

Resum

En l'actualitat, pebrots, chiles i ajíes (*Capsicum* spp.) estan presents en la pràctica totalitat de les zones temperades i càlides del món. Aquest cultiu està entre les deu principals hortalisses del món i la seua popularitat es deu, en gran part, a la seua utilització gastronòmica tant per a consum en fresc com a espècia. De les cinc espècies conreades, la que cridem comunament pebrot (*Capsicum annuum*), és la més popular i econòmicament important de totes, per la qual cosa la majoria d'esforços d'investigadors i milloradors se centren en aquesta espècie. En aquest sentit, dues importants eines per a la millora dels cultius són: i) la hibridació interespecífica, per a aprofitar la variabilitat genètica de les espècies relacionades i, ii) l'escurçament del cicle generacional, ja siga per a realitzar successives autofecundacions i generar línies pures o per a realitzar retrocreuaments i transferir gens. En tots dos casos el cultiu d'embrions inmadurs podria ser de gran utilitat. En el primer, permetria sortejar la freqüent barrera postcigòtica a la hibridació interespecífica de l'avortament embrionari, mitjançant el rescat d'embrió. En el segon, permetria extraure l'embrió procedent d'un fruit inmadurs, evitant haver d'esperar la seua maduració, escurçant el cicle generacional del cultiu.

D'aquesta manera, el primer objectiu d'aquesta tesi va ser augmentar l'eficiència de la germinació *in vitro* d'embrions inmadurs del gènere *Capsicum* treballant en els següents factors: i) una àmplia diversitat d'espècies i genotips, ii) els principals estadis inmadurs de desenvolupament embrionari (globular, cor, torpede i cotiledonar primerenc) i iii) diferents combinacions de mitjà de cultiu (sales MS, sacarosa, reguladors de creixement) i la incubació en foscor. Un segon objectiu va ser avaluar i aclarir les barreres interespecífiques que existeixen entre les espècies *Capsicum* del complex *annuum-chinense-frutescens* i d'aquestes amb *C. baccatum*, valorant la utilitat d'estratègies com el rescat *in vitro* d'embrions i el creuament amb espècies pont per a la consecució de creuaments entre *C. annuum* i *C. baccatum*. Finalment, el tercer objectiu va consistir a valorar la utilitat del cultiu *in vitro* d'embrions per a escurçar el cicle generacional del pebrot comú (*C. annuum*), permetent accelerar els programes de millora d'aquest cultiu.

En aquest estudi va ser possible germinar *in vitro* i obtenir plantes desenvolupades i viables de les cinc espècies estudiades a partir de tots els estadis embrionaris, amb l'única excepció dels embrions globulars de *C. chinense*. En relació al estadí embrionari es va observar un augment gradual de l'eficiència mitjana a mesura que avançava el desenvolupament de l'embrió: globular (5%), cor (21%), torpede (37%) i cotiledonar (69%). Açò coincideix amb la literatura revisada en altres espècies, i s'explicaria per una major dependència alimentosa dels embrions precoços (etapa heteròtrofa) enfront dels avançats (etapa autòtrofa).

Respecte als mitjans de cultiu emprats, es va observar que les dosis de sacarosa (4% i 8%) va afectar notablement a l'eficiència, mentre que l'efecte de la dosi MS (1/2×MS i 1×MS) va tenir un efecte menor. Així, al contrari de les dosis de sacarosa recomanades per la literatura per a la germinació *in vitro* d'embrions precoços de diverses espècies (8-12%), nosaltres vam demostrar que nivells del 4% ofereixen la millor resposta a la germinació en tots els estadis avaluats, amb una taxa mitjana de germinació de 43%. En el cas de les sals minerals, la dosi 1/2×MS va presentar la major taxa mitjana de germinació (48 v/s 38%). En conseqüència es va decidir utilitzar la formulació de sacarosa al 4% i sals minerals a 1/2×MS per a continuar l'optimització de mitjans.

Fixats aquests paràmetres, s'avalua l'efecte dels reguladors de creixement AIA i zeatina sobre la germinació d'embrions inmadurs de quatre accessions de *C. annuum* en els quatre estadis, trobant que els reguladors a baixa dosi (0,01 mg/L) van permetre les taxes mitjanes més altes (33%), seguits del mitjà en què aquests reguladors estaven absents (24%), mentre que els reguladors a altes dosis (0,2 mg/L) van afectar negativament a les taxes de germinació, especialment en el cas de la zeatina, amb taxes extremadament baixes, compreses entre 0% i 6% en tots els genotips i estadis de desenvolupament.

Finalment, treballant sobre el mitjà amb baixos nivells (0,01 mg/L) de AIA i zeatina, la incubació en foscor durant un període de cinc dies va mostrar ser, en tots els estadis, un factor positiu en l'eficiència de la germinació *in vitro* d'embrions de pebrot (*C. annuum*), destacant els estadis cor, en el qual la taxa de germinació va augmentar d'un 17% a un 27% i, especialment el estadi globular, la taxa del qual de germinació mitjana va augmentar d'un 3% a un 22%. Si bé aquestes taxes de germinació poden semblar baixes, realment ha de ser considerada un èxit doncs fins ara no s'havia descrit la germinació *in vitro* dels embrions més primerencs i delicats

(globulars) de *Capsicum*. Així mateix, les taxes registrades per al següent estadi (cor) són considerablement més altes que les descrites fins ara per altres autors. A més, en certes hibridacions interespecífiques, l'avortament embrionari ocorre en un estadi primerenc, per la qual cosa és necessari per als milloradores disposar de protocols que permeten rescatar l'embrió en qualsevol estadi, inclòs els més precoços. A manera de resum, la millor combinació dels factors estudiats per a les màximes taxes de germinació seria: sacarosa 4%, $\frac{1}{2} \times MS$ (alternativament $1 \times MS$ per als embrions globulars de determinats genotips), AIA a 0,01 mg/L, zeatina a 0,01 mg/L i incubació inicial de 5 dies sota fosc.

Respecte a la transferència de material genètic d'interès des de *C. baccatum* a *C. annuum* hem validat ambdues estratègies estudiades. D'una banda, en l'estratègia del pont genètic hem definit a *C. chinense* com l'espècie pont ideal, mentre que hem descartat a *C. frutescens* per les anomalies dels híbrids obtinguts i/o la seua baixa creuabilitat amb *C. annuum* i/o *C. baccatum*. Així hem establert, pel nombre de combinacions obtingudes i la viabilitat de pol·len de l'híbrid a tres vies, el següent model per a la consecució del creue pont híbrid (o híbrid a tres vies): [*C. baccatum* (♀) × *C. chinense* (♂)](♀) × *C. annuum* (♂). D'altra banda, en l'estratègia de l'encreuament directe i rescat d'embrions, a causa de: i) l'enduriment prematur del endosperm –el qual complica l'extracció de l'embrió– ii) el baix nombre de combinacions híbrides i iii) la impossibilitat d'aconseguir BC1 (retrocreuament 1), nosaltres suggerim el següent model per a la consecució de poblacions BC1: [*C. annuum* (♀) × *C. baccatum* (♂)](♀) × *C. annuum* (♂), aplicant la tècnica del rescat a l'embrió F1.

Respecte a l'escurçament de cicle generacional, el nostre estudi va demostrar que en pebrot es pot realitzar un màxim de dues generacions a l'any, on la suma dels cicles convencionals Tardor-Hivern (TH) + Primavera-Estiu (PE) va ascendir a un rang de 264 i 321 dies en tipus varietals com Guindilla i Bola, respectivament. En contrast, el cultiu d'embrions va permetre escurçar la suma dels cicles TH + PE a un rang de 183 i 240 dies per a les mateixes accessions. Així, aquests resultats possibiliten aconseguir almenys tres generacions per any en *C. annuum* (fins a 4 en tipus Guindillas o Cornicabra), permetent desenvolupar programes de millora que requerisquen F8-F10 en dos o tres anys.

Mitjançant aquest estudi hem aconseguit optimitzar la tècnica del cultiu d'embrions inmadurs de pebrot, alhora que hem validat aquesta tècnica en dues importants aplicacions

directes de millora vegetal, com són la hibridació interespecífica i l'escurçament de cicle generacional, deixant disponible per als milloradores de pebrot una informació de gran utilitat per al desenvolupament dels seus programes de millora.