

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

**EFEECTO DE LAS AUXINAS Y CITOCININAS EN LA
INDUCCIÓN DE CALLO Y ORGANOGÉNESIS A PARTIR
DEL CULTIVO DE ANTERAS DE *Solanum quitoense* L.**

Autora: Bach. Karina Medaly Valdivia Leon

Asesor: Dr. Carlos Eduardo Millones Chanamé

Co-Asesora: Dra. Ernestina Rosario Vásquez Castro

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2024

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres Eduar Valdivia y Esther Leon, a mis hermanas Yhoneire Valdivia y Grace Valdivia Por su gran amor , su confianza, sus palabras de ánimo y su apoyo incondicional.

A todos mis familiares.

A mis compañeras de la Escuela Profesional de Agronomía de la UNTRM, por su apoyo motivacional, que resultó fructífero en el desarrollo de la presente investigación.

Karina Medaly Valdivia Leon.

AGRADECIMIENTO

A Dios por la vida y la salud. Asimismo, agradezco a mis padres y hermanas por su apoyo incondicional lo que permitió hacer realidad la culminación de esta investigación.

A la Universidad Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, donde tuve la oportunidad de adquirir valiosos conocimientos gracias a la dedicación y entrega de los maestros de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias. Su compromiso con la enseñanza a dejado una huella imborrable en mi formación.

Al Dr. Carlos Eduardo Millones Chanamé y la Dra. Ernestina Rosario Vásquez Castro, por su excelente labor como asesor y co-asesora, durante todo el proceso de la investigación. Su guía y apoyo han sido invaluable en cada etapa de este trabajo.

Al SNIP Project N° 312252 Al” Creación del servicio de un Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, región Amazonas”- FISIOBVEG por brindarme las facilidades para la ejecución de parte del estudio correspondiente al cultivo de anteras in vitro al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) por cederme un área en el vivero para el manejo de plantas donadoras de botones florales de *S. quitoense*.

Al Ing. Raul Vargas y a la Bach. Sheyla Figueroa, por los avances en el cultivo de anteras de *s. quitoense*, que fueron fundamentales para el desarrollo del presente estudio.

Karina Medaly Valdivia Leon.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE
MENDOZA DE AMAZONAS**

Ph.D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA

RECTOR

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES

VICERRECTOR ACADÉMICO

Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOZA

VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN

Dr. ERICK ALDO AUQUIÑIVIN SILVA

DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS

VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X) / Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada EFECTO DE LAS AUXINAS Y CITOCININAS EN LA INDUCCIÓN DE CALLO Y ORGANOGÉNESIS A PARTIR DEL CULTIVO DE ANTERAS DE Solanum quitoense L. ; del egresado Karina Medaly Valdivia Leon de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 31 de Julio de 2024.

Firma y nombre completo del Asesor

Carlos Eduardo Millones Okaricú



VISTO BUENO DE LA CO – ASESORA DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada EFEECTO DE LAS AUXINAS Y CITOCININAS EN LA INDUCCIÓN DE CALLO Y ORGANOGÉNESIS A PARTIR DEL CULTIVO DE ANTERAS DE Solanum quitoense L.; del egresado Karina Medaly Valdivia Leon de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma de esta Casa Superior de Estudios.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 31 de Julio de 2024.

Firma y nombre completo del Asesor

Dra. ERNESTINA ROSARIO VÁSQUEZ CASTRO

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



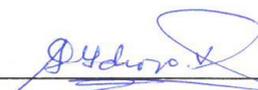
Ph.D. Juan Carlos Guerrero Abad

PRESIDENTE



Dr. Jorge Alberto Condori Apfata

SECRETARIO



Mg. Guillermo Idrogo Vásquez

VOCAL

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



ANEXO 3-Q

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

EFECTO DE LAS AUXINAS Y CITOCININAS EN LA INDUCCIÓN DE CALLO Y ORGANOGÉNESIS A PARTIR DEL CULTIVO DE ANTERAS DE *Sobnum quitense* L.

presentada por el estudiante ()/egresado (X) Karina Medaly Valdivia Leon

de la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma

con correo electrónico institucional 7015648661@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene 24 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (/ igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- b) La citada Tesis tiene _____ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 11 de 09 del 2024

Cardori A.
SECRETARIO

[Signature]
PRESIDENTE

[Signature]
VOCAE

OBSERVACIONES:

.....
.....

REPORTE TURNITIN

EFFECTO DE LAS AUXINAS Y CITOCININAS EN LA INDUCCIÓN DE CALLO Y ORGANOGÉNESIS A PARTIR DEL CULTIVO DE ANTERAS DE *Solanum quitoense* L.

INFORME DE ORIGINALIDAD

24% INDICE DE SIMILITUD	23% FUENTES DE INTERNET	11% PUBLICACIONES	10% TRABAJOS DEL ESTUDIANTE
-----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------	---------------------------------------

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	5%
2	repositorio.untrm.edu.pe Fuente de Internet	2%
3	Submitted to Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas Trabajo del estudiante	2%
4	livros01.livrosgratis.com.br Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	1%
6	ri.uaemex.mx Fuente de Internet	1%
7	www.repositorio.unasam.edu.pe Fuente de Internet	1%


Jesus Carlos Guerrero

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-S

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 24 de octubre del año 2024, siendo las 15:00 horas, el aspirante: Bach: Karina Medaly Valdivia León, asesorado por Dr. Carlos Eduardo Millones Chaname defiende en sesión pública presencial () / a distancia () la Tesis titulada: Efecto de los Auxinas y Citoquininas en la inducción de callo y organogénesis a partir del cultivo de anteras de Solanum quitoense L., para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Dr. Juan Carlos Guerrero Soto

Secretario: Dr. Jorge Alberto Condori Apfata

Vocal: Msc. Guillermo Ichrozo Vásquez



Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado () por Unanimidad () / Mayoría () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 16:15 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

Condori A.
SECRETARIO

[Firma]
PRESIDENTE

[Firma]
VOCAL

OBSERVACIONES:

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	iii
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS	iv
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS.....	v
VISTO BUENO DEL CO – ASESORA DE TESIS.....	vi
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS.....	vii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	viii
REPORTE TURNITIN	ix
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS	x
ÍNDICE.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	17
II. MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1 Lugar de ejecución	20
2.2 Material de estudio	20
2.2.1 Manejo de las plantas donadoras de anteras de <i>S. quitoense</i> Instalación de las plantas.....	21
2.3 Procedimiento para la inducción de callo en anteras de <i>S. quitoense</i> L.....	22
2.3.1 Elaboración de medios de cultivo para la inducción de callos	22
2.3.2 Colecta de botones florales de <i>S. quitoense</i> L.	22
2.3.3 Determinación del estado uninucleado de las microsporas	23
2.3.4 Desinfección de los botones florales de <i>S. quitoense</i> L. y establecimiento en sistema de refrigeración.....	24
2.3.5 Variables evaluadas en la inducción de callo.....	26
2.4 Regeneración de órganos a partir de callos inducidos.....	26
2.4.1 Preparación de medios de regeneración de órganos	26
2.4.2 Siembra de callos en medio de regeneración	27
2.4.3 Variables evaluadas en la regeneración de órganos.....	28

2.5 Análisis de datos.....	28
2.5.1 Efecto de las auxinas y citocininas en la inducción de callo	28
III. RESULTADOS	30
3.1 Estado de desarrollo de las microsporas.....	30
3.2 Efecto de diferentes dosis de ANA Y 2-iP en la inducción de callo a partir de anteras de <i>S. quitoense</i> L.	30
3.3 Diámetro de callo a partir de anteras de anteras de <i>S. quitoense</i> L	33
3.4 Regeneración de órganos en callos de anteras de <i>S. quitoense</i>	34
IV. DISCUSIÓN	36
4.1 Respuesta de las anteras de <i>S. quitoense</i> a medios de inducción de callo.....	36
4.2 Regeneración de los callos inducidos.....	37
V. CONCLUSIONES	39
VI. RECOMENDACIONES	40
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
VIII. ANEXOS	46
ANEXO 1.....	46
ANEXO 2.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamiento y reguladores de crecimiento para la inducción de callos.....	22
Tabla 2. Tratamiento y reguladores de crecimiento para el medio de regeneración de órganos.....	27
Tabla 3. Diseño para evaluar la inducción de callos a partir del cultivo de anteras de <i>S. quitoense</i> L.....	29
Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de inducción de callos	32
Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) para el diámetro de callo.	33
Tabla 6. Respuesta de los callos inducidos a partir del cultivo de anteras de <i>S. quitoense</i> L..	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Población de plantas donadoras del material biológico	20
Figura 2. Colecta de botones florales de <i>Solanum quitoense</i> L.....	23
Figura 3. Determinación del estadio uninucleado de las microsporas	23
Figura 4. Desinfección e instalación de los botones florales	22
Figura 5. Establecimiento de anteras en medio de inducción de callo.	26
Figura 6. Preparación de los medios base para inducción de órganos	24
Figura 7. Siembra de callos en medio de inducción de órganos	28
Figura 8. Tamaño de botón floral y estado de desarrollo de las microsporas en botones florales de <i>S. quitoense</i>	27
Figura 9. Botones florales de 12 a 14 mm y la respuesta de anteras al medio de inducción	31
Figura 10. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo a partir de anteras de <i>S. quitoense</i>	29
Figura 11. Efecto de los reguladores de crecimiento en el diámetro de callos a partir de anteras de <i>S. quitoense</i>	31

RESUMEN

La naranjilla (*S. quitoense* L.), es una solanácea que está siendo cultivada para el aprovechamiento del fruto por poseer sabor y aroma distintivo. Sin embargo, poco se sabe sobre el uso de la biotecnología vegetal para implementar procedimientos de multiplicación *in vitro* que permitan su conservación. En ese sentido, el uso de métodos biotecnológicos como el cultivo de anteras *in vitro* facilita la obtención de plantas doble haploides que en futuro puedan ser empleadas en el mejoramiento genético de esta especie. La Finalidad de la presente investigación es evaluar el efecto de las auxinas y citocininas en la inducción de callo y regeneración de órganos a partir del cultivo de anteras de *S. quitoense*. Para determinar las diferentes dosis de ANA y 2-iP en la inducción de callos se realizó cuatro tratamientos con ocho repeticiones, donde la dosis de ANA (1.5 y mg/L) más 2-iP (1 mg/L) en un medio MS registraron el mayor porcentaje de inducción con 41% y diámetro de callo de 18mm a los 28 días posteriores a la instalación. Seguidamente, los callos fueron transferidos a un medio MS con diferentes concentraciones de ANA, 2-iP, TDZ ,BAP ,Kinetina y Zeatina. Pese a que no se logró evidenciar un efecto de las auxinas y citoquininas sobre la regeneración de órganos, la combinación de ANA (0.5 y 1 mg/L) más Zeatina (0.25 mg/L) en medio MS, sí tuvo en efecto positivo en la generación de callos con las mejores características, semicompacto de color verde. Esta información permitirá a los gestores de la conservación generar una línea base de información de cara a la conservación *in vitro* de esta especie.

Palabras claves: *Solanum quitoense* L., Cultivo de anteras, Inducción de callo, Reguladores de crecimiento.

ABSTRACT

Naranjilla (*S. quitoense* L.) is a solanaceae that is being cultivated for its distinctive flavor and aroma. However, little is known about the use of plant biotechnology to implement *in vitro* multiplication procedures that allow its conservation. In this sense, the use of biotechnological methods such as *in vitro* anther culture facilitates the obtaining of double haploid plants that in the future can be used in the genetic improvement of this species. The present research was developed to evaluate the effect of auxins and cytokinins in the induction of callus and organ regeneration from anther culture of *S. quitoense*. To determine the different doses of ANA and 2-iP in callus induction, four treatments with eight replicates were carried out, where the dose of ANA (1.5 and mg/L) plus 2-iP (1 mg/L) in MS medium registered the highest percentage of induction with 41% and callus diameter of 18 mm at 28 days after installation. The callus were then transferred to MS medium with different concentrations of ANA, 2-iP, TDZ, BAP, Kinetin and Zeatin. Although there was no evidence of an effect of auxins and cytokinins on organ regeneration, the combination of ANA (0.5 and 1 mg/L) plus Zeatin (0.25 mg/L) in MS medium did have a positive effect on the generation of callus with the best characteristics, semi-compact green color. This information will allow conservation managers to generate a baseline of information for *in vitro* conservation of this species.

Keywords: *Solanum quitoense* L., Anther culture, Callus induction, Growth regulators

I. INTRODUCCIÓN

El lulo o naranjilla (*Solanum quitoense* L.), especie de la familia Solanácea, es una fruta nativa originaria de las zonas andinas de Colombia, Ecuador y Perú con potencial considerable para el mercado internacional de Europa y Norte América, debido a sus cualidades organolépticas es empleada para la elaboración de “refrescos, néctar, conservas, entre otros” (Criollo et al., 2014; Ramírez et al., 2018). Asimismo, su contenido de vitaminas A y C le confiere propiedad antioxidante y regeneradora de tejidos, además de ser un material atractivo para la industria agroalimentaria y farmacéutica por presentar ácidos clorogénicos, compuestos fenólicos y aminos bioactivos (Morillo et al., 2019; Obregón et al., 2023).

Vigil, (2021) destaca como principales productores de naranjilla son Colombia , Ecuador, Perú y Venezuela , sin embargo, la producción en Ecuador se ha visto reducida por el deficiente manejo de plagas y enfermedades, el desconocimiento de variedades resistentes por falta de programas de mejoramiento genético en esta especie (Revelo & Sandoval, 2003). En Perú, se ha incrementado la comercialización del fruto de naranjilla y de ser cultivado en huertas de manera tradicional se está buscando tecnificar e incrementar su cultivo, un claro ejemplo de ello es Oxapampa donde la naranjilla se ha convertido en uno de los principales frutos para la elaboración de néctares y mermeladas (Talavera, 2022).

La biotecnología vegetal ha proporcionado herramientas útiles para la mejora de plantas, incluyendo el cultivo *in vitro* de anteras, un método empleado para generar plantas haploides y dihaploides de gran importancia en los programas de mejoramiento, ya que permite lograr líneas homocigotas en una sola generación (Adhikari & Kang, 2017). Esta técnica de cultivo se inicia colocando las anteras en un medio con altas concentraciones de auxinas, promoviendo la formación de callos al estimular el proceso de mitosis en las microsporas, los callos pueden ser visible trascurridos los 20 días de la instalación; cuando alcanzan 2 mm de longitud, se transfieren a un medio con menor concentración de auxinas, pero alto en citoquininas (Letini et al., 1997).

Las auxinas juegan un papel muy importante en la división celular, el crecimiento de las células y su diferenciación; a su vez, pueden inducir la regeneración de estructuras vegetales como, la raíz, el tallo y la hoja. Además, promueve la génesis de raíces en

tejidos vegetales recién cortados, la elongación y formación de tallos. En la biotecnología vegetal, el ácido α -naftaleacético (ANA) es una de las auxinas más utilizadas (Alcántara et al., 2019). La auxina ANA promueve el alargamiento y la división celular, además facilita la diferenciación de los tejidos, lo que conduce a una mejor inducción de callos (Vega, 2016). Por otro lado, las citoquininas estimulan la diferenciación de las células de los microcallos hasta regenerar una planta completa (Letini et al., 1997). Para Pereira et al., (2007) las citoquininas Bencilaminopurina (BAP), Thidiazuron (TDZ) y 2 -isopentanoladenina (2-iP), fomentan la regeneración de órganos, sin embargo TDZ además permite la formación de más brotes. La zeatina (Z), la kinetina (KIN) y el BAP son las citocininas más utilizadas en el cultivo de anteras de solanáceas; sin embargo, el 2-iP se aplica ampliamente en el cultivo *in vitro* de diversas especies vegetales, incluyendo el cultivo de anteras de yuca donde KIN y el 2-iP lograron promover la regeneración de plantas en un menor tiempo (Caballero, 2010) y en la micropropagación de arandano el 2-iP estimulo el crecimiento y la multiplicación de células vegetales (Aquiye, 2020).

En *S. quitoense*, a la fecha no se han registrado trabajos concernientes al cultivo de anteras, sin embargo, en otras especies de esta familia se han desarrollado investigaciones evaluando diferentes tipos y proporciones de auxinas y citocininas en el cultivo de anteras de los géneros *Capsicum* y *Solanum*. En *Capsicum pubescens* el empleo de 2,4-D y kinetina, ambas en las concentraciones de 0.1 mg/L en el medio de inducción, se lograron inducir embriones somáticos (Hernández, 2019); igualmente, en *C. annuum* L. el empleo de mayor concentración de KIN y 2,4-D (1 mg/L de cada uno) se indujo bajo porcentaje de callo embriogénico (2%) (Vélez et al., 2010). En el cultivo de anteras del género *Solanum*, se llevó a cabo un estudio por Hernández & Díaz (2019), sobre el uso de reguladores de crecimiento en el cultivo de anteras de *S. goniocalyx*, se utilizó una concentración de 0.5 mg/L de zeatina y 0.5 mg/L de 2,4-D, lo que resultó en un aumento significativo en la producción de callos embriogénicos. Sin embargo, se registró una alta predisposición de las anteras a la oxidación.

Por otro lado, el estadio uninucleado tardío se identificó como el más adecuado para iniciar el proceso de androgénesis (Hernández & Díaz, 2019). En anteras de *S. iopetalum* el empleo de AIA + BAP (1 mg/L de cada uno) se logró 28% de inducción de callos al transferir estos callos a medios destinados a la regeneración de órganos,

utilizando una concentración de 0.05 mg/L de AIA y BAP y 0.1 mg/L de ácido giberélico (AG3), se lograron inducir raíces adventicias en un 40% de los callos, así como la aparición de algunas plántulas (Pacheco et al., 2003). En el cultivo de anteras de *Physalis peruviana* L., los medios de cultivo B5 (Gamborg et al., 1968) y LS (Linsmaier & Skoog, 1965), sin la incorporación de fitorreguladores, demostraron ser efectivos para la formación de callos y la regeneración de órganos a partir de estas estructuras (Mállap et al., 2022). Según Vargas (2023), la adición de ANA ya sea solo o combinado con TDZ, a los hipocótilos, hojas cotiledonares y yemas terminales de *S. quitoense* L., resultó en la formación de callos tanto friables como compactos. En el cultivo de anteras de yuca, Alva (2023) reportó que la formación de raíces adventicias se logró como resultado de una respuesta organogénica provocada por la aplicación de 1 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP.

El uso de distintas cantidades de auxinas y citocininas presenta efectos variables en las especies de la familia Solanácea. Por ello, es esencial llevar a cabo investigaciones sobre los requerimientos óptimos de reguladores de crecimiento para lograr la inducción de callo y generación de órganos a partir del cultivo de anteras. Uno de los desafíos que enfrentan los investigadores es la presencia de especies recalcitrantes que no responden a los procesos de organogénesis (Rueda, 2019). Las únicas especies de Solanácea que se consideran no recalcitrantes son *S. tuberosum*, *N. tabacum* y algunos ecotipos de *Capsicum* (Parra, 2015).

Considerando la relevancia de la especie en estudio, el objetivo general de la presente investigación fue evaluar el efecto de las auxinas y citocininas en la inducción de callo y la regeneración de órganos a partir del cultivo de anteras de *S. quitoense* L. Los objetivos específicos fueron: a) determinar la concentración de ácido indolacético (ANA) y 2-isopentiladenina (2-iP) para la inducción de callo; y b) determinar la concentración de ácido naftaleacético (ANA), bencilaminopurina (BAP), zeatina, kinetina (KIN) y thidiazurón (TDZ) en la regeneración de órganos a partir de los callos inducidos. Los resultados de esta investigación permitirán el desarrollo de un protocolo para el cultivo de anteras de *S. quitoense* L., lo que contribuirá significativamente a los programas de mejoramiento de esta especie, facilitando en el futuro la creación de variedades más resistentes y productivas.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Lugar de ejecución.

La presente investigación se realizó en el área de vivero del INDES-CES con coordenadas $-6.233714^{\circ}\text{S}$, $-77.851903^{\circ}\text{W}$ y una altitud de 2365 msnm, para el manejo de plantas donadoras de anteras y el cultivo *in vitro* de anteras se ejecutó en el laboratorio de biología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM) con coordenadas $-6.233096^{\circ}\text{S}$, $-77.854362^{\circ}\text{W}$ y una altitud de 2390.

2.2 Material de estudio

El material biológico empleado en el presente estudio estuvo constituido por las anteras contenidas en botones florales de plantas de naranjilla (*S. quitoense* L.) de ocho meses de edad sembradas en macetas de 50 litros de capacidad, instaladas en los viveros del INDES-CES, Chachapoyas, Perú (Figura 1).

Figura 1.

Población de plantas donadoras del material biológico



2.2.1 Manejo de las plantas donadoras de anteras de *S. quitoense* Instalación de las plantas.

Siembra

Se realizó la siembra en macetas de 50 L, con sustrato constituido por tierra agrícola, cascarilla de arroz y materia orgánica en proporción (2:0.5:1).

Labores culturales.

Fertilización. La primera fertilización se realizó durante la aparición de las primeras inflorescencias y la segunda aplicación se realizó después de las podas al finalizar la colecta de botones florares, agregando 10 g de MOLIMAX papa sierra (NPK 15-25-15 + 2MgO +3S) por maceta.

Riego. se realizaron dos veces por semana en época de verano y una vez por semana en época de invierno.

Control de malezas. Se realizo manualmente, retirando de las macetas y también de la superficie del vivero ,para evitar que se conviertan en hospederos de plagas.

Control fitosanitario. Para que la planta produzca inflorescencias de calidad , el monitoreo de plagas y enfermedades se realizó cada semana logrando encontrar como principal plaga la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), la que se controló con trampas amarillas untadas con aceite vegetal comercial (Tejada, Escobal, & Cervantes, 2014). También hubo presencia de marchitez para ello se realizó eliminación de las plantas afectadas y como tratamiento preventivo se aplicó Kurador (Carbendazim+Tebuconazole) fungicida sistémico.

Podas. Esta actividad cultural se realizó con la finalidad de eliminar las hojas viejas, dar mayor aireación de la planta y también al finalizar la colecta de botones de una determinada rama. Seguidamente después de haber realizado el corte bajo una rigurosa asepsia se unto una pasta compuesta por fungicida disuelto en alcohol para evitar contaminación.

2.3 Procedimiento para la inducción de callo en anteras de *S. quitoense* L.

2.3.1 Elaboración de medios de cultivo para la inducción de callos.

Para la etapa de inducción de callo a partir de anteras de *S. quitoense* se prepararon medios de cultivo para este fin, empleando las sales basales y vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962) como la Tiamina, Piridoxina, Ácido nicotínico a 0.5 mg/L y Glicina a 2 mg/L, mio-inositol 100 mg/L, sacarosa 3% y el pH fue ajustado a 5.8. Las combinaciones de reguladores de crecimiento se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

Tratamiento y reguladores de crecimiento para la inducción de callos

TRATAMIENTO	REGULADORES DE CRECIMIENTO
T1	ANA (1mg/L) + 2-iP (1mg/L)
T2	ANA (2mg/L) + 2-iP (1mg/L)
T3	ANA (5mg/L) + 2-iP (1mg/L)
T4*	ANA (5mg/L) + 2-iP (1mg/L)

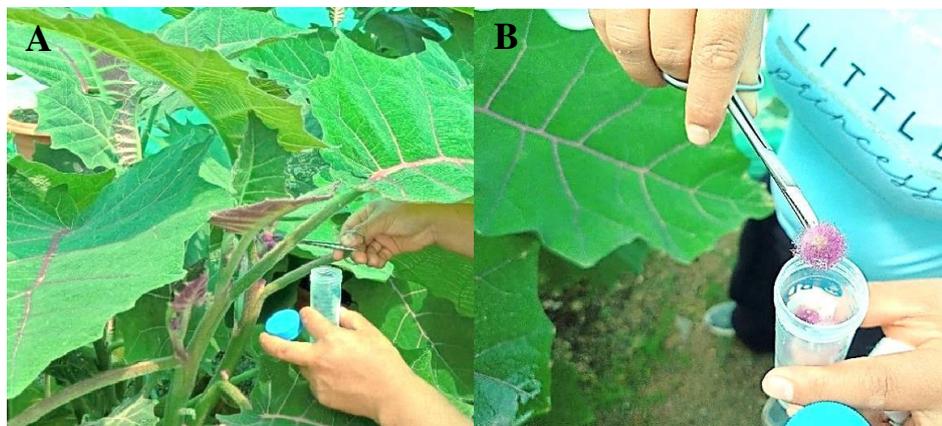
ANA = ácido naftaleacético, 2-iP = 2-isopenteniladenina. *Fuente de carbono maltosa 3.

2.3.2 Colecta de botones florales de *S. quitoense* L.

La colecta de botones florales se efectuó en las primeras horas de la mañana, realizando un corte en la base del botón con ayuda de una tijera quirúrgica curva punta fina (Figura 2A). Los botones colectados fueron colocados en tubo Falcon de 50 ml con solución de ácido cítrico al 0.3% (Figura 2B). Los tubos fueron transportados al laboratorio en caja térmica de poliestireno con gel pack refrigerante para mantener una temperatura de 4°C.

Figura 2.

Colecta de botones florales de Solanum quitoense.

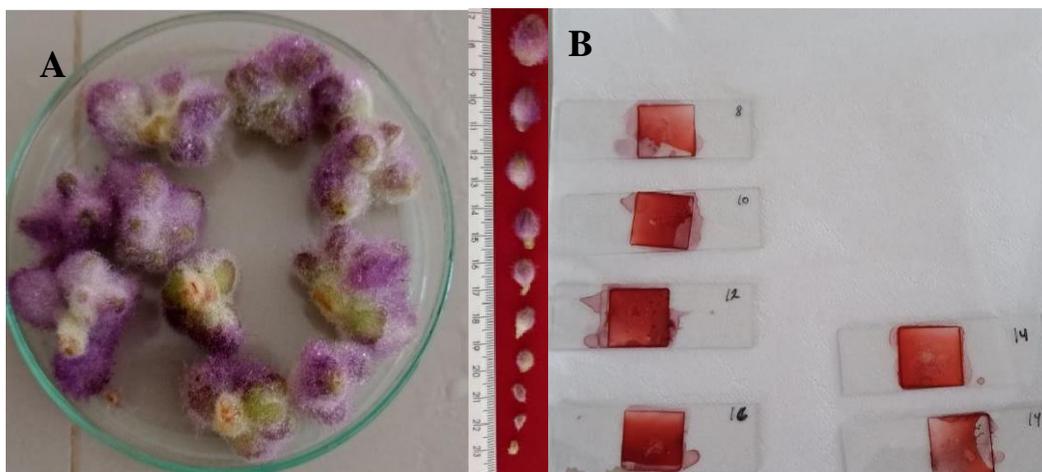


2.3.3 Determinación del estado uninucleado de las microsporas

Para determinar el estado uninucleado de las microsporas se utilizaron botones de *S. quitoense* de diferentes tamaños (Figura 3A), los cuales fueron sanitizados en una solución de lejía comercial al 5% (Clorox), durante 15 minutos seguidamente se realizó la extracción de anteras las cuales fueron seccionadas y colocadas en láminas portaobjetos y coloreados con orceína acética 1% (Figura 3B) y finalmente fueron presionadas para ser observadas bajo un microscopio binocular (Leica DM500) mediante la técnica de squash (Marcela, et al 2010).

Figura 3.

Determinación del estadio uninucleado de las microsporas.



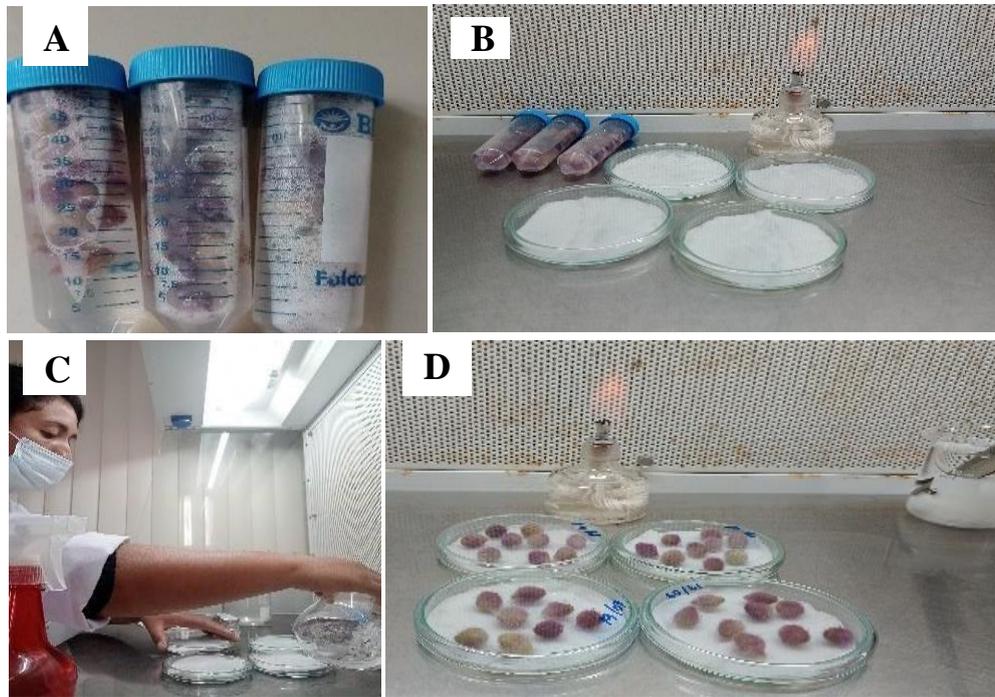
2.3.4 Desinfección de los botones florales de *S. quitoense* L. y establecimiento en sistema de refrigeración.

La desinfección de los botones se realizó en el laboratorio, para ello, se eliminó el ácido cítrico de los tubos Falcón enjuagando con agua corriente. Posteriormente se adicionó lejía comercial Clorox al 5% y detergente. Los tubos fueron agitados y dejados en reposo durante cinco minutos. Transcurrido el tiempo, se hicieron tres lavados empleando agua corriente, y finalmente, se agregó ácido cítrico al 1% hasta cubrir los botones dejando en reposo por 10 minutos (Figura 4A).

En la cámara de flujo que había sido desinfectada previamente y manteniendo la asepsia, se sumergieron los botones en alcohol al 70° durante un minuto y se enjuagaron con agua destilada estéril. Después de este enjuague, se incorporó a cada tubo una solución de lejía Clorox al 10% junto con 2 gotas de Tween. A los 15 a 20 minutos (Figura 4B), se repitió el enjuague con agua destilada estéril en tres ocasiones. A continuación, se aplicó una solución estéril de ácido cítrico al 0.1% durante 10 minutos. Finalmente, los botones florales se distribuyeron en placas Petri con un sistema diseñado para mantener la humedad (Figura 4C y 4D), se sellaron herméticamente con plástico transparente, se cubrieron con papel aluminio y se colocaron en refrigeración a 4°C durante tres días. Después de tratar las anteras en frío, se trasladaron a los medios destinados a la inducción de callo de acuerdo con el tratamiento asignado.

Figura 4.

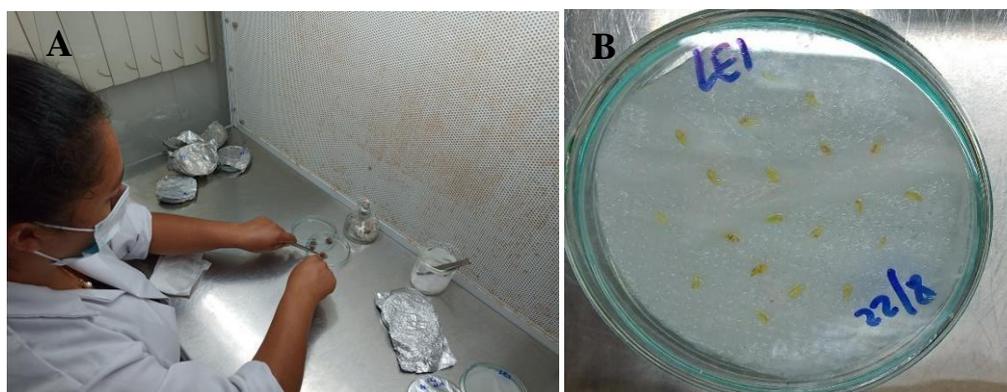
Desinfección e instalación de los botones florales.



La siembra de las anteras se realizó en un ambiente libre de contaminantes utilizando una cámara de flujo que había sido desinfectada previamente (Figura 4a). Las anteras se extrajeron con pinzas y escalpelos, eliminando los verticilos envolventes del botón floral (Figura 4b). Cada antera se depositó en una placa Petri que contenía un medio de inducción formado por auxinas y citocininas, según lo especificado en la Tabla 1 y (Figura 4c), colocando 20 anteras por placa (Figura 5d). Posteriormente, las placas se sellaron de manera hermética con plástico transparente y colocadas en una estufa para ser incubadas a 26°C durante un periodo de 4 a 5 semanas.

Figura 5.

Establecimiento de las anteras en medio de inducción de callo.



2.3.5 Variables evaluadas en la inducción de callo

Porcentaje de inducción de callos.

La evaluación de esta variable se llevó a cabo a los 21 días después de la instalación de las anteras en la placa Petri con el medio de inducción. Para calcular el porcentaje de inducción, se tomó el número de anteras que produjeron callo y se dividió entre el total de anteras en la placa Petri, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inducción de callo} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de anteras que indujeron callo}}{\text{Total de anteras cultivadas in-vitro}} * 100$$

Tamaño de callos.

Esta variable fue determinada a los 28 días después de la instalación de las anteras en la placa Petri con medio de inducción. El tamaño de los callos se evaluó mediante observación directa y estimación visual, usando una regla milimétrica al lado de la placa Petri, lo que facilitó la visibilidad y la medición del diámetro de los callos que aparecieron en algunas anteras como resultado positivo de la combinación de reguladores de crecimiento.

2.4 Regeneración de órganos a partir de callos inducidos

2.4.1 Preparación de medios de regeneración de órganos.

Para la preparación de medio de cultivo diseñado para la regeneración de órganos, se utilizó sales basales y vitaminas MS (Figura 6A), mio-inositol 100mg/L, sacarosa 3%, y el pH se ajustó a 5.8 con HCl 0.1 o NaOH 0.1 y la esterilización fue a 121°C durante 15 minutos (Figura 6). Las combinaciones de los reguladores de crecimiento se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2.

Tratamiento y reguladores de crecimiento para el medio de regeneración de órganos.

TRATAMIENTO	REGULADOR DE CRECIMIENTO
T1	ANA (1mg/L) + BAP (0.5 mg/L)
T2	ANA (0.5mg/L) + KIN (1 mg/L)
T3	ANA (0.5mg/L) + Z (0.25mg/L)
T4	Zeatina (0.5 mg/L)
T5	TDZ (0.5 mg/L)

ANA = ácido naftaleacético, BAP = bencilaminopurina, KIN=Kinetina, Z=Zeatina y TDZ = thidiazurón.

Figura 6.

Preparación de los medios base para inducción de órganos.

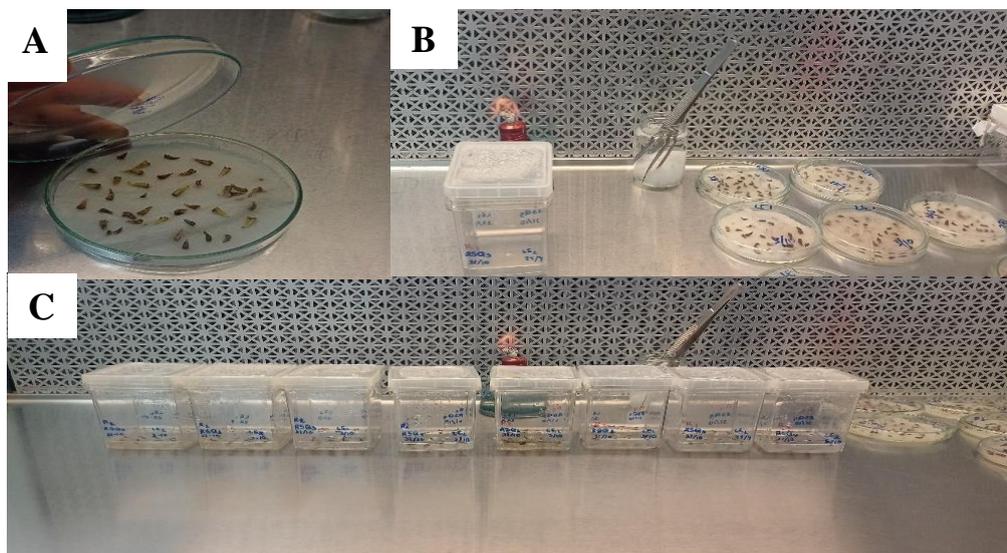


2.4.2 Siembra de callos en medio de regeneración.

Los callos generados en la etapa de inducción (Figura 7A), se colocaron en magentas conteniendo los medios de regeneración según se detalla en la Tabla 2, la siembra se realizó asépticamente en la cámara de flujo previamente desinfectada (Figura 7b) y fueron colocados cinco 5 callos por magenta (Figura 7c). Los explantes fueron incubados a 25 ± 1 ° C con un ciclo de luz de 16 horas y un periodo de oscuridad de 8 horas.

Figura 7.

Siembra de callos en medio de inducción de órganos.



2.4.3 Variables evaluadas en la regeneración de órganos.

Presencia de órganos a partir de los callos inducidos .

De manera visual se realizar el conteo de callos que inducen órganos como respuesta en los medios de regeneración a las ocho semanas después de la siembra de callos.

2.5 Análisis de datos

2.5.1 Efecto de las auxinas y citocininas en la inducción de callo

Para evaluar el efecto de las auxinas y citocininas en la inducción del callo se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con cuatro tratamientos y ocho repeticiones por tratamiento (Tabla 1). Cada repetición consistió en una placa Petri que contenía 20 anteras.

El modelo lineal es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ij} = Número de callos inducidos en el i -ésimo regulador de crecimiento en la k -ésima unidad experimental.

μ = Efecto de la media general

Ti = Efecto del i-ésimo regulador de crecimiento.

ε_{ijk} = Error experimental

La prueba de hipótesis planteada para el presente trabajo de investigación será:

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_n$

Ha: al menos una media (μ_i) es diferente de los demás

Donde: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_n$ son las medias de los tratamientos que se evalúan. Para la contrastación de la hipótesis se empleará ANOVA.

Todos los tratamientos fueron evaluados en cuanto a su significancia estadística mediante un análisis de varianza. Las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. Además, los datos correspondientes al porcentaje de inducción de callo fueron transformados utilizando la función $(x + 0.5)^{1/2}$.

Tabla 3.

Diseño para evaluar la inducción de callos a partir del cultivo de anteras de S. quitoense L.

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
T1	T1R1	T1R2	T1R3	T1R4	T1R5	T1R6	T1R7	T1R8
T2	T2R1	T2R2	T2R3	T2R4	T2R5	T2R6	T2R7	T2R8
T3	T3R1	T3R2	T3R3	T3R4	T3R5	T3R6	T3R7	T3R8
T4*	T4R1	T4R2	T4R3	T4R4	T4R5	T4R6	T4R7	T4R8

Reguladores de crecimiento: T1=ANA(1mg/L) + 2-iP (1mg/L), T2= ANA (2mg/L) + 2-iP (1mg/L), T3= ANA (5mg/L) + 2-iP (1mg/L) y T4= ANA (5mg/L) + 2-iP (1mg/L).

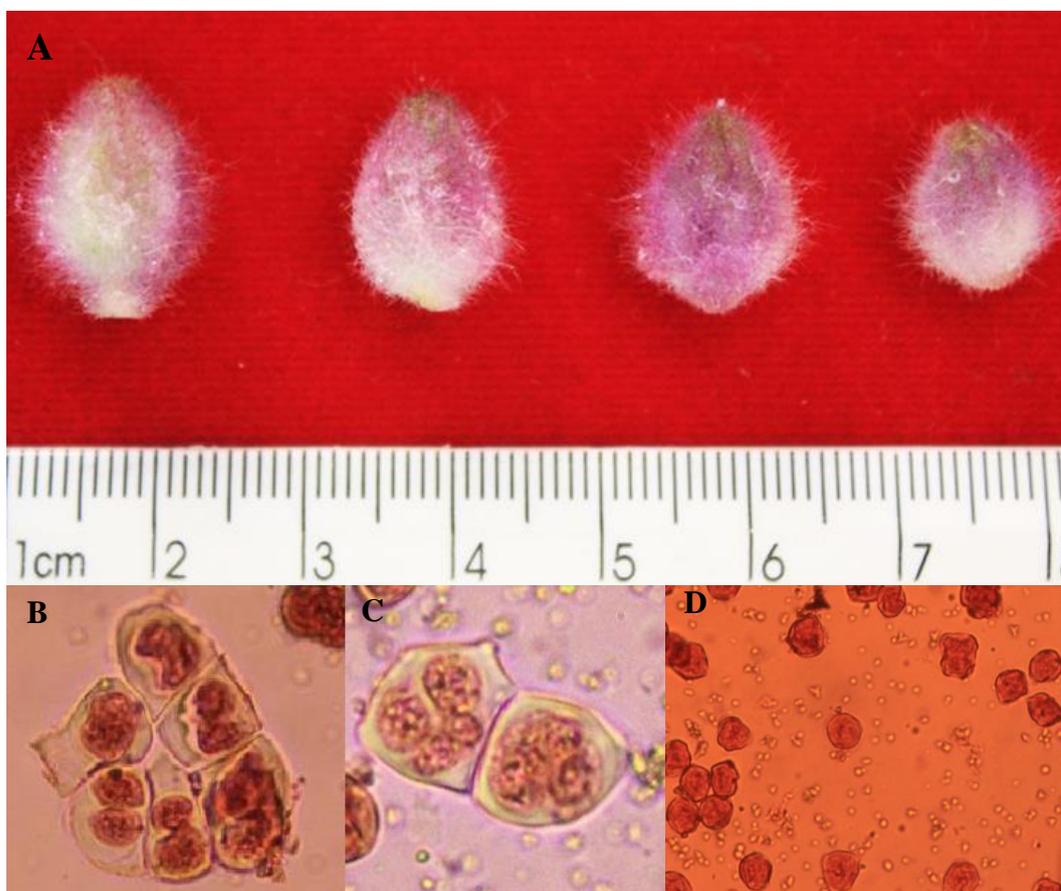
* Fuente de carbono maltosa 3.

III. RESULTADOS

3.1 Estado de desarrollo de las microsporas

Figura 8.

Tamaño de botón floral y estado de desarrollo de las microsporas en botones florales de S. quitoense.



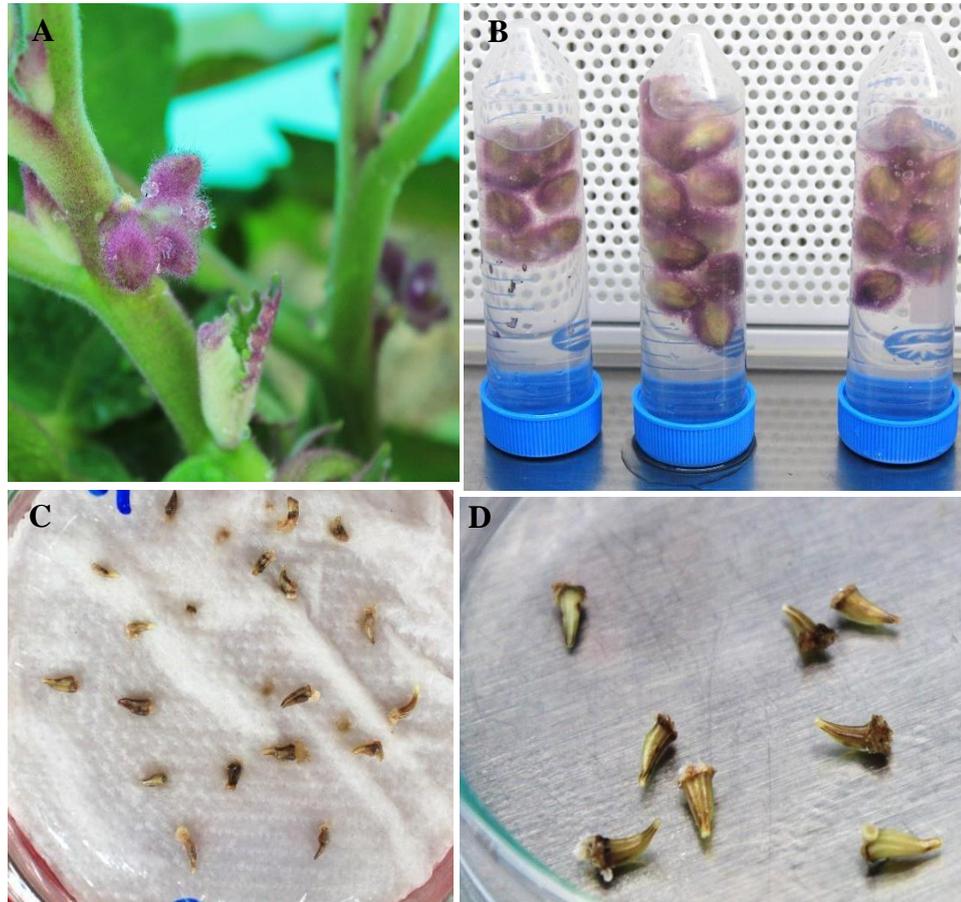
Los estados de desarrollo de las microsporas fueron identificados y descritos en la Figura 8. La primera división meiótica se observó mayormente en botones con longitud entre 8 a 10 mm (Figura 8B), el estado de tétrada fue observado en botones florales entre 10 a 12 mm (Figura 8C) y en botones florales entre 12 a 14 mm se observaron las microsporas en el estado uninucleado (Figura 8D).

3.2 Efecto de diferentes dosis de ANA Y 2-iP en la inducción de callo a partir de anteras de *S. quitoense* L.

El registro de callos obtenidos en los medios de inducción a partir de anteras de *S. quitoense* (Figura 9C) se tomó a los 28 días de cultivo *in vitro* a 26 °C.

Figura 9.

Botones florales de 12 a 14mm y la respuesta de anteras al medio de inducción.



La tabla 4 muestra el análisis de varianza ANOVA para la variable de inducción de callo, donde muestra una diferencia significativa para los tratamientos. Lo que demuestra el efecto positivo de las diversas dosis de ANA y 2-iP en el proceso de inducción de callo. Tal como se ilustra en la figura 10 que los tratamientos T1, T2 y T3 que están compuestos por medio Ms y la combinación de la auxina ANA en concentraciones de 1, 2 y 5 mg/L respectivamente , junto con la citocinina 2-iP a 1 mg/L presenta un porcentaje de inducción de 30.3,41.1 y 30.0% que según la prueba de Tukey los valores de inducción de callo son similares, lo que demuestra la inexistencia de diferencias significativas en dichos tratamientos, sin embargo en el T4 las dosis de 5 mg/L de ANA y 1 mg/L de 2-iP, utilizando maltosa al 3% como fuente de carbono, tiene un efecto significativamente menor ,con un porcentaje de 10.2% de inducción de callo.

Tabla 4.

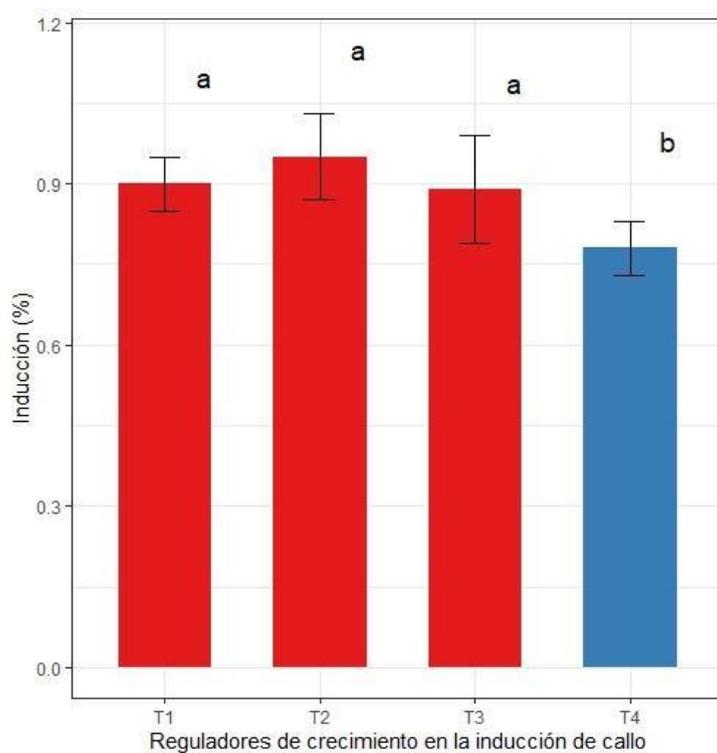
Análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de inducción de callos.

Fuente de variación	Suma de cuadros	Grados de libertad	Cuadrado medio	F Calculado	P-valor
Tratamiento	0.12933750	3	0.04311250	7.58	0.0007**
Error	0.15915000	28	0.00568393		
Total	0.28848750	31			

El P-valor de 0.0007 indica que existe una diferencia significativa en el porcentaje de inducción de callos entre los grupos comparados.

Figura 10.

*Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo a partir de anteras de *S. quitoense*.*



Las medias con diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $\leq 0,05$.

3.3 Diámetro de callo a partir de anteras de anteras de *S. quitoense* L

La tabla 5 evidencia que el análisis ANOVA muestra la existencia de diferencias significativas en el diámetro de callo en los diferentes tratamientos. Lo cual sugiere que las concentraciones de ANA y 2-iP tiene un efecto positivo en el crecimiento de callo, tal como se ilustra en la prueba de Tukey $\leq 0,05$ en la figura 11 que el mayor promedio de diámetro de callos se logró en medio MS con concentraciones de ANA (5mg/L) y 2-iP (1mg/L) en el T3 con 1.90 mm de diámetro, seguido por el T2 con concentraciones de ANA (2mg/L) y 2-iP (1mg/L) logrando un diámetro promedio de callo de 1.84mm, no habiendo diferencias significativas en estos tratamientos. Los callos más pequeños se encontraron en el T4 compuesto por el medio fuente de carbono maltosa al 3 %, ANA (5 mg/L) y 2-iP (1mg/L) con 1.16 mm de diámetro en promedio.

Tabla 5.

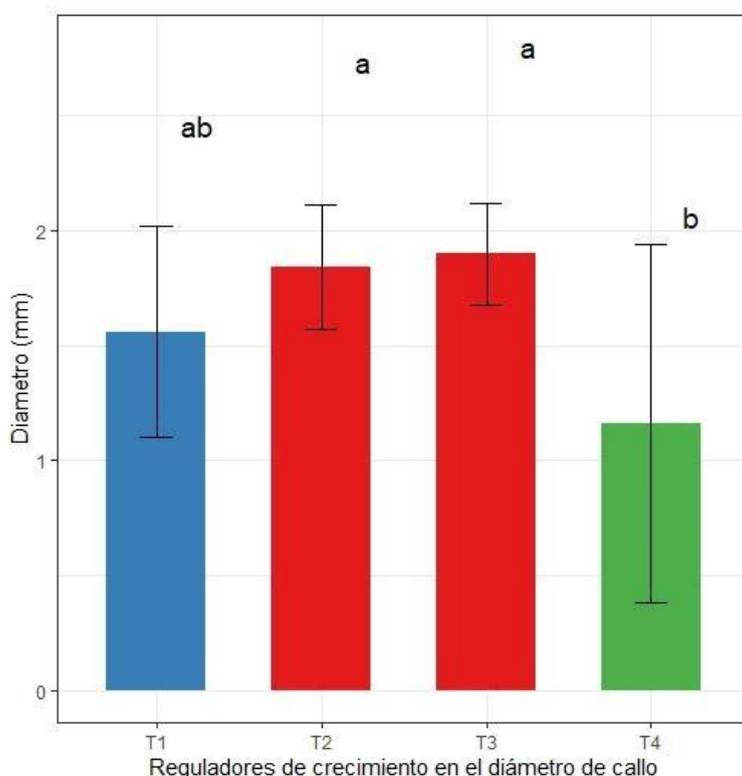
Análisis de varianza (ANOVA) para el diámetro de callo.

Fuente de variación	Suma de cuadros	Grados de libertad	Cuadrado medio	F Calculado	P-valor
Tratamiento	2.760625	3	0.92020833	3.9	0.0191**
Error	6.610325	28	0.23608304		
Total	9.37095	31			

El P-valor de 0.0191 indica que existe una diferencia significativa en el porcentaje de inducción de callos entre los grupos comparados.

Figura 11.

Efecto de los reguladores de crecimiento en el diámetro de callos a partir de anteras de S. quitoense.



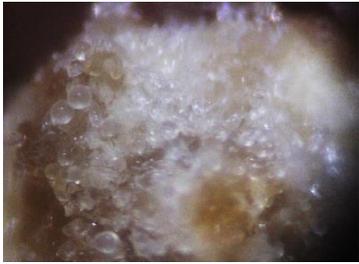
Las medias con diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey $\leq 0,05$.

3.4 Regeneración de órganos en callos de anteras de *S. quitoense*.

La respuesta de los callos *S. quitoense* de los tratamientos con medio de regeneración se muestra en la Tabla 6. El tratamiento T3 compuesto por medio MS + Zeatina y ANA nos permitió obtener un callo semicompacto verde bien desarrollado. Los T4 compuesto por medio MS + Zeatina y T5 compuesto por MS + TDZ nos permitió obtener como resultado un callo friable en crecimiento. Por otro lado, los T1 compuesto por MS + ANA + BAP y T2 compuesto por medio MS + ANA + KIN nos dio como resultado un callo friable de color beige a marrón. Ninguno de los tratamientos se logró evidenciar el desarrollo de estructuras vegetativas como, raíces adventicias y embriones somáticos. La mayoría de los callos experimentaron una pérdida de turgencia y adquirieron un tono marrón o café.

Tabla 6.

Respuesta de los callos inducidos a partir del cultivo de anteras de S. quitoense.

Composición medio de regeneración	Respuesta <i>in vitro</i>	Figura
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Medio MS + ANA 0.5 mg/L + BAP 0.5 mg/L ▪ Medio MS + ANA 5, 10 y 20 mg/L + KIN 1 mg/L 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Callo friable de beige a marrón 	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Medio MS + Zeatina 0.25 mg/L + ANA 0.5; 1.0 mg/L 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Callo semicompacto verde 	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Medio MS + Zeatina 0.5 mg/L ▪ Medio MS + TDZ 0.5 mg/L 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Callo friable en desarrollo. 	

IV. DISCUSIÓN

4.1 Respuesta de las anteras de *S. quitoense* a medios de inducción de callo.

En la colecta de botones florales de *S. quitoense*. L, se consideró la longitud de 12 mm a 14 mm, que fueron los que presentaron mayor número de microsporas en estadio uninucleado, y solamente se colectaron botones cerrados con buen aspecto y libres de plagas y enfermedades, al respecto Supriya, (2024), Lakshmana & Deepesh (1987) mencionaron que las anteras en la etapa correcta de la microspora tiene mayor probabilidad de producir callos y órganos de manera exitosa, logrando que las anteras provenientes de botones con buenas características alcancen un mayor porcentaje de inducción de callo.

La inducción de callos en anteras de naranjilla con medio de cultivo MS fue influenciado por la adición de diferentes concentraciones de ácido indolacético (ANA) y 2 -isopentiladenina (2-iP) en un medio MS, la concentración de ANA fue variable (1.2 y 5 mg/L) y la concentración de 2-iP fue constante (1 mg/L), obteniendo mayor número de callos en el tratamiento con mayor concentración de auxina (ANA 2mg/L) y citocinina (2-iP 1mg/L) obteniendo un 41.1% de inducción de callo al respecto a lo mencionado por Letini, et al., (1997), que en la fase de inducción una mayor concentración de auxina estimula la división mitótica de las microsporas y promueve la formación de callos. La citocinina 2-iP Posee la capacidad de promover el desarrollo y multiplicación de células vegetales Caballero, (2010) y Aquije, (2020). más no existe un registro de haber formado parte inducción en cultivo de anteras. Para la inducción de callos se puede prescindir de reguladores hormonales sintéticos ya que Mállap et al.(2023), obtuvo callos solamente con medios de cultivo B5 y LS.

Los resultados obtenidos en la inducción de callos en Naranjilla con Auxinas y Citocininas, en diferentes concentraciones presentó resultados similares al obtenido en *S. iopetalum* el empleo de AIA + BAP (1 mg/L de cada uno) se logró 28% de inducción de callos (Pacheco et al., 2003) y superior a los obtenidos en las a las investigaciones de anteras en *C. annuum* L. realizadas por Vélez-Torres et al., (2010). En un medio de cultivo MS que contenía 5 mg/L de ANA y BAP se observó un porcentaje de inducción de callos de 12.05%.

La medición de diámetro de callo se realizó a los 28 días posteriores a la instalación, considerando que en otros cultivos los callos son visibles a partir de los 20 días de posteriores a la instalación, los callos con un promedio de 1.90 mm fue el resultado de la combinación de medio MS + ANA (1 mg/L) + 2-iP (1 mg/L) y 1.84 mm con la combinación de medio MS + ANA (5 mg/L) + 2-iP (1 mg/L), no existe evidencia científica de estudios en solanáceas para comparar los resultados obtenidos, no obstante, en anteras de arroz se lograron callos de 2 mm en un lapso de 40 a 50 días (Letini, et al., 1997). El diámetro de callo es determinante para una mejor manipulación y respuesta de este a su paso en un medio de regeneración.

4.2 Regeneración de los callos inducidos

Uno de los principales inconvenientes que se presentó durante la investigación es la mínima respuesta organogénica, esto podría deberse a que estuvimos frente a una especie recalcitrante, (Rueda, 2019). Parra (2015), indica que las especies de la familia Solanaceae como *S. tuberosum*, *N. tabacum* y algunos ecotipos de *capsicum* como las únicas solanáceas no recalcitrantes.

En la investigación no se lograron formar órganos o embriones somáticos, el resultado más cercano al objetivo fue la formación de un callo semicompacto verde que fue el resultado de la combinación de medio MS + dosis de 0.5 mg/L de ANA + 0.25 mg/L de zeatine. Hernández & Díaz, (2019) logró inducir callo embriogénico en el cultivo de anteras del *S. goniocalyx* se empleando 0.5 mg/L zeatine + 0.5 mg/L 2,4-D en el medio de inducción MS. En *C. annuum* L. el empleo de una concentración de KIN y 2,4-D (1 mg/L de cada uno) se indujo bajo porcentaje de callo embriogénico 2% Vélez-Torres et al., (2010), mostrando que la misma concentración de auxinas y citocininas permiten una mínima inducción de embriogénesis. Los tratamientos de inducción con MS + TDZ 0.5 mg/L y MZ + Zeatina 0.5 mg/L, dio como respuesta callos friables con pseudo embriones. Los estudios de Hernández y Díaz (2019), en *S. goniocalyx* Juz. & Bukasov dio como resultado que una concentración de 0.5 mg/L ZEA y 0.5 mg/L 2,4-D, en medio MS, se favoreció la generación de la mayor cantidad de callos embriogénicos, cuyas características estaban vinculadas con el tipo de hormona empleada en su inducción. Los medios de regeneración compuestos por MS + ANA 0.5mg/L + BAP 0.5 mg/L y MS + ANA 5 mg/L + KIN 1 mg/L presentó callos friables con tendencia de color beige a marrón. En anteras de Yuca empleo los reguladores de crecimiento

ANA 1 mg/L y Bencilaminopurina BAP 1 mg/L generó una respuesta organogénica formando raíces adventicias (Alva,2023).Esto corrobora los estudios realizados por Letini, et al. (1997). Donde argumenta que las citocininas deben tener una mayor concentración que auxinas ya que estas estimulan la diferenciación de las células de los microcallos hasta regenerar la planta completa.

Durante el desarrollo de la investigación también se observó que la asepsia a pesar de no ser considerado como un objetivo de estudio juega un papel muy importante en el cultivo de anteras *in vitro*, debido a que los botones florales al ser un material vegetativo expuesto a los contaminantes del ambiente tales como microorganismos que de no ser eliminados podrían generar una pérdida importante del material experimental, por lo tanto, siguiendo las sugerencias de Hernández et al, (2022). Indican que para la eliminación de bacterias y hongos utilizó hipoclorito de sodio al 2% en su estudio del cultivo *in vitro* de anteras de *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav. En esta investigación, se empleó hipoclorito de sodio al 5% durante un período de 5 minutos. Posteriormente, se realizó un enjuague con agua corriente y se añadió ácido cítrico para prevenir la oxidación de la base del botón floral. Aguilera et al. (2021), en su estudio realizado de los métodos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de yuca, el tratamiento que mejores resultados fue hipoclorito de sodio al 2,5% durante 10 minutos y esta solución también contenía ácido cítrico, en tanto en el cultivo *in vitro* de *Vaccinium consanguineum*, se mantuvo el material vegetal en una solución antioxidante que contenía ácido cítrico (Jimenes & Abdelnour, 2016). También se utilizó NaOCL al 10% con Tween 20 durante 20 minutos para mantener botones libres de microorganismos, logrando la asepsia de los explantes (Teixeira, et al 2015) .Seguidamente los botones fueron sumergidos en ácido cítrico por un periodo de 10 minutos y para finalmente ser colocados en la placa Petri y ser llevados a tratamiento en frío 4°C por un periodo de 3 días, para estimular la respuesta de las microsporas.

V. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se concluye lo siguiente:

- El tamaño ideal de botones florales de *Solanum quitoense* L. con la mayor cantidad de microsporas uninucleadas fueron de 12 mm a 14 mm.
- Los tratamientos que incluían ANA en concentraciones de 1, 2 y 3 mg/L junto con 2-iP a 1 mg/L demostraron resultados altamente significativos en la inducción de callos a partir de anteras de *Solanum quitoense* L., logrando un porcentaje de inducción del 41.1%. Asimismo, las combinaciones de ANA a 2 y 5 mg/L con 2-iP a 1 mg/L propiciaron el desarrollo de callos de mayor diámetro.
- En la fase de regeneración no se logró obtener organogénesis, posiblemente por un efecto de recalcitrancia en esta especie. Sin, embargo utilizando medio de cultivo MS con 0.5 mg/L de ANA y 0.25 mg/L de Zeatina se logró un callo de buen tamaño de coloración verde.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda lo siguiente:

- Realizar el estudio de otros genotipos de *Solanum quitoense* L., con la finalidad de determinar la recalcitrancia en esta especie..
- Para el proceso de desinfección de los botones florales se recomienda optar por el uso de NaClO al 5% durante 5 minutos, ácido cítrico al 0.15% por un minuto, alcohol al 70% por un minuto , NaClO al 10% con 2 gotas de Tween durante 15 minutos y para finalizar ácido cítrico autoclavado por diez minutos.
- Para posteriores estudios en inducción de callo se recomienda utilizar un software de análisis de imagen ImageJ, para realizar una determinación más exacta del diámetro de callo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari, P. B., & Kang, W. H. (2017). Association of floral bud and anther size with microspore developmental stage in campari tomato. *Korean Journal of Horticultural Science&Technology*, 35(5), 608–617. <https://doi.org/10.12972/kjhst.20170065>.
- Aguilera-Arango, G. A., Puentes-Díaz, C. L., & Rodríguez-Henao, E. (2021). Métodos de desinfección para el establecimiento in vitro de dos variedades de yuca para uso agroindustrial. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 8(3), 21–30. <https://doi.org/10.53287/kdux7546xv19l>.
- Alcántara Cortes, J. S., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. D., & Sánchez Mora, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *REVISTA NOVA*, 17(32), 109-129. <https://doi.org/10.25058/24629448.3639>
- Alva, F. (2023). *Efecto del tiempo de exposición en frío y reguladores de crecimiento en la respuesta embriogénica de dos cultivares de yuca (Manihot esculenta Crantz)*. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza.
- Aquije, J. (2020). *Establecimiento in vitro de arándano (vaccinium corymbosum L.)-variedad Biloxi-*. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Obtenido de bdigital.zamorano.edu
- Caballero, M. (2010). *“Micropropagación de cultivares de mandioca (Manihot esculenta Crantz) de interés para Argentina*. Universidad Nacional del Nordeste. Obtenido de <https://repositorio.unne.edu.ar/handle/123456789/459>
- Criollo, H., Perea, M., Toribio, M., & Muñoz, J. (2014). Effect of the combination of NAA, kinetin and sucrose on the induction of somatic embryogenesis in lulo (*Solanum quitoense* Lam.). *Agronomía Colombiana*, 32(2), 170–179. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v32n2.43861>
- Gamborg, O.L., R.A. Miller y K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- Guzmán Rodríguez, E., Ramírez Serrano, C., Güitrón López, M. M., Palmeros Suárez, P. A., & Ángeles Espino, A. (2020). Cultivo de Anteras e inducción de callo

- haploide en germoplasma bc3 de girasol (*Helianthus annuus* L.). *Acta univ vol.30 México*. doi:<http://doi.org/10.15174.au.2020.2765>
- Hernández Amasifuen, A. D., & Díaz Pillasca, H. B. (2019). Inducción in vitro de callo embriogénico a partir del cultivo de anteras en “papa amarilla” *Solanum goniocalyx* Juz. & Bukasov (Solanaceae). *Arnaldoa*, 26(1), 277–286. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.261.26111>
- Hilto, A. (24 de 11 de 2011). *Cultivo de Anteras*. Obtenido de ClubEnsayos: <https://www.clubensayos.com/Ciencia/Cultivo-De-Anteras/105695.html>
- Jimenes Bonilla, V., & Abdelnour Esquibel, A. (2016). Establecimiento in vitro de (*Vaccinium consanguineum*), un arándano nativo de Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 29(2). doi:<http://dx.doi.org/10.18845/tm.v29i2.2692>
- Lakshmana R, P., & Deepesh N., D. (1987). Haploid plants from in vitro anther culture of the leguminous tree *Peltophorum pterocarpum*(DC) K. Hayne (Copper pod). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 167-177. doi:<https://doi.org/10.1007/BF00040423>
- Letini, Z., Martínez, C., & Roca, W. (1997). *Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma* (Vol. 293). (CIAT, Ed.) Cali, Colombia: Centro internacional de Agricultura Tropical. doi:ISBN-958-9439-92-6
- Linsmaier, E.M. y F. Skoog. 1965. Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 18: 100-127
- Mállap-Detquizán, G., Meléndez-Mori, J. B., Huaman-Huaman, E., Vilca-Valqui, N. C., & Oliva, M. (2022). Cultivo de anteras en *Physalis peruviana* L. estadios de microsporas, métodos de esterilización y medios de cultivo. *Bioagro-*, 35(1), 33–42. <https://doi.org/10.51372/bioagro351>.
- Mállap, G., Meléndez, J., Huaman, E., & Oliva, M. (2023). Cultivo in vitro de anteras en arroz (*Oryza sativa* L.): una revisión general. *Revista Científica Pakamuros*, 10(2). doi:10.37787/nkb9j006
- Marcela, L., Uribe, M., & Marulanda, M. (Diciembre de 2010). estandarización de la técnica citogenética “squash” para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth. *Scientia Et Technica*, vol. XVII(46), 74-79.

- Morillo Coronado, A. C., Rodríguez Fagua, A., & Morillo, C. (2019). Caracterización morfológica de Lulo(*Solanum quitoense* Lam.) en el municipio de Pachavita, Boyacá. *Acta Biológica Colombiana*, 24(2), 291-298. doi:<https://doi.org/10.15446/abc.v24n2.75832>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Supriya, N. (2019, January 24). *Anther culture*. Biology Reader. <https://biologyreader.com/anther-culture.html>
- Obregón A, J., López M, D., & Angeles R, D. (2023). Nutritional and bioactive properties of solanum quitoense lam: native fruit from the south american andes. *Repositorio Institucional Universidad Peruana Cayetano Heredia* . Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12866/14714>
- Pacheco-Sánchez, M., Lozoya-Saldaña, H., & Colinas-León, M. T. (2003). Reguladores de crecimiento y pretratamiento con frío en la androgénesis in vitro de *Solanum iopetalum* L. *Agrocencia*, 37(3), 257-265.
- Parra, V. (2015). *Aspectos básicos y aplicables de la inducción de embriogenesis en microsporas de pimiento y colza*. Valencia: Universitat Politècnica de Valencia.
- Pardo, A., Luna, F., & Hernández, N. (2011). Regeneración in vitro de *Allium sativum* L. a partir de segmentos de hojas y raíces. *Bioagro*, 23(3).
- Pereira, J., Guedes, R., & Fermino-Jr., P. (2007). Organogênese direta in vitro de explantes foliares de *Physalis angulata* L. – uma. *Ornamental Horticulture*, 11, 608-611.
- Ramírez, F., Kallarackal, J., & Davenport, T. L. (2018). Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) reproductive physiology: A review. *Scientia Horticulturae*, 238(April), 163-176. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.046>
- Revelo, J., y Sandoval, P. (2003). *Factores que afectan la producción y productividad de la naranjilla (Solanum quitoense Lam.) en la Región Amazónica del Ecuador*. Quito, Ecuador,:INIAP, Estación experimental Santa Catalina, Departamento de Protección Vegetal. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2434>

- Rodríguez Guzman, E., Serrano, C. M., Güitrón López, M. M., Suarez, P. A., & Espino, A. (2020). *Cultivo de Anteras e inducción de callo haploide en germoplasma bc3 de girasol (Helianthus annuus L.)*. *Acta Univeritaria*, 30, 1–15.
- Rueda, N. (2019). *Actualización de los conceptos asociados con la regeneración celular en plantas*. Universidad de Santander.
- Talavera, C. (11 de 10 de 2022). *Sierra y Selva Exportadora evalúa posibilidades de exportación de frutos exóticos de la selva peruana*. Obtenido de Agencia Agraria de Noticias : <https://agraria.pe/noticias/sierra-y-selva-exportadora-evalua-posibilidades-de-exportaci-29583>
- Teixeira da Silva, J., Winarto, B., Dobránszki, J., & Songjun, Z. (2015). Anther culture of Anthurium: a review. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(173).
- Tejada, T., Escobal, F., & Cervantes, M. (2014). Trampas amarillas para el control de insectos de los cultivos. (Plantwise, Ed.) *Ministerio de Agricultura y Riego, Instituto Nacional de Innovación Agraria*.
- Vargas, R. (2023). *Efecto del ANA y TDZ en la inducción de embriogénesis somática de naranjilla (Solanum quitoense. L.)*. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.
- Vélez Torres, M., Robledo Paz, A., Corona Torres, T., Heber Aguilar Rincón, V., Ramírez Vallejo, P., & Suárez Espinosa, J. (2010). Obtención de plantas haploides en chile miahuateco (*Capsicum annuum L.*). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1, 189–201. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v1n2/v1n2a6.pdf>
- Vega. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37(5 ESP), 33-39. Obtenido de <https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1186>
- Viera, M. A. (2004). Estudio fenológico y reproductivo de la naranjilla (*Solanum quitoense Lam*), cocona (*Solanum sessiliflorum Dunal*) y uchuva (*Physalis peruviana Lam*). *El Zamorano*, 3,4.

Vigil, C. (2021). Guía para la producción agroecológica de Naranjilla (*Solanum quitoense*). *Fundación para la Conservación de los Recursos Naturales - Fundación Natura* Panamá.

Winarto, B., Rachmawati, F., Pramanik, D., & Teixeira da Silva, J. A. (2011). Morphological and cytological diversity of regenerants derived from half-anther cultures of anthurium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105, 363-374.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1.

Manejo agrícola de las plantas donadoras de anteras. A) Preparación de suelo para la siembra de esquejes para reemplazar las plantas adultas, B) Fertilización, C) control de plagas con insecticida y D) Poda.



ANEXO 2.

Plantas de ocho meses listas para la colecta de los primeros botones florales.

