaje de respuesta negativa, utilizando el protocolo de Hemphill et al. (1998).

Genotipo	Explantes con respuesta negativa (%)
Coker 312	3,33 ± 3,06 ab
Guazuncho 2	2,00 ± 2,00 a
Guazuncho 3	19,33 ± 19,07 c
Porá	5,00 ± 7,07 ab
Porá Ité	12,00 ± 5,29 bc
Oro Blanco 2	19,33 ± 14,74 c
SP 48114	21,3 ± 9,87 c
SP 44825 (SG)	42,7 ± 2,31 d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher- $p > 0,05$)

La respuesta negativa más importante fue presentada por SP 44825 (SG) (42,7%) que se diferenció significativamente de las demás. En sentido contrario se puede observar en la Figura 11 que las variedades Guazuncho 2 (2,0%), Coker 312 (3,3%), Porá (5,0%) y Porá Ité (12,0%) fueron las de menor respuesta negativa.

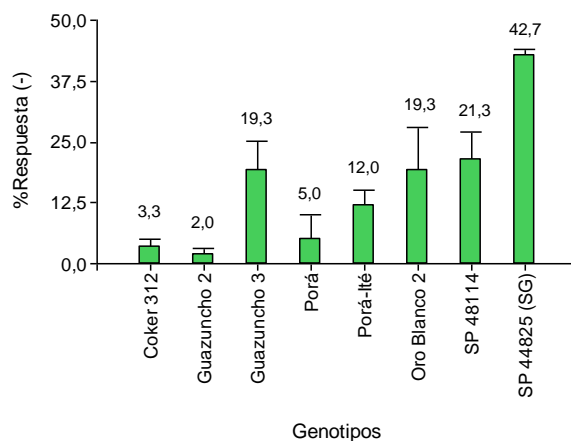


Figura 11: Porcentaje de explantes que dan respuesta negativa para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Hemphill et al. (1998).

Porcentaje de brotes que se secan: cuando se realizó el análisis de la varianza de los explantes que se secan en los medios de cultivo de Hemphill et al. (1998), se eliminó un dato atípico de Porá Ité (Tabla 16).

Tabla 16. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de varianza para la variable “porcentaje de brotes que se secan” en el medio de cultivo, utilizando el protocolo de Hemphill et al. (1998).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	181,77	25,97	1,49 ns
Error	15	260,67	17,38	
Total	22	442,43		

CV: 66,58% ns: No significativo

Si bien no se encontraron diferencias significativas para los explantes que brotan y luego se secan en los medios de cultivo, el menor valor se observó para la variedad Porá Ité, con tan sólo 1% de los explantes con esta respuesta, mientras que el mayor valor, fue para Guazuncho 3 (12,0%) (Figura 12).

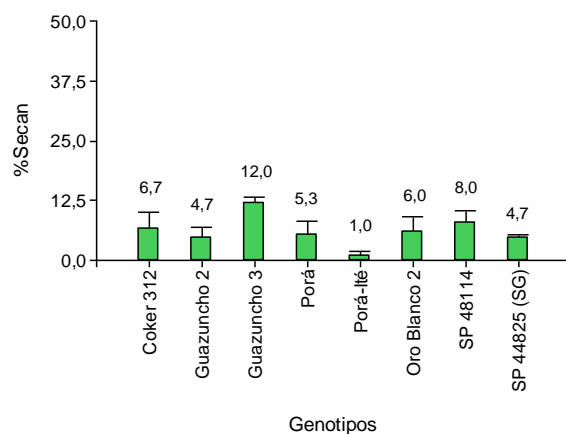


Figura 12: Porcentaje de brotes que se secan en los medios de cultivo para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Hemphill et al. (1998).

3.1.2 Protocolo de Morre et al. (1998)

Se realizaron los análisis para validar los supuestos de normalidad de los errores y la homogeneidad de varianzas, para cada una de las variables estudiadas (Anexo I). En la tabla 17 se observan los test de Levene y Shapiro-Wilks, la cual evidencia que, de los análisis realizados, los supuestos se cumplen. En aquellas variables en las cuales alguno de los supuestos no se cumplía, o bien se utilizó la variable transformada como el arcoseno de la raíz cuadrada (2) o se usó el test no paramétrico de Kruskal Wallis (1).

Tabla 17. Test de Levene y Test de Shapiro-Wilks para las variables estudiadas bajo el protocolo de Morre et al. (1998).

Variable	Test de Levene		Test de Shapiro-Wilks	
	F	p>F	W*	p
Porcentaje de explantes sin crecimiento	2,00	0,1187 ns	0,95	0,6088 ns
Porcentaje de explantes que forman callo	1,87	0,1412 ns	0,90	0,0710 ns
Porcentaje de explantes con brotes	2,47	0,0638 ns	0,97	0,9046 ns
Porcentaje de explantes con múltiples brotes (1)	3,10	0,0289*	0,95	0,6410 ns
Porcentaje de brotes que enraízan	1,19	0,3642 ns	0,93	0,2944 ns
Relación raíz/brote	1,07	0,4251 ns	0,93	0,2154 ns
Respuesta negativa	1,06	0,4321 ns	0,98	0,9398 ns
Porcentaje de brotes que se secan (2)	2,26	0,0879 ns	0,92	0,1919 ns

ns: no significativo (*): significativo $p < 0,05$ (1): análisis mediante el test no paramétrico de Kruskal Wallis (2): transformación arcoseno de la raíz cuadrada

Porcentaje de explantes sin crecimiento: el análisis de la varianza presentado en la tabla 18, indicó que no existen diferencias significativas en cuanto a los explantes que no se desarrollaron en el medio de inducción de brotes.

Tabla 18. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “explantes sin crecimiento” en el medio de inducción, utilizando el protocolo de Morre et al. (1998).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	879,83	125,69	1,07 ns
Error	16	1888,00	118,00	
Total	23	2767,83		

CV: 87,49% ns: No significativo

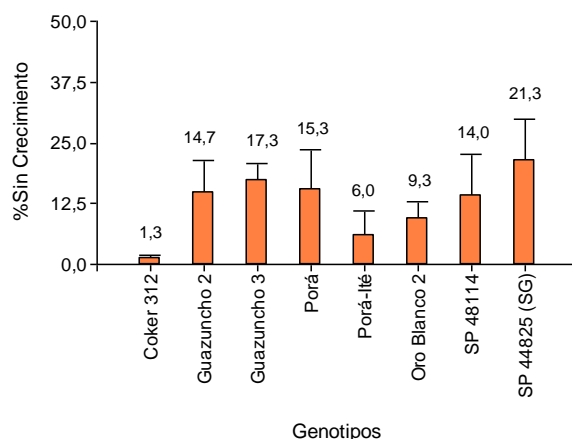


Figura 13: Porcentaje de explantes sin crecimiento en el medio de inducción de brotes para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Morre et al. (1998).

La línea SP44825 (SG) fue la que presentó el mayor porcentaje, implicando a una mayor cantidad de explantes que no dieron ningún tipo de respuesta (21,3%) en el medio de inducción de brotes. Mientras que la variedad que presentó menos dificultad en la inducción de brotes fue Coker 312 en la cual sólo el 1,3% de sus explantes no crecieron (Figura 13).

Porcentaje de explantes que forman callo: en el cuadro de análisis de la varianza (Tabla 19) se muestra que no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos evaluados para este protocolo.

Tabla 19: Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “explantes que forman callo” en el medio de inducción de brotes, utilizando el protocolo de Morre et al. (1998).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	1221,17	174,45	0,58 ns
Error	16	4789,33	299,33	
Total	23	6010,50		

CV 65,91% ns: No significativo

En el grupo de genotipos evaluados, el mayor porcentaje de callos se pudo apreciar para la variedad Porá Ité (36,0%), mientras que el menor porcentaje lo presentó la variedad Guazuncho 3 (18,0%) (Figura 14).

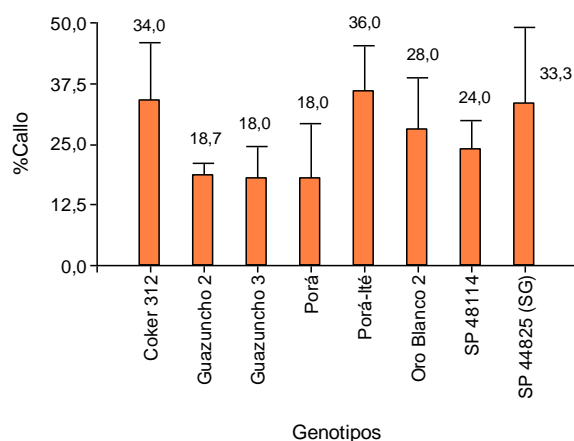


Figura 14: Porcentaje de explantes que forman callos en el medio de inducción de brotes para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Morre et al. (1998).

Porcentaje de explantes con brotes: no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos analizados (Tabla 20).

Tabla 20. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “explantes con brotes” en el medio de inducción, utilizando el protocolo de Morre et al. (1998).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	760,00	108,57	0,72 ns
Error	16	2405,33	150,33	
Total	23	3165,33		

CV 27,66% ns: No significativo

El valor más alto se encontró para la variedad Porá, siendo el único genotipo donde brotó más del 50% de los explantes (54,7%), mientras que el de menor capacidad de brote fue SP 44825 (SG), con sólo 34,0% (Figura 15).

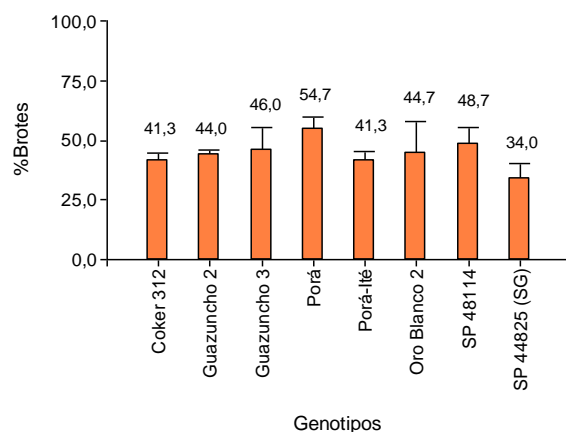


Figura 15: Porcentaje de explantes con brotes en el medio de inducción para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Morre et al. (1998).

Porcentaje de explantes con múltiples brotes: se realizó el análisis de Kruskal Wallis sobre los datos derivados de explantes que presentaron más de un brote (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis de varianza no paramétrico (Kruskal Wallis) para la variable “porcentaje de explantes con múltiples brotes”.

Genotipo	Medias	D.E.	H	p
Coker 312	1,33	2,31	10,86	0,1137 ns
Guazuncho 2	4,67	3,06		
Guazuncho 3	4,67	1,15		
Oro Blanco 2	4,00	3,46		
Porá	10,00	5,29		
Porá Ité	2,00	2,00		
SP 48114	3,33	3,06		
SP 44825 (SG)	0,00	0,00		

ns: No significativo

No se encontraron diferencias significativas entre genotipos. El máximo valor lo expuso Porá, donde el 10,0% de los explantes brotó con más de un brote por explante, y, por otro lado, SP44825 (SG) no mostró más de un brote en ninguno de sus explantes (Anexo I). La variedad que presentó más plantas con diferentes cantidades de brotes, y más brotes por planta fue Porá, donde se llegaron a contar hasta un

máximo de 6 brotes por explante. El número de explantes con más de un brote obtenido para cada genotipo se presenta en la Tabla 22.

Tabla 22. Número de brotes por explante para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Morre et al (1998).

Genotipos	Número de explantes con más de un brote				
	2b	3b	4b	5b	6b
Coker 312	2	-	-	-	-
Guazuncho-2	4	2	-	-	1
Guazuncho-3	3	4	-	-	-
Porá	7	3	1	1	1
Porá Ité	3	-	-	-	-
Oro Blanco 2	5	1	-	-	-
SP 48114	3	2	-	-	-
SP44825 (SG)	-	-	-	-	-

2b: explantes con dos brotes 3b: explantes con tres brotes 4b: explantes con cuatro brotes
 5b: explantes con cinco brotes 6b: explantes con 6 brotes

En la Figura 16 se presentan explantes con más de un brote obtenidos para la variedad Porá bajo las condiciones del protocolo de Morre et al. (1998).



Figura 16: Explantes con más de un brote obtenidos bajo el protocolo de Morre et al. (1998).

Porcentaje de brotes que enraízan: no se observaron diferencias significativas entre genotipos, lo que puede observarse en el análisis de la varianza de la Tabla 23.

Tabla 23. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “brotes que enraízan” en el medio de inducción de raíces, utilizando el protocolo de Morre et al. (1998).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	209,17	29,88	0,61 ns
Error	16	786,67	49,17	
Total	23	995,83		

CV 88,57% ns: No significativo

Según se aprecia en la figura 17, Guazuncho 3 presentó un porcentaje mayor de raíces (12,7%), obteniéndose la menor cantidad de plantas enraizadas en el genotipo SP 44825(SG), con sólo el 2,7% de plantas con raíz sobre el total de explantes evaluados.

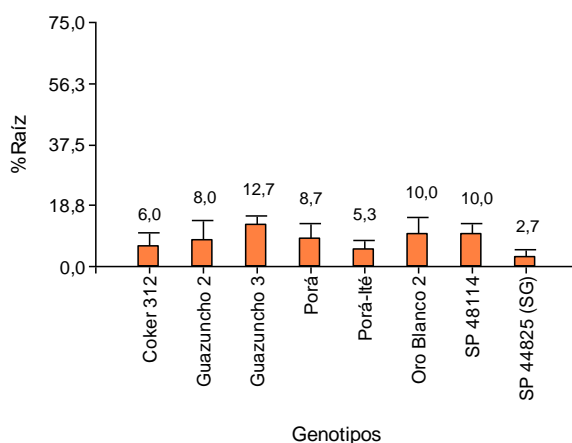


Figura 17: Porcentaje de brotes que enraízan para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Morre et al. (1998).

Relación raíz/brote: no se observaron diferencias significativas para la variable relación raíz/brote, indicando que todas se comportaron de manera similar (Tabla 24).

Tabla 24: Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “explantos que enraizaron” en relación al total de explantes brotados, utilizando el protocolo de Morre et al. (1998).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	209,17	29,88	0,61 ns
Error	16	786,67	49,17	
Total	23	995,83		

CV 95,65% ns: No significativo

La mejor respuesta se observó para Guazuncho 3, donde el 31,9% de las plantas que brotaron lograron enraizar (Figura 18), mientras que la respuesta más baja se observó para SP 44825 (SG) (5,8%).

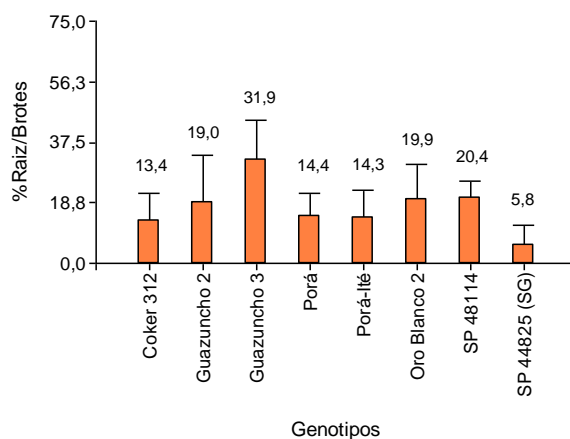


Figura 18: Porcentaje de explantes que enraizaron en relación al total de explantes que brotaron para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Morre et al. (1998)

Los brotes demoraron entre 40 y 90 días en generar raíces.

Porcentaje de respuesta negativa: en el análisis de variancia (Tabla 25) no se detectaron diferencias significativas entre los genotipos.

Tabla 25. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “respuesta negativa” en los medios de cultivo del protocolo de Morre et al. (1998).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	1045,33	149,33	0,41 ns
Error	16	5760,00	360,00	
Total	23	6805,33		

CV 49,07% ns: No significativo

Para este protocolo, la menor respuesta fue la de la línea SP 44825 (SG) dado que el 54.6% de los explantes puestos en el medio de cultivo dieron una respuesta negativa, mientras que Guazuncho 2 tuvo el menor porcentaje (33,3%) (Figura 19).

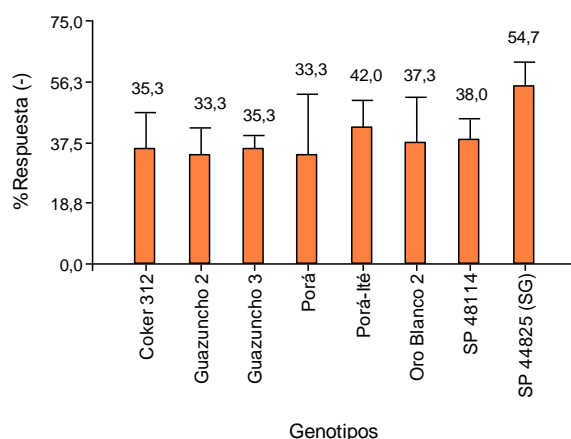


Figura 19: Porcentaje de explantes con respuesta negativa para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Morre et al. (1998).

Porcentaje de brotes que se secan: los datos obtenidos para el porcentaje de brotes que se secan fueron transformados con la función arcoseno de la raíz cuadrada para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Además debió eliminarse un dato atípico para Guazuncho 2.

Tabla 26: Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “porcentaje de brotes que se secan” en los medios de cultivo del protocolo de Morre et al. (1998).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	0,42	0,06	6,18**
Error	16	0,15	0,01	
Total	23	0,57		

CV 35,05% (**): significativo $p < 0,01$

Se encontraron diferencias significativas para esta variable (Tablas 26 y 27), observándose para Coker 312 el mayor porcentaje de plantas brotadas que se secan en los medios de cultivo (23,3%), mientras que el menor valor lo presentó SP44825 (SG) (Figura 20).

Tabla 27. Medias y desvíos estándares para la variable “porcentaje de brotes que se secan”, utilizando el protocolo de Morre et al. (1998).

Genotipo	Explantes que se secan (%)
SP 44825 (SG)	0,67 ± 1,15 a
Guazuncho 3	4,67 ± 3,06 ab
Porá Ité	4,67 ± 2,31 ab
Guazuncho 2	16,67 ± 18,58 bc
SP 48114	8,00 ± 10,39 bc
Porá	12,67 ± 5,03 bcd
Oro Blanco 2	17,33 ± 6,43 cd
Coker 312	23,33 ± 7,57 d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher- $p > 0,05$)

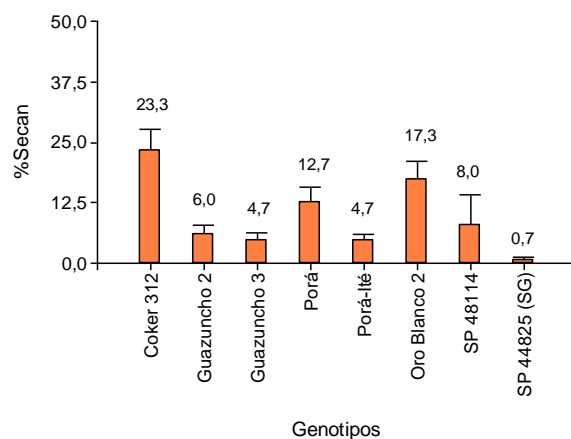


Figura 20: Porcentaje de brotes que se secan, para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Morre et al. (1998).

3.1.3 Protocolo de Pathi y Tuteja (2013)

Se realizaron los análisis para validar los supuestos de normalidad de los errores y la homogeneidad de varianzas, para cada una de las variables estudiadas (Anexo I). En la Tabla 28 se observan los test de Levene y Shapiro-Wilks, donde evidencia que los supuestos se cumplen. En aquellas variables (1) en las cuales alguno de los supuestos no se cumplía la variable fue transformada como el arcoseno de la raíz cuadrada.

Tabla 28. Test de Levene y Test de Shapiro-Wilks para las variables estudiadas bajo el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

Variable	Test de Levene		Test de Shapiro-Wilks	
	F	significancia	W*	significancia
Porcentaje de explantes sin crecimiento (1)	1,84	0,1481 ns	0,96	0,6598 ns
Porcentaje de explantes que forman callo	1,78	0,1751 ns	0,95	0,5407 ns
Porcentaje de explantes con brotes	2,19	0,0923 ns	0,96	0,7314 ns
Porcentaje de explantes con múltiples brotes (1)	1,67	0,1875 ns	0,95	0,6109 ns
Porcentaje de brotes que enraízan (1)	2,41	0,0689 ns	0,93	0,2267 ns
Relación raíz/brote	2,56	0,690 ns	0,98	0,9501 ns
Porcentaje de respuesta negativa	2,36	0,0870 ns	0,96	0,6810 ns
Porcentaje de brotes que se secan (1)	1,73	0,1765 ns	0,95	0,6160 ns

ns: no significativo (1): transformación arcoseno de la raíz cuadrada

Porcentaje de explantes sin crecimiento: la variable fue transformada mediante la función arcoseno de la raíz cuadrada. En el análisis de varianza (Tabla 29) se detectaron diferencias no significativas entre los genotipos. Sin embargo, el porcentaje más alto para explantes que no se desarrollaron en los medios de cultivo para este protocolo, fue para la línea SP 44825 (SG) (31.3%), mientras que el menor valor lo presentó la variedad Coker 312 (4.0%) (Figura 21).

Tabla 29. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de varianza para la variable “porcentaje de explantes sin crecimiento” utilizando el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

	FV	GL	SC	CM	F
Genotipo		7	0,42	0,06	1,24 ns
Error		16	0,78	0,05	
Total		23	1,21		

CV: 75,72%

ns: no significativo

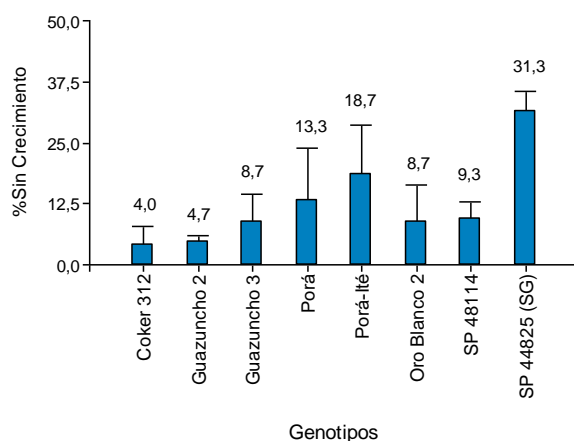


Figura 21: Porcentaje de explantes sin crecimiento para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

Porcentaje de explantes que forman callos: No se observaron diferencias significativas en el análisis de varianza realizado para esta variable (Tabla 30). Se eliminó un dato atípico para la variedad Guazuncho 2.

Tabla 30. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “porcentaje de explantes que forman callos” utilizando el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	1090,55	155,79	1,47 ns
Error	15	1586,67	105,78	
Total	22	2677,22		

CV: 52,33% ns: no significativo

El valor máximo de formación de callos se observó en la variedad Oro Blanco 2 (27.33%) mientras que los valores mínimos fueron encontrados en la línea SP 48114 (10%) (Figura 22).

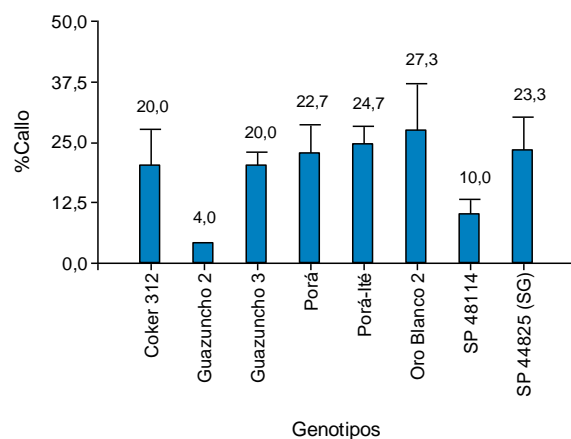


Figura 22: Porcentaje de explantes que forman callos para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

Porcentaje de explantes con brotes: en el cuadro de análisis de varianza (Tabla 31) puede apreciarse que no existen diferencias significativas entre los genotipos cuando se analizó esta variable.

Tabla 31. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de varianza para la variable “porcentaje de explantes con brotes” utilizando el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

FV	GL	SC	CM	Significancia
Genotipo	7	2898,00	414,00	2,02 ns
Error	16	3285,33	205,33	
Total	23	6183,33		

CV: 27,65%

ns: no significativo

El menor porcentaje de brotes se obtuvo para SP 44825 (SG) (29,3%), mientras que el genotipo Coker 312 (67,3%) tuvo los mayores valores de porcentaje para esta variable (Figura 23).

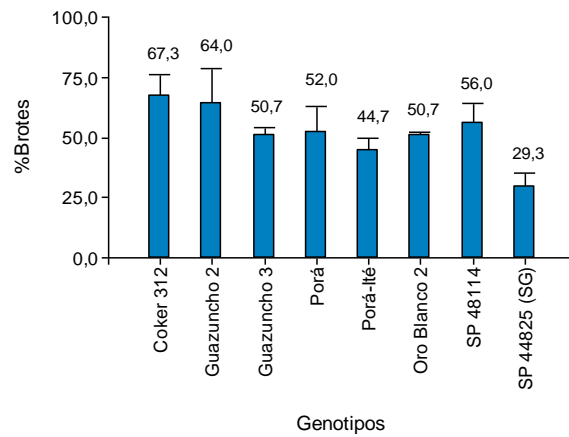


Figura 23. Porcentaje de explantes con brotes para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

Porcentaje de explantes con múltiples brotes: la variable fue transformada con la función arcoseno de la raíz cuadrada. El análisis de varianza presentado en la Tabla 32 indica que se encontraron diferencias no significativas entre los genotipos evaluados.

Tabla 32. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de varianza para la variable “porcentaje de explantes con múltiples brotes” utilizando el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	0,27	0,04	2,14 ns
Error	16	0,29	0,02	
Total	23	0,55		

CV: 62,49%

ns: no significativo

Tanto Guazuncho 3 como Porá fueron los dos genotipos que presentaron los mayores valores de explantes con múltiples brotes (12,0%). SP 48114 tuvo menos de 1,0% de explantes con múltiples brotes (Tabla 33).

Tabla 33. Medias y desvíos estándares para la variable “porcentaje de explantes con múltiples brotes”, utilizando el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

Genotipo	Explantes con multiples brotes (%)
Coker 312	5,33 ± 0,00
Guazuncho 2	8,00 ± 2,00
Guazuncho 3	12,00 ± 3,46
Porá	12,00 ± 9,87
Porá Ité	6,67 ± 8,33
Oro Blanco 2	6,67 ± 9,87
SP 48114	0,67 ± 1,15
SP 44825 (SG)	1,33 ± 2,31

El número de explantes que presentaron más de un brote para cada genotipo se muestra en la Tabla 34.

Tabla 34. Número de explantes con múltiples brotes, para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

Genotipos	Número de explantes con más de un brote				
	2b	3b	4b	5b	6b
Coker 312	7	1	-	-	-
Guazuncho-2	7	5	-	-	-
Guazuncho-3	11	1	6	-	-
Porá	12	6	-	-	-
Porá Ité	5	3	2	-	-
Oro Blanco 2	4	6	-	-	-
SP 48114	1	-	-	-	-
SP44825 (SG)	2	-	-	-	-

2b: explantes con dos brotes

3b: explantes con tres brotes

4b: explantes con cuatro brotes

5b: explantes con cinco brotes

6b: explantes con 6 brotes

Guazuncho 3 y Porá Ité presentaron el mayor número de brotes por explante brotado, siendo la primera la que mayor número de explantes con esta respuesta consiguió (6 explantes brotados con 4 brotes cada uno) (Anexo I).

En la Figura 24 pueden observarse explantes de las variedades Guazuncho 3, Porá Ité y Oro Blanco 2 que dieron respuesta de multiple brote en los medios del protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

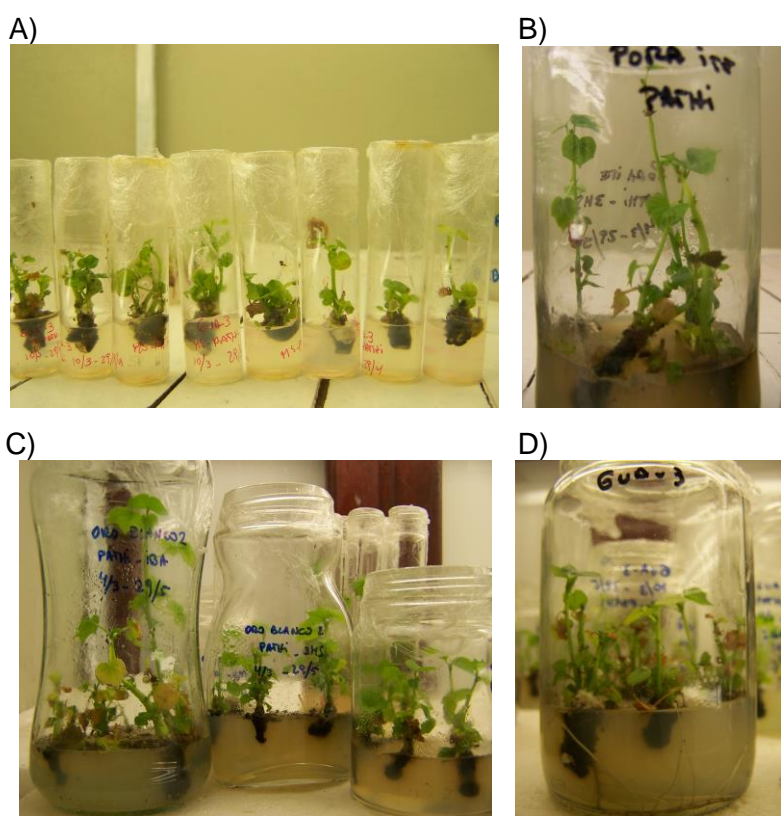


Figura 24. Explantes con más de un brote obtenidos bajo el protocolo de Pathi y Tuteja (2013). A) y D) Guazuncho 3. B) Porá Ité y C) Oro Blanco 2.

Porcentaje de brotes que enraízan: para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, la variable fue transformada con la función arcoseno de la raíz cuadrada. Se encontraron diferencias no significativas entre los genotipos evaluados (Tabla 35).

Tabla 35. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “porcentaje de explantes que enraizan” utilizando el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	0,29	0,04	2,10 ns
Error	16	0,32	0,02	
Total	23	0,61		

CV: 80,89% ns: No significativo

La mayor cantidad de plantas derivadas de explantes que brotaron y enraizaron se obtuvo para la variedad Guazuncho 3, (13,3%), mientras que para la variedad SP 48114 no se obtuvo ninguna planta enraizada (0,0%) (Figura 25).

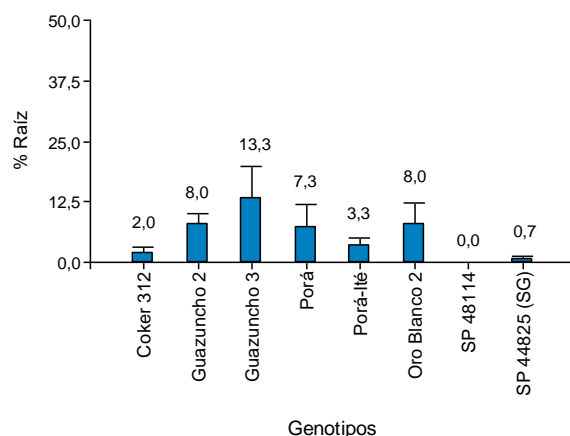


Figura 25. Porcentaje de brotes que enraízan para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

Relación raíz/brote: en el análisis de la variancia realizado para esta variable (Tablas 36 y 37) se encontraron diferencias significativas entre los genotipos. Se desactivó un dato atípico para Guazuncho 3.

Tabla 36. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “explantes que enraízan sobre el total de explantes que brotan” utilizando el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	2556,48	365,21	4,27**
Error	15	1282,53	85,50	
Total	22	3839,01		

CV: 86,52% (**): significativo $p < 0,01$

Tabla 37. Medias y desvíos estándares para la variable “explantes que enraízan sobre el total de explantes que brotan” utilizando el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

Genotipo	Explantes sin crecimiento (%)
SP 48114	0,00 ± 0,00 a
Coker 312	2,63 ± 2,65 a
SP 44825 (SG)	3,33 ± 5,77 a
Porá-Ité	8,03 ± 8,37 a
Porá	12,73 ± 15,23 a
Guazuncho 2	13,10 ± 4,33 ab
Oro Blanco 2	15,30 ± 13,57 ab
Guazuncho 3	40,20 ± 13,86 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher- $p > 0,05$)

El mayor valor de porcentaje de plantas enraizadas sobre el total de las que brotaron se observó en la variedad Guazuncho 3 (40%), mientras que el menor fue de SP 48114 que no presentó raíces (Tabla 37 y Figura 26).

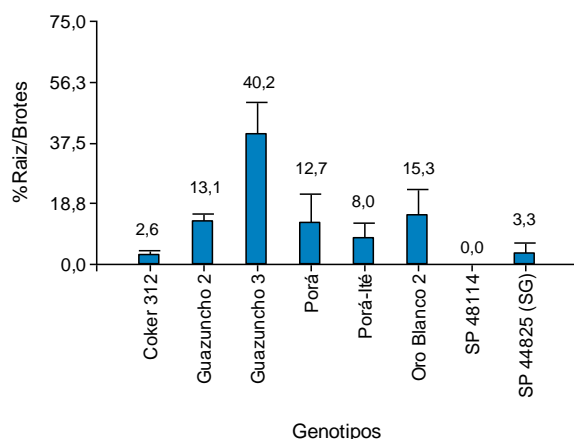


Figura 26. Porcentaje de brotes que enraízan en relación a los que brotan para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

Porcentaje de explantes con respuesta negativa: se encontraron diferencias no significativas cuando se realizó el análisis de la varianza presentado en la Tabla 38. Debíó eliminarse un dato atípico para la variedad Guazuncho 2.

Tabla 38. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “explantes con respuesta negativa” utilizando el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	3692,99	527,57	2,48 ns
Error	15	3186,67	212,44	
Total	22	6879,65		

CV: 44,94% ns: No significativo

SP 44825 (SG) presentó el valor más alto para la respuesta negativa (54,7%), en contraste con Guazuncho 2 que obtuvo la menor respuesta negativa con 10,0% (Figura 27).

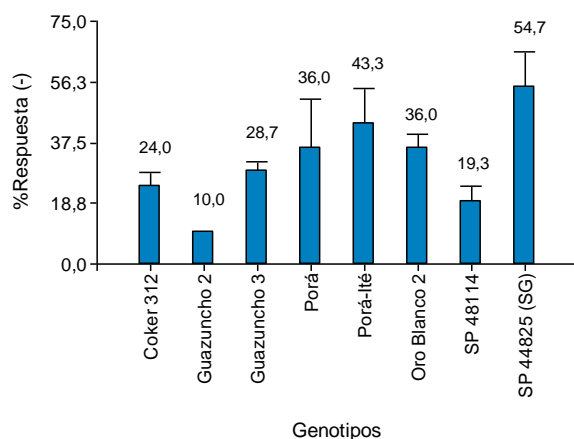


Figura 27. Porcentaje de explantes que dan respuesta negativa para los genotipos evaluados bajo el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

Porcentaje de brotes que se secan: los datos para esta variable fueron transformados mediante la función arcoseno para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Además debió eliminarse un valor atípico para SP 44825 (SG). Se encontraron diferencias no significativas entre los genotipos evaluados para los explantes que se secan en los medios del protocolo de Pathi y Tuteja (2013) (Tabla 39).

Tabla 39. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “porcentaje de brotes que se secan” utilizando el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

FV	GL	SC	CM	F
Genotipo	7	0,32	0,05	1,95 ns
Error	15	0,36	0,02	
Total	22	0,68		

CV: 62,85% ns: No significativo

El 20,7% de plantas de SP 48114 brotadas en los medios del protocolo de Pathi y Tuteja (2013) se secaron, mientras SP 44825 (SG) no presentó este tipo de respuesta (Figura 28).

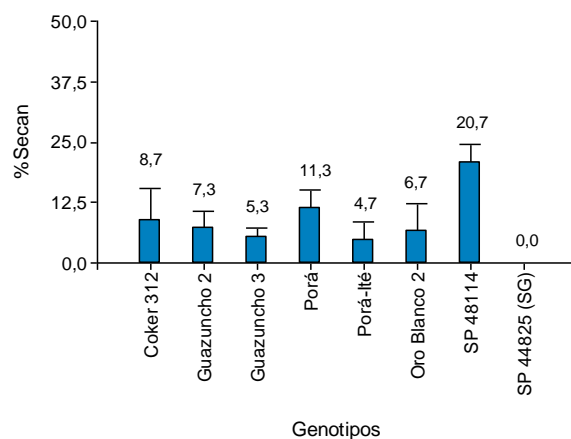


Figura 28. Porcentaje de brotes que se secan para los genotipos evaluados en los medios de cultivo del protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

3.1.4 Comparación entre los protocolos de ápices embrionarios

Se realizaron los análisis para validar los supuestos de normalidad de los errores y la homogeneidad de varianzas, para cada una de las variables estudiadas. En la tabla 40 se observan los test de Levene y Shapiro-Wilks, donde se evidencia que, de los análisis, los supuestos se cumplen. En aquellas variables en las cuales alguno de los supuestos no se cumplía, o bien se utilizó la variable transformada como el arcoseno de la raíz cuadrada (1) ó se usó el test no paramétrico de Kruskal Wallis (2).

Tabla 40. Test de Levene y Test de Shapiro-Wilks para las variables estudiadas bajo los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

Variable	Test de Levene			Test de Shapiro-Wilks	
	FV	F	p>F	W*	p
Porcentaje de explantes sin crecimiento (1)	Medio	2,83	0,0698 ns	0,96	0,2010 ns
	Genotipo	2,02	0,0738 ns		
	M*G	1,46	0,1678 ns		
Porcentaje de explantes que forman callo (1)	Medio	1,11	0,3369 ns	0,97	0,3019 ns
	Genotipo	1,72	0,1277 ns		
	M*G	1,62	0,1095 ns		
Porcentaje de explantes con brotes	Medio	0,55	0,5795 ns	0,97	0,2883 ns
	Genotipo	0,74	0,6414 ns		
	M*G	1,62	0,1105 ns		
Porcentaje de explantes con múltiples brotes (2)	Medio	29,73	<0,0001**	0,89	<0,0001**
	Genotipo	4,67	0,0005**		
	M*G	3,34	0,0009**		
Porcentaje de brotes que enraízan (2)	Medio	11,33	0,0001**	0,96	0,1100 ns
	Genotipo	2,28	0,0437*		
	M*G	1,38	0,1995 ns		
Relación raíz/brote (2)	Medio	3,52	0,0375*	0,98	0,8570 ns
	Genotipo	3,09	0,0089**		
	M*G	1,09	0,3872 ns		
Porcentaje de respuesta negativa	Medio	0,16	0,8560 ns	0,99	0,9360 ns
	Genotipo	1,12	0,3646 ns		
	M*G	1,59	0,1193 ns		
Porcentaje de brotes que se secan (2)	Medio	6,74	0,0027**	0,97	0,5316 ns
	Genotipo	3,39	0,0054**		
	M*G	3,65	0,0005**		

Ns: no significativo (*): significativo p<0,05 (**): significativo p<0,01 (1): transformación arcoseno de la raíz cuadrada (2): análisis mediante el test no paramétrico de Kruskal Wallis

Porcentaje de explantes sin crecimiento: para cumplir con el supuesto de homogeneidad de varianza, la variable fue transformada con la función arcoseno de la raíz cuadrada y se eliminaron 3 datos atípicos (dos datos del protocolo de Pathi y Tuteja (2013), uno de Porá y uno de Porá Ité y un dato de Porá del protocolo de Morre et al. (1998)). Se encontraron diferencias significativas entre medios y para la interacción medio por genotipo (Tabla 41).

Tabla 41. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “explantes sin crecimiento” utilizando los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y Pathi y Tuteja (2013).

FV	GL	SC	CM	F
Medio	2	0,77	0,38	15,71**
Genotipo	7	0,33	0,05	1,95 ns
Medio*Genotipo	14	0,79	0,06	2,31*
Error	45	1,10	0,02	
Total	68	2,97		

CV: 67,44% ns: No significativo (*): significativo $p < 0,05$ (**): significativo $p < 0,01$

El protocolo de Hemphill et al. (1998) (2,3%) se diferencia significativamente de los protocolos de Morre et al. (1998) (13,0%) y Pathi y Tuteja (2013) (11,9%) en relación a los explantes sin crecimiento en los medios de inducción de brotes (Figura 29).

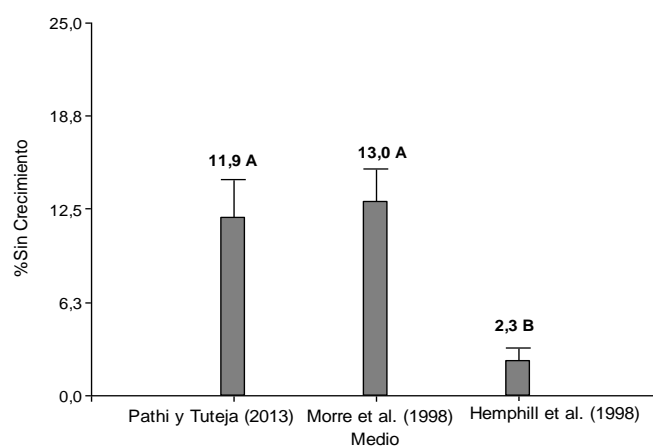


Figura 29. Porcentaje de explantes sin crecimiento para los genotipos evaluados en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre L. et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

Si bien se encontraron diferencias no significativas entre los genotipos (Figura 30) para los explantes que no dan respuesta en el medio de inducción de brotes, el genotipo con el mayor porcentaje fue SP 44825 (SG) con un 17,6%, mientras que la que menor valor presentó para esta variable fue Coker 312 (2,0%).

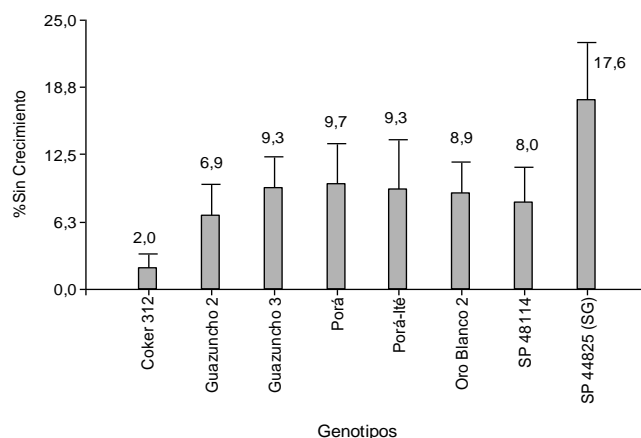


Figura 30. Porcentaje de explantes sin crecimiento entre los genotipos ensayados en medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

Para todos los medios y genotipos considerados, el mayor porcentaje de explantes sin respuesta se presentó bajo el protocolo de Pathi y Tuteja (2013) para SP 44825 (SG) (31,3% h) mientras que los menores valores correspondieron para el protocolo de Hemphill et al. (1998), para Porá Ité (a) y SP 44825 (SG) (a) con ningún explante que presente este tipo de respuesta (Figura 31 y Anexo I).

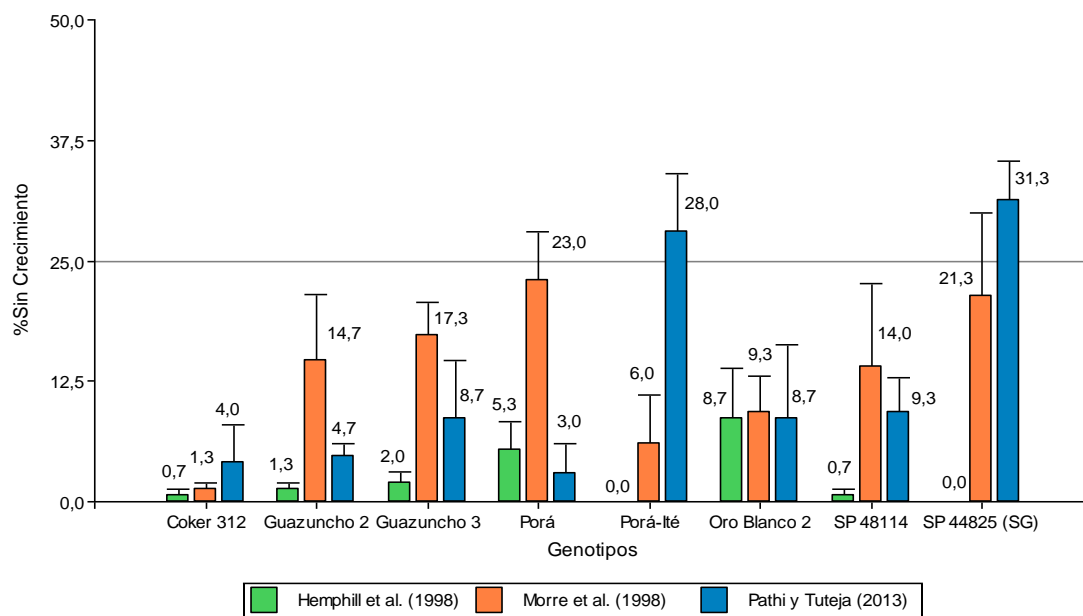


Figura 31. Porcentaje de explantes sin crecimiento para los genotipos evaluados en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

Porcentaje de explantes que forman callo: la variable fue transformada por la función arcoseno de la raíz cuadrada para cumplir con el supuesto de homogeneidad de varianza. Se eliminaron tres datos atípicos (un dato de Guazuncho 2 en el protocolo

de Pathi y Tuteja (2013) uno en el de Morre et al. (1998), de la línea SP 44825 (SG) y uno del protocolo de Hemphill et al. (1998), de la variedad Porá). Se encontraron diferencias altamente significativas para los medios, para los genotipos y para la interacción entre los medios y los genotipos según como se indica en el análisis de la varianza presentado en la Tabla 42.

Tabla 42. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “explantes que forman callo” utilizando los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y Pathi y Tuteja (2013).

FV	GL	SC	CM	F
Medio	2	0,41	0,21	9,25**
Genotipo	7	0,54	0,08	3,47**
Medio*Genotipo	14	0,81	0,06	2,62**
Error	45	1,00	0,02	
Total	68	2,78		

CV: 35,29% (**): significativo p<0,01

El protocolo de Hemphill et al. (1998) se diferenció de los protocolos de Pathi y Tuteja (2013) (19,7%) y de Morre et al. (1998) (24,6%), por presentar el menor valor de formación de callos (14,1%) (Figura 32).

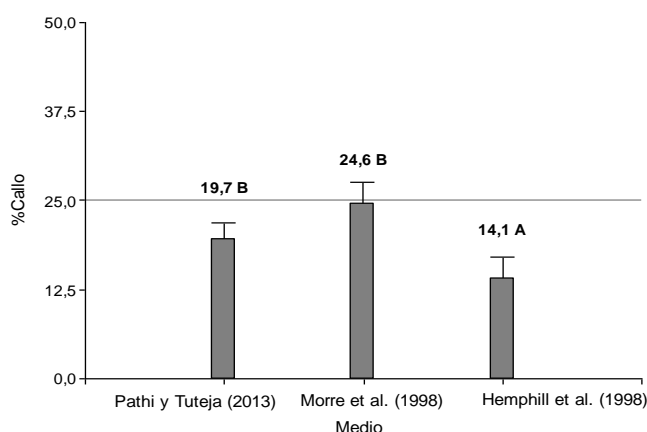


Figura 32. Porcentaje de explantes que forman callo en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

El genotipo que más callos desarrolló en los medios usados para los tres protocolos fue SP 44825 (SG) (29,3%) mientras que el que presentó el menor porcentaje para esta variable fue Guazuncho 2 (8,3%) (Figura 33).

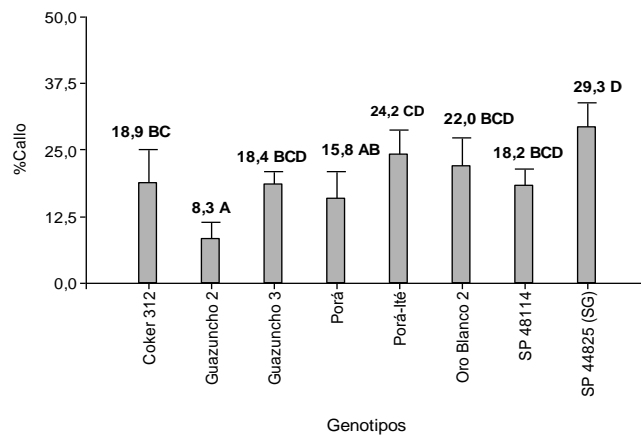


Figura 33. Porcentaje de explantes que forman callos para los genotipos evaluados en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

En la Figura 34 puede observarse que Guazuncho 2 presentó el menor porcentaje de callos cuando se desarrolló en los medios del protocolo de Hemphill et al. (1998) (0,7%, a) seguida por Coker 312 (2,7%, ab) y Porá (12,7%, ab) bajo las condiciones del mismo protocolo. En el otro extremo SP 44825 (SG) (42,7%, h) en el protocolo de Hemphill et al. (1998) y Porá Ité (36,0%, gh) bajo el protocolo de Morre et al. (1998) fueron los genotipos de mayor formación de callos (Anexo I).

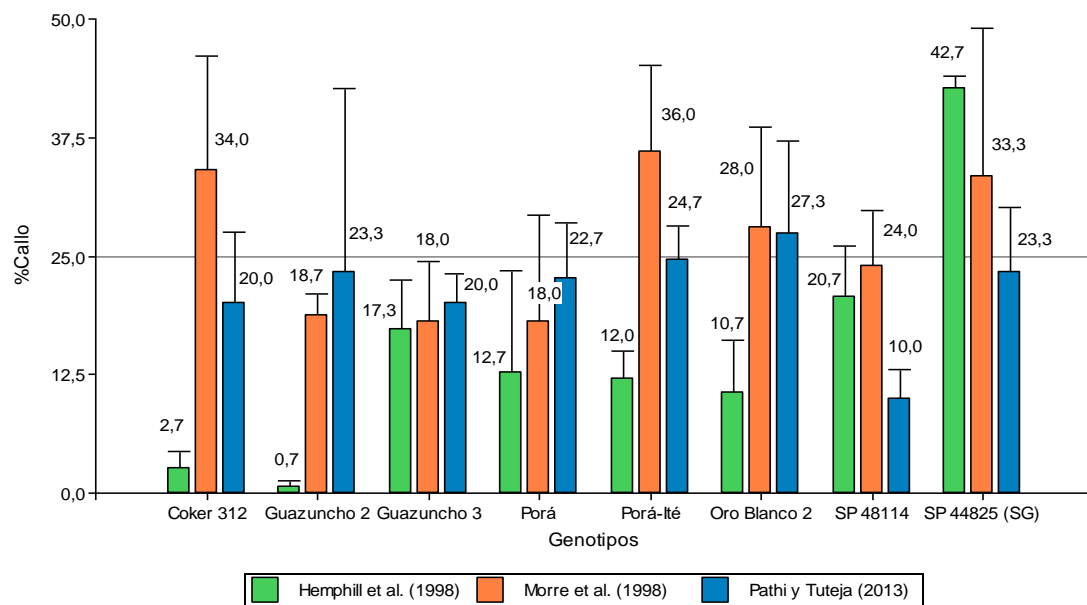


Figura 34. Porcentaje de explantes que forman callos para cada genotipo evaluado en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

Porcentaje de explantes que brotan: se encontraron diferencias significativas entre los protocolos evaluados (Medio) y entre los genotipos analizados mientras que se encontraron diferencias no significativas para la interacción entre genotipos y medio (Tabla 43). Para el análisis de la varianza se eliminaron datos atípicos para Guazuncho 2 en el protocolo de Pathi y Tuteja (2013), para Oro Banco 2 en el protocolo de Morre et al. (1998) y para Porá en el protocolo de Hemphill et al. (1998).

Tabla 43. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “porcentaje de explantes que brotan” utilizando los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y Pathi y Tuteja (2013).

FV	GL	SC	CM	Sign
Medio	2	1787,95	893,97	6,54**
Genotipo	7	3954,31	564,90	4,13**
Medio*Genotipo	14	3035,84	216,85	1,59 ns
Error	45	6148,67	136,64	
Total	68	14479,77		

CV: 23,35% (**): significativo p<0,01 ns: No significativo

Para todos los genotipos ensayados, en los medios que menos se observaron explantes brotados fue bajo las condiciones del protocolo de Morre et al. (1998) (42,3%) (Figura 35).

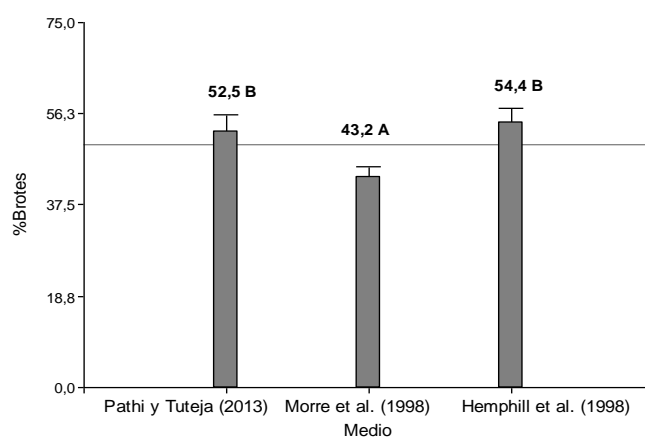


Figura 35. Porcentaje de explantes que brotan en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

La variedad de mayor porcentaje de explantes brotados para los 3 protocolos en general fue Guazuncho 2 (61,0%), mientras que el valor más bajo (35,8%) se observó en SP 44825 (SG) (Figura 36).

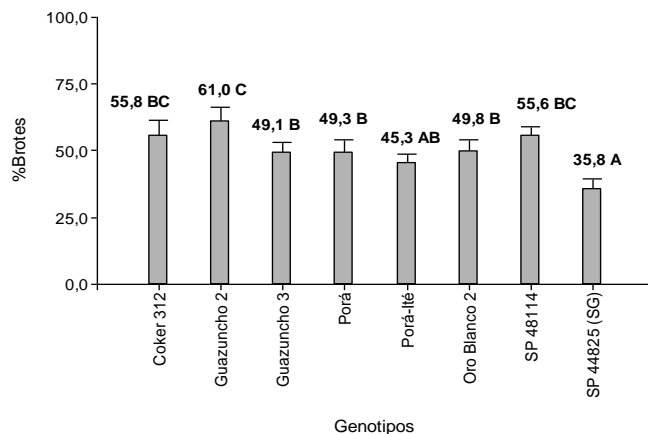


Figura 36. Porcentaje de explantes que brotan para los genotipos evaluados en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

El mayor valor de explantes brotados que se observan en la figura 37, corresponden a la variedad Guazuncho 2, cuando se usó el medio de inducción de brotes del protocolo de Pathi y Tuteja (2013) (78,0%), siendo el menor valor alcanzado por la línea SP 44825 (SG), bajo las condiciones del mismo protocolo.

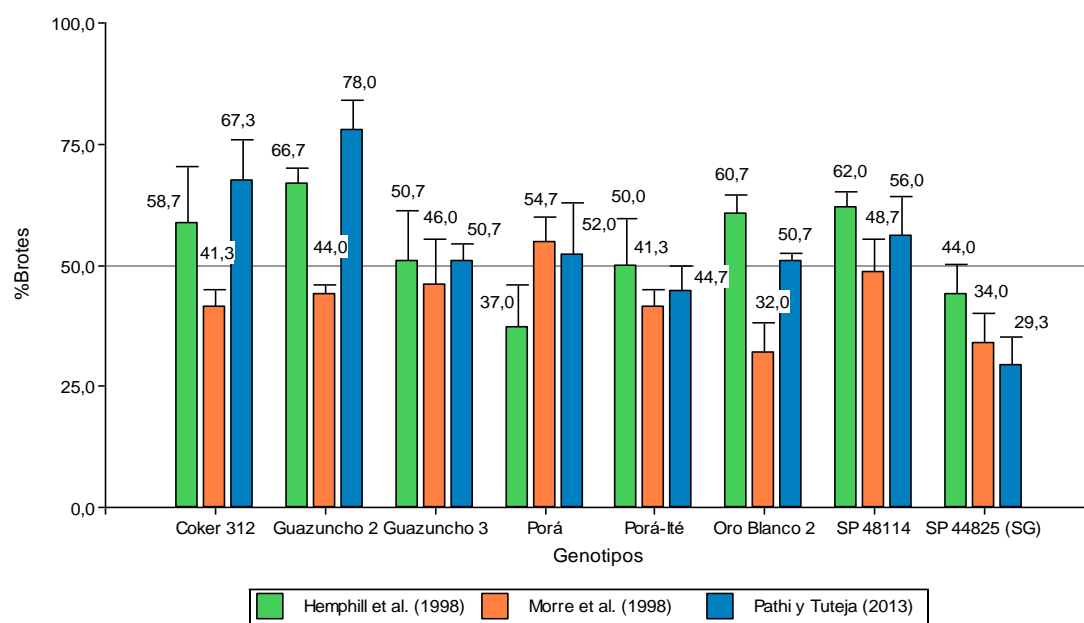


Figura 37. Porcentaje de explantes que brotan para cada genotipo evaluado en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

Porcentajes de explantes con múltiples brotes: se encontraron diferencias significativas entre los genotipos y medios evaluados cuando se realizó la prueba de Kruskal Wallis para análisis de la varianza no paramétrica (Tabla 44).

Tabla 44: Medias, desvíos estándares y significancia para la variable “porcentaje de explantes con múltiples brotes” evaluada para los genotipos y protocolos ensayados.

Medio	Genotipo	Media ± D.E.	H	Significancia
Hemphill et al. (1998)	Coker 312	0,00 ± 0,00 a	42,98	**
	Guazuncho 2	1,33 ± 2,31 abc		
	Guazuncho 3	0,00 ± 0,00 a		
	Porá	0,00 ± 0,00 a		
	Porá Ité	0,00 ± 0,00 a		
	Oro Blanco 2	0,00 ± 0,00 a		
	SP 48114 (SG)	0,00 ± 0,00 a		
	SP 44825	0,00 ± 0,00 a		
Morre et al. (1998)	Coker 312	1,33 ± 2,31 abc		
	Guazuncho 2	4,67 ± 3,06 abcd		
	Guazuncho 3	4,67 ± 1,15 abcd		
	Porá	10,00 ± 5,29 cd		
	Porá Ité	2,00 ± 2,00 abc		
	Oro Blanco 2	0,00 ± 0,00 a		
	SP 48114	3,33 ± 3,06 abcd		
	SP 44825 (SG)	0,00 ± 0,00 a		
Pathi y Tuteja (2013)	Coker 312	5,33 ± 3,06 bcd		
	Guazuncho 2	8,00 ± 2,00 cd		
	Guazuncho 3	12,00 ± 3,46 d		
	Porá	12,00 ± 9,17 cd		
	Porá Ité	6,67± 8,33 abcd		
	Oro Blanco 2	6,67± 9,87 abcd		
	SP 48114	0,67 ± 1,15 ab		
	SP 44825 (SG)	1,33 ± 2,31 abc		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) (**): significativo $p < 0,01$

Como ya se mencionó anteriormente, bajo el protocolo de Hemphill et al. (1998) no se pudieron obtener múltiples brotes en los genotipos evaluados (0,0%) salvo para un único explante de Guazuncho 2 (1,3%), mientras que donde pudo observarse la aparición de un mayor porcentaje de múltiples brotes fue en Guazuncho 3 (12,0%) bajo las condiciones de cultivo del protocolo de Pathi y Tuteja (2013), de igual modo que Porá (12,0%) bajo el mismo protocolo y seguido por Porá bajo el protocolo de Morre et al. (1998) (10,0%) (Tabla 44 y Figura 38).

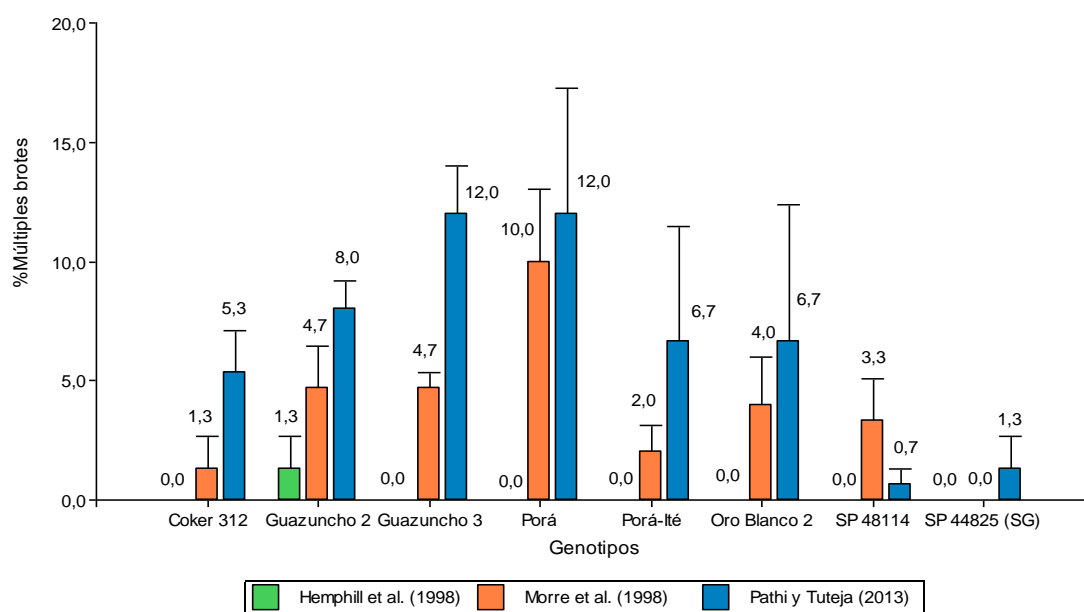


Figura 38. Porcentaje de explantes con múltiples brotes para cada genotipo evaluado en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

Porcentaje de explantes que enraízan: debido a que los datos no cumplían con el supuesto de homogeneidad de varianza para todas las fuentes de variación consideradas (medio, genotipo interacción medio por genotipo), se realizó el análisis de la varianza no paramétrica de Kruskal Wallis. A continuación, en la Tabla 45, se muestra la comparación de medias, desvíos estándar y significancia, donde puede verse la existencia de diferencias altamente significativas.

Tabla 45. Medias, desvíos estándares y significancia para la variable “porcentaje de raíz” utilizando los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y Pathi y Tuteja (2013).

Medio	Genotipo	Media ± D.E.	H	Significancia
Hemphill et al. (1998)	Coker 312	49,33 ± 22,74 f	50,25	**
	Guazuncho 2	46,67 ± 7,57 f		
	Guazuncho 3	32,00 ± 15,87 cdef		
	Porá	36,67 ± 19,01 def		
	Porá Ité	41,33 ± 22,03 ef		
	Oro Blanco 2	29,33 ± 17,01 bcdef		
	SP 48114 (SG)	22,00 ± 5,29 abcdef		
	SP 44825	8,67 ± 1,15 abcdef		
Morre et al. (1998)	Coker 312	6,00 ± 7,21 abc		
	Guazuncho 2	8,00 ± 10,58 abcd		
	Guazuncho 3	12,67 ± 4,62 abcdef		
	Porá	8,67 ± 7,57 abcde		
	Porá Ité	5,33 ± 5,03 ab		
	Oro Blanco 2	10,00 ± 8,72 abcdef		
	SP 48114	10,00 ± 5,29 abcdef		
	SP 44825 (SG)	2,67 ± 4,62 a		
Pathi y Tuteja (2013)	Coker 312	2,00 ± 2,00 a		
	Guazuncho 2	8,00 ± 3,46 abcdef		
	Guazuncho 3	13,33 ± 11,02 abcdef		
	Porá	7,33 ± 8,08 abcd		
	Porá Ité	3,33 ± 3,06 a		
	Oro Blanco 2	8,00 ± 7,21 abcd		
	SP 48114	0,00 ± 0,00 a		
	SP 44825 (SG)	0,67 ± 1,15 a		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) (**): significativo $p < 0,01$

Bajo los medios del protocolo de Hemphill et al. (1998) se observó el mayor porcentaje de explantes que enraizaron (33,3%) cuando se compararon con los observados en los protocolos de Pathi y Tuteja (2013) (5,3%) y de Morre et al. (1998) (7,9%) (Figura 39).

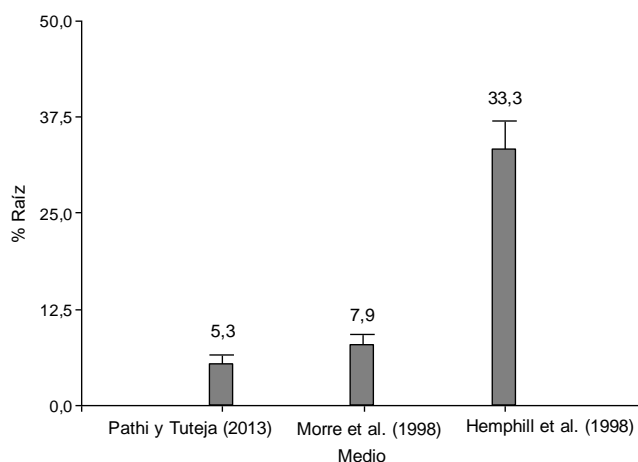


Figura 39. Porcentaje de explantes que enraízan en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

El mayor porcentaje de explantes que enraizaron se observó para el genotipo Guazuncho 2 (20,9%), mientras que el menor porcentaje de enraizamiento fue para SP 44825 (SG) (Figura 40).

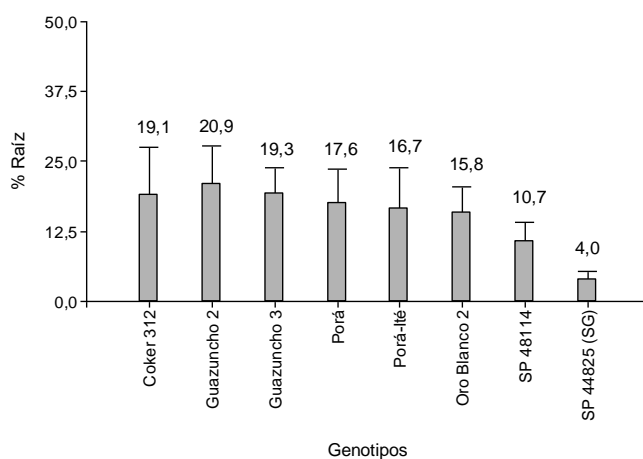


Figura 40. Porcentaje de explantes que enraízan para los genotipos evaluados en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

El porcentaje mayor de raíces se observó para Coker 312 (49,3%) y Guazuncho 2 (46,7%) bajo las condiciones del protocolo de Hemphill et al. (1998), presentando diferencias altamente significativas con SP 48114 que no desarrolló raíces en el protocolo de Pathi y Tuteja (2013) y SP 44825 (SG) que sólo enraizó para un 0,7% de sus explantes bajo el mismo protocolo (Figura 41).

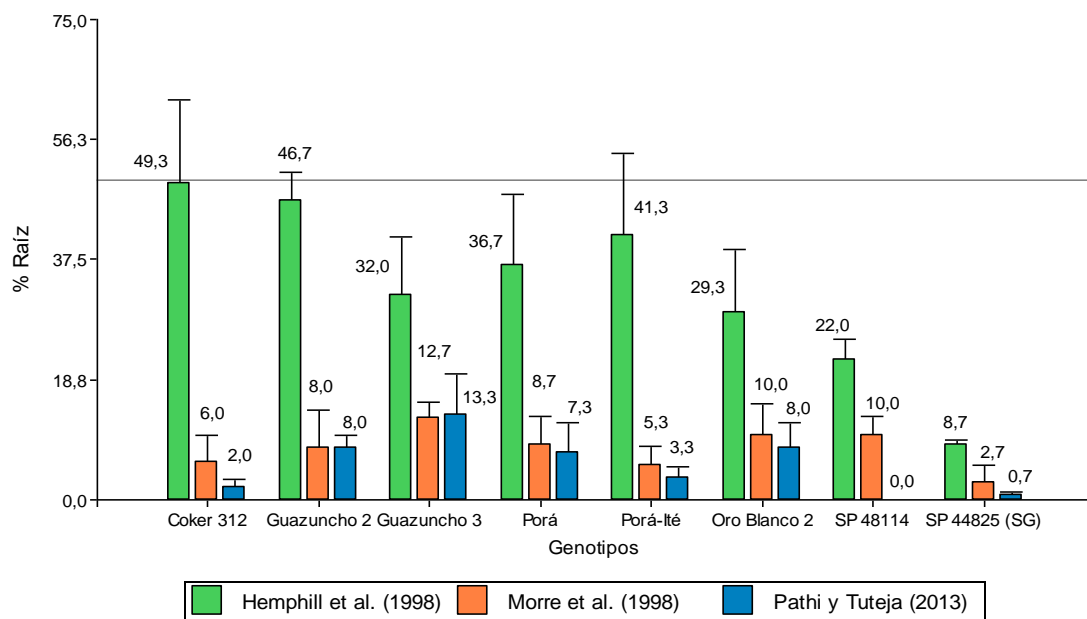


Figura 38. Porcentaje de explantes que enraízan para cada genotipo evaluado en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

Relación raíz/brote: se encontraron diferencias significativas entre los genotipos y medios evaluados cuando se realizó la prueba de Kruskal Wallis para análisis de la varianza no paramétrica (Tabla 46).

Tabla 46. Medias, desvíos estándares y significancia de la variable “porcentaje de explantes que enraízan en relación a los que brotan” para los genotipos y protocolos evaluados.

Medio	Genotipo	Media ± D.E.	H	Significancia
Hemphill et al. (1998)	Coker 312	81,67 ± 20,21 g	49,96	**
	Guazuncho 2	70,66 ± 15,43 fg		
	Guazuncho 3	61,42 ± 20,99 efg		
	Porá	70,85 ± 7,02 fg		
	Porá Ité	78,88 ± 20,51 fg		
	Oro Blanco 2	50,50 ± 32,26 defg		
	SP 48114	35,43 ± 7,75 cdefg		
	SP 44825 (SG)	35,43 ± 7,75 cdefg		
Morre et al. (1998)	Coker 312	13,43 ± 14,72 abcde		
	Guazuncho 2	19,05 ± 25,20 abcde		
	Guazuncho 3	31,90 ± 21,48 bcdefg		
	Porá	14,44 ± 12,62 abcde		
	Porá Ité	14,35 ± 14,72 abcde		
	Oro Blanco 2	19,90 ± 18,60 abcdef		
	SP 48114	20,41 ± 9,09 abcdefg		
	SP 44825 (SG)	5,80 ± 10,04 abc		
Pathi y Tuteja (2013)	Coker 312	2,63 ± 2,65 ab		
	Guazuncho 2	13,10 ± 4,33 abcde		
	Guazuncho 3	27,93 ± 23,40 abcdefg		
	Porá	12,73 ± 15,23 abcd		
	Porá Ité	8,03 ± 8,37 abcd		
	Oro Blanco 2	19,90 ± 18,60 abcdef		
	SP 48114	0,00 ± 0,00 a		
	SP 44825 (SG)	3,33 ± 5,77 ab		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) (**): significativo $p < 0,01$

El mayor porcentaje de explantes que enraizaron del total que brotaron se encontró para el protocolo de Hemphill et al. (1998), para el genotipo Coker 312

(81,7%), seguido por Porá Ité (78,9%), mientras que el genotipo de menor relación fue en el protocolo de Pathi y Tuteja (2013) para SP 48114, ya que del total brotado (56,0%, Figura 37), ninguno consiguió dar raíz (0,0%, Figura 42).

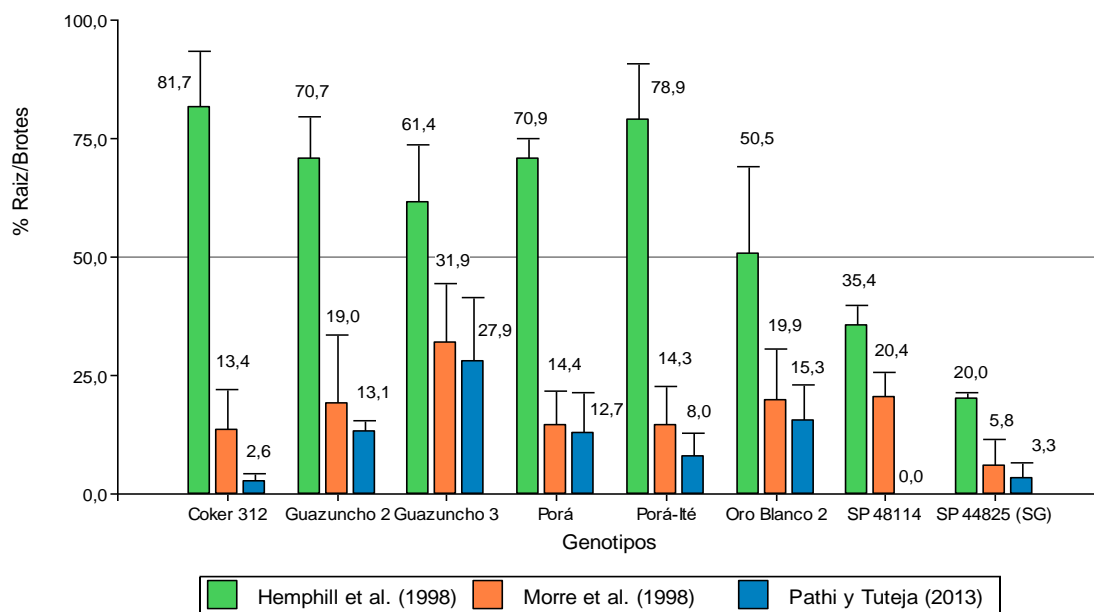


Figura 42. Porcentaje de explantes que enraízan en relación a los que brotan para cada genotipo evaluado en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

Porcentaje de explantes con respuesta negativa: se eliminaron dos datos atípicos para Porá en el protocolo de Morre y un dato para Guazuncho 2. Se encontraron diferencias altamente significativas para los medios y genotipos evaluados. Se encontraron diferencias no significativas en la interacción de los medios y los genotipos (Tabla 47).

Tabla 47. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para la variable “explantes con respuesta negativa” utilizando los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y Pathi y Tuteja (2013).

FV	GL	SC	CM	F
Medio	2	5062,56	2531,28	13,03**
Genotipo	7	6525,52	932,22	4,80**
Medio*Genotipo	14	1741,64	124,40	0,64 ns
Error	45	8741,33	194,25	
Total	68	22624,81		

CV: 47,66%

(**): significativo $p < 0,01$

ns: No significativo

En protocolo de Hemphill et al. (1998) los explantes presentaron una respuesta negativa menor (17,3%) que en los protocolos de Morre et al. (1998) (39,0%) y Pathi y Tuteja (2013) (32,4%) (Figura 43).

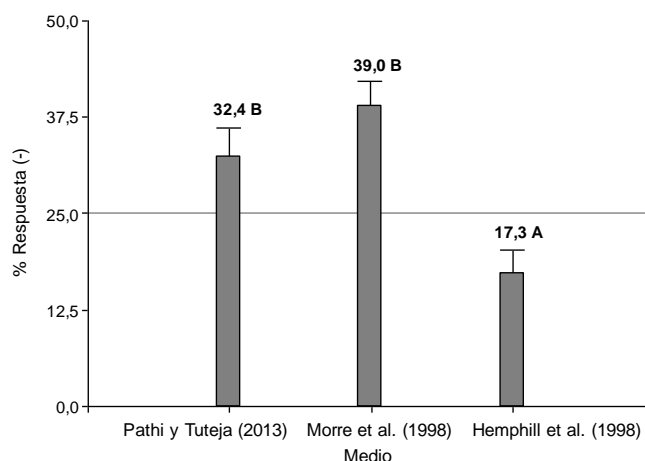


Figura 43. Porcentaje de explantes que dan respuesta negativa en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

En la Figura 44 se observa que el genotipo de mayor respuesta negativa para los tres protocolos ensayados fue SP 44825 (SG), donde el 50,7% de los explantes tuvieron un mal desempeño mientras que Guazuncho 2 fue la de menor respuesta negativa (15,8%).

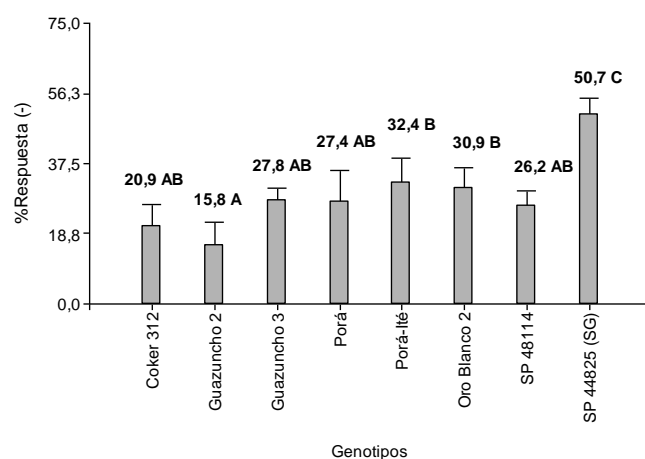


Figura 44. Porcentaje de explantes que dan respuesta negativa para los genotipos evaluados en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

Se distingue en la Figura 45 que Guazuncho 2 presentó el menor valor de respuesta negativa cuando se ensayó bajo los medios del protocolo de Hemphill et al. (1998) (2,0%) seguido por Coker 312 (3,3%) bajo el mismo protocolo y SP 44825 (SG) tuvo un alto porcentaje de respuesta negativa (54,7%) tanto en el protocolo de Morre et al. (1998) como en el de Pathi y Tuteja (2013).

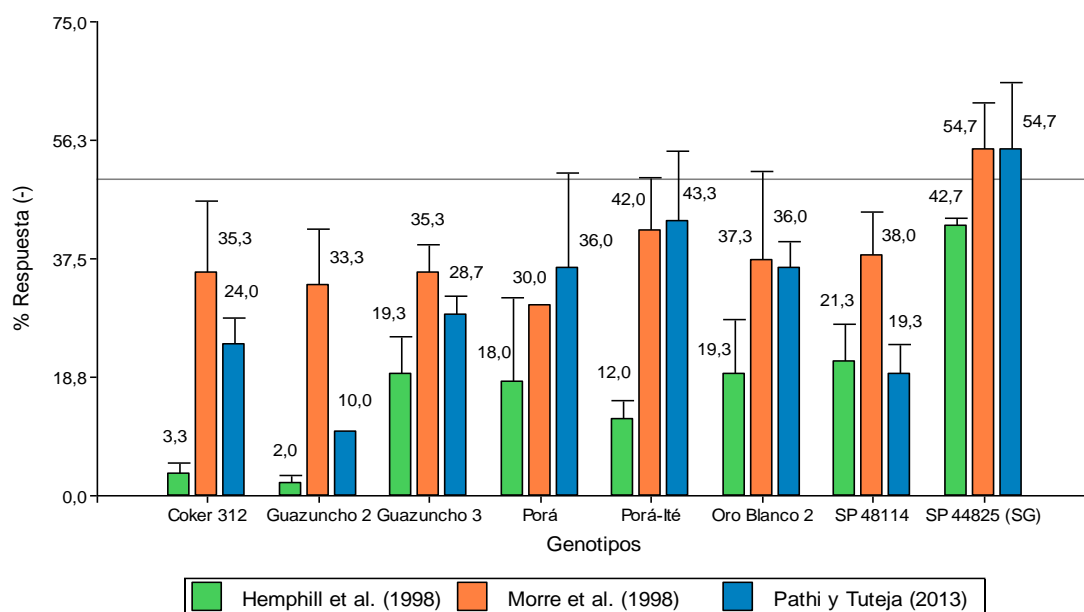


Figura 45. Porcentaje de explantes que dan respuesta negativa para cada genotipo evaluado en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013).

Porcentaje de brotes que se secan: debido a que los datos no mostraron homogeneidad de varianza, se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal Wallis a un nivel de significancia de 0,05 (α), donde no se encontraron diferencias significativas (Anexo I).

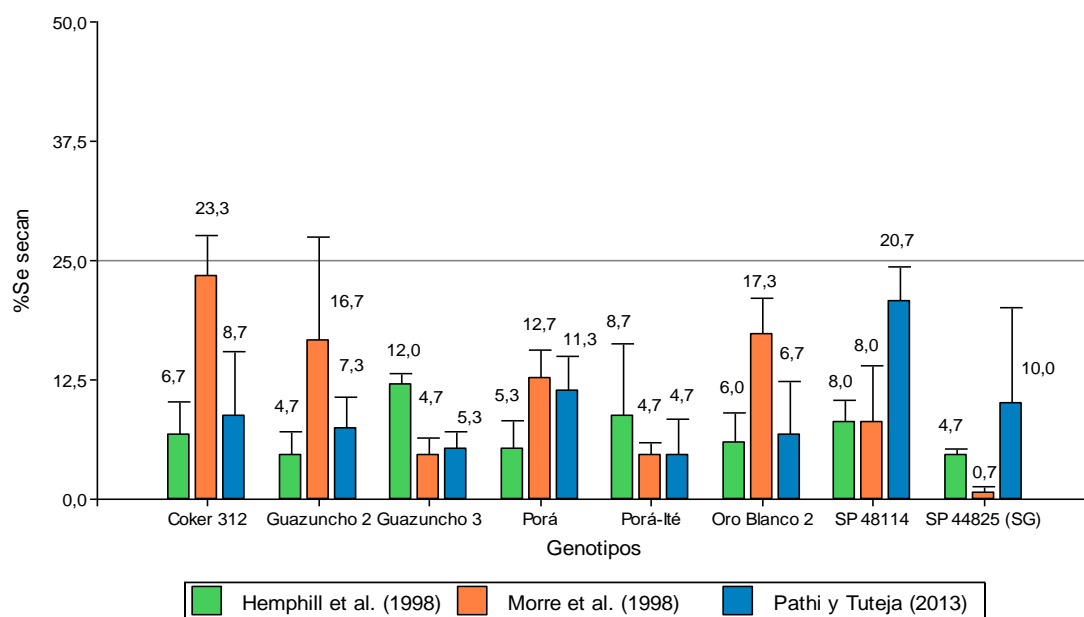


Figura 46. Porcentaje de brotes que se secan en los medios de cultivo de los protocolos de Hemphill et al. (1998), Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013) para cada genotipo evaluado.

El mayor valor de explantes que brotan y luego se secan en los medios de cultivo se observó para Coker 312 en Morre et al. (1998) alcanzando un 23,3%, seguido por SP 48114 en Pahi y Tuteja (2013) (20,7%) (Figra 46), mientras que los brotes que menos se secaron fueron los de SP 44825 (SG) en Morre et al. (1998) (0,7%).

3.2 Protocolos para yemas axilares

3.2.1 Protocolo de Agrawal et al. (1997)

Los explantes no se desarrollaron en el medio de cultivo de inducción de brotes para el protocolo de Agrawal et al. (1997), en ninguna de las tres repeticiones realizadas para ninguno de los genotipos evaluados (Figura 48).

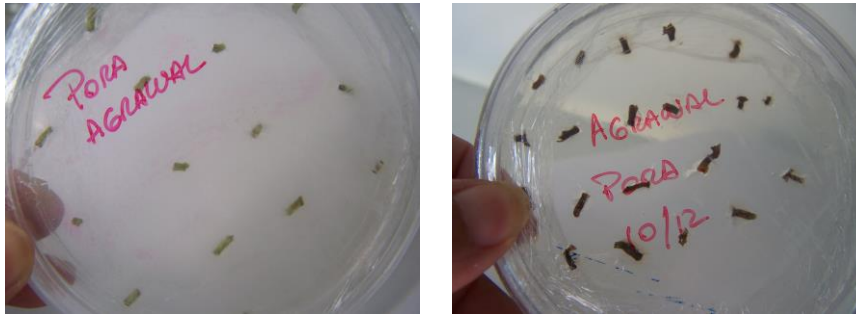


Figura 47. Explantes de la variedad Porá en el medio de inducción de brotes del protocolo de Agrawal et al. (1997). Izquierda, explantes colocados en el medio. Derecha, explantes secos en una semana de permanencia en el medio de inducción.

3.3 Protocolos para ápices caulinares y yemas axilares

3.3.1 Protocolo de Gould y Magallanes-Cedeno (1998)

Los explantes no crecieron cuando se colocaron sobre el medio de inducción de brotes para el protocolo de Gould y Magallanes-Cedeno (1998). A excepción de la variedad Porá que presentó 10 brotes en 2 repeticiones, pero los mismos se secaron luego de dos semanas en el medio quedando uno sólo de ellos en crecimiento (Figura 48, A-C)



Figura 48. Explantes de ápices caulinares de la variedad Porá en el medio de inducción de brotes. A) explantes nuevos. B) explantes marrones luego de una semana de permanencia. C) Brote de Porá.

3.3.2 Protocolo de Bazargani et al. (2011)

Los explantes no lograron crecer y desarrollarse cuando se ensayaron sobre el medio de inducción de brotes del protocolo de Bazargani et al. (2011) (Figura 49 A-D), salvo para el genotipo Porá (Figura 49 E), donde se observó la existencia de brotes en 3 explantes y en Oro Blanco 2, con 2 explantes brotados.

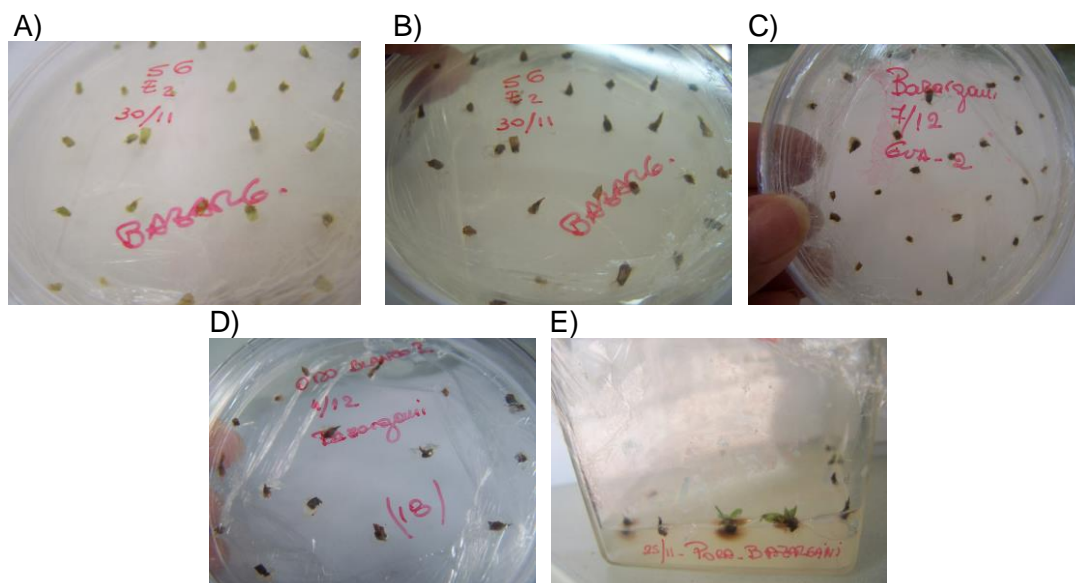


Figura 49. Medio de inducción de brotes del protocolo de Bazargani et al. (2011): A) explantes nuevos del genotipo SP 44825 (SG). B) Explantes secos luego de 2 semanas de permanencia en el medio de inducción. C) y D) explantes secos de Guazuncho 2 y Oro Blanco 2 en el mismo tiempo. E) Brotes del genotipo Porá en el medio de inducción.

3.4 Estrés abiótico

Se realizaron los análisis para validar los supuestos de normalidad de los errores y la homogeneidad de varianzas, para la variable porcentaje de germinación (Anexo II). En la Tabla 48 se observan los test de Levene y Shapiro-Wilks, la cual evidencia que, de los análisis, los supuestos se cumplen para estrés hídrico y no para el salino, por lo que en este último se realizó el análisis de la varianza con el test no paramétrico de Kruskal Wallis.

Tabla 48. Test de Levene y Test de Shapiro-Wilks para el porcentaje de germinación *in vitro* bajo los medios de cultivos de Murashigue y Skoog adicionado con distintas concentraciones de sustancias estresoras.

Estrés abiótico	Test de Levene			Test de Shapiro-Wilks	
	FV	F	p>F	W*	p
Estrés salino (1)	Medio	1,19	0,3251 ns	0,97	0,5633 ns
	Genotipo	4,42	0,0022**		
	M*G	1,60	0,1034 ns		
Estrés hídrico	Medio	0,48	0,7471 ns	0,97	0,4591 ns
	Genotipo	1,82	0,1399 ns		
	M*G	1,66	0,0882 ns		

ns: No significativo de Kruskal Wallis. (**): significativo $p < 0,01$ (1): Análisis de la varianza con el test no paramétrico

3.4.1 Estrés salino impuesto sobre semillas de algodón

Se encontraron diferencias altamente significativas cuando se realizó el análisis de la varianza no paramétrica, test de Kruskal Wallis, presentado en la tabla 49.

Tabla 49. Medias, desvíos estándares y significancia para el porcentaje de germinación en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de cloruro de sodio.

Medio	Genotipo	Media \pm D.E		H	Signifancia
MS	Guazuncho 2	94,67 \pm 5,03	f	52,55	**
	Guazuncho 3	68,67 \pm 26,03	cdef		
	Porá	88,00 \pm 9,17	f		
	Prá Ité	54,00 \pm 17,78	abcdef		
	Oro Blanco 2	71,33 \pm 8,08	cdef		
	SP 48114	78,00 \pm 13,11	def		
MS + 50 NaCl	Guazuncho 2	84,00 \pm 10,58	ef		
	Guazuncho 3	59,33 \pm 18,58	bcdef		
	Porá	83,33 \pm 14,19	ef		
	Porá Ité	49,33 \pm 31,77	abcdef		
	Oro Blanco 2	58,00 \pm 22,54	bcdef		
	SP 48114	59,33 \pm 9,45	abcdef		
MS + 100 NaCl	Guazuncho 2	64,00 \pm 8,72	bcdef		
	Guazuncho 3	42,67 \pm 27,15	abcde		
	Porá	76,00 \pm 17,44	def		
	Porá Ité	26,67 \pm 20,23	abc		
	Oro Blanco 2	23,33 \pm 8,33	abc		
	SP 48114	54,00 \pm 5,29	abcdef		
MS + 200 NaCl	Guazuncho 2	28,00 \pm 19,70	abc		
	Guazuncho 3	14,00 \pm 19,29	ab		
	Porá	31,33 \pm 35,57	abcd		
	Porá Ité	16,67 \pm 18,15	ab		
	Oro Blanco 2	7,33 \pm 7,02	a		
	SP 48114	19,33 \pm 9,02	ab		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) (**): significativo $p < 0,01$

Los genotipos analizados se comportaron disminuyendo su porcentaje de germinación a medida que aumentó la concentración de sal en el medio, desde un 75,8% de germinación para medios sin el agregado de cloruro de sodio hasta un mínimo de 19,4% (Figura 50) cuando se expusieron a la máxima concentración salina (200 mM de cloruro de sodio).

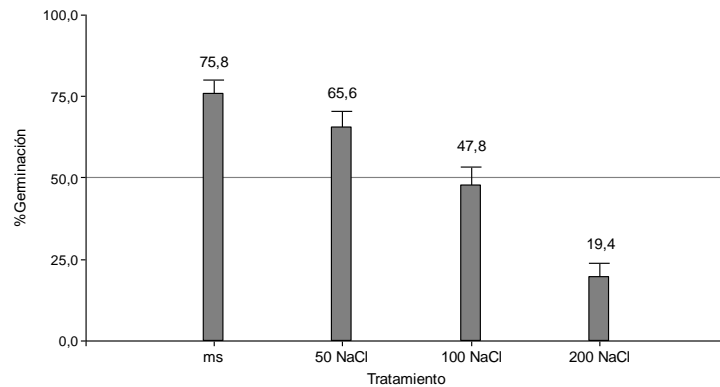


Figura 50. Porcentaje de semillas que germinan en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de cloruro de sodio para ensayos de estrés salino.

En el medio sin cloruro de sodio, Guazuncho 2 tuvo el mayor porcentaje de germinación (94,7%) mientras que Porá Ité presentó el menor (54,0%). Cuando se agregó en el medio 50 mM de cloruro de sodio, se repitió el comportamiento, siendo Guazuncho 2 la de mayor porcentaje de germinación (84,0%) y la de menor Porá Ité (49,3%). En el medio que contenía 100 mM de cloruro de sodio, Porá resultó la de mayor porcentaje de germinación (76,0%) y Oro Blanco 2, la de menor (23,3%). A la mayor concentración salina (200 mM de cloruro de sodio) Porá germinó más (31%) y Oro Blanco 2, la del menor porcentaje de germinación (7,3%) (Figura 51).

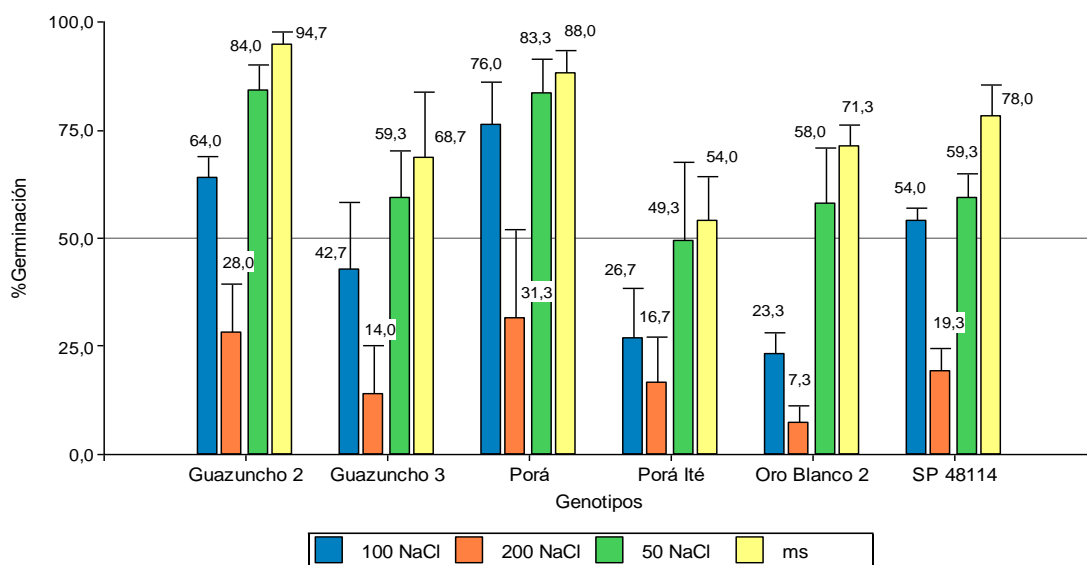


Figura 51. Porcentaje de semillas que germinan en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de cloruro de sodio para los genotipos evaluados.

Cuando se comparó los medios y genotipos en general, el genotipo que menos germinó fue Oro Blanco 2 (7,3%) en el medio suplementado con 200 mM de cloruro de sodio, seguido por Guazuncho 3 (14,0%), Porá Ité (16,7%) y SP 48114 (19,3%) en el mismo medio, y las de mayor porcentaje Guazuncho 2 (94,7%) y Porá (88,0%) en el medio sin el agregado de cloruro de sodio.

3.4.2 Estrés salino sobre explantes de hipocótilos

Los callos se desarrollaron a partir de explantes hipocótilos sólo cuando no estaban presentes las sustancias estresoras (Figura 52).

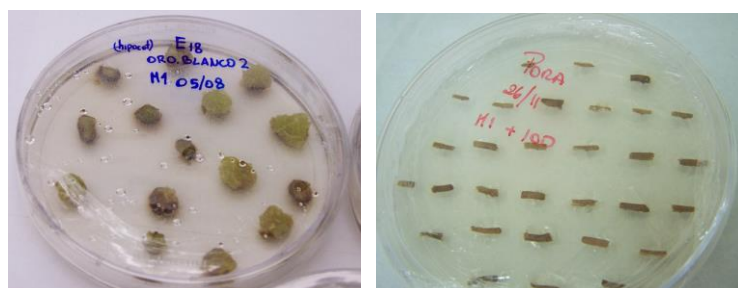


Figura 52. Izquierda: callos desarrollados a partir de explantes de hipocótilos en el medio de cultivo P1-AS del protocolo de Sunilkumar y Rathore (2001) a concentración 0 mM de cloruro de sodio (tres semanas de permanencia). Derecha: explantes de Porá sin crecimiento celular luego tres semanas de permanencia en el medio P1-AS suplementado con 100 mM de cloruro de sodio.

3.4.3 Estrés hídrico impuesto sobre semillas de algodón

El genotipo SP 48114 no pudo ser incluido en el análisis debido a que las semillas que se disponían no presentaban la calidad adecuada y se contaminaron con frecuencia al realizar los ensayos.

Se eliminaron dos datos atípicos, uno para Porá Ité en el medio suplementado con 80 mM de Sorbitol y Oro Blanco 2 en el medio suplementado con 20 mM de Manitol. Se encontraron diferencias significativas cuando se realizó el análisis de la varianza (Tabla 50) para los medios evaluados, los genotipos considerados y para la interacción entre ellos.

Tabla 50. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para el porcentaje de germinación en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de sorbitol y manitol.

FV	GL	SC	CM	F
Medio	4	4334,93	1083,73	9,33**
Genotipo	4	11394,42	2848,60	24,53**
Medio*Genotipo	16	3623,98	226,50	1,95*
Error	48	5574,67	116,14	
Total	72	24600,22		

CV: 17,81% (*): significativo p<0,05 (**): significativo p<0,01

Todos los genotipos evaluados germinaron más en el medio sin sustancias estresantes agregadas (70,1%), mientras que su comportamiento fue distinto en los medios suplementados con distintas concentraciones de manitol y sorbitol. El menor porcentaje de germinación se observó en los medios con el agregado de 80 mM de sorbitol (47,1%) (Figura 53).

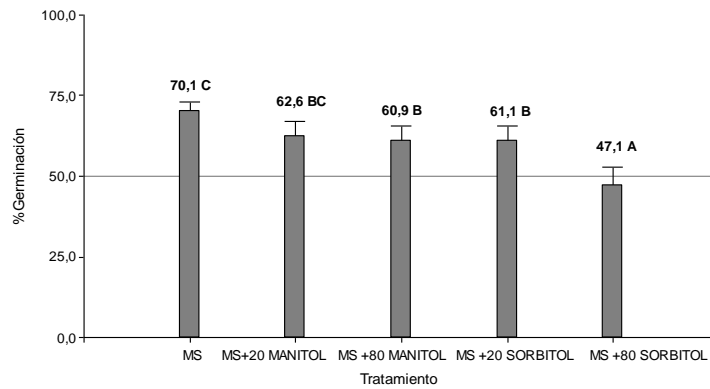


Figura 53. Porcentaje de semillas que germinan en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de manitol y sorbitol, para ensayos de estrés hídrico.

Entre los genotipos usados en este ensayo, para todos los medios de distinta concentración de sustancias estresantes, Guazuncho 2 fue la que presentó el mayor porcentaje de germinación (83,6%), diferenciándose significativamente de Guazuncho 3 con el menor porcentaje (47,2%) y de las de germinación intermedia Porá y Porá Ité (Figura 54).

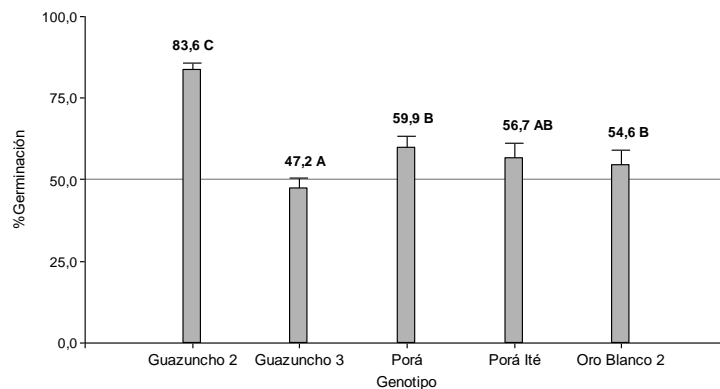


Figura 54. Porcentaje de semillas que germinan para cada genotipo en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de manitol y sorbitol, para ensayos de estrés hídrico.

Se analizó la interacción de cada genotipo con los diferentes medios de cultivo. Se realizaron los análisis para validar los supuestos de normalidad de los errores y la homogeneidad de varianzas, para la variable porcentaje de germinación. En la Tabla 51 se observan los test de Levene y Shapiro-Wilks, la cual evidencia que los supuestos se cumplen para el porcentaje de germinación de las variedades en los diferentes medios.

Tabla 51. Test de Levene y Test de Shapiro-Wilks para el porcentaje de germinación de las variedades en los medios suplementados con diferentes concentraciones de manitol y sorbitol.

Variable	Test de Levene		Test de Shapiro-Wilks	
	F	significancia	W*	significancia
Porcentaje de germinación Guazuncho 2	0,77	0,5685 ns	0,95	0,6668 ns
Porcentaje de germinación Guazuncho 3	1,50	0,2737 ns	0,92	0,3453 ns
Porcentaje de germinación Porá	2,12	0,1604 ns	0,94	0,5880 ns
Porcentaje de germinación Porá Ité	2,42	0,1167 ns	0,94	0,6163 ns
Porcentaje de germinación Oro Blanco 2	0,92	0,4915 ns	0,89	0,1636 ns

ns: no significativo

Guazuncho 2: el análisis de la varianza presentado en la Tabla 52 indica que para esta variedad no se encontraron diferencias significativas cuando se germinaron las semillas en los medios con diferentes concentraciones de sustancias estresoras.

Tabla 52. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para el porcentaje de germinación de Guazuncho 2 en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de sorbitol y manitol.

FV	GL	SC	CM	F
Medio	4	321,60	80,40	1,32 ns
Error	10	608,00	60,80	
Total	14	929,60		

CV: 9,33%

ns: No significativo

En la Figura 55 se observa que el mayor porcentaje de germinación ocurrió en el medio suplementado con 20 mM de sorbitol (90,0%), mientras que el menor valor se obtuvo cuando se usó el medio suplementado con 20 mM de manitol (76,7%).

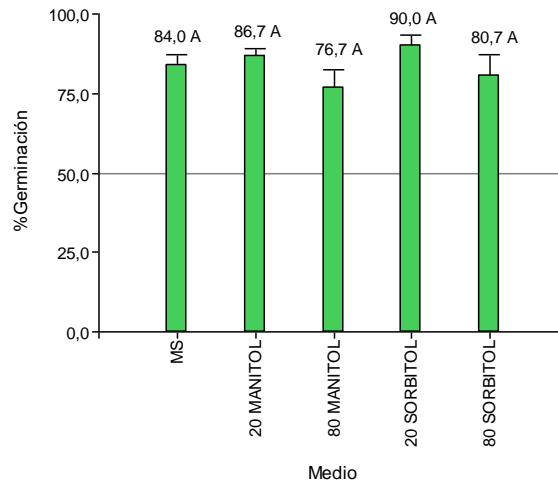


Figura 55. Porcentaje de semillas Guazuncho 2 que germinan en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de manitol y sorbitol, para ensayos de estrés hídrico

Guazuncho 3: se observaron diferencias significativas entre los distintos medios usados para la germinación de esta variedad cuando se realizó el análisis de la varianza presentado en la Tabla 53.

Tabla 53. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para el porcentaje de germinación de Guazuncho 3 en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de sorbitol y manitol.

FV	GL	SC	CM	F
Medio	4	1321,07	330,27	4,27*
Error	10	773,33	77,33	
Total	14	2094,40		

CV: 18,63%

(*): significativo $p < 0,05$

Según se percibe en la Figura 56, el menor valor de porcentaje de germinación se observó para Guazuncho 3 en el medio conteniendo 80 mM de sorbitol, mientras el mayor valor encontrado fue registrado en el medio sin el agregado de agentes estresantes (MS, 62,0%).

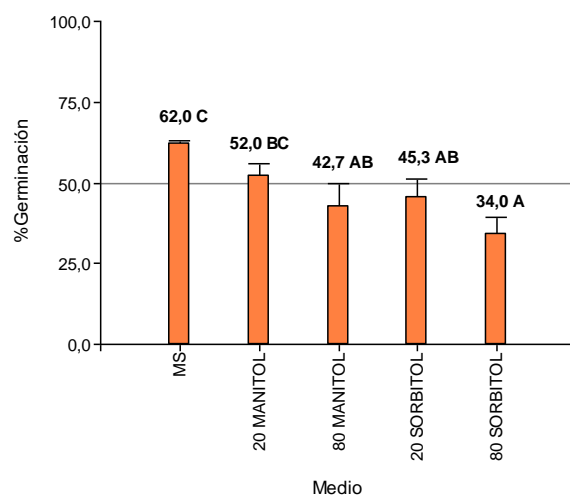


Figura 56. Porcentaje de semillas Guazuncho 3 que germinan en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de manitol y sorbitol, para ensayos de estrés hídrico

Porá: se eliminó un caso atípico para Porá en el medio suplementado con 20 mM de manitol. Se encontraron diferencias altamente significativas para esta variedad cuando se germinó en los medios suplementados con diferentes concentraciones de sorbitol y manitol (Tabla 54).

Tabla 54. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para el porcentaje de germinación de Porá en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de sorbitol y manitol.

FV	GL	SC	CM	F
Medio	4	1487,05	371,76	7,52**
Error	9	444,67	49,41	
Total	13	1931,71		

CV: 11,36% (**): significativo $p < 0,01$

El mayor porcentaje de germinación se observó para la germinación en 80 mM de manitol (73,3%), sin presentar diferencias significativas con la germinación en MS (71,3). Por otro lado, el menor porcentaje de germinación para Porá (46,7%), fue encontrado para 80 mM de sorbitol (Figura 57).

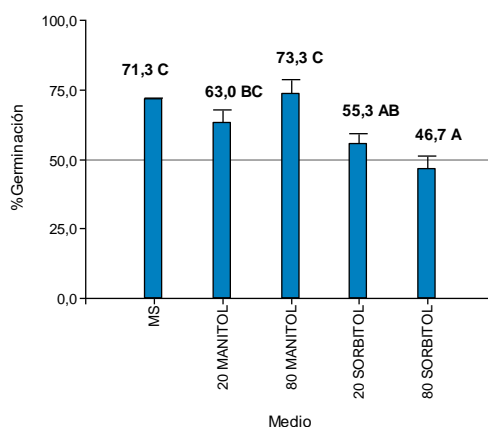


Figura 57. Porcentaje de semillas *Porá* que germinan en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de manitol y sorbitol, para ensayos de estrés hídrico

Porá Ité: no se encontraron diferencias significativas cuando se hizo germinar semillas de esta variedad en los medios de cultivos suplementados con distintas concentraciones de sorbitol y manitol (Tabla 55).

Tabla 55. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para el porcentaje de germinación de *Porá* Ité en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de sorbitol y manitol.

FV	GL	SC	CM	F
Medio	4	1150,40	287,60	0,88 ns
Error	10	3253,33	325,33	
Total	14	4403,73		

CV: 30,81%

ns: No significativo

El valor más alto de germinación (70,7%) se observó en el medio sin sustancias estresoras, mientras que el valor más bajo (52,7%) se vio en los medios con 20 mM de sorbitol (Figura 58).

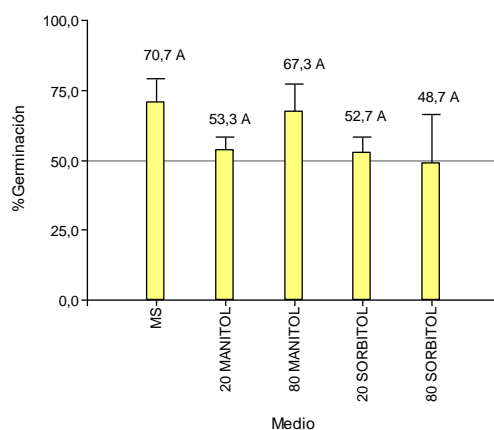


Figura 52. Porcentaje de semillas Porá Ité que germinan en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de manitol y sorbitol, para ensayos de estrés hídrico

Oro Blanco 2: en el análisis de la varianza presentado en la tabla 56 puede observarse que no se encontraron diferencias significativas cuando se hizo germinar las semillas de esta variedad en los medios suplementados con las sustancias estresoras, manitol y sorbitol

Tabla 56. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia obtenidos en el análisis de variancia para el porcentaje de germinación de *Oro Blanco 2* en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de sorbitol y manitol.

FV	GL	SC	CM	F
Medio	4	1525,33	381,33	1,50 ns
Error	10	2544,00	254,40	
Total	14	4069,33		

CV: 29,91% ns: No significativo

El máximo porcentaje de germinación ocurrió en los medios sin estrés (62,7%), mientras que el menor (38,0%) se observó en 80 mM de sorbitol (Figura 59).

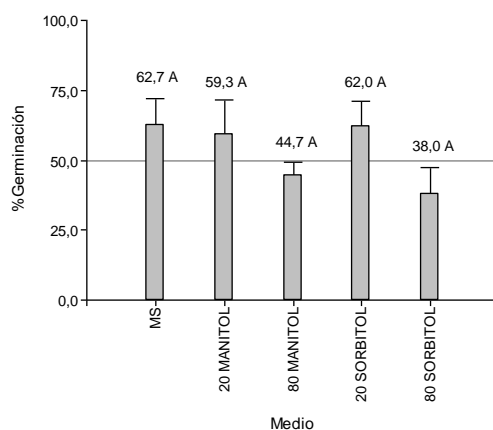


Figura 59. Porcentaje de semillas Oro Blanco 2 que germinan en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de manitol y sorbitol, para ensayos de estrés hídrico

En el medio suplementado con 20 mM de sorbitol se observó el mayor porcentaje de germinación para la variedad Guazuncho 2, mientras que el valor más bajo observado fue para Porá Ité cuando se puso a germinar en el medio conteniendo 80 mM de sorbitol (Figura 60). En general, Guazuncho 2 tuvo un porcentaje de germinación más alto en todos los medios ensayados en relación con el resto de los genotipos considerados.

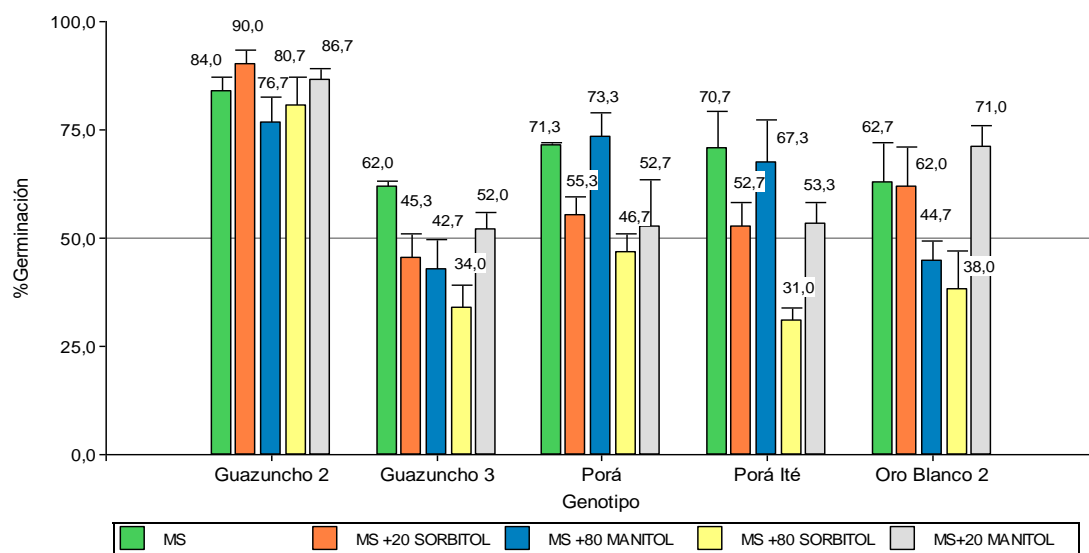


Figura 60. Porcentaje de semillas que germinan en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de sorbitol y manitol para los genotipos evaluados.

4. DISCUSION

El rendimiento promedio del algodón a nivel mundial ha aumentado de manera constante, con períodos de intermitencia que fueron desde un crecimiento lento a ningún crecimiento observable. Desde 2007/08, el promedio mundial no se ha elevado al ritmo en que lo hizo durante el decenio anterior (ICAC, 2014).

Debido al estrechamiento en la base genética del algodón, se hace necesario contar con estrategias que aporten a la variabilidad de manera tal que puedan ser usadas en los Programas de Mejoramiento Genético de INTA.

Dado que el cultivo de algodón es de importancia económica a nivel mundial y debido a este estrechamiento en la base genética, en este trabajo se abordó la investigación en búsqueda de materiales de algodón con capacidad de regeneración directa, que resulten atractivos para ser acoplados a protocolos que incluyan transformación genética y que posean algún nivel apreciable de tolerancia a estrés abiótico. Con el fin de encontrar algún material vegetal con características destacadas, se propuso realizar una investigación sobre los materiales de algodón de INTA, para conocer su performance *in vitro*.

4.1 Ensayos de regeneración sobre ápices embrionarios

Consideraciones preliminares

Para discutir el trabajo realizado sobre los protocolos ensayados usando como explantes los ápices embrionarios se hicieron las siguientes consideraciones:

- los genotipos evaluados en este trabajo de tesis (a excepción de Guazuncho 2) no han sido evaluados anteriormente para su capacidad de regeneración *in vitro*.

- en general, no todas las variables que se presentan en este trabajo fueron consideradas en los trabajos publicados anteriormente (particularmente es el caso de las que dieron la respuesta negativa total).

- las semillas usadas en este trabajo (a excepción de Coker 312, y las obtenidas para los ensayos de yemas axilares y ápices caulinares de SP 44825 (SG)) no fueron multiplicadas por el grupo de trabajo de biotecnología, sino que fueron recibidas del Programa de Mejoramiento Genético de INTA Sáenz Peña. Posiblemente, la calidad algunas de las semillas usadas en este trabajo, no era la óptima necesaria para usar en los medios de cultivos (ricos en azúcares) que conforman los protocolos ensayados, por lo que se tuvieron contaminaciones frecuentes que hicieron necesario repetir experiencias. De todas maneras, no se disponía de tiempo ni espacio suficiente para realizar multiplicaciones para todo el material vegetal usado en la tesis.

- la línea SP 44825 (SG) usada en los protocolos de ápices embrionarios no fue multiplicada en la campaña 2014/15 sino en la anterior, nuevamente podría ser un efecto a considerar cuando se analizan los resultados obtenidos para este genotipo.

- en todos los protocolos y para todos los genotipos, los explantes brotados que se secaban no dieron respuesta de raíz, sino que permanecían en el medio de cultivo sin crecimiento y senescían.

4.1.1 Protocolo de Hemphill et al. (1998)

En la publicación de Hemphill et al. 1998 se propuso un método rápido, independiente del genotipo para la regeneración de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) a partir de meristemas pre-existentes (ápices, meristemas nodales, nodos foliares y cotiledonares). La intención era evitar la formación de callos usando un procedimiento de regeneración que empleara bencil aminopurina como regulador de crecimiento (a la concentración de 0.3 μ M) que pudiera ser acoplado a un sistema de transformación genética. El desarrollo de este protocolo se fundamentó en la necesidad de evitar la

regeneración mediante embriogénesis somática, ya que ésta es dependiente de germoplasma, exitosa con unos pocos cultivares regenerables, por lo general líneas Coker (Koonce et al. 1996) e insume largos períodos de cultivo hasta la obtención de plantas con el gen de interés (entre 6 a 10 años de retrocruza para introgresar la característica en cultivares de valor agronómico adecuado). Además, se expuso que las plantas regeneradas a partir de callos a veces son estériles y/o muestran signos de variaciones somaclonales que afectan el genotipo y el fenotipo (Firoozabady y DeBoer, 1993).

En esta tesis, se planteó seguir los pasos propuestos en el trabajo de Hemphill et al. (1998) para ápices embrionarios de Stoneville 7A y Paymaster HS26, con el objetivo de evaluar la capacidad de regenerar *in vitro*, de genotipos locales provenientes del Programa de Mejoramiento Genético de INTA y de la variedad modelo, Coker 312, mencionada en la Tabla 2. Con esa intención se registraron las variables que se consideraron importantes para determinar la eficiencia en la producción de brotes y la respuesta por explante, las que se considerarán a continuación.

Respuesta negativa total del protocolo de Hemphil et al. (1998)

Se consideró a los explantes que no dieron respuesta en el medio de inducción de brotes como la primera respuesta negativa observable, ya que se trataba de explantes que una vez colocados sobre el medio de cultivo no se contaminaban, no daban respuesta de crecimiento celular (callos) ni desarrollo de brotes. Este efecto disminuía el número de explantes brotados a obtener y, por lo tanto, el de plantas regeneradas desde el inicio del experimento. Cuando se evaluó el porcentaje de explantes sin respuesta (porcentaje de explantes sin crecimiento en el medio de inducción de brotes) se encontró que el genotipo Oro Blanco 2 presentaba el mayor valor. En el otro extremo, Porá Ité y SP 44825 (SG) no mostraron este tipo de respuesta y los demás genotipos mostraron un comportamiento intermedio.

Para el análisis del porcentaje de la formación de callos, se hallaron diferencias altamente significativas cuando se comparó entre los genotipos. Esta respuesta constituye un segundo nivel de respuesta negativa y si bien se consideró en todo el

experimento, por lo general, la formación de los callos ocurrió en los medios de inducción de brotes, entre el primer y segundo repique. El genotipo con mayor formación de callos fue SP 44825 (SG) superando el 40%, mientras que el resto de los genotipos tuvo menos de la mitad de esta respuesta con un mínimo porcentaje de formación de callos para Guazuncho 2 (menos que el 1%) y Porá (2%), siendo Guazuncho 2 el genotipo más promisorio en ensayos que usen las condiciones de medio de Hemphill et al. (1998).

Esto es de gran magnitud (40%) si se considera que, de comenzar un experimento con 100 explantes de SP 44825 (SG), entre el primer y segundo repique, sólo quedarían 60 de ellos que avancen a la siguiente etapa (sin considerar otros aspectos negativos que reduzcan este valor al inicio de la experiencia, como por ejemplo las contaminaciones).

Para considerar las dos respuestas no deseadas en los experimentos de regeneración por organogénesis que se tienen al principio de la experiencia, se construyó la variable "porcentaje de respuesta negativa". SP 44825 (SG) presentó la respuesta negativa más importante, en este caso debido por completo a la formación de callos y no por falta de crecimiento, mientras que Guazuncho 2 se diferenció por tener el menor valor (2% de respuesta negativa de explantes que no brotan).

La última respuesta negativa estimada fue de los explantes que brotan, crecen, pero luego de un tiempo de permanencia en los medios de cultivo del protocolo considerado se secaban tornándose de color marrón (tejido con necrosis). Se observó que el mayor porcentaje de explantes que se secan fue alcanzado por Guazuncho 3 (12%).

Si para este genotipo se tiene en cuenta una respuesta negativa total, Guazuncho 3 alcanzaría un valor de 31,3%, compuesto por la respuesta negativa (19,3% de explantes sin crecimiento o que forman callos) más las que se secan luego de brotar (12,0%). Es decir, por ejemplo, si se partiera de 100 explantes de Guazuncho 3, tendría que 2 de los explantes no darían respuesta (sin crecimiento), 17 serían callos y 12 se secarían en los medios de cultivo de este protocolo, conservando 69 que avancen en el desarrollo.

Considerando una respuesta negativa total entre todos genotipos evaluados se encuentra que el mayor valor correspondió a SP 44825 (SG) y la de menor respuesta negativa total fue Guazuncho 2 bajo las condiciones del protocolo de Hemphill et al. (1998).

Respuestas esperadas en el protocolo de Hemphill et al. (1998)

En general la respuesta fue aceptable, superando al 50% de explantes con brotes, con la excepción de SP 44825 (SG) que presentó el menor valor de 44%, lo que no resulta sorprendente debido a que, como se mencionó anteriormente, la respuesta negativa (sin crecimiento y callos) alcanzó el 42,7% (el 13,3% restante se perdió debido a la contaminación).

Los valores más promisorios se encontraron para Guazuncho 2 con 66,7% de brotes, aunque con más alto valor de contaminación (31,3%), dado que sólo el 2% de sus explantes presentó respuesta negativa. Este genotipo fue seguido en la capacidad de formar brotes por SP 48114, Oro Blanco 2, Coker 312, Porá, Guazuncho 3 y Porá Ité, bajo las condiciones de cultivo del protocolo de Hemphill et al. (1998). Dado que el porcentaje de contaminación no está asociado al genotipo de los materiales y es posible tomar medidas adicionales para minimizarlo, no se consideró como variable del ensayo que afecte al genotipo.

Bajo el protocolo de Hemphill et al. (1998), de los 150 explantes estudiados para cada variedad (3 repeticiones de 50 explantes, en total 1200 explantes bajo las condiciones de este protocolo) se encontró sólo uno que brotó con dos brotes para Guazuncho 2, el resto lo hizo sólo con uno. Todos los explantes fueron colocados de en posición horizontal al comenzar la experiencia. Por ello, si se quiere elegir un protocolo de regeneración para acoplar a un sistema de transformación genética que promueva la formación de múltiples brotes, este no sería el protocolo indicado.

No se encontraron diferencias significativas entre los genotipos evaluados en cuanto al porcentaje de brotes que enraízan en relación con el total de explantes

analizados en cada caso. Es significativo desatacar que la formación de raíces es una de las variables casi tan o más importante que el porcentaje de brotes, ya que define la cantidad de plantas que se van a obtener para hacer crecer y aclimatar en condiciones de invernáculo y, por lo tanto, podría ser considerado como un indicador de tendencia hacia los genotipos para seleccionar en el caso de querer realizar una transformación genética. Para este protocolo, si bien no hay diferencias significativas, el mayor valor de raíces lo presentó el genotipo Coker 312 (variedad modelo de regeneración para embriogénesis somática) con casi el 49,3% de plantas que brotaron y enraizaron seguida por Guazuncho 2 con 46,7% y el resto de los genotipos con valores más bajos, destacándose entre ellos SP 44825 (SG) con tan sólo 8,7% de explantes brotados y enraizados.

Si se usara este protocolo con 100 explantes de este último genotipo, encontraríamos, como ya se mencionó anteriormente, que obtendríamos 44 explantes brotados de los cuales (además de los 42 callos), sólo desarrollaría entre 8 a 9 plantas (8,7%). En oposición, Coker 312 y Guazuncho 2 son los que producen más plantas enraizadas.

En un intento por determinar una eficiencia de enraizamiento para cada genotipo evaluado y poder compararlos, se construyó la variable relación raíz/brote que considera los brotes enraizados del total de explantes brotados para cada genotipo y no del total de explantes ensayados (a diferencia del porcentaje de brotes enraizados). Cuando se analizó esta variable bajo las condiciones del protocolo de Hemphill et al (1998), los genotipos mostraron diferencias altamente significativas. El más eficiente para generar raíces resultó Coker 312, ya que del 58,7% de explantes brotados logró raíces en el 49,3% del total (81,7%), este fue seguido por Porá Ité, aunque sólo logró brotes en el 50% de los explantes que se ensayaron, por lo que, si se compara con Coker 312, partiendo de 100 explantes para Coker se conseguirían 49 plantas y en Porá Ité sólo 32 (determinado por el porcentaje de raíces). Pero, si se quisiera elegir para ensayos de transformación genética a la variedad Porá Ité debido a características agronómicas que la distinguen de las demás, si bien no obtendría muchos brotes, se esperaría que la mayoría de los brotes conseguidos produzcan raíz. Le siguen en eficiencia para dar raíces: Porá, Guazuncho 2, en un término medio Guazuncho 3 y Oro Blanco 2, mientras que las de menor eficiencia resultaron las líneas SP 44825 (SG) y SP48114.

Dado que el porcentaje de raíces determina la cantidad de plantas que pueden obtenerse, ya que implica a explantes que primero brotaron y luego enraizaron, en este protocolo la mejor respuesta fue del genotipo Coker 312, seguido de Guazuncho 2, quedando en los últimos lugares las líneas SP 48114 y SP 44825 (SG).

4.1.2 Protocolo de Morre et al. (1998)

En este trabajo se reprodujo el procedimiento publicado por Morre et al., (1998), quienes proponen el uso alternativo de explantes de ápices embrionarios para regenerar plantas de especies recalcitrantes como el algodón, cuya respuesta está limitada a unos pocos genotipos Coker y Siokra (Trolinder y Xhixian, 1989; Cousins et al., 1991). Además, el protocolo plantea este procedimiento como inductor de múltiples brotes sobre la variedad Guazuncho 2, un cultivar argentino con baja o nula capacidad para regenerar por embriogénesis somática (Schroeder et al., 1994). Sugieren además que este procedimiento podría acoplarse a un sistema de transformación genética, tal como se consideró en el protocolo de Hemphill et al. (1998), que transforme este tipo de explantes por el bombardeo de microproyectiles o mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Este procedimiento involucra el uso de bencil aminopurina, al igual que el de Hemphill et al. (1998), pero a una concentración de 3 mg/l (equivalente a 13,3 μ M). Discute sobre la presencia del regulador de crecimiento BAP, sugiriendo que no sería necesario para iniciar la actividad meristemática inicial. Sin embargo, la exposición de corto plazo acelera el crecimiento del hipocótilo y el desarrollo de nuevas hojas y la exposición de 20 días cambia los patrones de brotación reprogramando el desarrollo del ápice caulinar e induciendo la formación de múltiples brotes.

Como en el protocolo de Hemphill et al. (1998), en el presente trabajo de tesis se evaluaron genotipos locales provenientes del programa de mejoramiento genético de INTA y del genotipo Coker 312 para determinar la capacidad de regeneración *in vitro* usando los medios propuestos por Morre et al. (1998).

Respuesta negativa total del protocolo de Morre et al. (1998)

Cuando se estudiaron los explantes que no presentaban crecimiento en los medios de inducción de brotes del protocolo de Morre et al. (1998), no se encontraron diferencias para los genotipos considerados, aunque sí hubo diferentes grados de respuesta para esta variable. SP 44825 (SG) presentó el valor más alto de explantes que se colocaron en el medio, no brotaron ni se contaminaron y sólo permanecieron sin presentar respuesta (21,3%), seguido por Guazuncho 3, Porá, Guazuncho 2, Oro Blanco 2, y los valores más bajos para esta respuesta fueron para Coker 312 y Porá Ité. Exceptuando a Oro Blanco 2, el resto de los genotipos tuvieron un mayor valor para esta variable en comparación a su comportamiento bajo el protocolo de Hemphill et al. (1998). Es importante considerar que SP44825 (SG) fue el genotipo que evaluado en el protocolo de Morre et al. (1998) presentó el valor más alto de explantes sin crecimiento, mientras que, cuando se examinó bajo las condiciones del protocolo de Hemphill et al. (1998), no tuvo este tipo de respuesta.

Morre et al. (1998) discuten entre sus resultados para la variedad Guazuncho 2 que aproximadamente el 10% de los ápices brotados fueron recalcitrantes al desarrollo de múltiples brotes con un 70% de brotación.

Considerando el porcentaje de callos que se formaron en el medio de inducción de brotes bajo las normas de este protocolo, en el análisis de la varianza no hubo diferencias entre los genotipos bajo evaluación. Sin embargo, se encontraron distintos niveles de formación de callos y en todos los genotipos evaluados, los valores alcanzados bajo el protocolo de Morre et al. (1998) fueron más altos que los vistos para el protocolo de Hemphill et al. (1998), con excepción de SP 44825 (SG). En este caso, el valor más alto fue para Porá Ité (el 36,0% de sus explantes formaron callos), seguido de Coker 312 y SP 44825 (SG), mientras que los genotipos que menos formaron callos fueron Guazuncho 3, y Porá. Guazuncho 2 formó callos en el 18,7% de sus explantes, por lo que considerando que, además, el 14,7% no crecieron en el medio, resultó que el 33,4% no presentó respuesta de brote, por lo que la diferencia (66,6%) se asemeja al valor de brotes encontrados en el trabajo de Morre et al. (1998) para el mismo genotipo.

Con los valores obtenidos para las dos variables consideradas anteriormente, se podría estimar que si, por ejemplo, se pusieran a prueba 100 explantes de SP 44825

(SG), en el medio de inducción de brotes, se encontraría que 21 de ellos no crecen y 33 forman callos. Esto hace que más de la mitad de los ápices embrionarios ensayados se pierdan al comienzo de la experiencia sin tener la posibilidad de avanzar hacia una fase de formación de brotes. Por esa razón la línea SP 44825 (SG) no sería apta para usar en protocolos de regeneración usando ápices embrionarios como explantes.

Con la finalidad de hacer este tipo de análisis e inferencias, se estudió el porcentaje de respuesta negativa, el cual indica cómo es el comportamiento inicial de los explantes.

El porcentaje de respuesta negativa al inicio de la experiencia no mostró diferencias significativas entre los genotipos considerados, pero nuevamente, los valores fueron altos en comparación a los obtenidos bajo los medios del protocolo Hemphill et al. (1998) (debido a que sus dos componentes fueron más altas). Como ya se nombró anteriormente, el mayor valor (54,7%) de SP 44825 (SG) fue superior al obtenido bajo al protocolo de Hemphill et al. (1998) (42,7%), pero fue la que menos incrementó este valor de respuesta. Las que incrementaron en más de un 30% fueron Coker 312 y Guazuncho 2, que fueron las de menor respuesta negativa bajo las condiciones de medio del protocolo de Hemphill et al. (1998). Las restantes tuvieron un comportamiento intermedio.

Para los explantes que brotan y se secan luego de su permanencia en los medios de inducción de brotes, de elongación o de enraizamiento se encontraron diferencias significativas entre los genotipos evaluados. Coker 312 (23,3%) fue el genotipo en el que más explantes se secaron, diferenciándose en el otro extremo de SP 44825, que tuvo el menor porcentaje, lo que pudo haberse debido más a una fuerte respuesta negativa o menor número de brotes relativos a esta variable. Si se considera que para Coker 312, se observó brotes en 41,3% de sus explantes, bajo las condiciones de este protocolo, este valor implica que más de la mitad de estos brotes se secan y no llegan a regenerar.

Considerando una respuesta negativa global, para cada genotipo, la del comportamiento menos promisorio sorprendentemente resultó ser para este protocolo

la variedad Coker 312, ya que, en los primeros medios, su respuesta negativa alcanzó un 35,3% y dentro de los que brotaron, se secaron el 23,3%. Esto hace que el 58,6% de los explantes en este medio nunca lleguen a ser plantas, a pesar de que el porcentaje de brotes que no se contaminaron fue de 41,35%. Le siguieron en este comportamiento SP 44825 (SG), Oro Blanco 2, Guazuncho 2, Porá Ité, Porá y SP 48114 y la de menor respuesta negativa global resultó Guazuncho 3 bajo las normas de este protocolo. Esta respuesta negativa total es muy alta para todos los genotipos evaluados, pero no existen datos en la bibliografía consultada que describan estos aspectos negativos, por lo que sólo se los puede comparar entre ellos.

Esto implicaría que, si se parten de 100 explantes de Coker 312, se obtendría aproximadamente 1 explante sin crecimiento, 34 formando callos, y de los que 65 que brotan, se secarían 23, con la posibilidad adicional de que alguno de ellos se contamine.

Respuestas esperadas en el protocolo de Morre et al. (1998)

El porcentaje de brotes obtenido para cada genotipo ensayado en este protocolo, con la excepción de la variedad Porá (que se incrementó en un 4%), resultó más bajo que el obtenido bajo las condiciones del protocolo de Hemphill et al. (1998). No se encontraron diferencias significativas para esta variable. El menor porcentaje de brotes correspondió al genotipo SP 44825 (SG) y el mayor valor (único superior al 50%, sacando de la consideración los brotes que se contaminan) se observó en Porá, seguido por SP 48114 y Guazuncho 3. De todas maneras, para estos tres genotipos de mayor número de brotes, si se considera que en distintas proporciones sus explantes se secan, el valor efectivo de plantas que podrían obtenerse ronda el 40% y ninguno de los otros genotipos supera este valor. En el trabajo realizado por Morre et al. (1998), encontraron un 70% de formación de brotes en todos los tratamientos a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento probados. Ellos proponen que no sería necesario el uso de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo para iniciar la actividad meristemática, de acuerdo con lo publicado también por Gould y Magallanes-Cedeno (1998), pero sí es necesario BAP para lograr la elongación de los hipocótilos, para el desarrollo de nuevas hojas y para la reprogramación hacia la obtención de múltiples brotes, los que no son preexistentes, sino que se generan “de

novo". Estos valores no fueron observados en ninguno de los genotipos ensayados en esta tesis, sino que fueron menores.

En cuanto al porcentaje de explantes que presentaron múltiples brotes (Anexo I), Porá fue la que presentó el mayor número de explantes con múltiples brotes y el único genotipo que presentó más de 3 brotes por explante brotado (hasta 6 brotes por explante) seguida por Guazuncho 2 y Guazuncho 3, en las que se contaron hasta un máximo de 3 brotes por explante. Morre et al. (1998) encontraron que el 90% de los explantes que brotaron tuvieron múltiples brotes, mientras que en el presente trabajo encontramos el valor más alto de 25% de múltiples brotes en Porá. En este sentido, es posible que la alta concentración del regulador de crecimiento (equivalente a 13,3 μ M de BA) haya afectado los patrones de brotación, por lo menos no produjo el efecto multiplicador esperado en los genotipos considerados.

Para este protocolo, no se encontraron diferencias significativas en relación al porcentaje de raíces formadas a partir de los explantes iniciales en el medio de cultivo. Los valores máximos encontrados rondaron en el 10% de los brotes enraizados (máximo de 12,7% para Guazuncho 3). Nuevamente, si hiciéramos una inferencia usando los valores en este caso de Porá, iniciando un ensayo con 100 explantes en el protocolo de Morre et al. (1998), en los primeros repiques se perderían aproximadamente 15 explantes sin crecimiento y 18 explantes que forman callos, logrando el brote en 67 de ellos (en este caso particular con la pérdida adicional de 12,7% por contaminación). De estos últimos se perderían 12 o 13 que se secarían en el medio de cultivo y enraizarían sólo entre 8 y 9. Ya sea del grupo de los que se secan o de los que dan raíces, 13 de ellos tendrían más de un brote por explante.

En relación a la eficiencia de enraizamiento de cada genotipo, nuevamente no se encontraron diferencias significativas. De todas maneras, fue notable que la más eficiente para generar raíces fue Guazuncho 3 ya que con menos brotes logra una mayor proporción de enraizamiento, le siguen Oro Blanco 2 y SP 48114, y la que menos logró enraizar, además de tener muy bajo porcentaje de brotes fue SP 44825 (SG).

Para este protocolo, el genotipo que mejor funcionó fue Guazuncho 3 ya que presentó menor respuesta negativa total y mayor porcentaje de formación de raíces (además de más eficiente para generarlas), aunque con valores no muy prometedores. Se desprende de estos datos que, si se quisiera lograr mayor porcentaje de múltiples brotes, debería usar la variedad Porá, aunque se deberían realizar los ajustes necesarios en las condiciones de cultivo (principalmente en la concentración de BAP y con acciones tendientes a minimizar las contaminaciones) que permitan disminuir la respuesta negativa total y aumentar el porcentaje de enraizamiento.

4.1.3 Protocolo de Pathi y Tuteja (2013)

El trabajo presentado por Pathi y Tuteja (2013), planteó los mismos inconvenientes que el de Morre et al. (1998) y el de Hemphill et al. (1998), en cuanto a la obtención de plantas de algodón regeneradas *in vitro*, dependencia de genotipo, evitación del estado de callos, y por lo tanto, de variaciones somaclonales y los largos períodos insumidos para regenerar plantas completas mediante embriogénesis somática. Con base en estos argumentos proponen un protocolo que pueda sortear estos inconvenientes, y generar explantes con múltiples brotes en la variedad india Narashimha, con la observación de que los ápices embrionarios son los mejores materiales para la inducción de brotes múltiples, en comparación a hipocótilos y cotiledones que generan callos. Con este objetivo proponen el uso de dos reguladores de crecimiento. En efecto, como en los protocolos considerados anteriormente usan BAP e incorporan además kinetina (BAP y KIN a concentración de 2 mg/l), con lo cual encontraron altos porcentajes de formación de brotes (90%) y sugieren en base a sus resultados que la frecuencia en la formación de brotes estuvo influenciada por el tipo y concentración de reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo.

En este trabajo se reprodujeron las condiciones del protocolo propuesto por Pathi y Tuteja (2013) para los genotipos locales de INTA y el cultivar Coker 312, el que fue incluido por ser la variedad modelo en experiencias de regeneración mediante embriogénesis somática.

Respuesta negativa total del protocolo de Pathi y Tuteja (2013)

El porcentaje de explantes sin crecimiento en los medios de inducción de brotes del protocolo considerado mostró diferencias no significativas entre los genotipos, aunque se encontraron valores tan altos como 31% para SP 44825 (SG) y tan bajos como 4% en Coker 312, los cuales son mayores a los encontrados en el protocolo de Morre et al. (1998).

Cuando se estudió el porcentaje de callos generados en el medio de inducción de brotes para los genotipos bajo este protocolo, se encontraron diferencias no significativas. De todas maneras, si bien no diferentes entre sí, se observaron valores considerables, resultando Oro Blanco 2 la del peor comportamiento en cuanto a la producción de callos, pero no muy diferente de Porá Ité, SP 44825 (SG), Porá, Coker y Guazuncho 3 (en orden descendente salvo las dos últimas con 20%).

La respuesta negativa en el inicio de la experiencia bajo las normas del protocolo de Pathi no fue significativamente diferente entre los materiales evaluados. Sin embargo, se encontraron valores tan altos como 54,7% y 43,3% para SP 44825 (SG) y Porá Ité respectivamente y el más bajo de 10% para Guazuncho 2. Sin considerar el caso menos promisorio, si se estimara partir de 100 explantes de Porá ité, se encontraría, al final de la primera fase que entre 24 y 25 explantes se perderían formando callos y entre 18 y 19 se perderían sin crecimiento, quedando casi 60 para otras respuestas.

La situación se vuelve un poco más compleja cuando se consideran los explantes que luego de presentar brotes en los medios de inducción, se secan disminuyendo la posibilidad de lograr plantas. Si bien no hay diferencias significativas entre los genotipos evaluados, se encontraron valores de "brotes que se secan" que son tan altos como el 20,7%, visto para SP 48114 seguido de 11,3% para Porá.

Si se considera el cuadro más desfavorable, para cada genotipo incluyendo a los explantes que no crecen en el medio de cultivo, los que forman callos y los que luego de brotar se secan, se encontraría que SP 44825 (SG) fue la de mayor respuesta negativa total (54,7%), seguida de Porá Ité, Porá, Oro Blanco 2 y, SP 48114. Mientras

que la menor respuesta negativa total se encontró para Guazuncho 2 cuando se estudió la capacidad de regeneración *in vitro* bajo el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

Respuesta esperada

El porcentaje de brotes más alto encontrado para los genotipos evaluados fue para Coker 312 y Guazuncho 2 (67,3% y 64%). Además, la mayoría de los genotipos (con excepción de Porá Ité y SP 44825 (SG)) superaron el 50% de explantes brotados, siendo el genotipo SP 44825 (SG) el de menor porcentaje de brotes bajo las condiciones de este protocolo (29,3%) y el menor porcentaje observado para los tres protocolos analizados. Este bajo valor era esperable, dado que presentó un valor muy alto de respuesta negativa (31,3% sin crecimiento y 23,3% de callos, el restante 16,0% se contaminó).

Si para cada genotipo se considera el porcentaje de brotes que se secan, se disminuye notablemente el porcentaje de explantes brotados que siguen su desarrollo hacia la formación de raíces. Así, con esta consideración, ninguno de los genotipos evaluados superó el 60%, aunque este resulta mayor que los encontrados para el protocolo de Morre et al. (1998) que se discutió previamente.

Considerando el porcentaje de explantes que presentan múltiples brotes, no se obtuvieron diferencias entre los genotipos, pero los que más presentaron respuesta de más de un brote por explante fueron Guazuncho 3 y Porá, ambos con 12% de respuesta y en orden descendente le siguió Guazuncho 2 (8,0%). Además, Guazuncho 3 y Porá Ité presentaron hasta 4 brotes por explante brotado. El genotipo que menor respuesta de múltiples brotes presentó, fue SP 48114 (0,7%) y muy parecido fue el caso de SP 44825 (SG) con 1,3% (Anexo I).

En el trabajo de Pathi y Tuteja (2013) expresan que bajas concentraciones de BAP y KIN redujeron en número de brotes sobre el genotipo Narashima aunque altas concentraciones de estos reguladores combinados afecta negativamente la tasa de multiplicación, la formación de brotes y reduce el número de brotes por explante. El agregado de BAP solo, a bajas concentraciones también disminuyó el número de

brotos a 1,1 y, por el contrario, las altas concentraciones de este regulador de crecimiento (2,5 mg/l) rindió un máximo de 4,7 brotes. Por ello, proponen que la concentración de citoquininas juega un rol principal en la inducción de múltiples brotes, lo que ha sido reportado también por Banerjee et al. (2000), que promueve la regeneración de plantas, pero con brotes cortos y compactos.

En cuanto al porcentaje de raíces obtenido en relación a los explantes totales para cada genotipo, se encontró que no había diferencias entre los genotipos evaluados y estos valores en general fueron bajos. El caso más dramático se presentó para el genotipo SP48114, donde ninguno de los explantes dio respuesta de raíz a pesar de haber obtenido brotes en el 56% de sus explantes. Esto implicó que esos brotes permanecieron en los medios de cultivos de este protocolo con varios repiques, consumiendo recursos hasta que cerca del 20% de ellos se secaron y el resto que sobrevivió nunca dio raíces por lo tanto no se pudieron regenerar plantas. No fue muy diferente el caso de SP44825 (SG), con 0,7% de raíces. Por otro lado, de la variedad Guazuncho 3 se obtuvo el mayor porcentaje de plantas ya que enraizaron el 13,0% de sus explantes, seguidos por Guazuncho 2 y Oro Blanco 2, ambas con 8,0%. Pathi y Tuteja (2013) encontraron un alto porcentaje de enraizamiento por el uso de 1 mg/l de IBA, mientras que, en el presente trabajo, la permanencia en este medio promovió que los brotes regenerados se secaran luego de varios repiques.

En cuanto a la eficiencia de producción de raíces para cada genotipo, interpretada mediante el porcentaje de raíces por explantes brotados, se encontraron diferencias altamente significativas. Guazuncho 3, además de ser la que más raíces dio fue la eficiente para producirlas ya que obtuvo esta respuesta en el 40,2% de los explantes que brotaron. Muy diferente fue el caso para SP 48114, cuya consideración ya se hizo en el párrafo anterior (sin raíces), pero también se vio que no fue estadísticamente diferente de Coker 312, de SP 44825 (SG), y de Porá Ité, aunque con muy alto coeficiente de variación.

Si se quisiera aplicar este protocolo para obtener regeneración, el genotipo más indicado podría ser Guazuncho 3, ya que fue el genotipo con menor respuesta negativa total, el de mayor respuesta esperada en cuanto a raíces (plantas regeneradas) y el número de explantes con múltiples brotes. De todos modos, sería necesario ajustar las condiciones de cultivo (reguladores de crecimiento), para lograr

mayor eficiencia, ya que los valores negativos son altos y la obtención de plantas es escasa.

Si se eligiera Guazuncho 3 para reproducir el experimento bajo las condiciones del protocolo de Pathi y Tuteja (2013), en busca de un método de regeneración *in vitro*, y partiera de 100 explantes, se podría esperar tener entre 8 y 9 que no crezcan, 20 de ellos formando callos, entre 71 y 72 con brotes, de los cuales podrían secarse aproximadamente 5, y darían raíces, aproximadamente 29 (calculado a partir de la eficiencia, sin considerar los que se contaminan).

4.1.4 Comparación entre los protocolos de ápices embrionarios

Respuesta negativa total

Para el porcentaje de explantes sin crecimiento se encontraron diferencias cuando se consideró el medio y la interacción de estos medios con los distintos genotipos analizados. En el protocolo de Hemphill et al. (1998) se tuvieron los menores porcentajes de explantes sin crecimiento (2,3%), mientras que los explantes que no crecieron en los medios de Pathi y Tuteja (2013) y Morre et al. (1998) fueron, en porcentaje, muy similares entre sí, superando el 10% en ambos casos.

Si bien no se encontraron diferencias entre los genotipos, SP 44825 (SG) fue el del comportamiento menos favorable en todos los medios considerados, ya que alcanzó un valor de 17,6% en esta respuesta, mientras el resto no superó el 10% y Coker 312 sólo presentó esta respuesta en el 2%. Estos valores son importantes si se tiene en cuenta que en total se analizaron 3600 explantes (1200 en cada protocolo, 150 para cada genotipo).

Considerando la interacción estadística, medio por genotipo, fue notable que el valor más alto de explantes sin crecimiento en el protocolo de Pathi y Tuteja (2013) (cercaos al 30%) se observó para SP44825 (SG), y resultó superior al obtenido en el medio de Morre et al. (1998), (cercano al 20%) para el mismo genotipo, mientras que

éstos a su vez fueron superiores a los vistos para esta variable en el protocolo de Hemphill et al. (1998), donde fue Oro Blanco 2 el genotipo de mayor respuesta (13%).

El porcentaje de callos para los genotipos evaluados, para los medios considerados y para la interacción entre ellos se presentó con diferencias altamente significativas.

Nuevamente en el protocolo de Hemphill et al. (1998) se presentaron los menores porcentajes de producción de callos, a diferencia de los vistos en los protocolos de Morre et al. (1998) y Pathi y Tuteja (2013). Entre los genotipos considerados, para los tres medios, Guazuncho 2 fue el mejor, dado que presentó el menor valor de callos desarrollados y SP 44825 (SG) el de mayor respuesta de este tipo y, en consecuencia, el menos favorable para usar en ensayos de regeneración directa por medio de ápices embrionarios. Los demás genotipos tuvieron un comportamiento intermedio entre estos dos, aunque Porá le siguió en orden a Guazuncho 2 como segundo mejor (ambas variedades de INTA que no se comercializan en la actualidad).

Aunque bajo el protocolo de Hemphill et al. (1998) se obtuvieron los menores valores de formación de callo, para el genotipo SP44825 (SG) se produjo el mayor porcentaje de callos en comparación con los otros medios y para todos los genotipos analizados. La diferencia fundamental entre los medios de cultivo de Hemphill et al. (1998) y los otros dos es la concentración del regulador de crecimiento (BAP), siendo de mayor magnitud que en los medios de Morre et al. (1998) (3 mg/l) y Pathi y Tuteja (2013) (2 mg/l). Es posible, de este modo, que las altas concentraciones de esta hormona afecten de alguna manera el desarrollo de brotes para ese genotipo, como se pone de manifiesto en los trabajos de Hemphill et al. (1998) y Pathi y Tuteja (2013). Sin embargo, debería ser repetida la experiencia para confirmarlo (el coeficiente de variación fue de 35,3%).

La respuesta negativa mostró diferencias significativas entre los genotipos y entre los medios evaluados, pero la interacción entre ambos no fue significativa, indicando que para analizar los efectos negativos (formación de callos y explantes sin crecimiento) se puede discriminar según el medio o según la variedad. Cuando se

consideró el medio, es decir el protocolo empleado, la menor respuesta negativa fue la encontrada bajo las condiciones de Hemphill et al. (1998) con menos del 20% de este tipo de respuesta. Los protocolos de Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013), no se diferenciaron entre sí, pero sí del de Hemphill et al. (1998), con un porcentaje de respuesta negativa que supera el 30%.

Para todos los protocolos evaluados, el genotipo de peor comportamiento fue SP 44825 (SG) dado que su respuesta negativa en general fue de más del 50%, siendo el de mejor comportamiento, cuando se analizan los aspectos positivos, el genotipo Guazuncho 2, con un valor bajo de respuesta negativa de 15,8%, seguido Coker 312 (20,9%) y el resto con valores superiores al 25%.

Cuando se consideraron los explantes que brotan y luego se secan en los medios de cultivo de todos los protocolos en general no se encontraron diferencias que fueran significativas entre los genotipos, los medios y la interacción entre estos dos componentes de variación. De todas maneras, los mayores valores fueron para Coker 312, bajo el protocolo de Morre et al. (1998) y para SP 48114 en el protocolo de Pathi y Tuteja (2013).

Si se considera nuevamente una respuesta negativa total, sumando los aspectos negativos que ocurren al inicio de la experiencia (explantes sin crecimiento y explantes que forman callos) a los que ocurren a lo largo de la experiencia, se observa que el resultado más desfavorable lo presentó el genotipo SP 44825 (SG) bajo las condiciones del protocolo de Pathi y Tuteja (2013), llegando casi hasta un 65% de sus explantes con respuesta negativa final (54,7% respuesta negativa al inicio, 10% de los que brotaron se secan). Con un valor igual o superior al 50% le siguen Coker 312, Oro Blanco 2 y Guazuncho 2 bajo las condiciones del protocolo de Morre et al. (1998).

El mejor comportamiento, dado que se tuvo menor respuesta negativa total, se observó bajo los medios del protocolo de Hemphill et al. (1998) para el genotipo Guazuncho 2 con sólo 6,7% (2,0% de respuesta negativa más 4,7% que se secan) de esta respuesta, seguida en valor por Coker 312 con 10% (3,3% de respuesta negativa más 6,7% que brotan y se secan) en los medios del mismo protocolo.

Respuesta esperada

En el porcentaje de brotes no se vieron diferencias significativas si se considera el comportamiento del genotipo en cada medio (interacción), pero las diferencias son altamente significativas considerando los protocolos (medios) evaluados para todos los genotipos y considerando los genotipos.

En el protocolo de Morre et al. (1998) fue donde menos brotes se encontraron (menos del 50%) a diferencia de los protocolos de Pathi y Tuteja (2013) y de Hemphill et al. (1998), con valores superiores al 50% (sacando de la consideración aquellos que se contaminan). Esta consideración se realizó sobre una base de 150 explantes para cada genotipo y 8 genotipos por medio considerado.

Entre los genotipos vistos, el porcentaje más alto de explantes con brotes fue observado para Guazuncho 2 con más del 60% (con un valor cercano al 20% de contaminación), para los tres protocolos en general, distinguiéndose del resto y fundamentalmente de SP 44825 (SG) con un 35,8% (con 13,5% de explantes contaminados). Los demás genotipos tuvieron un comportamiento intermedio, con Coker 312 y SP 48114 (SG).

En cuanto al porcentaje de raíz, se encontró un comportamiento diferente, dependiendo del protocolo usado. En los medios propuestos por Hemphill et al. (1998) se obtuvieron mayores porcentajes de enraizamiento en relación a los explantes iniciales. Éstos superaron en magnitud en más del 20% a los obtenidos tanto en los protocolos propuestos por Pathi y Tuteja (2013) como por Morre et al. (1998), para todos los genotipos en conjunto.

En los genotipos, para los tres protocolos en conjunto, el mejor desempeño fue de Guazuncho 2 y Coker 312, con valores cercanos al 20%, mientras que en el otro extremo se distinguió SP 44825 (SG), con sólo un 4% de enraizamiento (sobre un total de 450 explantes para cada genotipo).

De la comparación entre medios y genotipos se distingue el porcentaje de enraizamiento de los genotipos destacados en el párrafo anterior, bajo las normas del protocolo de Hemphill et al. (1998) (Coker 312 con 49,3% y Guazuncho 2 con 46,7%, es decir, casi la mitad de los explantes ensayados bajo las condiciones de este protocolo brotan y enraízan). Estos genotipos se distinguieron en una forma altamente significativa de SP 44825 (SG), tanto en el medio de Morre et al. (1998) como en el de Pathi y Tuteja (2013).

El genotipo Coker 312 fue el más eficiente para generar las raíces bajo el protocolo de Hemphill et al. (1998), dado que enraizó en el 81% de los explantes brotados. Este comportamiento no fue diferente del observado en Porá Ité, Porá y Guazuncho 2 (con porcentajes superiores a 70 bajo los medios del mismo protocolo).

Si se necesitara seleccionar uno de los protocolos de regeneración por organogénesis para acoplar a un sistema de transformación por biobalística o usando *Agrobacterium tumefaciens*, según los resultados obtenidos sería elegido el protocolo de Hemphill et al. (1998), ya que en éste se obtuvieron los menores porcentajes de respuesta negativa total y los mejores valores para el porcentaje de brotes y de enraizamiento. Si la misma elección quisiera hacerse entre los genotipos evaluados, para este protocolo se debería elegir entre los cultivares Coker 312 y Guazuncho 2 que tuvieron el menor porcentaje de respuesta negativa y la mejor respuesta de enraizamiento (por lo tanto, de obtención de plantas regeneradas). Coker 312 está en desventaja ante Guazuncho 2 dado que este último es un genotipo mejorado, adaptado a la zona y si bien hoy no se comercializa, fue de amplia adopción por parte de los productores algodoneros en Argentina. Pero si la respuesta necesaria fuera la obtención de múltiples brotes, se debería considerar a los genotipos Porá y Guazuncho 3 (Anexo I), pero sería oportuno realizar un ajuste en el tipo y la concentración de BAP a utilizar, estando este valor entre 0,3 μM usado en Hemphill et al. (1998) y el equivalente a 8,87 μM (2,0 mg/l) usado en Pathi y Tuteja (2013).

Como se mencionó para cada protocolo, los mismos fueron desarrollados como métodos de regeneración directa, en principio independientes del genotipo pero, según los resultados obtenidos en este trabajo, diferentes genotipos de INTA y Coker 312 fueron evaluados dieron respuestas diferentes, según los medios considerados, lo que

pone en discusión la independencia del genotipo para la respuesta a la regeneración directa que se plantea con este tipo de protocolos.

Consideraciones finales

Las variables negativas no están incluídas en otros trabajos publicados (al menos no de forma expresa sino como una diferencia), por lo que, si bien no se tienen puntos de referencia, resultó interesante incluirlas como un criterio más de elección entre materiales genéticos que se quieren mejorar. La variable porcentaje de explantes sin crecimiento, representa tanto a los explantes que no crecen por condiciones intrínsecas al estado de las semillas usadas como así también por condiciones asociadas a la obtención y manipulación de los explantes. Por ello, no sería difícil de mejorar este factor, realizando acciones tendientes a minimizar los problemas asociados y es posible que esta sea la causa de la gran variabilidad observada.

Rauf et al. (2005) usaron como variable la eficiencia de regeneración de los explantes, indicando que el tipo de explante tiene influencia en su habilidad de regenerar y, además, la inducción de múltiples brotes es afectada por la concentración de citoquininas. Ozyigit et al. (2007), trabajando sobre la variedad de algodón Nazilli 84S, encontraron que sus resultados estaban correlacionados con el material vegetal como ser fuente de explante, edad o genotipo y, con las condiciones de cultivo, como ser reguladores de crecimiento, composición del medio u otras condiciones físicas. En este trabajo de tesis, comparando la eficiencia de regeneración para el mismo tipo de explante, con la misma edad, usando las mismas condiciones de cultivo, puede atribuirse la diferencia en los resultados obtenidos al genotipo y la concentración y el tipo de citoquininas del medio.

La diferencia fundamental entre los medios de los protocolos considerados fue la concentración del regulador de crecimiento bencil aminopurina y en Pathi y Tuteja (2013) se agregó además de ésta, kinetina. Pathi y Tuteja, proponen en su trabajo de 2013 que el tipo y la concentración de los reguladores de crecimiento afectan la frecuencia de formación de brotes. Pereira Campos Caramori et al. (2001) usaron tidiazurón (TDZ) para promover la inducción de múltiples brotes en meristemas y

ápices caulinares de genotipos IAC 22 y Coker 312 a concentraciones de 0,02 μM para meristemas y 0,5 μM para ápices. Ellos encontraron una tasa de supervivencia alta, variando entre el 95% y 100%. Además, el cultivar IAC 22 respondió más que el cultivar Coker 312 y la cantidad de callos formados se incrementó con el aumento en la concentración de TDZ. El mismo resultado fue encontrado por Satyavathi (2002) cuando desarrolló un protocolo de transformación genética de este tipo de explantes para tres variedades de algodón de India, logrando la regeneración usando bencilaminopurina (0.1 mg/l) en combinación con ANA (0.1 mg/l). Este regulador de crecimiento también inhibió la formación de raíces. En el trabajo publicado por Divya et al. (2008) se describe un método eficiente, rápido e independiente del genotipo para la regeneración directa por organogénesis de explantes de hipocótilos donde usan TDZ y ANA como los reguladores de crecimiento con mejor respuesta y, además, indican que la edad de plántulas de donde provienen los explantes tiene influencia considerable sobre la frecuencia de regeneración. Estas consideraciones suman a la realizada anteriormente en cuanto a la obtención de distintos resultados variando el genotipo o la composición del medio de cultivo.

Morre et al. (1998) mencionan el hecho de que, si bien el regulador de crecimiento BAP reprograma el desarrollo de ápices y la formación de múltiples brotes, inicia una inhibición del desarrollo de esos brotes y de su elongación, fenómeno que también fue observado en soja (Flick, 1983). Si bien no se registró como variable el alto de los brotes, el tiempo de permanencia en el medio conteniendo BAP no afectó de manera apreciable el tamaño de los mismos, aunque sí fue notoria la influencia sobre la promoción de múltiples brotes para los genotipos considerados.

Asimismo, los requerimientos de diferentes reguladores de crecimiento para la iniciación de callos desde diversos explantes en distintos genotipos puede ser debido a niveles endógenos de hormonas en los explantes (Triparthy and Reddy, 2002).

Bazargani et al. (2011), si bien usan ápices caulinares de las variedades comerciales Sahel y Varamin, no encontraron respuesta de múltiples brotes a ninguna concentración de bencil aminopurina y concentraciones altas de este regulador de crecimiento resultaron en la formación de callos. Satyavathi et al. (2002) usaron ápices embrionarios de algodón de las variedades Coker 310FR, MCU5 y DCH32 y observaron que la regeneración de los brotes ocurrió por medio de la proliferación

adventicia de la porción axilar de los cotiledones, así como del ápice caulinar cuando el medio se suplementó con 0,1 mg/l de BAP y 0,1 mg/l de ANA. Además, notaron que al posicionar los ápices caulinares verticalmente se producía un solo brote, mientras que los que se ubicaron acostados sobre el medio de cultivo produjeron brotes adventicios. En el presente trabajo, los ápices embrionarios se colocaron al inicio, en el medio de inducción de brotes de manera horizontal hasta el primer repique, luego de lo cual, los explantes brotados se pasaron a posición vertical para todos los protocolos ensayados, encontrando múltiples brotes en los de Morre et al. (1998) y de Pathi y Tuteja (2013), mientras que no se observaron múltiples brotes (salvo en uno de los 1200 explantes) bajo las condiciones de medios de Hemphill et al. (1998).

Se cree que es en realidad el balance entre los reguladores de crecimiento el verdadero factor clave en la regulación de la respuesta morfogénica de los explantes (Satyavathi et al. 2002). El balance y la relación de reguladores de crecimiento presentes es lo que ayuda a influenciar las reacciones en las plantas. El balance normal posiblemente regule las reacciones enzimáticas en las plantas amplificándolas, conduciendo a los resultados necesarios para el crecimiento. El balance de los reguladores de crecimiento es aparentemente más importante que la concentración absoluta de alguno de ellos. La división y expansión celular ocurren en el tejido que se divide activamente, por lo tanto, el balance de auxinas y citoquinas juega un rol crucial en el crecimiento global de los tejidos vegetales (Bazargani et al. 2011).

Por otro lado, se ha propuesto que no es necesario el uso de reguladores de crecimiento para el desarrollo de brotes (Gould y Magallanes-Cedeno, 1998), de hecho, la baja concentración usada bajo el protocolo de Hemphill et al. (1998) produciendo en general los valores más altos podría ser un indicativo de este efecto en los genotipos evaluados. En el trabajo de Hemphill et al. (1998) se realizaron experiencias sobre Stoneville 7A y Paymaster HS26, que sugirieron que la concentración de 0,3 μM de BAP agregada al medio de cultivo promueve la formación de brotes (en mayor proporción sobre yemas axilares que en ápices), mientras que concentraciones más altas (3,0 μM o mayores) la suprimen, en un período de tres semanas de cultivo. Además, mencionan el hecho de que, en comparación, cuando usaron su propio sistema de regeneración sobre ápices embrionarios no encontraron requerimientos de citoquininas para la formación de brotes elongados. Como en este trabajo no se contrastó con un medio sin reguladores de crecimiento, sería necesario

realizar experimentos adicionales para obtener una concentración óptima con los mejores genotipos, a la cual los explantes broten y promuevan la formación de múltiples brotes o confirmar si puede eliminarse del medio el regulador de crecimiento cuando se usa este tipo de explantes.

4.2 Ensayos de regeneración sobre ápices caulinares yemas axilares

El significado de la propagación clonal de plantas maduras radica en poder multiplicar rápidamente las plantas seleccionadas de acuerdo a características fenotípicas o genotípicas (Hazra et al. 2001).

Basados en que el hecho de que el cultivo de ápices caulinares es un método más fácil para obtener plantas regeneradas, comparado al cultivo de células somáticas y además se puede evitar la incidencia de mutaciones somaclonales, Bazargani et al. (2011) proponen un protocolo rápido para la micropropagación sobre los cultivares de algodón Sahel y Varamin, que utiliza tales explantes empleando ANA y BAP a concentración de 0,1 mg/l en el medio de inducción. Bajo estas condiciones logran obtener el mayor número de brotes por explante. De igual manera, Gould y Magallanes-Cedeno (1998) proponen el uso del mismo tipo de explante pero usando KIN como regulador del crecimiento (a concentración de 0,1 mg/l) promoviendo la transformación genética mediada por *Agrobacterium thumefaciens*.

En el presente trabajo de tesis no pudieron regenerarse plantas en los genotipos evaluados, cuando se reprodujeron las condiciones de los protocolos citados anteriormente sobre explantes de ápices caulinares.

Asimismo, cuando se ensayaron yemas axilares sobre los medios reproducidos desde el protocolo de Agrawal et al. (1997) (usando BAP y KIN a concentración de 2,5 mg/l) no se observó la aparición de brotes.

Hemphill et al. (1998), trabajando sobre explantes de yemas axilares de hojas y cotiledones de Stoneville 7A y Paymaster HS26 observaron que la brotación sobre

medios conteniendo 0,3 ó 0,5 μM de BAP era mejor que para los ápices embrionarios mientras que los mismos explantes extraídos de plantas de 28 días necesitaron 1,0 μM de BAP. Ellos proponen que estos resultados son indicativos de que los meristemas de las diferentes fuentes de explantes parecen poseer diferentes grados de dormancia debido a la dominancia apical y a la localización del meristema. En este trabajo, los explantes tanto de ápices caulinares como los de yemas axilares fueron extraídos de plántulas de 7 días, crecidas en condiciones asépticas para todos los genotipos estudiados, por lo que es posible que el estado de dormancia y localización de los meristemas no sea un factor determinante de los resultados obtenidos.

Gupta et al. (1997) y Saeed et al. (1997) indicaron que la edad de los explantes tiene una influencia importante en el éxito de la micropropagación del algodón. Agrawal (1997) indica que la diferencia en el desarrollo de brotes visto sobre el cultivar Anjali-LRK 516, estuvo determinado por la edad del explante lo que podría deberse a la dormancia apical, tal como encontraron Jackson y Hobbs (1990) en *Pisum sativum*. En la experiencia realizada por Ouma et al., (2004) se determinó que la edad de los explantes de ápices y yemas axilares cotiledonares de cultivares Stonville 747 y Delta Pine 50 influía sobre la formación de raíces, siendo mayor en explantes de más de 14 días. Consideran que es de importancia también el tamaño de explante y el estado de las plantas donantes de los mismos. Estos autores postulan que, dado que el sitio de biosíntesis de las auxinas está localizado en tejido joven que crece activamente, existe la posibilidad de que los explantes de ápices puedan influenciar la cantidad de auxina endógena sintetizada y junto a las auxinas aplicadas exógenamente se alcanzaría un nivel umbral para la inducción de raíces principales y la iniciación de raíces adventicias.

Este puede ser un motivo por el cual no se observaron explantes brotados en los medios propuestos para yemas axilares de los genotipos de algodón de INTA ni de la variedad Coker 312, más aún si se considera que Agrawal (1997) consiguió los mejores resultados cuando los explantes provenían de plántulas de 35 días. De todas maneras, Ibrahim et al. (2008), encontraron una eficiente regeneración usando explantes de plántulas de 7 días provenientes de los cultivares Nazili 84S y Cukurova 1518 cuando los medios fueron suplementados con ANA y KIN.

Hazra et al. (2001) encontraron la brotación e inducción de múltiples brotes a la concentración óptima de 2,22 μM de BAP, cuando usaron yemas axilares de plantas maduras como explantes del cultivar DCH-32. Observaron también que concentraciones mayores de este regulador de crecimiento inhibían tanto la formación de brotes como el número brotes por explante. El protocolo de Agrawal et al. (1997), usado en esta tesis, para promover la formación de brotes en yemas axilares, lleva concentraciones mayores de BAP (2,5 mg/l, equivalente a 11,01 μM) y es una consideración importante para hacer sobre estos explantes que no brotaron durante la experiencia.

Nandeshwar et al. (2002) usaron explantes de nudos cotiledonarios en medio de cultivo con BAP y KIN (2:1 mg/l), lo que resultó en la formación de una masa de incontables brotes que regeneraron en forma directa sin la formación de callos, aunque no encontraron diferencias estadísticas significativas en los cultivares en el número de brotes por explante. En medios suplementados con las mismas concentraciones de hormonas de crecimiento, Rocha et al. (2008) lograron promover una gran capacidad regenerativa, así como mayor tamaño de brotes cuando partían de nudos cotiledonares de plántulas de 25 días como explante.

En relación a la concentración y tipo de regulador de crecimiento, ya sea que usara 2,5 o 0,1 mg/l de ANA o BAP, o por el uso de 0,1 mg/l de KIN, no se tuvieron las mismas repuestas que en los trabajos mencionados en cuanto a la obtención de brotes, por lo que podría pensarse que quizá pueda deberse la respuesta a una dependencia del genotipo que difieren con los ensayados en esta tesis.

Si bien no se menciona en los resultados, la obtención de plantas libres de contaminación fue un problema significativo y requirió de varias repeticiones para obtener los resultados vistos.

4.3 Estrés abiótico

La producción y productividad de los cultivos sigue siendo afectada negativamente debido a varios estreses bióticos y abióticos. Los daños causados por estos estreses son los responsables de enormes pérdidas económicas en todo el mundo. Las tecnologías de mejoramiento convencional y las estrategias de manejo apropiado continúan jugando un rol vital en el mejoramiento de los cultivos. Los programas de mejoramiento genético convencional siguen siendo empleados para introducir genes de interés por cruzamientos entre géneros y especies para inducir la tolerancia. Sin embargo, para algunas características los métodos convencionales tienen poco éxito y han fallado en proveer los resultados deseados (Purohit et al., 1998).

En el algodón, el control genético de la tolerancia al estrés abiótico es muy complejo y está influido por factores ambientales, variando su influencia en intensidad según la etapa del desarrollo de la planta (ICAC, 2014).

Uno de los métodos más comúnmente usados para determinar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico es la evaluación de la capacidad de germinación bajo tales condiciones (Larcher, 2000).

4.3.1 Estrés salino

La salinidad afecta el crecimiento y producción de los cultivos al reducir el potencial hídrico de la solución del suelo, disminuyendo así la disponibilidad de agua, y al crear un desequilibrio nutritivo dada la elevada concentración de elementos (iones sodio y cloruro) que pueden interferir con la nutrición mineral y el metabolismo celular. En consecuencia, los diversos efectos observados a distinta escala, desde reducción de turgencia y crecimiento hasta la pérdida de la estructura celular por desorganización de membranas e inhibición de la actividad enzimática, son el producto combinado de estrés hídrico, toxicidad iónica y desequilibrio nutricional (Leidi y Pardo, 2002).

Los problemas de salinidad aparecen cuando se encuentran sales solubles en el suelo en cantidades que afectan a la productividad, que provienen de los minerales primarios del suelo o del agua de riego (proceso que se denomina salinización secundaria). La presencia de suelos salinos y/o alcalinos es un problema común en las provincias de Chaco y Formosa, que se agrava hacia el oeste a medida que disminuyen las precipitaciones. En áreas agrícolas pueden encontrarse formando manchones intercalados con suelos normales a menudo altamente productivos; el problema adquiere mayor importancia cuando se presentan en superficies extensas, afectando suelos de aptitud agrícola, ganadera o forestal (Zurita, 2008). El interés por mejorar la tolerancia de los cultivos a la salinidad, ha ido creciendo en los últimos años, empleando métodos de mejora y selección tradicionales o producción de organismos genéticamente modificados.

Sabiendo que el algodón es un cultivo relativamente tolerante, en este trabajo se propuso evaluar la respuesta de las variedades comerciales de algodón de INTA, usando semillas y promoviendo el desarrollo de callos en medios de cultivo conteniendo distintas concentraciones de cloruro de sodio para ser tenido en cuenta como criterio de elección de materiales del programa de mejoramiento genético. Si bien es común usar la germinación como criterio de selección bajo condiciones de estrés (Larcher 2002), en este trabajo se desarrolló esta metodología bajo condiciones *in vitro*, con el objetivo de controlar las variaciones en la concentración de componentes del medio y la temperatura. Además, se eliminó la cubierta de las semillas, para evitar contaminaciones.

La consecuencia principal del estrés inducido por cloruro de sodio es la disminución del agua intracelular. Para prevenir esta pérdida de agua de las células y proteger las proteínas celulares, las plantas acumulan varios metabolitos que son conocidos como “solutos compatibles” u osmolitos (Breesan et al., 1998). La acumulación de estos osmolitos facilita el ajuste osmótico (Louis y Galiski, 1997).

Ashraf y Harris (2004), concluyen que no hay indicadores bien definidos para la tolerancia a la salinidad que puedan ser usados de forma práctica en los programas de mejoramiento genético para un gran número de cultivos agrícolas. Además, afirman que, durante el desarrollo vegetal, la forma y función de los órganos cambia

considerablemente y la habilidad de las plantas para reaccionar frente al estrés salino depende de los genes que se están expresando al estado del desarrollo durante el cual es impuesto el estrés.

Munns (2002) advierte que es sorprendentemente difícil cuantificar diferencias en tolerancia entre especies relacionadas ya que la reducción en el crecimiento depende del período de tiempo en el cual las plantas crecen bajo condiciones salinas.

En el algodón, la tolerancia al estrés salino parece estar más relacionada a una compartimentalización efectiva del ion sodio en las células que a una alta selectividad o exclusión a nivel radical y no existen marcadores fisiológicos definidos (Cuartero et al., 1992; Leidi y Gorham, 1998; Romero-Aranda et al., 2001). La habilidad para compartimentalizar el sodio puede resultar, en parte, de la estimulación de la bomba de protones presentes en las membranas plasmáticas (PM-ATPasa) y vacuolares (V-ATPasa). Howard et al. (1997) estudiaron el efecto de estas bombas de protones sobre plántulas de una línea de algodón sensible no encontrando respuestas con el agregado de sodio, sugiriendo que serían insuficientes para regular el sodio intracelular.

El crecimiento apical de las plantas de algodón se ve generalmente afectado por las condiciones salinas del medio. Sin embargo, el crecimiento de la raíz y de los ápices de líneas genótipicamente diferentes muestran respuesta diferencial al estrés salino (Gorham et al., 2010).

Vamadevaiah et al. (2003) realizaron un estudio *in vitro* sobre meristemas apicales de algodón provenientes de 35 líneas para investigar la tolerancia a sales tales como cloruro de sodio, sulfato de magnesio, carbonato de sodio y cloruro de calcio. Basaron su trabajo sobre la afirmación de que la búsqueda de tolerancia a salinidad bajo condiciones naturales es difícil debido a que no se puede tener uniformidad en las sales que afectan los cultivos a campo, además de que insume tiempo y labor intensiva.

En el presente trabajo, cuando se ensayaron semillas de algodón sobre los medios de cultivo suplementados con cloruro de sodio, considerando a todos los

genotipos, se vio que el porcentaje de germinación era mayor en los medios menos concentrados y disminuía a medida que la concentración aumentaba. Esto está de acuerdo con el conocimiento previo sobre la influencia negativa que tiene el aumento de salinidad sobre el desarrollo vegetal y además, confirma que las condiciones de promoción de ese estrés en este trabajo, desencadenaron el efecto esperado en las plántulas de algodón. En general, el porcentaje promedio de germinación de las semillas fue del 75% en los medios sin estresar, llegando a un valor mínimo de 19,4% cuando la concentración alcanzó los 200 mM de cloruro de sodio.

Guazuncho 2 y Porá fueron las que presentaron los mayores porcentajes de germinación en todos los medios en comparación con los demás genotipos considerados, pero a las concentraciones de 100 y 200 mM de cloruro de sodio, Porá mostró un porcentaje de germinación superior al resto. Este último resultado concuerda con el encontrado por Meloni et al. (2003), quienes proponen que Porá es un cultivar que exhibe mayor tolerancia a sales teniendo una actividad enzimática antioxidante mayor que Guazuncho 2.

En general, entre el medio sin estresar y el medio que contenía el valor más bajo de cloruro de sodio (50 mM), la disminución en el porcentaje de germinación fue leve, lo que quizá podría indicar un nivel de tolerancia basal para todos los genotipos de algodón. Mientras que a la más alta concentración de cloruro de sodio evaluada (200 mM) todas las variedades experimentaron una gran disminución del porcentaje de germinación y la diferencia entre genotipos se vuelve menos evidente.

A la concentración de 100 mM de cloruro de sodio, la disminución en el porcentaje fue más importante, comparado con el medio sin sustancias estresantes agregadas. La menos afectada fue Porá que redujo el porcentaje de germinación en 12%, de característica intermedia fue el comportamiento de SP 48114 (24% de reducción), Guazuncho 3 (26% de reducción) y Porá Ité (27,3%) y en el otro extremo se ubicaron Oro Blanco 2 con un 48% de reducción y Guazuncho 2 con 30%. A esta concentración de la sustancia estresante, las diferencias en el porcentaje de germinación fueron más notorias entre los distintos genotipos. Esta diferencia no fue tan clara en las otras concentraciones.

Meloni et al. (2003) estudiaron la fotosíntesis y actividad de las enzimas superóxido dismutasa, peroxidasa y glutathion reductasa en cultivares Guazuncho 2 y Porá bajo condiciones de estrés salino en plantas de 21 días. Estas enzimas son las encargadas de remover las especies reactivas del oxígeno producidas cuando las plantas están sujetas a estrés abiótico. Además, determinaron las concentraciones de malonildialdehído el cual es un indicador del daño en las membranas. Concluyeron que Porá es un cultivar que exhibe un valor más alto de tolerancia a salinidad debido a que logró un nivel superior en la actividad de las enzimas antioxidantes en comparación con Guazuncho 2, quien además presentó valores mayores de malonildialdehído. Ellos atribuyen las distintas respuestas en la actividad enzimática al estrés oxidativo, que podría ser un factor influyente en el estrés ambiental ejercido sobre el algodón, lo cual incrementa la actividad enzimática en Porá, pero permanece inalterable en Guazuncho 2. Estos resultados son acordes a los obtenidos en este trabajo para los tratamientos usando 100 mM de cloruro de sodio.

A la concentración de 200 mM de cloruro de sodio la reducción en el porcentaje de germinación fue notable en todos los genotipos, aunque Guazuncho 2 resultó más afectada (pasando de 94,7% de germinación en el medio sin estresar a 28,0% en el estresado, es decir, 66,7% de disminución). Este resultado concuerda con los obtenidos por Meloni et al. (2003) comentados más arriba. Oro Blanco 2 le siguió en magnitud decreciente (64,0%) y resultó la de menor porcentaje de germinación a la concentración de 200 mM de cloruro de sodio, seguido en disminución por SP 48114 (58,7%), Guazuncho 3 (54,7%), Porá (52,0%) y Porá Ité (37,3%). A la misma concentración de cloruro de sodio, Tiwari et al. (2013) detectaron diferencias significativas entre genotipos derivados del cruzamiento entre algodón Upland (*G. hirsutum*) por algodón Pima (*G. barbadense*) al estado de plántula (142 líneas) para todas las variables medidas comparadas con un control sin estresar. Propusieron que, según sus resultados, la tolerancia al cloruro de sodio durante el crecimiento, al estado de plántulas es un carácter moderadamente heredable y que las variaciones ambientales juegan un rol igualmente importante.

Garrat et al. (2002) investigaron el estatus de los componentes antioxidantes en algodón (*G. herbaceum*) encontrando que la respuesta en cultivos bajo suspensión celular era claramente dependiente del genotipo. Si bien los materiales usados en este

trabajo difieren de los empleados por Garrar et al. (2002), puede considerarse aquí que la respuesta observada es también dependiente del genotipo evaluado.

El mejoramiento de la tolerancia de los cultivos a múltiples factores de estrés depende de la existencia de variación genética dentro del pool de genes de la especie de interés. En este sentido, la variación inter e intraespecífica para tolerar la salinidad en el algodón sugiere que las variedades de este cultivo difieren considerablemente en su respuesta al estrés salino (Gorham et al., 2010). Tal variación puede ser de considerable valor práctico para aumentar la tolerancia a la salinidad mediante cruzamientos y selección siempre y cuando la mayor parte de esta variación sea genéticamente aditiva (Ashraf, 2002). Cualquier estrategia de cruzamiento para tolerancia a la salinidad depende de la una adecuada variabilidad del carácter (Flowers, 2004).

Si bien guazuncho 2 presentó el mayor porcentaje de reducción bajo condiciones fuertes de estrés (200 mM de cloruro de sodio), Oro Blanco 2 resultó la más sensible, entre los genotipos considerados, ya que presentó una reducción importante en su porcentaje de germinación a las concentraciones tanto de 50 y 100 mM de cloruro de sodio (estrés moderado), como a la de 200 mM (fuerte condición de estrés).

4.3.2 Estrés hídrico

El algodón (*Gossypium hirsutum*) es un cultivo relativamente tolerante al estrés hídrico, pero varios estreses pueden disminuir significativamente la producción el desarrollo de la planta (Lv et al., 2007). Además, la respuesta al estrés hídrico varía entre los cultivares y con la fase del desarrollo de las plantas. Durante la fase de germinación, el agua absorbida es requerida para las reacciones enzimáticas para la solubilización y el transporte de metabolitos y como reactivo en la digestión hídrica de proteínas, carbohidratos y lípidos desde los tejidos de reserva de la semilla hacia el embrión (Woodstock, 1998; Khajeh-Hosseini et al., 2003).

Además, bajos niveles de humedad en el ambiente de germinación, inducen mecanismos de protección contra sequía y frenan preventivamente los procesos del desarrollo (Bewley y Oliver, 1992).

La producción y productividad de los cultivos se ve afectada por estreses bióticos y abióticos. Los daños causados por estos estreses son responsables de enormes pérdidas en todo el mundo. Las tecnologías de mejoramiento tradicional y las estrategias de manejo apropiadas siguen jugando un rol vital en el mejoramiento de los cultivos. Los programas de mejoramiento convencional están siendo empleados para integrar genes favorables de interés en cruzamientos entre géneros y especies en los cultivos para inducir tolerancia (Rai et al., 2011).

El crecimiento y la productividad de las plantas cultivadas, depende ampliamente de su vulnerabilidad a estreses ambientales. El déficit hídrico es la restricción principal que limita la producción agrícola (Boyer, 1982).

El estrés hídrico puede alcanzarse como resultado de dos condiciones, debido a un exceso o un déficit de agua. El estrés más común es por déficit de agua y es conocido como estrés por sequía. La remoción del agua de las membranas afecta el normal funcionamiento de la estructura de la bicapa lipídica y resulta en la conversión de la membrana en excepcionalmente porosa cuando se diseca. En adición al daño en la membrana, las proteínas citosólicas y de las organelas pueden exhibir una actividad reducida o pueden aún desnaturalizarse por completo cuando se deshidratan. La alta concentración de electrolitos debido a la deshidratación del protoplasma puede cambiar también la interrupción del metabolismo celular (Liu y Zhu, 1998).

Si bien las distintas especies vegetales varían en su sensibilidad y respuesta a la disminución del potencial hídrico causado por la sequía, todas las plantas tienen la información genética necesaria para percibir y responder frente a situaciones de estrés hídrico (Bonhert et al., 1995; Bonhert y Sheveleva, 1998).

Como ya se mencionó anteriormente, uno de los métodos usados más comúnmente para determinar la tolerancia de las plantas a los estreses abióticos es la evaluación de la capacidad de germinación de las semillas bajo tales condiciones

(Larcher, 2000). Para simular las condiciones de estrés en el laboratorio, los estudios de germinación han sido llevados a cabo en algunos trabajos con soluciones acuosas de Polietilenglicol 6000 (PEG 6000) y manitol (Murillo-Amador et al., 2002; Costa et al., 2004; Fanti y Perez, 2004; Parkhi et al. 2009; Manoj et al., 2011).

En este trabajo se emplearon sustancias estresantes como sorbitol y manitol, agregadas en el medio de cultivo de Murashige y Skoog en concentraciones de 0; 20 y 80 mM, para estudiar la germinación de las semillas bajo estrés. El objetivo fue evaluar la respuesta in vitro de los materiales de INTA bajo condiciones de estrés hídrico.

Como se esperaba, la germinación fue mayor en los medios sin las sustancias estresantes adicionadas, en comparación con los cuatro medios restantes (suplementados con manitol y sorbitol). Los medios conteniendo 20 mM de manitol, 80 mM de manitol y 20 mM de sorbitol, no se diferenciaron entre sí en cuanto al porcentaje de germinación para los genotipos evaluados, aunque si lo hicieron con el medio sin estresar (MS) y con 80 mM de sorbitol (Figura 53, Anexo II). En este último, el porcentaje de germinación resultó diferente del porcentaje obtenido en los demás medios, y se evidenció una disminución importante en esta variable. Este resultado sugiere que el sorbitol, a la concentración de 80 mM, podría ser usado como un único indicador de diferencias en la capacidad de germinación para diferentes genotipos de algodón, en relación a un control sin estresar.

En los resultados obtenidos, para todos los medios analizados, fue notable que Guazuncho 2 presentó el mayor porcentaje de germinación, superando un 80%, mientras que Guazuncho 3 fue el de menor porcentaje, sin lograr el 50% (Figura 54, Anexo II). Porá, Porá Ité y Oro Blanco 2 tuvieron un comportamiento intermedio con más del 50% de germinación y menos de 60%.

Gadelha Manese (2011) exploró la germinación de las semillas de algodón bajo condiciones de estrés inducido por polietilenglicol 6000 indicando que se retrasaba la germinación a medida que se incrementaban los niveles de estrés, probablemente debido a una disminución en el movimiento y accesibilidad del agua para la imbibición de las semillas. Además, se indicó que en las semillas de las cuatro variedades

usadas en ese estudio (*G. hirsutum* var. *latifolium*) presentaban buena calidad fisiológica dado que el promedio de germinación fue del 75%.

Considerando la germinación de cada variedad en los medios sin sustancia estresante agregada, la única variedad que presenta un valor superior a 75% de germinación es Guazuncho 2, mientras que Porá y Porá Ité superan el 70% de germinación y Oro Blanco 2 y Guazuncho 3, apenas logran un 62%.

Dado que el análisis de la interacción para los medios y genotipos considerados dió diferencias significativas, se realizó por separado un análisis de la varianza para detectar el comportamiento de cada genotipo en los cuatro medios con sustancias estresantes y un medio sin el agregado de las mismas.

La variedad Guazuncho 2 no fue afectada en su porcentaje de germinación (diferencias no significativas), ya que éste varió de un mínimo de 76,7% encontrado en 80 mM de manitol y un máximo de 90% para 20 mM de sorbitol, lo que puede interpretarse de dos maneras. Por un lado, es posible que el manitol sea para esta variedad la verdadera sustancia discriminante para la tolerancia (a otro valor de concentración) en esta fase del desarrollo de la planta, o bien, que el no deterioro de sus semillas sea suficiente para no sufrir el estrés provocado por las sustancias agregadas al medio en el estado de germinación. Bourland e Ibrahim (1982) demostraron que existe una variación en el deterioro de las semillas entre los distintos cultivares de algodón, además, esta característica es heredable (Furbek et al., 1993).

En el genotipo Guazuncho 3 se encontraron diferencias significativas para el porcentaje de germinación según el medio donde se desarrollan. Cuando no hay sustancias estresantes en el medio, germina en mayor proporción que cuando las mismas están presentes. Además, la disminución en la germinación es más importante (de 62% en MS a 34%) con 80 mM de sorbitol, como sucedió para todas las variedades estudiadas.

Porá también presentó diferencias altamente significativas cuando se puso a germinar sus semillas en los distintos medios, con y sin el agregado de sorbitol y manitol. A diferencia de Guazuncho 2 y Guazuncho 3, el mayor porcentaje de

germinación no se presentó en el medio libre de sustancias estresantes sino en 80 mM de Manitol (si bien no se diferenció significativamente entre estas dos condiciones). El menor valor se presentó en la germinación en el medio con 80 mM de sorbitol, coincidiendo con el análisis de comparación de medios, observándose un porcentaje de germinación intermedio en 20 mM de manitol y 20 mM de sorbitol. Aquí nuevamente se presenta el medio de 80 mM como discriminante para el porcentaje de germinación de semillas de algodón con y sin sustancia estresante agregada.

Cuando se realizó el análisis de la varianza para el porcentaje de germinación en los medios con y sin sustancias estresantes agregadas, para Porá Ité, no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, el comportamiento fue similar a Guazuncho 2 y Guazuncho 3 con un mínimo porcentaje observado en el medio de 80 mM de sorbitol y un máximo para el medio sin sorbitol ni manitol. De todas maneras, es notable para esta variedad que en el medio con 80 mM de manitol presenta un valor cercano al medio sin estresar (al igual que Porá en mismo medio) mientras que en 20 manitol y 20 sorbitol lo presentan casi al mismo nivel del medio conteniendo 80 mM de sorbitol.

Oro Blanco 2 tampoco fue afectada por el medio de cultivo para germinar (diferencias no significativas). Con valores de porcentaje de germinación muy parecidos para los medios sin sustancias estresantes y con 20 mM de manitol y 20 mM de sorbitol (cercasas al 60%), mientras que las concentraciones más altas de manitol y sorbitol (80 mM) produjeron una disminución de valores cercanos a 60% a valores cercanos a 40%. Si bien no se detectaron diferencias significativas, la variedad mostró ser lo suficientemente sensible como para reducir el porcentaje de germinación con el aumento en la concentración de sustancia estresante en el medio y siguiendo el comportamiento de análisis de la varianza sobre los medios, la que más afectó la germinación fue 80 mM de sorbitol y el mayor valor se observó para el medio sin sustancias estresoras agregadas.

El mayor valor de porcentaje de germinación se observó en Guazuncho 2 en 20 mM de sorbitol (90,0%) mientras que los menores valores se encontraron para Porá Ité (31%) y Guazuncho 3 (34%) en el medio suplementado con 80 mM de sorbitol.

Si se considera la reducción en el porcentaje de germinación entre el medio sin sustancias estresantes con el medio que contiene 80 mM de sorbitol, Guazuncho 2 redujo de 84 a 80,7% (3,3%), Guazuncho 3 de 62 a 34% (28%), Porá de 71,3 a 46,7% (24,6%), Porá Ité de 70,7 a 31% (39,7%) y Oro Blanco 2 de 62,7 a 38, 0% (24,7%). Con estos valores podría decirse que la variedad más afectada en 80 mM de sorbitol en cuanto a su porcentaje de germinación fue Porá Ité, seguido por Guazuncho 3, Oro Blanco 2 y Porá. En el otro extremo estaría considerada la variedad Guazuncho 2, la cual presentó una mínima reducción en el porcentaje de germinación en 80 mM de sorbitol, y con una reducción de 84 a 76% para el medio conteniendo 20 mM de manitol (7,3%).

Cada estrés es una característica de origen multigénico y por lo tanto la manipulación puede resultar en una alteración de un gran número de genes, así como de sus productos. El conocimiento generado a través de estos estudios podría ser utilizado para evaluar plantas transgénicas capaces de tolerar las condiciones de estrés sin perturbar el crecimiento o el rendimiento (Mahajan y Tuteja, 2005).

El método empleado en este trabajo logró discriminar, de manera rápida y fácil, entre genotipos con distintas capacidades de germinación ante distintas condiciones de estrés hídrico y salino, por lo que sería de gran utilidad para realizar un análisis preliminar en los materiales derivados del programa de mejoramiento genético de INTA.

5. CONCLUSIONES

Se realizó la evaluación de la respuesta *in vitro* de meristemas apicales y axilares de materiales de INTA y del genotipo Coker 312 como alternativas de regeneración de lo cual se extrajeron las siguientes conclusiones.

1. El uso de los protocolos que utilizan como explante ápices embrionarios fue eficaz como sistema alternativo a la embriogénesis somática, para la regeneración *in vitro* de plantas de algodón de los genotipos considerados, mientras que los que utilizaron yemas axilares y ápices caulinares fallaron en la respuesta regenerativa.
2. En el protocolo de Hemphill et al. (1998) se observaron las respuestas más sobresalientes de regeneración de plantas de algodón dado que se presentaron los menores valores de respuesta negativa y el mayor porcentaje de plantas regeneradas, aunque prácticamente no pudo registrarse la aparición de múltiples brotes.
3. Los genotipos Coker 312 y Guazuncho 2 se destacaron en el número de plantas regeneradas, obteniendo los mejores resultados para el protocolo de Hemphill et al. (1998). Por ello, entre los genotipos de INTA evaluados, el genotipo Guazuncho 2 es el más promisorio para ensayos de regeneración usando como explantes ápices embrionarios.
4. Para estudios de regeneración que requieran la producción de múltiples brotes, los genotipos que presentaron mejor respuesta fueron Guazuncho 3 y Porá, aunque en baja proporción, por lo que deberían realizarse ensayos adicionales para encontrar las condiciones de cultivo óptimas, modificando el tipo y concentración de reguladores de crecimiento que permitan mejorar los resultados encontrados.

Por ello, se concluye que pudo cumplirse con el objetivo de evaluar la respuesta *in vitro* de genotipos de algodón provenientes del programa de mejoramiento genético

de INTA en relación a la capacidad de regeneración directa y, además, se comprobó la hipótesis planteada de existencia de variabilidad presente en estos materiales para la regeneración.

Se evaluó la respuesta diferencial *in vitro* ante condiciones de estrés abiótico (hídrico y salino) de las variedades comerciales de algodón de INTA llegándose a las siguientes conclusiones

1. Los genotipos considerados en los ensayos de estrés salino cambiaron su estatus en el porcentaje de germinación en función de la concentración de cloruro de sodio agregada al medio, siendo menor este porcentaje con el aumento de la concentración de sal.
2. El genotipo más afectado fue Oro Blanco 2, reduciendo en mayor proporción el porcentaje de germinación con el aumento de la concentración de cloruro de sodio.
3. Los genotipos considerados en los ensayos de estrés hídrico sufrieron una disminución en el porcentaje de germinación en el medio conteniendo 80 mM de sorbitol en relación al observado en el medio sin estresar.
4. En el medio conteniendo 80 mM de sorbitol, Guazuncho 2 resultó ser la menos afectada, mientras que la que más reducción en el porcentaje de germinación experimentó fue Porá Ité.

Con base en los resultados obtenidos se concluye que pudo evaluarse la respuesta diferencial *in vitro* ante condiciones de estrés abiótico en las variedades comerciales de algodón de INTA y existe variabilidad en la respuesta a estas condiciones en cuanto al porcentaje de germinación de semillas.

Como perspectivas a futuro, a partir de los resultados obtenidos en este trabajo se pretende continuar con las pruebas de regeneración directa de los genotipos más destacados para la obtención de plantas regeneradas y producción de múltiples brotes en búsqueda de mejorar las condiciones de cultivo. Para los ensayos de estrés, se proyectan realizar futuros ensayos, usando los genotipos con respuesta antagónica que apoyen los resultados y el análisis de líneas avanzadas del programa de mejoramiento genético de INTA.

Bibliografía

Agrawal DC, Banerjee AK, Kolala RR, Dhage AB, Kulkarni AV, Nalawade SM, Hazra S and Krishnamurthy KV (1997). *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports 16 (9): 647-652.

Ashraf M (2002). Salt tolerance of cotton: some new advances. Crit. Rev. Plant Sci. 21: 1-30.

Ashraf M and Harris PJC (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Science 166 (1): 3-16.

Ayers RS and Westcot DW (1976). Water quality for agriculture. FAO Irrigation and Drainage Paper No 29. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Banerjee AK, Agrawal D, Nalawade SM and Krishnamurthy KV (2000). Recovery of *in vitro* cotton shoots through micro grafting. Current Science; Vol. 78 N°5: 623-626.

Bazargani MM, Sayed Tabatabaei BE and Omid M (2011). Multiple shoot regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via shoot apex culture system. African Journal of Biotechnology 10(11): 2005-2011.

Benedict JH and Altaman DW (2001). Commercialization of transgenic cotton expressing insecticidal crystal protein. En: Kumria R., Leelavathi S, Bhatnagar RK y Reddy VS (2003). Regeneration and genetic transformation of cotton: Present status and future perspectives. Plant Tissue Culture 13(2): 211-225.

Bernstein L (1955). Salt tolerance of field crops cotton. United States salinity laboratory report to Collaborators, Riverside, CA: 37-41.

Bewley JD, Oliver MJ (1992). Desiccation tolerance in vegetative plant tissues and seeds: protein synthesis in relations to desiccations and a potential role for protection and repair mechanisms. p. 141-160.

Bonhert HJ, Nelson DE and Jensen RG (1995). Environmental Stresses. Plant Cell Vol. 7: 1099-1111.

Bonhert HJ and Sheveleva E (1998). Plant Stress adaptations – making metabolism move. Current Opinion in Plant Biology 1: 267-274.

Bourlan FM and Ibrahim AAL (1982). Effects of accelerated aging treatments on six cotton cultivars. Crop. Sci. 22 (3): 637-640.

Boyer JS (1982). Plant productivity and environment. *Science* 218 (4571): 443-448.

Bradlow JM and Bauer PJ (2010). The origin and evolution of *Gossypium*. En: Stewart JMcd, Oosterthuis D, Heilholt J and Mauney J (eds.) *Physiology of Cotton*. Springer. p. 48-56.

Bresan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1998). Plant use calcium to resolve salt stress. *Trends in Plant Science* 3(11): 411-412.

Chaudhary B, Kumar S, Prasad KVSK, Oinam GS, Burma PK and Pental D (2003). Slow desiccation leads to high-frequency shoot recovery from transformed somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 310 FR). *Plant Cell Reports* 21: 955-960.

Chen TZ, Wu SJ, Li FF, Guo WZ, and Zhang TZ (2008). In Vitro Regeneration of Four Commercial Cotton Cultivars (*Gossypium hirsutum* L.) Grown in Xinjiang, China. *Acta Agrono. Sin.* 34(8): 1374-1380.

Constable GA (1977). Growth and distribution of dry matter in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Australian Journal of Agricultural Research* 28: 249-256.

Constable GA and Rawson HM (1980a). Carbon production and utilization in cotton – Interferences from a carbon budget. *Australian Journal of Plant Physiology* 7: 539-553.

Constable GA and Rawson HM (1980b). Effect of leaf position, expansion and age on photosynthesis, transpiration and water-use efficiency of cotton. *Australian Journal of Plant Physiology* 7: 89-100.

Constable GA and Shaw AJ (1988). Temperature requirements for cotton. Division of Plant Industries, New Wales Department of Agriculture and Fisheries.

Costa PR, Custódio CC, Machado Neto NB and Marubayashi OM (2004). Water deficit induced by mannitol on soybean seed classified in different sizes. *Revista Brasileira de Sementes* 26: 105-113.

Cousins YL, Lyon BR and Llewellyn DJ (1991). Transformation of an Australian cotton cultivar: Prospects for cotton through genetic engineering. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 481-494.

Cuartero J, Yeo AR and Flowers TJ (1992). Selection of donors for salt-tolerance in tomato using physiological traits. *The New Phytologist*, 121:63-69.

Davidonis GH and Hamilton RH (1983). Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. Plant Science Lett. 32: 89-93.

Díaz ML; Zappacosta DC; Franzone PM y Ríos RD (2004). Transformación genética, Parte III, Capítulo 3. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal, 1ra Edición. Ediciones INTA. Editores: Echenique V, Rubinstein C y Mroginsky L. Buenos Aires, Pag.: 109-123.

Di Renzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>

Divya K, Swathi Anuradha T, Jami SK and Kirti PB (2008). Efficient regeneration from hypocotyl explants in three cotton cultivars. Biologia Plantarum 52 (2): 201-208.D

Evans MMS and Barton MK (1997). Genetics of angiosperm shoot apical meristem development. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 673-701.

Fanti SC and Perez SCJGA (2004). Seed germination of paineira under water and salt stress. Pesquisa Agropecuária Brasileira 39: 903-909.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2002). Technical report in cotton. Commodities and Trade Division. (Ed. Paola Fortucci).

Finner JJ (1988). Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports 7: 399-402.

Firoozabady E and Deboer DL (1993). Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) In Vitro Cell. Dev. Biol. 29: 166-173.

Flick CE, Evans DA and Sharp WR (1983). En: Amirato PV, Evans DA, Sharp WR y Yamada Y (eds) Handbooks of Plant Cell Culture 3: 13-81. McMillan, New York.

Flowers TJ (2004). Improving crop salt tolerance. Journal Exp. Bot. 55: 307-319.

Furbeck SM, Bourland FM and Watson Jr. CE (1993). Inheritance of resistance to seed deterioration in cotton. Euphytica 69: 203-209.

Gadelha Maneses CHS, Riselane de Lucena AB, Dantas Fernandes P, Pereira WE, Guedes de Morais LLH, Magalhaes de Anrade LM and Soares Vidal M (2011). Germination of cotton cultivar seeds under water stress induced by polyetylen glycol – 6000. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz) 68 (2): 131-138.

Gamborg OL, Miller RA and Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean cells. Experimental Cell Research 50: 151-158.

Garrat LC, Janagoudar BS, Lowe KC, Anthony P, Power JB and Davey MR (2002). Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. *Free Radical Biology & Medicine* 33 (4): 502-511.

Gerik TJ, Faver L, Thaxton PM and El-Zik KM (1996). Late Season Water Stress in Cotton: Plant Growth, Water Use, and Yield. *Crop Science* 36: 914-921.

Gorham J, Läuchli A and Leidi EO (2010). Plant responses to salinity. *Physiology of cotton*. Stewart JMcD, Oosterhuis DM, Heitholt JJ and Mauney JR (eds). Chapter 13: 129-141.

Gould J, Banister S, Fahima M, Hasegawa O and Smith RH (1991). Regeneration of *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* from the shoot apex. *Plant Cell Rep.* 10: 12-16.

Gould JH and Magallanes-Cedeno M (1998). Adaptation of cotton shoot apex culture to *Agrobacterium*- mediated transformation. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 1-10.

Guinn G (1982). Absciscic acid and abscission of young cotton bolls in relation to water availability and boll load. *Crop Science* 22: 580-583

Gupta SK, Srivastava AK, Singh PK and Tuli R (1997). *In vitro* proliferation of shoots and regeneration of cotton. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 51:149-152.

Han GY, Wang XF, Zhang G and Ma ZY (2009). Somatic embryogenesis and plant regeneration of recalcitrant cottons (*Gossypium hirsutum*). *African Journal of Biotechnology* Vol. 8(3): 432-437.

Haq-ul-Ikram (2005). Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology* 4 (2): 206-209.

Hazra S, Agrawal DC, Banerje AK, Krishnamurthy KV and Nalawade SM (2001). Induction of multiple shoots and plant regeneration “accessory buds” of nodal segments from field-grown mature cotton plants (*Gossypium hirsutum* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 37: 830-834.

Hearn AB (1969a). Growth and performance cotton in a desert environment I. Morphological development of the crop. *Journal of Agricultural Science* 73: 65-74.

Hearn AB (1969b). Growth and performance cotton in a desert environment II. Dry matter production. *Journal of Agricultural Science* 73: 75-86.

Hearn AB and Constable GA (1984). Irrigation for crops in a sub-humid environment: Evaluation of irrigation strategies for cotton. *Irrigation Science* 5: 75-94.

Hemphill JK, Maier CG and Chapman KD (1998). Rapid *in vitro* plant regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports*. 17: 273-278.

Hipertextos de Botánica Morfológica-TEMA 10: Clasificación de Tejidos-Meristemas. www.biologia.edu.ar/botnica/tema10/index10.htm

Howard L, Salus SS and Schumaker KS (1997). Salt sensitivity and the activities of the H⁺ -ATPases in cotton seedlings. *Crop Science* 37: 190-197.

Ibrahim IO and Nermin G (2008). High Efficiency shoot and cotyledonary nodes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Pak J. Bot.*, 40(4): 1665-1672.

ICAC (Comité Consultivo Internacional del Algodón) (2009). Technical report: world situation of cotton. International Cotton Advisory Committee. Washington DC, Estados Unidos de América.

ICAC. 2014. The ICAC RECORDER. Consecuencias y repercusiones del cambio climático en la producción de algodón. Secretaría del Comité Consultivo Internacional del Algodón, 1629 K Street, NW, Suite 702, Washington, DC 20006-1636, EE.UU. Editor: M. Rafiq Chaudhry <rafiq@icac.org>. p: 10-14.

ICAC-FAO. 2015. Cotton Production and Trade. Measuring Sustainability in Cotton Farming Systems Towards a Guidance Framework. Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Cotton Advisory Committee. Rome. URL: <https://www.icac.org/getattachment/Home-International-Cotton-Advisory-Committee-ICAC/measuring-sustainability-cotton-farming-full-english.pdf>

Izquierdo Rojo M (1999). Transferencia génica a plantas. Ingeniería genética y transferencia génica. Ed. Pirámide p: 283-315.

Jackson JA and Hobbs SLA (1990). Rapid multiple shoot production from cotyledonary node explants of Pea (*Pisum sativum*). *In Vitro Cell Dev Biol* 26: 835-838.

Kerby TA and Buxton DR (1981). Competition between adjacent fruiting forms in cotton. *Agronomy Journal* 73: 867-871.

Khajeh-Hosseini M, Powell AA and Bingham IJ (2003). The interaction between salinity stress and seed vigor during germination of soybean seeds. *Seed Science and Technology* 31: 715-725.

Koonce L, Dever J, Burns T and Trolider NL (1996). Progress towards genotype independent transformation. In: Dugger P, Richter D (eds) National Cotton Council of America, Nashville, Tenn, 9-12 Jan, p 1173.

Kruskal WH and Wallis WA (1952). Use of ranks on one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47: 583-621.

Kumar S, Sharma P and Pental D (1998). A genetic approach to in vitro regeneration of non-regenerating cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. *Plant Cell Reports* 18: 59-63.

Kumria R, Leelavathi S, Bhatnagar RK and Reddy VS (2003a). Regeneration and genetic transformation of cotton: Present status and future perspectives. *Plant Tissue Cult.* 13(2): 211-225.

Kumria R, Sunnichan VG, Das DK, Gupta SK, Reddy VS, Bhatnagar RK, Leelavathi S (2003b). High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. *Plant Cell Rep.* 21: 635-639.

Larcher W (2000). *Plant ecophysiology*. RIMA, São Carlos, SP, Brazil. 531 p.

Leelavathi S, Sunnichan VG, Kumria R, Bhatnagar RK and Reddy VS (2004). A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 22: 465-470.

Leidi EO and Gorham J (1998). Salt and water stress tolerant cotton. En: *Biotechnology and Forestry* 42. Cotton (Bajaj YP ed.), Springer Berlin Heidelberg: 227-242.

Leidi EO y Pardo JM (2002). Tolerancia de los cultivos al estrés salino: que hay de Nuevo. *Revista de Investigación de la Facultad de Ciencias Agrarias, Secretaría de Investigación, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, N° II*; <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Inveestigacion/revista/rev2/5.htm>

Levene H (1960). "Robust test for equality vof variances." In: *Contributions to Probability and Statistics*, 278-292. I. Olkin (ed.). Stanford, Valif.; Stanford University Press.

Levitt J (1980). *Response of plants to environmental stresses*, vol. 1 y 2. 2nd edn. Academic Press. New York (USA).

Levitt J (1982). Tress Terminology. En: Turner NC and Kramer PJ (eds.). Adaptations of plant to Water and High Temperature Stress. Wiley-Interscience, New York.

Lin H, Salus SS and Schumaker KS (1997). Salt Sensitivity and the Activities of the H⁺- ATPases in Cotton Seedlings. Crop Sci. 37: 190-197.

Lindorf H, L de Parisca y Rodriguez P (1991). Botánica. Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca. Caracas.

Liu J and Zhu JK (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. Science 280: 1943-1945.

Louis P and Galinski EA (1997). Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *E. coli*. Microbiology 143: 1141-1149.

Lv S, Yang A, Zhang K, Wang L and Zhang J (2007). Increase of glycinebetaine synthesis improves drought tolerance in cotton. Mol Breeding 20: 233-248.

Maas EV and Hoffman GJ (1977). Crop salt tolerance. Current assessment. J. Irrig. and Drainage Div., ASCE 103 (IR2): 115-134.

Mahajan S and Tuteja N (2005). Cold, salinity and drought stresses: An Overview. Archives of Biochemistry and Biophysics 444: 139-158.

Mahibbur RM and Govindarajulu Z (1997). A modification of the test of Shapiro and Wilks for normality. Journal of Applied Statistics, 24(2): 219-235.

Manoj KR, Rajwant KK, Rohtas S, Manu PG, Dhawan AK (2011). Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection- An overview of the recent progress. Environmental and Experimental Botany 71: 89-98.

Marascuilo L and McSweeney M (1977). Nonparametric and Distribution-Free Methods for the Social Sciences. Wadsworth Publishing Company, Inc. U.S.A.

Mason TG (1922). Growth and abscission in Sea Island cotton. Annals of Botany 36: 457-484.

McMichel BL (1986). Growth of roots. p. 29-38. En: Mauney JR and Mc Stewart. 1986. Cotton Physiology. Cotton Foundation Publisher Memphis USA.

Meloni DA, Oliva MA, Martinez CA and Cambraia J (2003). Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. Environmental and Experimental Botany 49: 69-76.

Merkle SA, Parrott WA and Flinn BS (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In *In Vitro Embryogenesis in Plants*, Thorpe T. A. (ed). 155-203.

Mishra R, Wang H, Yadav NR and Wilkins TA (2003). Development of a highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Maxxa) – a step towards genotype – independent regeneration. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 73: 21-35.

Mitten DH (1985). Somatic embryogenesis in *Gossypium hirsutum* L. En: Kumria R, Leelavathi S, Bhatnagar RK y Reddy VS (2003). Regeneration and genetic transformation of cotton: Present status and future perspectives. *Plant Tissue Cult.* 13(2): 211-225.

Morre JL, Permingeat HR, Romagnoli MV, Heisterborg CM and Vallejos RH (1998). Multiple shoot induction and plant regeneration from embryonic axes of cotton. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 54: 131 – 136.

Munns R (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25, 239-250.

Murashige T and Skoog FA (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 154: 473-497.

Murillo-Amador B, Lopez-Aguilar R, Kaya C, Larrinaga-Mayoral J and Flores-Hernandez A (2002). Comparative effects of NaCl and polyethylene glycol on germination, emergence and seedling growth of cowpea. *Journal of Agronomy and Crop Science* 188: 235-247.

Nandeshwar SB, Dongre AB and Moghe S (2002). In vitro regeneration in cotton by multiple shoot induction. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 3: 35-42.

Niklas KJ (1994). *Olant Allometry: The Scaling of Form and Process*. The University of Chicago Press. Chicago.

Nilsen ET and Orcutt DM (1996). *Physiology of plants under Stress*. Abiotic Factor. Cap1:1-12. Cap 7: 278-321.

Nilsen ET, Sharifi MR and Rundel PW (1984). Comparative water relations of phreatophytes in Sonoran Desert of California. *Ecology* 65:767-778.

Oosterhuis DM (1999). Morphology and anatomy of the cotton plant. En: Smith W.C. and Cothren (eds.). *Cotton, origin, history, technology and production*. (Eds. W.C. Smith y J.T. Cothren). John Wiley and sons Inc. New York. p: 175-206.

Osmond CB, Austin MP, Berry JA, Billing WD, Boyer JS, Dacey JWH, Nobel PS, Smith SD and Winner WE (1987). Stress physiology and the distribution of plants. *Bioscience* 37:38-48.

Ouma JP, Young MM, Reichert NA (2004). Rooting of *in vitro* regenerated cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is influenced by genotype, medium composition, explant type and age. *African Journal Biotechnology* 3 (6): 313-318.

Ozyigit II, Kahraman MV and Ercan O (2007). Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology* 6(1): 003-008.

Parkhi V, Kumar V, Sunilkumar G, Rathore KS (2009). Expression of apoplastically secreted tobacco osmotin in cotton confers drought tolerance. *Mol Breeding* 23: 625-639.

Pathi KM and Tujeta N (2013). High-frequency regeneration via multiple shoot induction of an elite recalcitrant cotton (*Gossypium hirsutum* L cv. Narashima) by using embryo apex. *Plant Signaling and Behavior* 8:1, e22763-94.

Paytas M (2010). Improving cotton yield under water limiting conditions in Argentina. En: ICCAC Recorder International Cotton Advisory Committee XXVIII (2). Washington DC, Estados Unidos.

Paytas M y Ploschuk E (2013). Algodón. Capítulo 3.3. En: Cultivos industriales/ De la Fuente E., Gil A., Kantolil A. 1ª ed. Buenos Aires: Editorial Facultad de Agronomía, p. 414-445.

Pereira Campos Caramori L, Fávoro S and Gonzaga Esteves Vieira L (2001). Thidiazuron as a promoter of multiple shoots in cotton explant (*Gossypium hirsutum* L.). *Acta Scientiarum. Maringá* 23 (5) p. 1195-1197.

Poisson JA (2002). Breve Historia de la Producción de Algodón en la Argentina. SAGPyA, INTA.

Price HJ and Smith RH (1979). Somatic embryogenesis in suspension cultures of *Gossypium klotzschianum*. *Planta* 145: 305-307.

Purohit M, Srivastava S, Srivastava PS (1998). Stress tolerant plants through tissue culture. In: Srivastava PS (Ed.) *Plant Tissue Culture and Molecular Biology: Application and Prospects*. Narosa Publishing House, New Delhi: 554-578.

Quirolo, ME (2015). Gestión de Riesgos en el Sector Algodonero de Argentina. Presentado en VI Coloquio Nacional de Percepción y Gestión de Riesgo Agropecuario,

Buenos Aires, Argentina. Recuperado a partir de http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_gestion_de_riesgos_en_el_sector_algodonero_en_argentina.pdf

Rai MJ, Kalia RK, Singh R, Gangola MP and Dhawan AK (2011). Developing stress tolerant through *in vitro* selection- An overview of the recent progress. *Environmental Botany* 71: 89-98.

Rangan TS (1993). Regeneration of cotton. USA patent 5:244-802. En: Kumria R, Leelavathi S, Bhatnagar RK y Reddy VS 2003. Regeneration and genetic transformation of cotton: Present status and future perspectives. *Plant Tissue Cult.* 13(2): 211-225.

Rangan TS and Rajasekaran K (1996). Regeneration of cotton plants in suspension culture. USA patent 5: 583-036. En: Kumria R, Leelavathi S, Bhatnagar RK and Reddy VS (2003). Regeneration and genetic transformation of cotton: Present status and future perspectives. *Plant Tissue Cult.* 13(2): 211-225.

Rauf S, Usman M, Fatima B and Kan IA (2005). In vitro regeneration and multiple shoot induction in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Tissue Cult.* 15(1): 75-81.

Roca WM y Mroginski LA (eds). (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro internacional de agricultura Tropical) Cali, Colombia. Pág. 969.

Rocha MDS, Carvalho JMFC, Cavalcanti Mata MERM, Lopes KP (2008). *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 12 (5): 503-506.

Romero-Aranda R, Soria T and Cuartero J (2001). Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Science*, 160: 265-272.

Satyavathi VV, Prasad V, Gita Lakshmi B and Lakshmi SG (2002). High efficiency transformation protocol for three Indian cotton varieties via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 162:215-223.

Saeed NA, Zafar Y and Malik KA (1997). A simple procedure of *Gossypium* meristems shoot tip culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 51: 201-207.

Sakhanokho HF, Zipf A, Rajasekaran K and Sharma GC (2001). Induction of highly embryogenic calluses and plant regeneration in Upland and Pima cottons. *Crop Science* 41: 1235-1240.

Schroeder MA, Royo OM, Suster GA, Sacconi JLF, Rey HY y Mroginsky LA (1994). Cultivo de tejido de algodón (*Gossypium hirsutum* L) Actas Resúmenes REDBIO 1994, A-118.

Shoemaker RC, Couche LJ and Galbraith DW (1986). Characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium L.*). *Plant Cell. Rep.* 3: 178-181.

Srivatanakul M, Park S, Sanders J, Salas M and Smith R (2000). Multiple shoot regeneration of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from a shoot apex culture system. *Plant Cell Rep.* 19:1165-1170.

Stelly DM, Altman DW, Kohel RJ, Rangan TS and Commiskey E (1989). Cytogenetic abnormalities of cotton somaclones from callus culture. *Genome*, 32: 762-770.

Stephens SG (1967). Evolution under domestication of the New World Cottons (*Gossypium* spp.). *Science Culture* 19: 118-134.

Sunilkumar G and Rathore KS (2001). Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. *Molecular Breeding* 8: 37-52.

Taíz L and Zeiger E (2002). Fisiología del estrés. *Plant Physiology* 3rd Edition, Sinauer Associates, Sunderland.

Tcach MA, Poisson AF, Bonacic I, Ibaló S, Montenegro A, Ojeda D, and Cracogna M (2011). New Cotton Germoplasm as an Intermediate Cycle Called SP48114 Development by the National Institute of Agricultural Technology – INTA. World Cotton Research Conference – 5: 13-16.

Tiwari RS, Picchioni GA, Steiner RL, Jones DC, Hugs SE and Zhang J (2013). Genetic variation in salt tolerance at the seedling stage in an interspecific backcross inbred line population of cultivated tetraploid cotton. *Euphytica* 194: 1-11.

Triparthy S and Reddy GM (2002). *In vitro* callus induction and plantlet Regeneration from indian cotton cultivars. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 3 (3&4): 137-142.

Trolinder NL and Goodin JR (1988a). Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*) I. Effects of source of explant and hormone regime. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 12: 178-181.

Trolinder NL and Goodin JR (1988b). Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*) II. Requiriments for embryodevelopment and plant regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 12: 43-53.

Trolinder NL and Xhixian C. (1989). Genotype specificity of the somatic embryogenesis response in cotton. *Plant Cell Rep.* 8: 133-136.

U.S. Salinity Laboratory Staff (1954). Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. USDA Handbook60, U.S. Government Printing Office, Washington D.C.

Vamadevaiah HM, Katageri IS, Khadi BM, Shobha Immadi AB and Manjula MI (2003). *In vitro* screening for salinity resistance in cotton (*G. hirsutum*). *World Cotton Research Conference-3*: 765-770.

Villalobos AVM (1980). Plantas libres de virus. *Ciencia y desarrollo*, CONACYT (México) 33:35-49. En: Villalobos AVM y Thorpe TA. 1991. *Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Capítulo 6*: 126-141.

Wakelyn P (2007). *Cotton Fiber chemistry and technology*.162 p. CRC Press. US.

Wakelyn P and Chaudhry R (2010). *Cotton: Technology for the 21st Century*. International Cotton Advisory Commytee. Washington DC.

Wang YX, Wang XF, Zhang GY and Han GY (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration from two recalcitrant genotypes of *Gossypium hirsutum* L. *Sci. Agric. Sin.* 5(5): 323-329.

Wendel JF, Brubaker CL, and Seelanan T (2010). The origin and evolution of *Gossypium*. En: McF Stewart J, Oosterhuis D, Heilholt J and Mauney JR (*Eds.*). *Physiology of cotton*. Springer: 1-18

Willkins TA, Mishra R, and Trolinder NL (2004). *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of cotton. *Food. Agr. Environ.* 2: 179-197.

Woodstock LW (1998). Seed imbibition: a critical period for successful germination. *Journal of Seed Technology* 12: 1-15.

Zapata C, Sricatanakul M, Park SH, Lee BM, Salas MG and Smith H (1999). Improvements in shoot apex regeneration of two fiber crops: cotton and kenaf. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 54: 185-191.

Zhang BH y Li XL (1995). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of elite cotton variety. *Acta Agriculturae Boreall- occidentalis Sinica* 4: 11-16.

Zhang BH, Liu F, Yao CB, and Wang KB (2000). Recent progress in cotton biotechnology and genetic engineering in China. *Current Science* 79: 37-44.

Zhang BH, Feng R, Liu F and Wang Q (2001). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42: 9-16.

Zurita JJ (2008). La salinidad. Su incidencia en las provincias de Chaco y Formosa. En: *La salinización de suelos en Argentina: su impacto en la producción agropecuaria.* Pag. 81-91. Ed. Taleisnik E, Grunberg K y Santa María G – 1a ed. – Córdoba: EDUCC – Editorial de la Universidad Católica de Córdoba.

ANEXO I

PROTOCOLOS DE ÁPICES EMBRIONARIOS

En los casos en que no se aclara, el programa estadístico usado fue Infostat/P (2014).

i) Protocolo de Hemphill et al. (1998)

Porcentaje de explantes sin crecimiento

Para cumplir los supuestos, la variable fue transformada. Un caso desactivado (16). Pruebas normalidad de residuos (Sección 3.1.1 - Tabla 5).

Shapiro-Wilks (modificado)

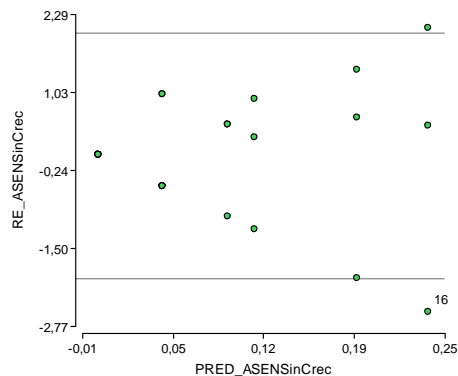
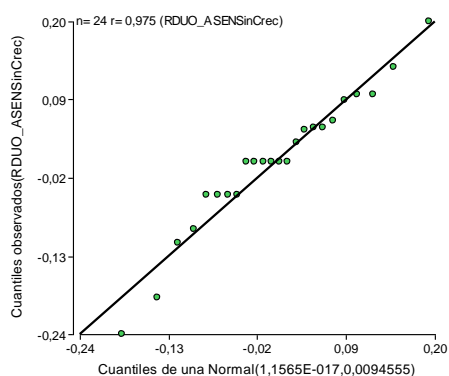
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO_ASEnSinCrec	23	0,00	0,08	0,96	0,7387

Prueba de Levene para homogeneidad de varianza usando el programa estadístico SAS (Sección 3.1.1 - Tabla 5).

Levene's Test for Homogeneity of asen_sincr Variance
ANOVA of Squared Deviations from Group Means

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
gen	6	0.000739	0.000123	2.45	0.0783
Error	14	0.000703	0.000050		

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos para la variable porcentaje de explantes sin crecimiento.



Porcentaje de explantes que forman Callo

Con un caso desactivado (12). Pruebas normalidad de residuos (Sección 3.1.1 - Tabla 5).

Shapiro-Wilks (modificado)

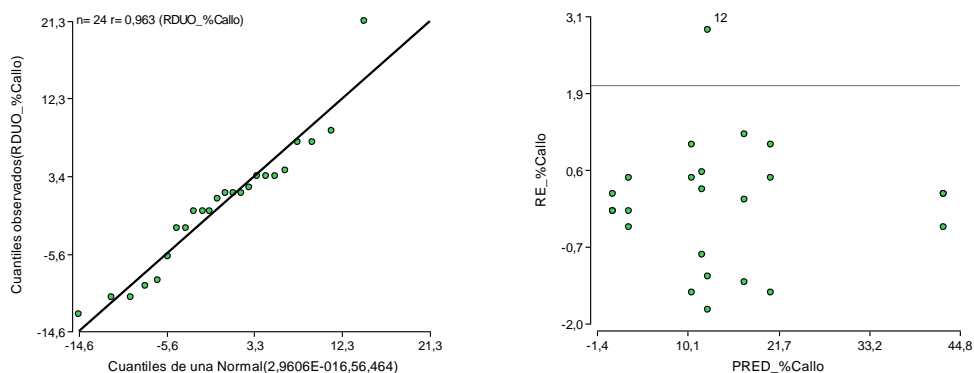
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO_%Callo	23	0,00	5,29	0,91	0,1284

Prueba de Levene para homogeneidad de varianza usando el programa estadístico SAS. (Sección 3.1.1 - Tabla 5).

Levene's Test for Homogeneity of callo Variance

ANOVA of Squared Deviations from Group Means					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
gen	6	13700.1	2283.3	2.04	0.1271
Error	14	15651.6	1118.0		

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos para la variable porcentaje de explantes que forman callos.



Porcentaje de explantes con brotes

Pruebas normalidad de residuos y homogeneidad de varianza (Sección 3.1.1 - Tabla 5).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Brotos	24	0,00	12,90	0,95	0,5820

Prueba de Levene para homogeneidad de varianza (Sección 3.1.1 - Tabla 5).

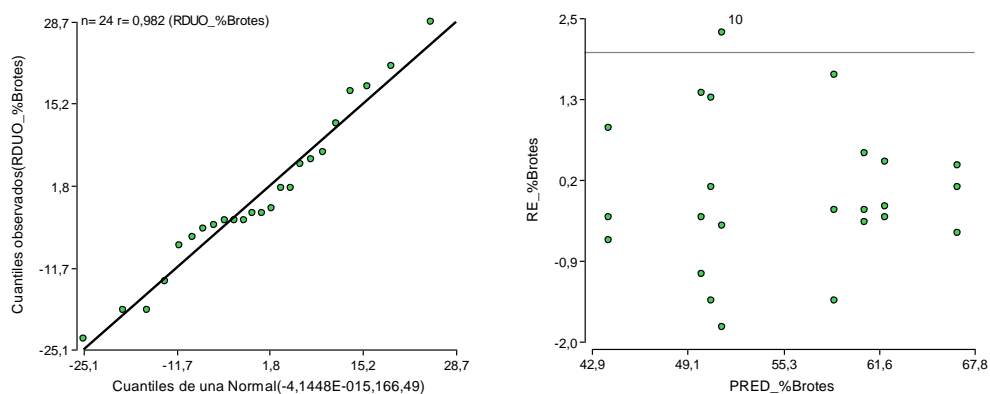
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Brotos	24	0,42	0,17	74,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	623,11	7	89,02	1,66	0,1902
Genotipos	623,11	7	89,02	1,66	0,1902
Error	859,26	16	53,70		
Total	1482,37	23			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Porcentaje de explantes que enraízan

Pruebas normalidad de residuos (Sección 3.1.1 - Tabla 5).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Raíz	24	0,00	13,16	0,93	0,2533

Prueba de Levene para homogeneidad de varianza (Sección 3.1 - Tabla 5).

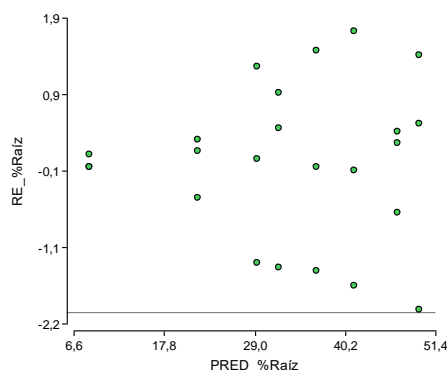
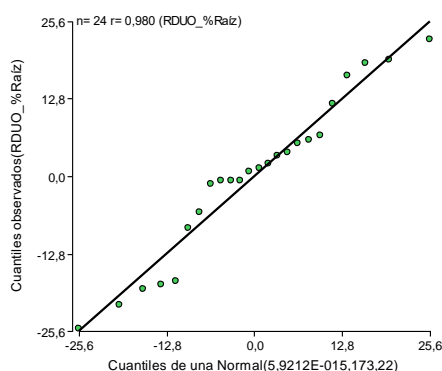
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Raíz	24	0,41	0,16	78,40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	675,26	7	96,47	1,60	0,2046
Genotipos	675,26	7	96,47	1,60	0,2046
Error	961,78	16	60,11		
Total	1637,04	23			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Relación raíz/brote

Pruebas normalidad de residuos (Sección 3.1.1 - Tabla 5).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Raíz/Brotes	24	0,00	15,22	0,98	0,9454

Prueba de Levene para homogeneidad de varianza. (Sección 3.1.1 - Tabla 5).

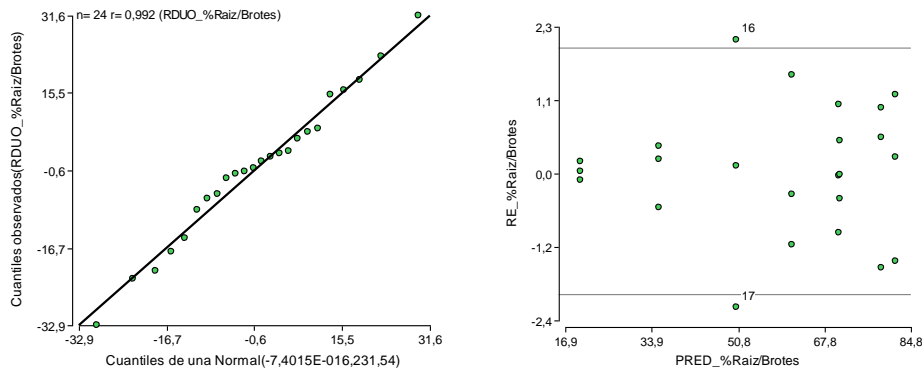
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Raíz/Brotes	24	0,43	0,18	79,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	975,44	7	139,35	1,72	0,1737
Genotipos	975,44	7	139,35	1,72	0,1737
Error	1293,79	16	80,86		
Total	2269,23	23			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Porcentaje de respuesta negativa

La variable fue transformada para cumplir los supuestos. Un dato desactivado (12). Pruebas normalidad de residuos (Sección 3.1.1 - Tabla 5).

Shapiro-Wilks (modificado)

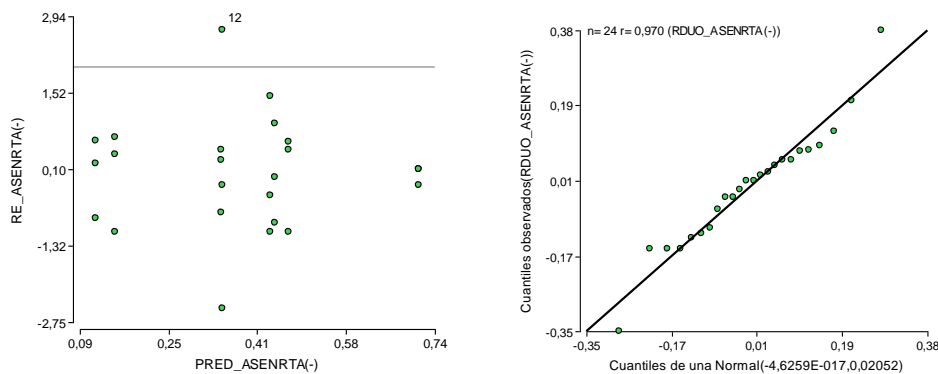
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO ASENRTA (-)	23	0,00	0,11	0,91	0,1426

Prueba de Levene para homogeneidad de varianza usando el programa estadístico SAS (Sección 3.1.1 - Tabla 5).

Levene's Test for Homogeneity of ars_resp Variance

ANOVA of Squared Deviations from Group Means						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	
gen	6	0.000873	0.000146	1.39	0.2851	
Error	14	0.00147	0.000105			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Porcentaje de explantes brotados que se secan

Un caso desactivdo (15). Pruebas normalidad de residuos (Sección 3.1.1 - Tabla 5).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Secan	23	0,00	3,44	0,92	0,1738

Prueba de Levene para homogeneidad de varianza. (Sección 3.1.1 - Tabla 5).

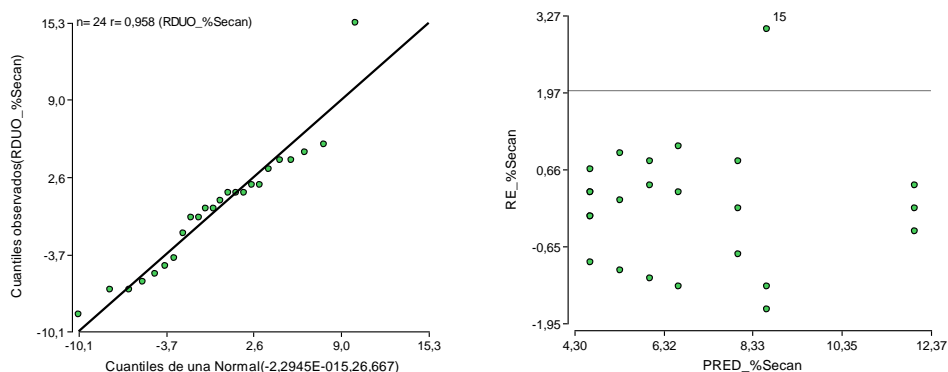
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Secan	23	0,41	0,13	71,30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	38,13	7	5,45	1,47	0,2491
Genotipos	38,13	7	5,45	1,47	0,2491
Error	55,41	15	3,69		
Total	93,54	22			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



ii) Protocolo de Morre et al. (1998)

Porcentaje de explantes sin crecimiento

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %SinCrec	24	0,00	9,06	0,95	0,6088

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

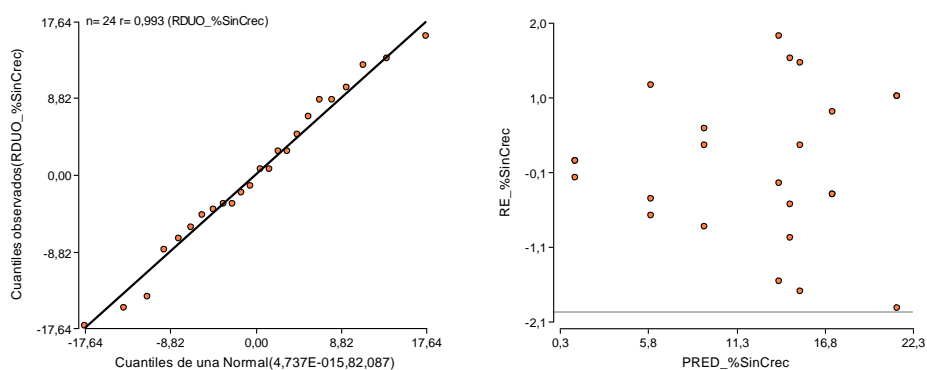
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %SinCrec	24	0,47	0,23	62,30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	287,93	7	41,13	2,00	0,1187
Genotipos	287,93	7	41,13	2,00	0,1187
Error	328,89	16	20,56		
Total	616,81	23			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Porcentaje de explantes que forman callo

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Callo	24	0,00	14,43	0,90	0,0710

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

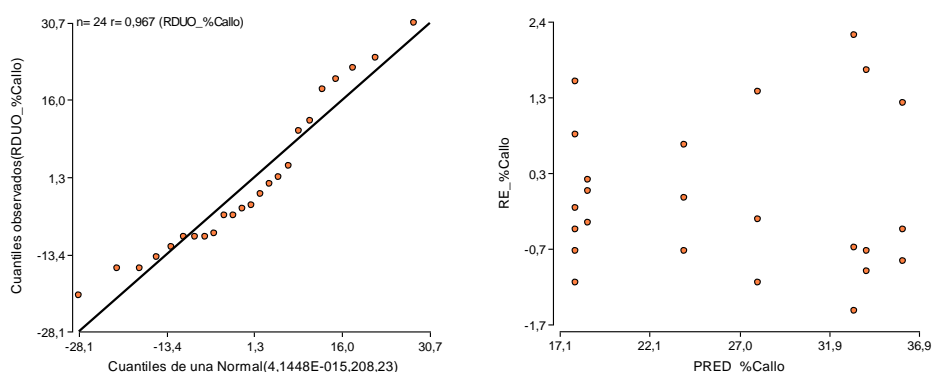
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Callo	24	0,45	0,21	60,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	657,78	7	93,97	1,87	0,1412
Genotipos	657,78	7	93,97	1,87	0,1412
Error	802,37	16	50,15		
Total	1460,15	23			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Porcentaje de explantes con brotes

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Brotes	24	0,00	10,23	0,97	0,9046

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

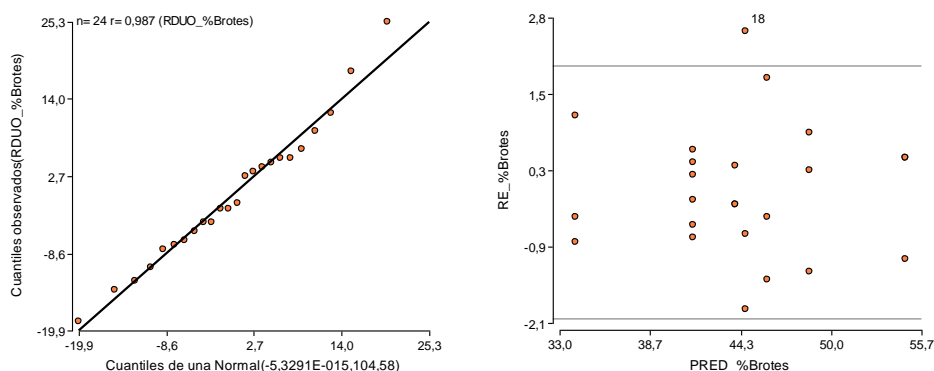
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Brotos	24	0,52	0,31	62,66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	440,22	7	62,89	2,47	0,0638
Genotipos	440,22	7	62,89	2,47	0,0638
Error	407,70	16	25,48		
Total	847,93	23			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Porcentaje de explantes con múltiples brotes

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Mbrotos	24	0,00	2,46	0,95	0,6410

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

Análisis de la varianza

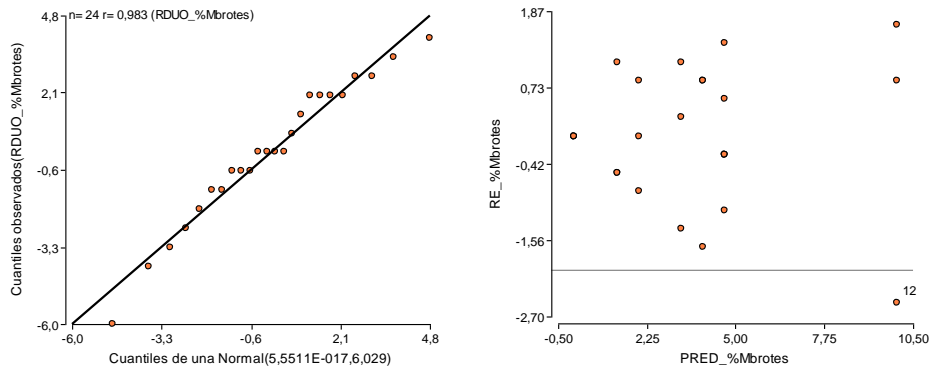
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Mbrotos	24	0,58	0,39	62,81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

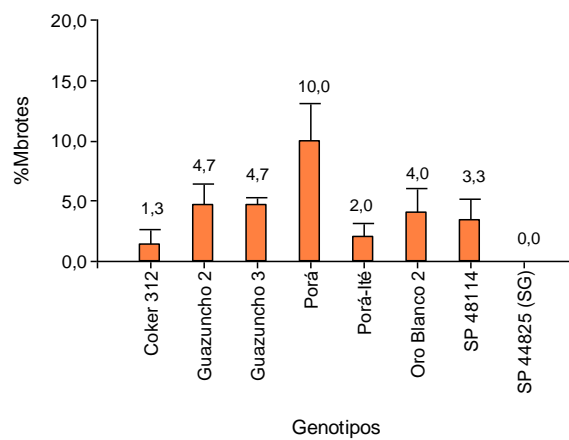
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	30,52	7	4,36	3,10	0,0289
Genotipos	30,52	7	4,36	3,10	0,0289
Error	22,52	16	1,41		
Total	53,04	23			

Los residuos se distribuyen según la normal pero las varianzas no son homogéneas, por lo que debe analizarse con Test no paramétrico.

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Porcentaje de explantes con múltiples brotes en función del genotipo (Sección 3.1.2 y Sección 4.1.2) Protocolo de Morre et al. (1998)



Porcentajes de explantes que enraizan

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Raíz	24	0,00	5,85	0,93	0,2944

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

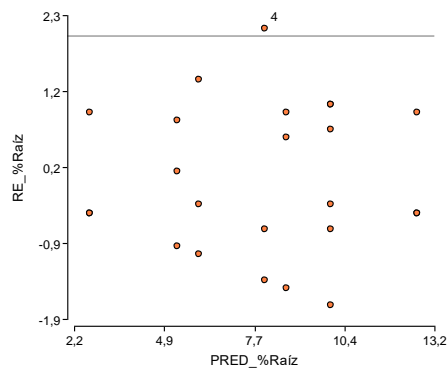
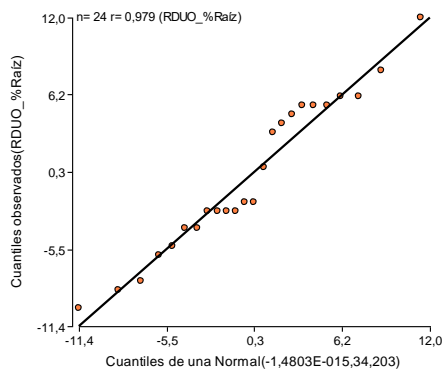
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Raíz	24	0,34	0,05	52,82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	59,19	7	8,46	1,19	0,3642
Genotipos	59,19	7	8,46	1,19	0,3642
Error	114,07	16	7,13		
Total	173,26	23			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Relación raíz/brote

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Raiz/Brotes	24	0,00	13,89	0,93	0,2154

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

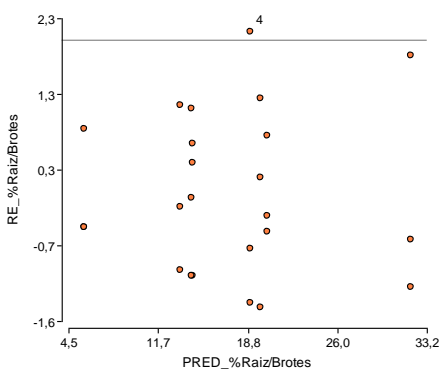
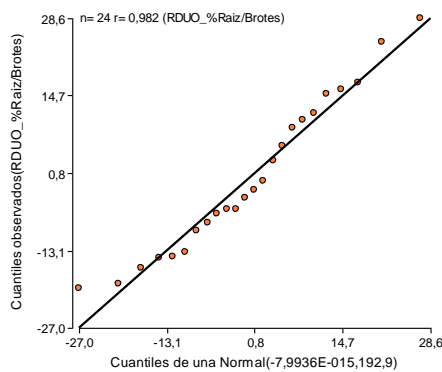
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Raiz/Brotes	24	0,32	0,02	60,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	372,80	7	53,26	1,07	0,4251
Genotipos	372,80	7	53,26	1,07	0,4251
Error	796,01	16	49,75		
Total	1168,81	23			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Porcentaje de respuesta negativa

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Rta (-)	24	0,00	15,83	0,98	0,9398

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

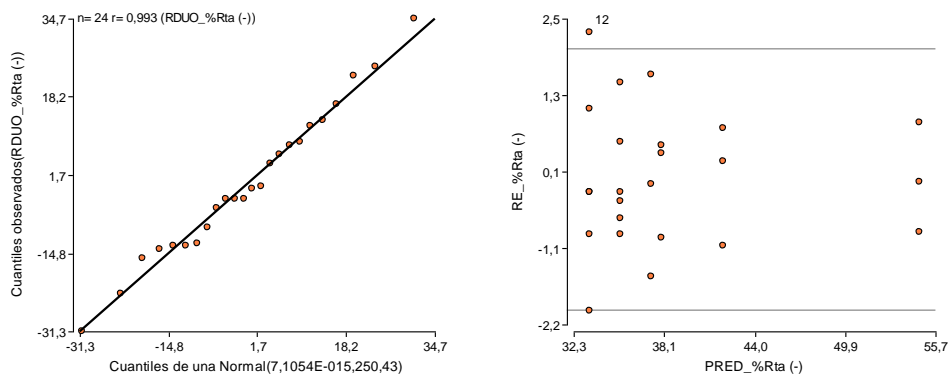
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Rta (-)	24	0,32	0,02	73,19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	625,48	7	89,35	1,06	0,4321
Genotipos	625,48	7	89,35	1,06	0,4321
Error	1351,11	16	84,44		
Total	1976,59	23			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Porcentajes de explantes que brotan y se secan

Para cumplir con los supuestos, la variable fue transformada. Un caso desactivado (6). Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO ASENSecan	23	0,00	0,08	0,92	0,1919

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.2 – Tabla 17).

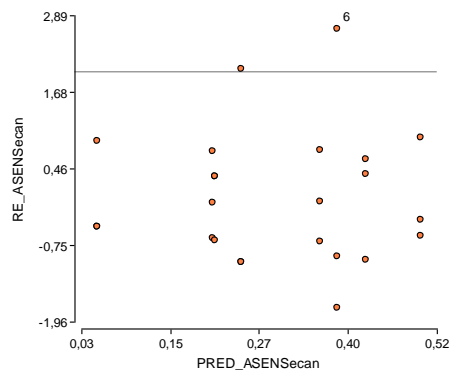
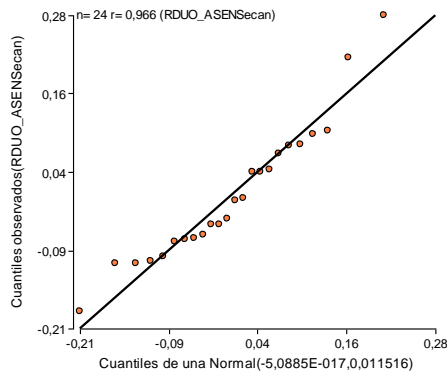
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS ASENSecan	23	0,51	0,29	53,89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	7	3,0E-03	2,26	0,0879
Genotipos	0,02	7	3,0E-03	2,26	0,0879
Error	0,02	15	1,3E-03		
Total	0,04	22			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



iii) Protocolo de Pathy y Tuteja (2013)

Porcentaje de explantes sin crecimiento

Para cumplir con los supuestos, la variable fue transformada.
Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO ASENSinCrec	24	0,00	0,18	0,96	0,6598

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

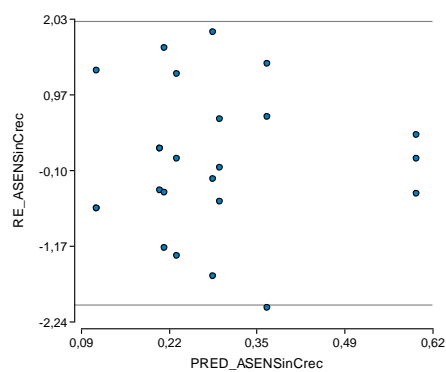
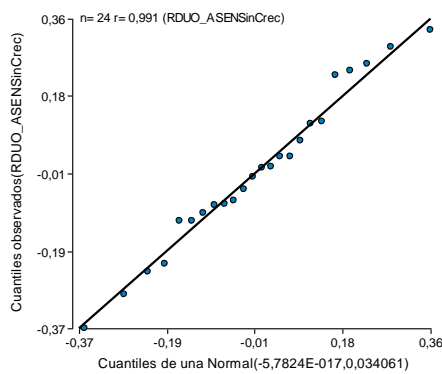
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS ASENSinCrec	24	0,45	0,20	68,63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,13	7	0,02	1,84	0,1481
Genotipos	0,13	7	0,02	1,84	0,1481
Error	0,16	16	0,01		
Total	0,28	23			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Porcentaje de explantes que forman callo

Un caso desactivado (4).

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Callo	23	0,00	8,49	0,95	0,5407

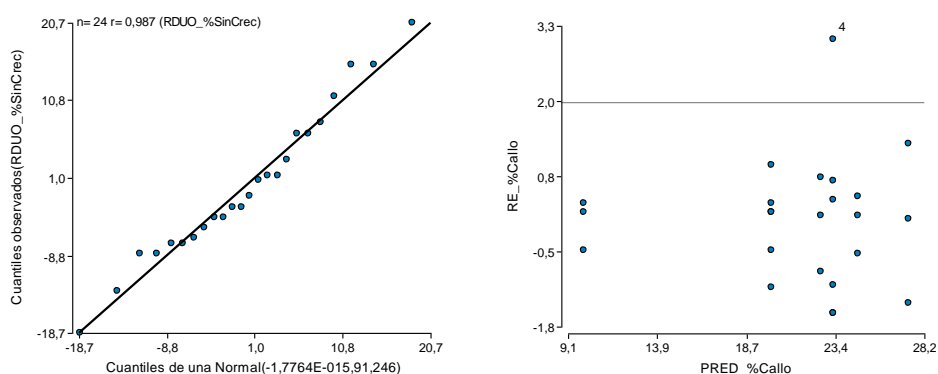
Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas usando el programa estadístico SAS (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

Levene's Test for Homogeneity of callo Variance

ANOVA of Squared Deviations from Group Means

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
gen	6	73969.8	12328.3	1.78	0.1751
Error	14	96925.6	6923.3		

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Porcentaje de explantes con brotes

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Brotos	24	0,00	11,95	0,96	0,7314

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

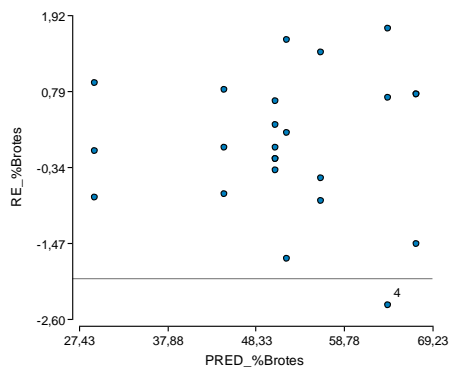
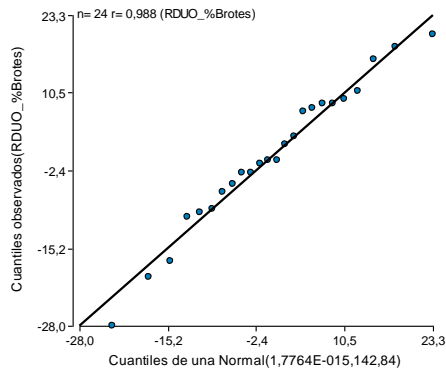
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Brotos	24	0,49	0,27	66,18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	584,30	7	83,47	2,19	0,0923
Genotipos	584,30	7	83,47	2,19	0,0923
Error	610,37	16	38,15		
Total	1194,67	23			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Porcentaje de explantes con múltiples brotes

Para cumplir con los supuestos, la variable fue transformada.
Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO ASENMBrotos	24	0,00	0,11	0,95	0,6109

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

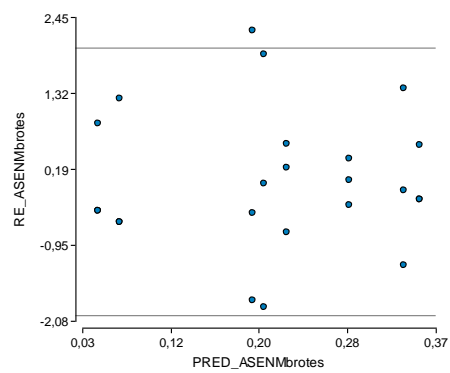
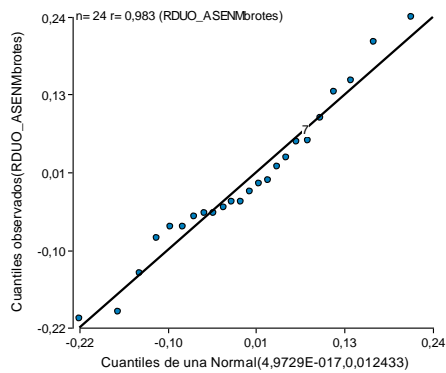
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS ASENMBrotos	24	0,42	0,17	76,31

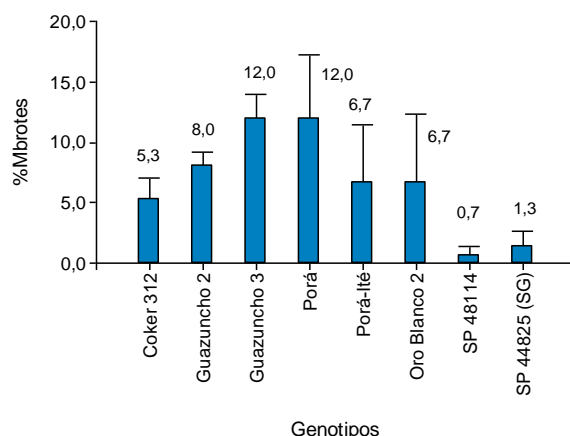
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,05	7	0,01	1,67	0,1875
Genotipos	0,05	7	0,01	1,67	0,1875
Error	0,07	16	4,2E-03		
Total	0,11	23			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Porcentaje de explantes con múltiples brotes en función del genotipo (Sección 3.1.3 y Sección 4.1.3) Protocolo de Pathi y Tuteja (2013)



Porcentaje de explantes que enraízan

Para cumplir con los supuestos, la variable fue transformada.
Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO ASEN Raíz	24	0,00	0,12	0,93	0,2267

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

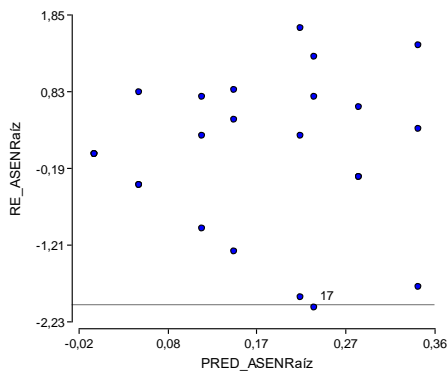
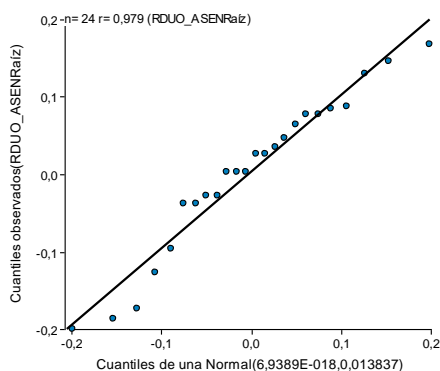
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS ASEN Raíz	24	0,51	0,30	66,89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,06	7	0,01	2,41	0,0689
Genotipos	0,06	7	0,01	2,41	0,0689
Error	0,06	16	3,7E-03		
Total	0,12	23			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos.



Relación raíz/brote

Un caso desactivado (9).

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

Shapiro-Wilks (modificado)

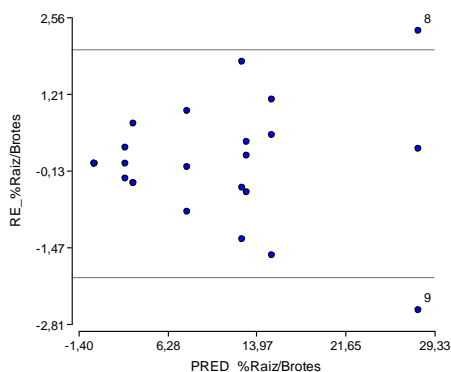
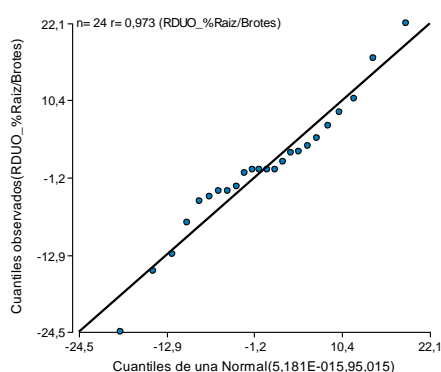
Variable	n	Media D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Raiz/Brotes	23	0,00 7,64	0,98	0,9501

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas usando el programa estadístico SAS (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

Levene's Test for Homogeneity of raiz_brte Variance
ANOVA of Squared Deviations from Group Means

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
gen	6	68878.2	11479.7	2.56	0.0690
Error	14	62750.4	4482.2		

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos



Porcentaje de respuesta negativa

Un caso desactivado (4).

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Rta (-)	23	0,00 12,04	0,96	0,6810

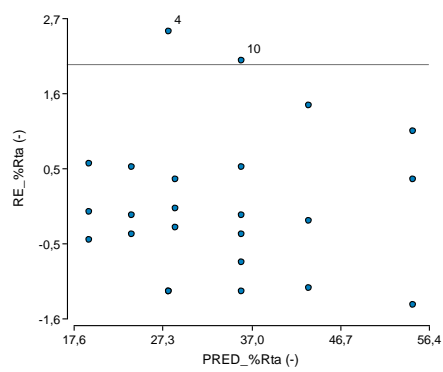
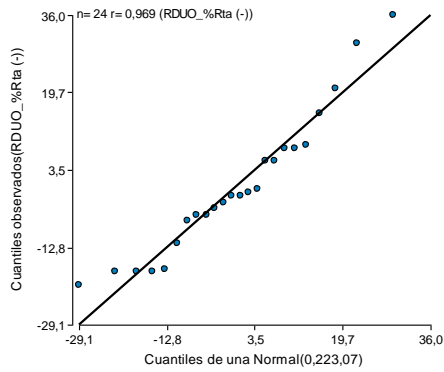
Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas usando el programa estadístico SAS (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

Levene's Test for Homogeneity of resp Variance

ANOVA of Squared Deviations from Group Means

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
gen	6	494885	82480.8	2.36	0.0870
Error	14	489224	34944.6		

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos



Porcentaje de explantes que brotan y se secan

Para cumplir con los supuestos, la variable fue transformada. Un caso desactivado (24). Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO ASENSecan	23	0,00	0,13	0,95	0,6160

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.3 – Tabla 28).

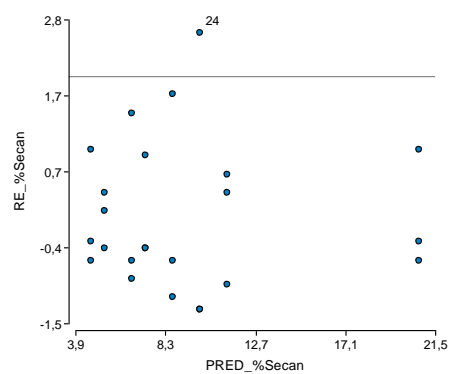
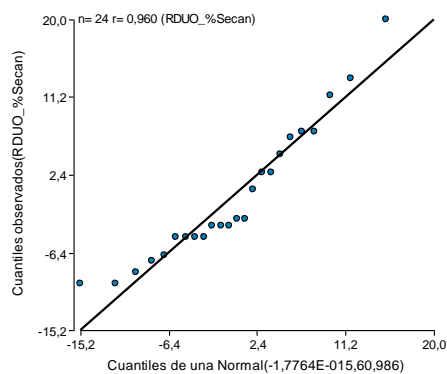
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS ASENSecan	23	0,45	0,19	73,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,06	7	0,01	1,73	0,1765
Genotipos	0,06	7	0,01	1,73	0,1765
Error	0,08	15	0,01		
Total	0,14	22			

Gráfico de QQ Plot y residuos estudentizados versus predichos



iv) Comparación entre los protocolos

Porcentaje de explantes sin crecimiento

Para cumplir con los supuestos, la variable fue transformada. Tres casos desactivados (10, 14 y 34).

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO ASENSinCrec	69	0,00	0,17	0,96	0,2010

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

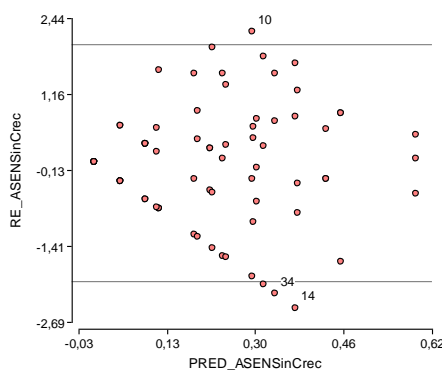
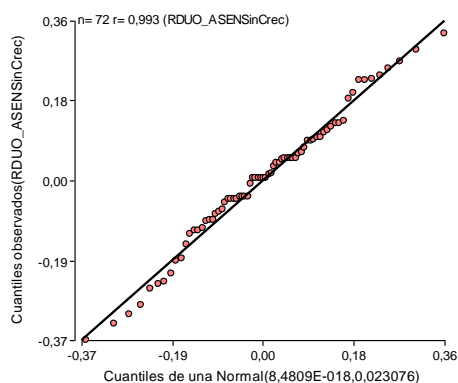
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS ASENSinCrec	69	0,46	0,18	59,53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,26	23	0,01	1,66	0,0721
Medio	0,04	2	0,02	2,83	0,0698
Genotipos	0,10	7	0,01	2,02	0,0738
Medio*Genotipos	0,14	14	0,01	1,46	0,1678
Error	0,31	45	0,01		
Total	0,57	68			

Gráficos: QQ Plot y residuos estudentizados vs predichos



Se encontraron diferencias significativas para la interacción medio por genotipo (Tabla 41).

Medias y desvíos estándar para la interacción entre medio y genotipo

Medio	Genotipo	Media			
Hemphill	Porá-Ité	0,00	3	0,09	A
Hemphill	SP 44825 (SG)	0,00	3	0,09	A
Hemphill	SP 48114	0,05	3	0,09	AB
Hemphill	Coker 312	0,05	3	0,09	AB
Morre	Coker 312	0,09	3	0,09	ABC
Hemphill	Gua-2	0,09	3	0,09	ABC
Hemphill	Gua-3	0,11	3	0,09	ABC
Pathi	Coker 312	0,12	3	0,09	ABC
Pathi	Porá	0,12	2	0,11	ABCD
Morre L.	Porá-Ité	0,18	3	0,09	ABCDE
Hemphill	Porá	0,19	3	0,09	ABCDE
Pathi	Gua-2	0,21	3	0,09	ABCDEF
Pathi	Oro Blanco 2	0,22	3	0,09	ABCDEF

Pathi	Gua-3	0,24	3	0,09	ABCDEF
Hemphill	Oro Blanco 2	0,24	3	0,09	ABCDEF
Morre	Oro Blanco 2	0,29	3	0,09	BCDEFG
Pathi	SP 48114	0,30	3	0,09	BCDEFG
Morre	SP 48114	0,31	3	0,09	CDEFG
Morre	Gua-2	0,38	3	0,09	DEFGH
Morre	Gua-3	0,43	3	0,09	EFGH
Morre	SP 44825 (SG)	0,45	3	0,09	FGH
Morre	Porá	0,50	2	0,11	FGH
Pathi	Porá-Ité	0,56	2	0,11	GH
Pathi	SP 44825 (SG)	0,59	3	0,09	H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) Hemphill: Protocolo de Hemphill et al. (1998) Morre: Protocolo de Morre et al. (1998) Pathi: Protocolo de Pathi y Tuteja (2013)

Porcentaje de explantes que forman callo

Para cumplir con los supuestos, la variable fue transformada. Tres casos desactivados (4, 46 y 60).

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO_ASENCallo	69	-0,02	0,13	0,97	0,3019

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

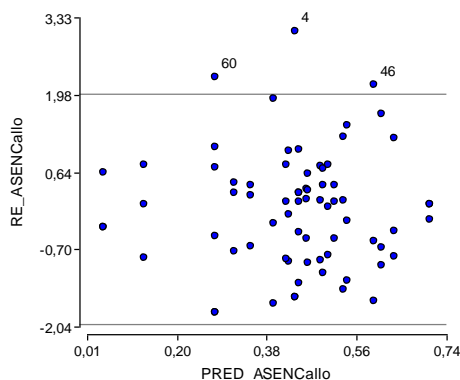
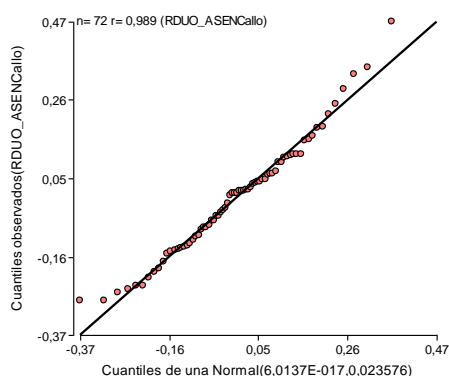
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS_ASENCallo	69	0,45	0,17	64,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,19	23	0,01	1,63	0,0807
Medio	0,01	2	0,01	1,11	0,3369
Genotipos	0,06	7	0,01	1,72	0,1277
Medio*Genotipos	0,11	14	0,01	1,62	0,1095
Error	0,22	45	4,9E-03		
Total	0,41	68			

Gráficos: QQ Plot y residuos estudentizados vs predichos



Se encontraron diferencias significativas para la interacción medio por genotipo (Tabla 42).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,25241

Error: 0,0222 gl: 45

Medio	Genotipo	MEDIA	N	E. E.	
Hemphill	Gua-2	0,05	3	0,09	A
Hemphill	Porá	0,10	2	0,11	AB
Hemphill	Coker 312	0,13	3	0,09	AB
Pathi	Gua-2	0,20	2	0,11	ABC
Hemphill	Oro Blanco 2	0,27	3	0,09	ABCD
Pathi	SP 48114	0,31	3	0,09	BCDE
Hemphill	Porá-Ité	0,35	3	0,09	BCDE
Morre	Porá	0,39	3	0,09	CDEF
Hemphill	Gua-3	0,42	3	0,09	CDEFG
Morre	Gua-3	0,43	3	0,09	CDEFG
Morre	SP 44825 (SG)	0,43	2	0,11	CDEFG
Morre	Gua-2	0,45	3	0,09	CDEFG
Pathi	Coker 312	0,45	3	0,09	CDEFG
Pathi	Gua-3	0,46	3	0,09	CDEFG
Hemphill	SP 48114	0,46	3	0,09	CDEFG
Pathi	Porá	0,49	3	0,09	DEFGH
Pathi	SP 44825 (SG)	0,49	3	0,09	DEFGH
Morre	SP 48114	0,51	3	0,09	DEFGH
Pathi	Porá-Ité	0,52	3	0,09	DEFGH
Pathi	Oro Blanco 2	0,53	3	0,09	EFGH
Morre	Oro Blanco 2	0,54	3	0,09	EFGH
Morre	Coker 312	0,61	3	0,09	FGH
Morre	Porá-Ité	0,64	3	0,09	GH
Hemphill	SP 44825 (SG)	0,71	3	0,09	H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) Hemphill: Protocolo de Hemphill et al. (1998) Morre: Protocolo de Morre et al. (1998) Pathi: Protocolo de Pathi y Tuteja (2013)

Porcentaje de explantes con brotes

Tres casos desactivados (4, 42 y 58).

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Brotes	69	-0,38	10,33	0,97	0,2883

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

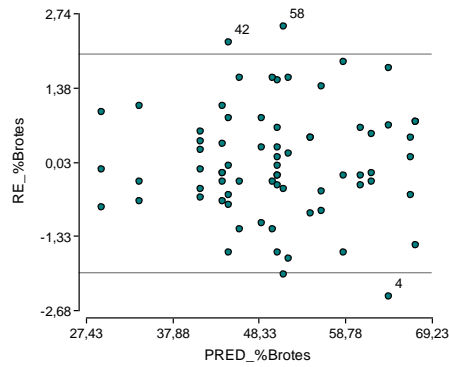
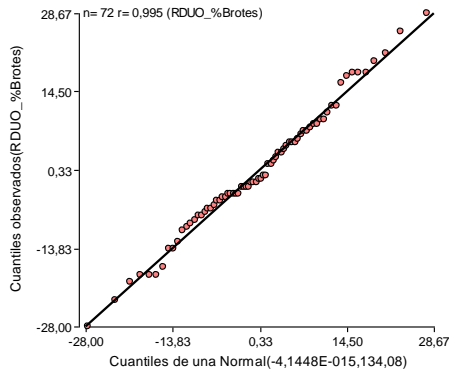
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Brotes	69	0,40	0,10	69,63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1016,85	23	44,21	1,32	0,2067
Medio	36,88	2	18,44	0,55	0,5795
Genotipos	172,41	7	24,63	0,74	0,6414
Medio*Genotipos	757,33	14	54,09	1,62	0,1105
Error	1502,74	45	33,39		
Total	2519,59	68			

Gráficos: QQ Plot y residuos estudentizados vs predichos



Porcentaje de explantes con múltiples brotes

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Mbrotos	72	0,00	3,17	0,89	<0,0001

Los residuos no se distribuyen según la normal.

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

Análisis de la varianza

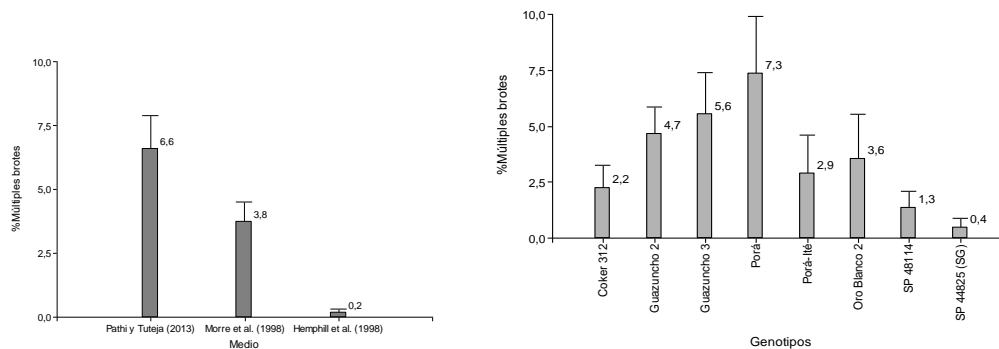
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Mbrotos	72	0,74	0,62	80,36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	332,64	23	14,46	6,04	<0,0001
Medio	142,42	2	71,21	29,73	<0,0001
Genotipos	78,22	7	11,17	4,67	0,0005
Medio*Genotipos	112,00	14	8,00	3,34	0,0009
Error	114,96	48	2,40		
Total	447,60	71			

Las varianzas no son homogéneas. Se realizó el análisis no paramétrico (Tabla 44).

Porcentaje de explantes con múltiples brotes en función del Protocolo (Izquierda) y en función del genotipo (derecha). (Sección 4.1.4)



Porcentaje de explantes que enraizan

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO % Raíz	72	0,00	8,64	0,96	0,1100

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS % Raíz	72	0,55	0,33	82,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1455,19	23	63,27	2,52	0,0035
Medio	569,33	2	284,67	11,33	0,0001
Genotipos	400,37	7	57,20	2,28	0,0437
Medio*Genotipos	485,48	14	34,68	1,38	0,1995
Error	1205,93	48	25,12		
Total	2661,11	71			

Las varianzas no son homogéneas. Se realizó el análisis no paramétrico (Tabla 45).

Relación raíz/brote

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Raíz/Brotes	72	0,00	12,97	0,98	0,8570

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

Análisis de la varianza

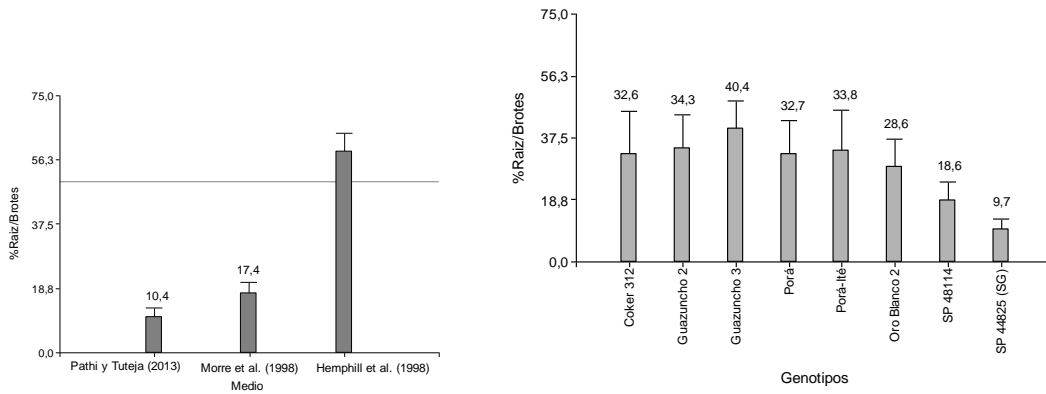
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Raíz/Brotes	72	0,48	0,23	74,38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2366,80	23	102,90	1,91	0,0292
Medio	378,39	2	189,20	3,52	0,0375
Genotipos	1165,11	7	166,44	3,09	0,0089
Medio*Genotipos	823,31	14	58,81	1,09	0,3872
Error	2581,61	48	53,78		
Total	4948,41	71			

Las varianzas no son homogéneas. Se realizó el análisis no paramétrico (Tabla 46).

Relación raíz/brote en función del Protocolo (Izquierda) y en función del genotipo (derecha). (Sección 4.1.4)



Porcentaje de respuesta negativa

Tres casos desactivados (4, 34 y 36).
Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO ASENRTa (-)	69	-0,01	0,14	0,99	0,9360

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

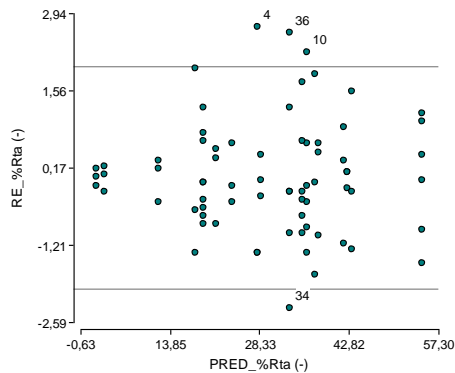
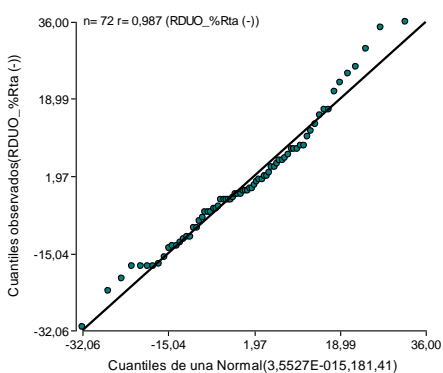
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS ASENRTa (-)	69	0,46	0,18	70,49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,22	23	0,01	1,65	0,0754
Medio	1,8E-03	2	9,2E-04	0,16	0,8560
Genotipos	0,05	7	0,01	1,12	0,3646
Medio*Genotipos	0,13	14	0,01	1,59	0,1193
Error	0,27	45	0,01		
Total	0,49	68			

Gráficos: QQ Plot y residuos estudentizados vs predichos



Porcentaje de explantes que brotan y se secan

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Secan	72	0,00	6,72	0,94	0,0097

No presenta distribución normal de residuos.

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.1.4 – Tabla 40).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Secan	72	0,68	0,53	57,86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	901,93	23	39,21	4,48	<0,0001
Medio	81,93	2	40,96	4,68	0,0139
Genotipos	161,98	7	23,14	2,65	0,0214
Medio*Genotipos	658,02	14	47,00	5,37	<0,0001
Error	419,85	48	8,75		
Total	1321,78	71			

Las varianzas no son homogéneas. Se realizó el análisis no paramétrico.

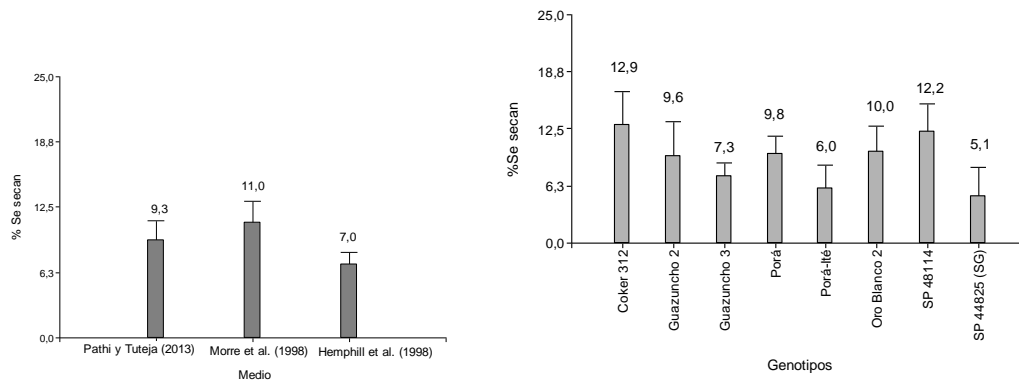
Prueba de Kruskal Wallis

Medio	Genotipos	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Hemphill	Coker 312	3	6,67	6,11	8,00	28,03	0,2029
Hemphill	Gua-2	3	4,67	4,16	6,00		
Hemphill	Gua-3	3	12,00	2,00	12,00		
Hemphill	Oro Blanco 2	3	6,00	5,29	8,00		
Hemphill	Porá	3	5,33	5,03	6,00		
Hemphill	Porá-Ité	3	8,67	13,32	2,00		
Hemphill	SP 44825 (SG)	3	4,67	1,15	4,00		
Hemphill	SP 48114	3	8,00	4,00	8,00		
Morre	Coker 312	3	23,33	7,57	20,00		
Morre	Gua-2	3	16,67	18,58	8,00		
Morre	Gua-3	3	4,67	3,06	4,00		
Morre	Oro Blanco 2	3	17,33	6,43	20,00		
Morre	Porá	3	12,67	5,03	12,00		
Morre	Porá-Ité	3	4,67	2,31	6,00		
Morre	SP 44825 (SG)	3	0,67	1,15	0,00		
Morre	SP 48114	3	8,00	10,39	2,00		
Pathi	Coker 312	3	8,67	11,72	4,00		
Pathi	Gua-2	3	7,33	5,77	4,00		
Pathi	Gua-3	3	5,33	3,06	6,00		
Pathi	Oro Blanco 2	3	6,67	9,87	2,00		
Pathi	Porá	3	11,33	6,43	14,00		
Pathi	Porá-Ité	3	4,67	6,43	2,00		
Pathi	SP 44825 (SG)	3	10,00	17,32	0,00		
Pathi	SP 48114	3	20,67	6,43	18,00		

Hemphill: Protocolo de Hemphill et al. (1998)

Morre: Protocolo de Morre et al. (1998) Pathi: Protocolo de Pathi y Tuteja (2013)

Porcentaje de explantes que brotan y se secan en función del Protocolo (Izquierda) y en función del genotipo (derecha). (Sección 4.1.4)



Si bien no se consideró como objetivo de trabajo medir algún parámetro durante el crecimiento de las plantas regeneradas a partir de ápices embrionarios, se observó en el invernáculo hasta la aparición de flores y frutos.



Figura: Plantas crecidas desde explantes de ápices embrionarios regenerados bajo los protocolos de Pathi y Tuteja (2013) y Morre et al. (1998).



Figura: Plantas crecidas desde explantes de ápices embrionarios regenerados bajo el protocolo de Hemphill et al. (1998).



Figura: Fruto y flor de plantas crecidas desde explantes de ápices embrionarios

ANEXO II

ENSAYOS DE SALINIDAD *IN VITRO*

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.4 – Tabla 48).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Germinacion	72	0,00	14,74	0,97	0,5633

Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas (Sección 3.4 – Tabla 48).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Germinacion	72	0,51	0,27	63,09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2751,98	23	119,65	2,16	0,0123
Medio	197,01	3	65,67	1,19	0,3251
Genotipos	1222,94	5	244,59	4,42	0,0022
Medio*Genotipos	1332,02	15	88,80	1,60	0,1084
Error	2658,37	48	55,38		
Total	5410,35	71			

Las varianzas no son homogéneas. Se realizó el análisis no paramétrico (Tabla 49).

Análisis por genotipo.

En cada caso se comprobó la distribución normal de los residuos y la homogeneidad de varianza.

GUAZUNCHO 2

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%Germinacion	12	0,87	0,82	18,12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7748,00	3	2582,67	17,18	0,0008
Medio	7748,00	3	2582,67	17,18	0,0008
Error	1202,67	8	150,33		
Total	8950,67	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=23,08564

Error: 150,3333 gl: 8

Medio	Medias	n	E.E.		
200 NaCl	28,00	3	7,08	A	
100 NaCl	64,00	3	7,08		B
50 NaCl	84,00	3	7,08		B C
ms	94,67	3	7,08		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

GUAZUNCHO 3

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%Germinacion	12	0,55	0,38	50,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5179,67	3	1726,56	3,24	0,0816
Medio	5179,67	3	1726,56	3,24	0,0816
Error	4264,00	8	533,00		
Total	9443,67	11			

PORÁ

Caso desactivado 200 Mm de NaCl para normalidad de los residuos.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%Germinacion	11	0,50	0,29	23,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2275,33	3	758,44	2,37	0,1561
Medio	2275,33	3	758,44	2,37	0,1561
Error	2236,67	7	319,52		
Total	4512,00	10			

PORÁ ITÉ

Variable transformada para normalidad de residuos y varianzas homogéneas.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ASENGERM	12	0,84	0,77	25,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,14	3	0,38	13,56	0,0017
Medio	1,14	3	0,38	13,56	0,0017
Error	0,22	8	0,03		
Total	1,37	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,31557

Error: 0,0281 gl: 8

Medio	Medias	n	E.E.	
200 NaCl	0,22	3	0,10	A
100 NaCl	0,50	3	0,10	A
50 NaCl	0,87	3	0,10	B
ms	1,01	3	0,10	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ORO BLANCO 2

Caso desactivado Oro Blanco 2 en 50 NaCl para homogeneidad de varianza.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%Germinacion	11	0,96	0,94	17,85

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8896,18	3	2965,39	56,10	<0,0001
Medio	8896,18	3	2965,39	56,10	<0,0001
Error	370,00	7	52,86		
Total	9266,18	10			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=14,88828

Error: 52,8571 gl: 7

Medio	Medias	n	E.E.	
200 NaCl	7,33	3	4,20	A
100 NaCl	23,33	3	4,20	B
50 NaCl	71,00	2	5,14	C
ms	71,33	3	4,20	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

SP 48114

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%Germinacion	12	0,88	0,83	18,28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5397,33	3	1799,11	19,41	0,0005
Medio	5397,33	3	1799,11	19,41	0,0005
Error	741,33	8	92,67		
Total	6138,67	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=18,12492

Error: 92,6667 gl: 8

Medio	Medias	n	E.E.	
200 NaCl	19,33	3	5,56	A
100 NaCl	54,00	3	5,56	B
50 NaCl	59,33	3	5,56	B
ms	78,00	3	5,56	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ENSAYOS DE ESTRÉS HÍDRICO *IN VITRO*

Dos casos desactivados (59 y 65)

Prueba de normalidad de los residuos (Sección 3.4 – Tabla 48).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO %Germinación	73	0,00 8,80	0,97	0,4591

LEVENE

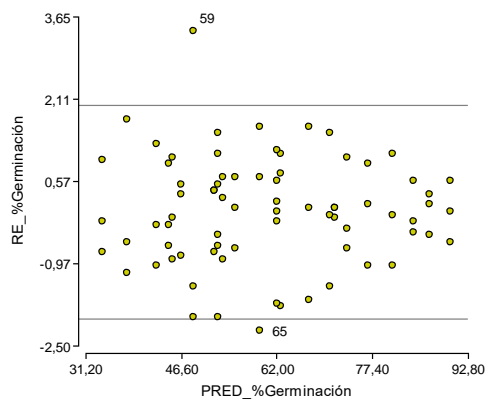
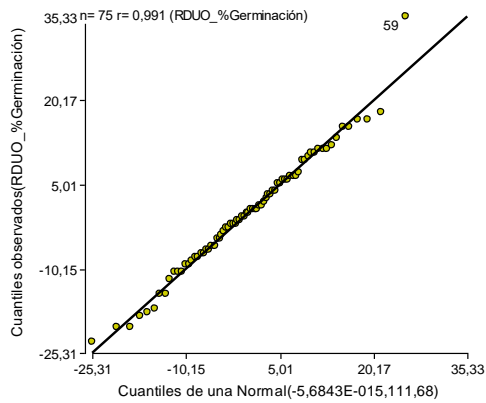
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS %Germinación	73	0,44	0,16	68,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	860,63	24	35,86	1,56	0,0947
Medio	44,57	4	11,14	0,48	0,7471
Genotipo	167,72	4	41,93	1,82	0,1399
Medio*Genotipo	612,18	16	38,26	1,66	0,0882
Error	1104,30	48	23,01		
Total	1964,93	72			

Gráficos: QQ Plot y residuos estudentizados vs predichos.



ANÁLISIS DE LA VARIANZA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%Germinación	73	0,77	0,66	17,81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	19025,55	24	792,73	6,83	<0,0001
Medio	4334,93	4	1083,73	9,33	<0,0001
Genotipo	11394,42	4	2848,60	24,53	<0,0001
Medio*Genotipo	3623,98	16	226,50	1,95	0,0382
Error	5574,67	48	116,14		
Total	24600,22	72			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=8,02433

Error: 116,1389 gl: 48

Medio	Medias	n	E.E.	
MS +80 SORBITOL	46,07	14	2,92	A
MS +80 MANITOL	60,93	15	2,78	B
MS +20 SORBITOL	61,07	15	2,78	B
MS+20 MANITOL	63,13	14	2,92	B C
MS	70,13	15	2,78	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=8,02433

Error: 116,1389 gl: 48

Genotipo	Medias	n	E.E.	
Guazuncho 3	47,20	15	2,78	A
Porá Ité	55,00	14	2,92	A B
Oro Blanco 2	55,67	14	2,92	B
Porá	59,87	15	2,78	B
Guazuncho 2	83,60	15	2,78	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=18,04235

Error: 116,1389 gl: 48

Medio	Genotipo	Medias	E.E.	
MS +80 SORBITOL	Porá Ité	31	7,62	A
MS +80 SORBITOL	Guazuncho 3	34	6,22	A
MS +80 SORBITOL	Oro Blanco 2	38	6,22	AB
MS +80 MANITOL	Guazuncho 3	42,67	6,22	AB
MS +80 MANITOL	Oro Blanco 2	44,67	6,22	ABC
MS +20 SORBITOL	Guazuncho 3	45,33	6,22	ABCD
MS +80 SORBITOL	Porá	46,67	6,22	ABCD
MS+20 MANITOL	Guazuncho 3	52	6,22	BCDE
MS+20 MANITOL	Porá	52,67	6,22	BCDE
MS +20 SORBITOL	Porá Ité	52,67	6,22	BCDE
MS+20 MANITOL	Porá Ité	53,33	6,22	BCDE
MS +20 SORBITOL	Porá	55,33	6,22	BCDEF
MS	Guazuncho 3	62	6,22	CDEFG
MS +20 SORBITOL	Oro Blanco 2	62	6,22	CDEFG
MS	Oro Blanco 2	62,67	6,22	DEFG
MS +80 MANITOL	Porá Ité	67,33	6,22	EFGH
MS	Porá Ité	70,67	6,22	EFGHI
MS+20 MANITOL	Oro Blanco 2	71	7,62	EFGHIJ
MS	Porá	71,33	6,22	FGHIJ
MS +80 MANITOL	Porá	73,33	6,22	GHIJ
MS +80 MANITOL	Guazuncho 2	76,67	6,22	GHIJ
MS +80 SORBITOL	Guazuncho 2	80,67	6,22	HIJ
MS	Guazuncho 2	84	6,22	HIJ
MS+20 MANITOL	Guazuncho 2	86,67	6,22	IJ
MS +20 SORBITOL	Guazuncho 2	90	6,22	J

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Para cada genotipo en particular se analizó la normalidad en la distribución de residuos y homogeneidad de varianza.