

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS

“OBTENCIÓN DE EMBRIONES HAPLOIDES *in vitro* DE *Solanum stenotomum* PROCEDENTE DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL ANDENES-CUSCO”

PRESENTADA POR:

Bach. FLOR CAMILA DURAN CARRASCO

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL
DE BIÓLOGO**

ASESORES:

Dra. JULIA GRISELDA MUÑIZ DURAN

Ing. LADISLAO PALOMINO FLORES

CUSCO – PERU

2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro. CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, Asesor del trabajo de investigación/tesis titulada: OBTENCION DE EMBRIONES HAPLOIDES in vitro DE Solanum stenotomum PROCEDENTE DE LA ESTACION EXPERIMENTAL - CUSCO

presentado por: Flo. Camila Duron Camacho con DNI Nro.: 73835932 presentado por: con DNI Nro.: para optar el título profesional/grado académico de Biologo

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 2 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 2 %.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 21 de mayo de 2024

Firma

Post firma, Julia Georgetta Muñoz Duran

Nro. de DNI 23822964

ORCID del Asesor 0000-0001-9488-4827

ORCID del 2do Asesor 0000-0002-2972-8818

Nro. de DNI 23833585

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid: 27259:356079748

NOMBRE DEL TRABAJO

TESIS_CAMILADURAN

RECUENTO DE PALABRAS

41367 Words

RECUENTO DE CARACTERES

184671 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

122 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

2.6MB

FECHA DE ENTREGA

May 20, 2024 7:25 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

May 20, 2024 7:28 PM GMT-5**● 2% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 2% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 1% Base de datos de trabajos entregados
- 0% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Fuentes excluidas manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 12 palabras)

Presentación

Me es grato presentar ante usted Sr. Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas, Dr. Luciano Julián Cruz Miranda, y ante ustedes Sres. Docentes Miembros del Jurado de la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas, el presente trabajo de investigación titulado “Obtención de embriones haploides *in vitro* a partir de la especie diploide *Solanum stenotomum* procedente de la Estación Experimental Andenes-Cusco” con la finalidad de optar el Título Profesional de Biólogo de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos vigente de la universidad. El principal objetivo de la investigación es obtener embriones haploides *in vitro* a partir de la especie diploide *Solanum stenotomum* procedente de la Estación Experimental Andenes-Cusco. De esta manera, esperamos que el siguiente trabajo pueda ser de utilidad para la comunidad académica e interesados en el tema.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a la jefa de laboratorio Bianca Vigil Santillán, Bióloga especialista en Bioinformática y Mejoramiento Genético de Plantas, quien me brindó la oportunidad de llevar a cabo el plan de investigación bajo su tutela en la Estación Experimental Andenes. También brindó apoyo durante todo el proyecto, superando problemas técnicos ante las dificultades en el laboratorio y el análisis estadístico.

Asimismo, quisiera agradecer el apoyo de los asesores de tesis, el ingeniero Ladislao Palomino Flores, quien brindó su apoyo en todos los aspectos documentarios y en la gestión para el acceso al laboratorio de la Estación Experimental, además del uso de los reactivos y equipos utilizados durante el proyecto. A la Dra. Griselda Muñiz Duran, quien brindó su apoyo para los trámites documentarios en la UNSAAC y la revisión técnica del perfil de investigación, así como las correspondientes correcciones en el plan inicial y la versión final.

También quisiera expresar mi agradecimiento al Sr. Aurelio, encargado de los invernaderos de la Estación Experimental, quien se encargó de mantener las plántulas en condiciones óptimas. Quisiera agradecer al Biólogo Francisco quien me ayudo a la organización de los datos para la estadística.

Quiero agradecer a mis padres por su apoyo y motivación durante todo el tiempo que me llevó realizar la tesis. Sin su apoyo, todo habría sido más complicado y difícil. Gracias por estar siempre a mi lado, alentándome a alcanzar mis metas y brindándome el apoyo emocional y financiero que ha hecho posible esta realización.

Sin su apoyo, este no habría sido posible. Este trabajo es un tributo a su inquebrantable fe en mí para superar los desafíos que encontré en el camino.

Índice

Presentación	ii
Agradecimientos	iii
Índice.....	iv
Resumen.....	xi
Summary	viii
Introducción	x
Planteamiento del problema.....	xii
Justificación	xiii
Objetivos de la Investigación.....	xvi
Hipótesis	xvii
Variables	xvii
CAPITULO I:	17
Marco Teórico y Conceptual.....	18
1.1 Marco conceptual	18
1.2 Antecedentes	19
1.2.1 Antecedentes internacionales.....	19
1.2.2 Antecedentes nacionales	22
1.3 Marco teórico	24
1.3.1 Descripción de la papa.....	24
1.3.2 Clasificación Taxonómica	27
1.3.3 La especie <i>Solanum stenotomum</i>	28
1.3.4 Reproducción de papa del género <i>Solanum</i>	29
1.3.5 Genética de la <i>Solanum stenotomum</i>	31
1.3.6 Microsporogénesis de papa del género <i>Solanum</i>	33
1.3.7 Mejoramiento genético de la papa	34
1.3.8 Incompatibilidad cromosómica en la papa	34
1.3.9 Producción de plantas haploides.....	35

1.3.10	Inducción de haploides paternos- androgénesis.....	38
CAPITULO II:		45
Materiales y Métodos.....		45
2.1	Materiales	45
2.1.1	Área de Estudio.....	45
2.1.2	Material Biológico	45
2.1.3	Equipos y materiales de Laboratorio	45
2.1.4	Reactivos.....	46
2.1.5	Material de campo.....	46
2.2	Tipo de investigación y Metodología.....	47
2.2.1	Tipo de Investigación.....	47
2.2.2	Metodología	48
CAPITULO III.....		62
Resultados y Discusión		62
3.1	Introducción <i>in vitro</i> de la especie <i>Solanum stenotomum</i> a través de yemas de los estolones.....	62
3.2	Aclimatación en invernadero de la plántula <i>in vitro</i> de <i>Solanum stenotomum</i> para la obtención de botones florales.....	65
3.3	Tratamiento del botón floral para la introducción <i>in vitro</i> de anteras	68
3.4	Tratamiento óptimo para la inducción de embriogénesis y callogenesis en las anteras cultivadas	73
3.5	Análisis de Datos.....	82
3.5.1	Análisis dinámico.....	82
3.5.2	Análisis estadístico inferencial	91
Conclusiones		98
Recomendaciones.....		100
Bibliografía		101
Anexos		107

Resumen

En el presente trabajo de investigación, se obtuvo embriones somáticos *in vitro* mediante la técnica de cultivo de anteras a partir de la especie diploide *Solanum stenotomum*, proveniente de la Estación Experimental Andenes- Cusco, para contribuir a la obtención de variedades biofortificadas de papa, como se viene trabajando, con características de elevados niveles de polifenoles que incluye a los flavonoides y antocianinas aprovechando el potencial genético de las variedades nativas y cultivadas en nuestra región.

Se introdujo *in vitro* la especie *Solanum stenotomum* a partir de las yemas de los estolones. Posteriormente, las plántulas resultantes fueron trasladadas al invernadero. Una vez que estas plantas crecieron, se procedió a la extracción de las anteras, las cuales desempeñaron un papel central en la aplicación de la técnica de cultivo *in vitro*. En esta fase se el primer tratamiento 1: T1 (Kin (4) + ANA (2)) y el tratamiento 2: T2 (2,4D (1) + Kin (1)).

Los resultados revelan que el T2 (2,4D (1) + Kin (1)) demostró ser el más efectivo en la formación de embriones y callos, con un porcentaje de formación de callos por antera de 9.36% y un porcentaje de formación de embriones por antera de 4.98%. En contraposición, el tratamiento T1 (Kin (4) + ANA (2)) presentó un porcentaje de formación de callos por antera de 3.99% y un porcentaje de formación de embriones de 1.66%. Estos resultados sugieren que el T2 supera al T1 en términos de la formación de embriones y callos. Se llevó a cabo un análisis estadístico que incluyó la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar las diferencias entre los tratamientos en relación con la variable "Embrión". Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (valor de 0.02236 > pV0.05) entre al menos dos grupos, lo que indica que el tratamiento tiene un efecto significativo en el número de embriones formados.

Se aplicó la prueba de Wilcoxon para contrastar los tratamientos T1 y T2 con el grupo de control con respecto a la variable "Embrión". Se observó que el tratamiento T2 exhibió diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo de control y T1, lo que sugiere que T2 es ligeramente más efectivo en términos de la variable "Embrión", con un valor de *p-Value* de 0.044.

Palabras clave: *Solanum stenotomum*, haploide, cultivo *in vitro*, antera y embrión.

Summary

In the present research work, somatic embryos were obtained in vitro using the anther culture technique from the diploid species *Solanum stenotomum*, sourced from the Andenes Experimental Station in Cusco, to contribute to the development of improved potato varieties, as has been ongoing, with characteristics of high levels of polyphenols including flavonoids and anthocyanins, leveraging the genetic potential of native and cultivated varieties in our region.

The species *Solanum stenotomum* was introduced in vitro from the buds of stolons. Subsequently, the resulting seedlings were transferred to the greenhouse. Once these plants grew, anther extraction was carried out, which played a central role in the application of the in vitro culture technique. In this phase, the first treatment 1: T1 (Kin (4) + ANA (2)) and treatment 2: T2 (2,4D (1) + Kin (1)) were introduced.

The results reveal that T2 (2,4D (1) + Kin (1)) proved to be the most effective in the formation of embryos and calluses, with a percentage of callus formation per anther of 9.36% and a percentage of embryo formation per anther of 4.98%. In contrast, treatment T1 (Kin (4) + ANA (2)) presented a percentage of callus formation per anther of 3.99% and a percentage of embryo formation of 1.66%. These results suggest that T2 outperforms T1 in terms of embryo and callus formation. A statistical analysis was conducted, including the Kruskal-Wallis test to assess differences between treatments in relation to the variable "Embryo." Statistically significant differences were found (p -Value of 0.02236 > $pV0.05$) between at least two groups, indicating that the treatment has a significant effect on the number of embryos formed.

The Wilcoxon test was applied to contrast treatments T1 and T2 with the control group regarding the variable "Embryo." It was observed that treatment T2 exhibited statistically significant differences compared to the control group and T1, suggesting that T2 is slightly more effective in terms of the variable "Embryo," with a *p-Value* of 0.044.

Keywords: *Solanum stenotomum*, haploid, *in vitro* culture, anther, and embryo.

Introducción

La papa es uno de los alimentos más consumidos en el mundo debido a su gran importancia nutricional. Pertenece al género *Solanum*, el cual incluye tanto las variedades cultivadas como las llamadas "papas silvestres". En el Perú, país con una gran diversidad de papas, se han identificado 276 especies de *Solanum*, de las cuales 253 son nativas y 23 son cultivadas, según el informe del Ministerio del Ambiente (Cañedo Torres et al., 2019).

Se debe señalar que las especies de papa silvestre, específicamente la especie *Solanum brevicaulle*, jugó un papel fundamental en el proceso de domesticación de la papa; siendo la especie *S. stenotomum*, considerada la primera especie de papa domesticada, que presenta varias características de especies de *Solanum* silvestres con resistencia a enfermedades y plagas, así también para adaptarse a condiciones ambientales adversas. Luego, mediante un proceso de poliploidización sexual interparental, se originó la especie *Solanum andigena*, especie que se encuentra principalmente en los Andes, tal como se menciona en la recopilación de un estudio realizado por Cañedo Torres et al., (2019).

El proceso de domesticación de la papa ha sido crucial para el desarrollo y la diversificación de esta importante fuente de alimentación a nivel mundial, contribuyendo significativamente a la seguridad alimentaria y nutricional de numerosas poblaciones (F. Rodríguez et al., 2010).

Las especies cultivadas de papa suelen estar compuestas por 12 cromosomas, con una serie poliploide que va desde diploides ($2X=24$) hasta hexaploides ($5X=60$) (Cañedo Torres et al., 2019).

La papa es una especie en la que la obtención de líneas homocigotas con caracteres puros resulta compleja debido a su poliploidia, sin embargo, mediante la producción de líneas haploides, es posible obtener híbridos con expresión de alelos recesivos (Murovec et al., 2012).

La formación de plantas haploides es un proceso que, aunque puede ocurrir de manera espontánea en la naturaleza, su probabilidad es muy baja, y su utilidad en el mejoramiento práctico es limitada (Murovec et al., 2012) pero también se puede inducir el proceso de formación de haploides en laboratorio para acortar el ciclo de mejoramiento clásico considerablemente, pues este proceso genera un rápido desarrollo de líneas totalmente homocigotas en 2 o 3 generaciones mientras que el proceso convencional de desarrollo de líneas endogámicas tarda de 6-8 generaciones (Prasanna et al., 2013). Por esta razón, se ha recurrido a la biotecnología para mejorar las plantas. Esta técnica se utilizó por primera vez en 1964 con el tabaco, logrando la formación de embriones somáticos haploides a partir del cultivo de anteras; desde entonces, este método se ha aplicado para obtener líneas homocigotas a partir de padres heterocigotos, evitando así las cinco a siete generaciones de autofecundación requeridas en el método clásico de endogamia. Guha et al., (1964), también la técnica implica un bajo costo en su aplicación, este enfoque permite obtener nuevos genotipos mejorados con mayor rapidez (Lassaga et al., 2010).

Los protocolos para la producción de haploides se han desarrollado en más de 250 especies de plantas del reino vegetal (Murovec, 2012). Por lo que el uso de la biotecnología y el cultivo de anteras *in vitro* ha facilitado la obtención de líneas homocigotas y ha acelerado el proceso de mejora genética en la producción de papas y otras especies vegetales (Germanà, 2006) .

Este método facilita la obtención de variedades de plantas que son usadas como intermediarios para transferir información genética en cruzamientos posteriores con variedades comerciales compatibles que presenten las características deseables, como la alta concentración de polifenoles y la resistencia a sequías y heladas (Ordoñez et al., 2016).

Planteamiento del problema

Problema general

Uno de los retos en el mejoramiento genético de las plantas es transferir características agronómicas de plantas silvestres a las comerciales, en el contexto de cambio climático, seguridad alimentaria y desarrollo agrícola sostenible. Se necesita emplear la *Solanum stenotomum* para transferir características clave de seguridad alimentaria. Por lo tanto, es crucial evaluar estrategias de mejoramiento genético como el cultivo de anteras. Sin embargo, aún no se dispone de un protocolo establecido para la especie *S. stenotomum*.

¿Es posible obtener embriones haploides *in vitro* de la especie *Solanum stenotomum*?

Problemas Específicos

Existe una incompatibilidad cromosómica entre la especie diploide *Solanum stenotomum* y las variedades comerciales poliploides de *Solanum tuberosum*. Cuando se intentan realizar cruces interespecíficos, en lugar del cruzamiento se produce un aborto.

1. ¿Es posible introducir *in vitro* la especie *Solanum stenotomum* a través del cultivo *in vitro* de yemas a partir de los estolones?
2. ¿En condiciones de invernadero es posible inducir la floración en la especie *Solanum stenotomum*?
3. ¿La aplicación del tratamiento físico a las anteras contribuirá a la embriogénesis y callogenesis?
4. ¿Cuál de los tratamientos: Tratamiento 1 (Kin (4) + Ana (2)) o el Tratamiento 2 (2,4D (1) + Kin (1)) será el más óptimo para la inducción de embriogénesis en las anteras?

Justificación

Justificación Teórica

El interés en las plantas haploides surgió en la organización del “Primer Simposio de Haploides en plantas superiores” en 1974 en Canadá siendo vista como una innovación tecnológica, documentada por más de 200 especies de angiospermas y se ha consolidado como el método más usado y efectivo para la regeneración de plantas (Pintos et al., 2014).

Dentro de la familia de las Solanáceas, se destaca su gran relevancia en términos agrícolas, ya que engloba algunas de las plantas más cultivadas, como la papa (*Solanum tuberosum*), el pimiento (*Capsicum annuum*), la berenjena (*Solanum melongena*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y el tomate (*Solanum lycopersicum*). A pesar de la importancia agrícola de las solanáceas, la tecnología de haploides aún no se ha implementado de manera eficiente en ninguna especie de estos cultivos. Por ejemplo, en el caso de la papa, aunque existen métodos para inducir la formación de embriones somáticos (Seguí-Simarro Editor, 2021), no hay ningún protocolo establecido en la Estación Experimental Andenes para especies de papa nativas.

En la práctica la producción de líneas haploides en papas facilita la producción de híbridos al cruzarlos especies similares y/o muy cercanas (Murovec et al., 2012).

Sin embargo, es necesario avanzar en la implementación amplia y eficiente de la tecnología de haploides en las especies de papa, con el tiempo se espera que esta tecnología se difunda y contribuya al desarrollo y mejora de los cultivos, aprovechando el potencial de los haploides para la obtención de nuevas variedades con características deseables en el ámbito agrícola.

Justificación Práctica

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo ampliar la base genética de la papa, buscando mejorar las accesiones biofortificadas. En la estación se ha intentado realizar cruces interespecíficos, sin embargo, los resultados han sido poco favorables debido a la incompatibilidad en la ploidías que se presenta durante las hibridaciones interespecíficas en el campo. Para abordar este problema, se ha considerado la técnica de cultivo *in vitro* para la obtención de plantas haploides como una alternativa para generar compatibilidad entre las especies. Al emplear esta técnica, se puede evitar la necesidad de utilizar grandes áreas de producción, resolver la insuficiencia de semillas de buena calidad y prevenir la transferencia de virus (Murovec et al., 2012).

Por otro lado, las variedades comerciales de *Solanum tuberosum* son valoradas por sus características industriales y de producción significativas (Cañedo Torres et al., 2019). Mientras tanto, la especie *Solanum stenotomum*, especie nativa, exhibe características alimenticias relevantes, destacando su alto contenido de glutenina, hierro, zinc y polifenoles (Fock et al., 2007). Estas cualidades son deseables para ser introducidas en las variedades comerciales de *Solanum tuberosum*, con el fin de desarrollar nuevas variedades que ofrezcan un alto valor nutricional.

Por lo que la producción de embriones somáticos es la base para la formación de plantas haploides que serán usadas para lograr cruces que involucran a la especie *Solanum stenotomum* que tiene una constitución genómica diploide, con variedades comerciales de *Solanum tuberosum* que poseen una constitución poliploide.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Obtener embriones haploides *in vitro* a partir de la especie diploide *Solanum stenotomum* procedente de la Estación Experimental Andenes- Cusco.

Objetivos Específicos

1. Introducir *in vitro* la especie *Solanum stenotomum* a través de yemas de los estolones
2. Obtener los botones florales a partir de *S. stenotomum* en condiciones invernadero
3. Realizar el tratamiento físico al botón floral para la introducción *in vitro* de anteras
4. Determinar el tratamiento hormonal óptimo a partir del Tratamiento 1 (T1: Kin (4) + Ana (2)) y el Tratamiento 2 (T2: 2,4D (1) + Kin (1)), para la inducción de embriogénesis y callogenesis en las anteras cultivadas.

Hipótesis

Es posible obtener embriones haploides *in vitro* a partir de la especie *Solanum stenotomum* procedente de La Estación Experimental Andenes- Cusco, bajo el Tratamiento 2 (T2: 2,4D (1) + Kin (1)).

Variables

Variables Independientes

- Especie *Solanum stenotomum*
- Medio de cultivo con 2 tratamientos diferentes con fitohormonas.

Variables Dependientes

- Formación de callos
- Formación de embriones

CAPITULO I:

Marco Teórico y Conceptual

1.1 Marco conceptual

Según Seguí-Simarro et al., (2011), Prasanna et al., (2013), Ordoñez et al., (2016) y Jordán et al., (2006) la terminología usada en esta investigación es:

Haploides: Los haploides son organismos que poseen la mitad de la carga cromosómica normal.

Doble haploides: Los doble haploides son organismos que han duplicado su conjunto haploide para formar uno diploide y son utilizados en la mejora de plantas y la investigación genética.

Técnica de fitomejoramiento de haploides: La técnica de fitomejoramiento de haploides implica la generación y manipulación de plantas con un solo juego de cromosomas en lugar de dos, acelerando la selección y reproducción de características deseables en plantas para la mejora genética.

Anteras: Son las estructuras masculinas de la flor de la planta de papa (*Solanum tuberosum*). Estas pequeñas estructuras contienen polen, que se utiliza en la polinización de las flores y, en algunos casos, para la formación de nuevas variedades de papas a través de la hibridación controlada.

Incompatibilidad cromosómica: La incapacidad de dos plantas con diferentes números de cromosomas o configuraciones cromosómicas para producir descendencia fértil. Esta incompatibilidad puede ser un obstáculo para la hibridación y la reproducción entre especies de

plantas que tienen diferencias significativas en su número o estructura de cromosomas, lo que limita la formación de híbridos fértiles.

Microsporas: Son esporas haploides que se desarrollan en las anteras, contienen al gametofito masculino, que se convertirá en los granos de polen

Auxinas: Son fitohormonas que regulan la elongación celular, la formación de raíces, la orientación del crecimiento de los tallos y la respuesta a la luz y la gravedad.

Citoquininas: Son fitohormonas que estimulan la división celular, promueven la diferenciación de los tejidos y órganos, y regulan la formación de brotes laterales.

Embriones: son estructuras embrionarias que se desarrollan a partir de células somáticas (no sexuales), se generan en cultivos de tejidos vegetales *in vitro*.

Callos: Son masas de tejido vegetal *in vitro* que tienen la capacidad de desarrollar estructuras embrionarias, como embriones somáticos, a partir de células somáticas.

Solanum stenotomum: Es la primera papa cultivada, con un alto contenido de solanina y con genes resistentes a plagas y enfermedades.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Antecedentes internacionales

Valkonen et al., (1999), en Dinamarca, obtuvieron líneas enanas ($2n=2\times=24$) a partir de la variedad de papa adaptada a días largos 'Pito' (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*), que es tetraploide ($2n=4\times=48$), mediante cultivo de anteras. Estas líneas enanas presentaron un crecimiento lento, internodos muy cortos, una apariencia compacta y esférica, y hojas de color

verde oscuro. Las líneas enanas respondieron de manera fuerte y rápida a la aplicación exógena de bajas cantidades (79 nM) de giberelina bioactiva (GA3), lo que restauró el crecimiento normal y lograron obtener nueve líneas enanas (di)haploides ($2n=2\times=24$) a partir del cultivo de patata tetraploide ($2n=4\times=48$) utilizando la técnica de cultivo de anteras y variando las concentraciones de ácido gliberélico (GA). Sorprendentemente, estas líneas enanas respondieron positivamente al tratamiento y mostraron un crecimiento normal.

Germanà, (2006) reviso el estado actual de la investigación sobre la producción de haploides dobles en los principales cultivos de frutas, que incluyen Citrus, *Malus domestica*, *Pyrus communis*, *Pyrus pyrifolia*, *Prunus persica*, *Prunus avium*, *Prunus domestica*, *Prunus armeniaca*, *Vitis vinifera*, *Actinidia deliciosa*, *Olea europaea*, *Morus alba*, *Musa balbisiana* (BB), *Carica papaya*, *Annona squamosa*, *Feijoa sellowiana*, *Opuntia ficus-indica* y *Eriobotrya japonica*. Se destaca que la etapa de desarrollo de las micrósporas es un factor crítico para inducir la callogenesis y la embriogénesis en el proceso de obtención de haploides y dobles haploides. Esta etapa ocurre entre la primera mitosis haploide, conocida como etapa uninucleada tardía, y es esencial para que las micrósporas cambien su vía de desarrollo hacia la gametofítica, lo que permitirá obtener los haploides y dobles haploides deseados, además, otro factor crítico para el éxito de este proceso es la aplicación de estrés externo sobre las micrósporas. Este estrés puede ser inducido mediante heridas, condiciones térmicas específicas o tratamientos químicos. La aplicación adecuada de estos estresantes externos es fundamental para lograr la diferenciación celular y la formación de los haploides y dobles haploides en los cultivos frutales mencionados.

Chirinos et al., (2006), en Venezuela, evaluaron la respuesta morfogénica de dos clones de yuca (*Manihot esculenta*) experimentales, denominados UCV2375 (amarga) y UCV-2726 (dulce), mediante el cultivo de sus anteras en condiciones de laboratorio, considerando el tamaño

del botón floral (1-1,5 mm y 2-2,5 mm) como un factor importante. Se probaron dos medios de cultivo, Murashige y Skoog (MS) suplementado con diferentes concentraciones de auxina. El estudio se llevó a cabo mediante un diseño completamente aleatorio en un arreglo factorial 3x2, y se utilizó la prueba de media de Duncan para analizar los resultados. Se observaron microsporas en tétradas y en fase uninucleada en botones florales de 1-1,5 mm. Durante la inducción de callos, se observaron diferencias en la respuesta en función del tamaño del botón, con un mayor número de callos formados en botones de 1-1,5 mm. El análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre el tipo de clon y la respuesta al medio de cultivo. El tejido calloso resultante se diferenció morfogénicamente en raíces, lo que posiblemente esté relacionado con la presencia de auxinas en el medio de cultivo.

Paola et al., (2009), en Colombia, establecieron un sistema eficiente de regeneración de plantas para la variedad de papa *Solanum tuberosum* L. var. Pastusa Suprema, en el que se evaluó el efecto de diferentes fitohormonas, como la zeatina ribósido (ZR), el ácido gibérelico (GA3) y el ácido naftalénacetico (NAA), en combinaciones específicas, en la inducción de callos y la regeneración de brotes en los explantes de papa. Los resultados mostraron que la presencia del ácido naftalénacetico (NAA) es crucial para la respuesta callogénica y regenerativa de los explantes. La combinación óptima de fitohormonas que indujo la organogénesis indirecta en la variedad de papa Pastusa Suprema consistió en agregar 3.0 mg/L de ZR, 0.02 mg/L de NAA y 1.0 mg/L de GA3 a un medio básico M-S. Esta fórmula hormonal produjo callogénesis y regeneración en más del 90% de los explantes, con un promedio de seis regenerantes por explante.

Seguí-Simarro et al., (2011), indujeron la androgénesis en tomate, berenjena y pimiento, en el que redujeron el mejor estadio para el cultivo de la antera a la etapa de meiocito antes de

formar la tétrada, con un medio básico para la regeneración del callo a 35°C por 8 días en obscuridad y luego el callo se cambió a un medio de 2,4D y kinetina para promover el desarrollo del embrión, se pone énfasis en este artículo en el cuidado de la capa tapetal que rodea al saco polínico para que no afecte el estado del callo.

Rodríguez Beraud et al., 2014, en Temuco, se evaluó la respuesta callogénica y organogénica de la especie *Ugni molinae* (Murtilla) con el cultivo de cotiledón e hipocótilo con diferentes concentraciones de hormonas fitorreguladoras, los porcentajes de callos formados se logró con el medio de Murashi & Skoog suplementado con 0.5mg/L de ANA para cotiledones y 0.5mg/L con 1.0mg/L de ANA, luego se transfirió los callos a un medio de diferenciación en el que la mejor respuesta fue un medio con 0.1mg/L de ANA y 1.0mg/L de BAP.

Araque Barrera, (2020) en Colombia, indujo la regeneración adventicia mediante el cultivo de anteras de papa amarilla diploide (*Solanum tuberosum* Grupo Phureja). Para esto, los botones florales se clasificaron según su tamaño, en rangos de 0.2 a 2.0 cm, con el fin de observar la etapa de las microsporas. Luego, se cultivaron en un medio de cultivo M&S suplementado con diferentes concentraciones de auxinas. Los resultados mostraron cambios morfológicos en las anteras cultivadas, así como la formación de callos y la regeneración de embriones somáticos a partir de dichos callos. Además, se obtuvieron líneas homocigotas que posteriormente fueron utilizadas como progenitores de cultivares F1 en programas de mejoramiento genético.

1.2.2 Antecedentes nacionales

Gonzales-Zavaleta et al. (2018) en Trujillo, evaluaron el efecto del ácido naftalenacético (ANA) y 6- bencilaminopurina (BAP) en la papaya (*Carica papaya*), para la inducción de callos

embriogénicos, donde usaron las hormonas ANA (1) y BAP (0.5) a concentraciones de ppm, con una transformación del 40% de anteras en callos y el de ANA (1) y BAP (1), con el 2.9% de transformación de anteras en callos, también reporta que no presento producción de embriones pero si desdiferenciación del tejido .

Porras Mija, (2019) en Lima, indujeron callos haploides del cultivo *in vitro* de anteras y determino el método de desinfección de para la introducción *in vitro* de las anteras, junto con el medio óptimo para inducir los callos.

Méndez-Hernández et al. (2019), trabajo con la "papa amarilla", también conocida como *Solanum goniocalyx* Juz. & Bukasov, el cual posee características de variedades comerciales y se propaga a través de tubérculos, lo que mantiene las características de una variedad, pero puede transferir enfermedades y tener limitaciones genéticas. Para superar estos problemas, se investigó la formación de callo embriogénico *in vitro* a partir del cultivo de anteras en la "papa amarilla". Se probaron cinco tratamientos de medio de cultivo con zeatina y 2,4-D y AIA en diferentes concentraciones. Se logró un 100 % de desinfección, pero las anteras eran propensas a la oxidación. El tratamiento con Z (0.5) y 2,4D (0.5) resultó en una mayor formación de callos embriogénicos y callos de mayor tamaño en comparación con otros tratamientos.

Huanuqueño et al., 2021, Huanuco, trabajaron con el maíz morado reventón a partir de maíces nativos. Este estudio evaluó 256 líneas "S1" en tres experimentos, analizando caracteres como volumen de expansión (VE), expansión de granos (EG), pericarpio negro (PN) y rendimiento de grano (RG). Se observó una predominancia de alelos aditivos en VE, EG, PN y RG, con cierta dominancia de genes con valores bajos en VE, EG y RG, y la presencia de tres

modas en PN, indicando posiblemente genes con efectos mayores. Un índice de selección identificó 80 líneas destacadas para VE y PN, representando el 31,25% de presión de selección y proporcionando una base sólida para futuras fases de mejora genética en la obtención de híbridos de maíz morado reventón usando la tecnología de doble haploides para acelerar la obtención de variedades uniformes.

1.3 Marco teórico

1.3.1 Descripción de la papa

La papa, como solanácea, tiene una gran relevancia a nivel mundial debido a su diversidad (Rodríguez, L. E. 2010) ya que también abarca el mayor grupo de angiospermas, siendo la *Solanum tuberosum* la más importante en el sector económico (Ordoñez et al., 2016) . Según Estrada (2000), existen en el mundo 8 especies de papas cultivadas y 226 variedades silvestres. Las variedades comerciales de papa son el resultado de la selección y cruzamiento entre múltiples especies silvestres (Cañedo Torres et al., 2019).

La papa es una planta que presenta una amplia diversidad en su tamaño, color, sabor y ploidías, lo que le proporciona diferentes propiedades organolépticas. Además, es una fuente rica en nutrientes como minerales, fibra, proteína, carotenos y polifenoles. Las papas amarillas, en particular, son conocidas por su alto contenido en carbohidratos, vitaminas, polifenoles, aminoácidos, minerales y carotenoides, mientras que las papas de colores destacan por tener mayor cantidad de antocianinas, lo que las ha convertido en una opción más valorada por sus beneficios para la salud. De hecho, los péptidos de proteína presentes en las papas tienen propiedades antioxidantes (Pinky Raigond, 2023). En cuanto a su reproducción, puede llevarse a

cabo tanto por semillas como por propagación vegetativa utilizando tubérculos u otros explantes *in vitro*. Para la reproducción sexual, la papa emplea su estructura floral, que es hermafrodita y alberga tanto el androceo como el gineceo. La flor contiene el cáliz, la corola, el pistilo y el estambre, que es el órgano masculino que consta de 5 anteras. El color del polen varía desde el amarillo hasta un naranja intenso y es esparcido hacia el pistilo a través de poros ubicados en la punta de la antera (Cañedo Torres et al., 2019).

La diversidad nutricional y reproductiva de la papa la convierte en un cultivo de gran interés tanto para la alimentación como para la investigación agrícola. La variabilidad en sus propiedades organolépticas y nutricionales abre oportunidades para el desarrollo de nuevas variedades con características específicas y mejor adaptadas a diferentes condiciones ambientales. Además, comprender su proceso de reproducción sexual puede contribuir al mejoramiento genético y la conservación de la diversidad genética de este importante cultivo agrícola (Cañedo Torres et al., 2019).

La papa es una planta que muestra una notable capacidad para percibir cambios a lo largo del año, y su floración es altamente sensible a factores ambientales y genéticos. Un aspecto crítico es el fotoperiodo al que está expuesta, que puede variar entre días cortos y días largos, y esto tiene una influencia significativa en la inducción de los órganos florales (Ritter et al., 2008). Por ejemplo, en el caso de *Solanum tuberosum*, esta especie no florece en días cortos y fríos (Cañedo Torres et al., 2019). Las condiciones de días cortos y bajas temperaturas favorecen la formación de tubérculos. Sin embargo, en temperaturas más altas y con fotoperiodos más prolongados, la cantidad de flores por tallo aumenta y la supervivencia de los primordios florales se convierte en el factor principal que determina la producción de flores (Almekinders et al., 1996).

La floración en la papa está influenciada por varios factores, entre ellos la calidad de la luz. Se ha observado que la luz roja en un rango de 600 a 700nm es la más óptima para promover la floración. Además, la disponibilidad de nitrógeno y factores genéticos también juegan un papel importante. Se ha observado que las plantas poliploides, que tienen más de dos juegos de cromosomas, florecen menos que las diploides, que tienen dos juegos de cromosomas. También se ha notado que la esterilidad masculina es más común en plantas tetraploides, que tienen cuatro juegos de cromosomas (Cañedo Torres et al., 2019). En conjunto, estos factores ambientales y genéticos ejercen un control complejo sobre la floración de la papa, lo que afecta directamente su desarrollo y producción de tubérculos. El entendimiento de estos mecanismos es esencial para optimizar la producción de este importante cultivo agrícola y mejorar su adaptabilidad a diferentes condiciones climáticas (Calderón Torres et al., 2021).

En términos de carga cromosómica, las papas cultivadas presentan desde 12 cromosomas, hasta una serie poliploide que abarca desde diploides ($2x=24$) hasta pentaploides ($5x=60$). Las especies tetraploides tienen una mayor importancia económica ya que suelen tener un rango de distribución muy amplio desde Estados Unidos hasta el Sur de Chile, mientras que las especies diploides poseen genes con mayor resistencia a los factores bióticos y abióticos y de gran utilidad para el mejoramiento genético de las variedades comerciales y también estas abundan más en los Andes (Ordoñez et al., 2016).

Un dato interesante es que la Colección Nacional de Germoplasma de papa de EE. UU. alberga más de 5900 accesiones, de las cuales el 75% son parientes silvestres de cultivos. Los bancos de germoplasma de papa más grandes del mundo se encuentran en Francia, Rusia, Perú, Alemania, EE. UU. y Japón. Estos bancos conservan entre el 5% y el 69% de las especies

silvestres de papa. La mayoría de las accesiones se conservan clonalmente y requieren subcultivarse periódicamente (Jenderek et al., 2023).

La preservación de este rico germoplasma es de suma importancia para el desarrollo y mejora genética de las variedades comerciales de papa, ya que las especies silvestres contienen características valiosas que pueden ser útiles para enfrentar desafíos agrícolas y adaptarse a distintos ambientes. La diversidad genética que se mantiene en estos bancos es fundamental para garantizar la seguridad alimentaria y la sostenibilidad de los cultivos de papa en el futuro (Jenderek et al., 2023).

1.3.2 Clasificación Taxonómica

El estudio se centró en la especie *Solanum stenotomum*, que pertenece al reino vegetal, con la clasificación filogenética del Angiosperm Phylogeny Group (APG):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum stenotomum*

Fuente: Angiosperm Phylogeny Group (2016)

1.3.3 La especie *Solanum stenotomum*

Existen diferentes clasificaciones taxonómicas de la papa bajo el código Internacional de Nomenclatura Botánica, pero para este trabajo se ha considerado utilizar la literatura de Ochoa, (1999) para la taxonomía.

Según Ochoa (1999), la primera papa domesticada es *Solanum stenotomum*, una especie diploide con 24 cromosomas ($2n=24$), proveniente de cruces entre *S. bukasovii*, *S. canasense* y *S. multidissectum*. A su vez, *S. stenotomum* dio origen a la forma más primitiva de la papa, *S. tuberosum*, y posteriormente a *S. andigena*. A través de cruces con otras especies y adaptación a diferentes entornos, se originaron las subespecies que dieron lugar a la mayoría de las variedades cultivadas de papa que se han extendido por todo el mundo (Ochoa, 1999).

Los parientes diploides de la papa poseen rasgos de gran importancia, como la resistencia a patógenos, plagas y estrés abiótico. *Solanum stenotomum* es una especie nativa con una alta concentración de antocianinas en la que destaca la antocianidina 3-acilrutinosido-5-glucósido, que ofrecen una gama cromática que abarca desde el rojo hasta el azul, incluyendo tonalidades como el naranja, el morado y el violeta, también responsables de la pigmentación en las flores, tallos, raíces y hojas, además de generar un efecto antioxidante (Chirinos et al., 2008).

La planta de *Solanum stenotomum* produce muchos tubérculos, pero de un tamaño reducido (Fock et al. 2007), la superficie presenta un tono brillante, mientras que, en el interior, se aprecia un área coloreada que se extiende desde la cáscara hasta el centro del tubérculo. La pigmentación tanto de la piel como de la pulpa se origina por la existencia de antocianinas. Estos tubérculos representan uno de los principales alimentos en las naciones donde se cultivan en las características que presenta también se destaca la resistencia a la marchitez bacteriana, que es

ocasionada por *Ralstonia solanacearum*, la marchitez bacteriana es una enfermedad que afecta a las papas en todo el mundo y la capacidad de adaptarse a una amplia gama de climas. Por lo que es una especie usada para el mejoramiento genético especies comerciales, al ser una especie diploide es compatible con especies tetraploides mientras genere gametos no reducidos, pero existe la posibilidad de generar gametos triploides debido a una falla con el endospermo, y al realizar retrocruces con otras especies, este suele ser incompatible generando cero descendencia o una muy reducida, por lo que al usar la técnica de haploidización en la *Solanum stenotomum* se da la alternativa de introducir caracteres valiosos a variedades de papa comerciales (Fock et al., 2007).

1.3.4 Reproducción de papa del género *Solanum*

La papa tiene dos fases en su ciclo de vida. La primera fase, conocida como esporofítica, es diploide ($2n$), donde las células experimentan dos divisiones reduciendo a la mitad su material genético. Luego sigue la segunda fase, llamada gametofítica, en la cual las células son haploides (n), culminando con la fusión de los dos gametos haploides para formar un cigoto diploide como parte de su ciclo reproductivo (Ordoñez et al., 2016).

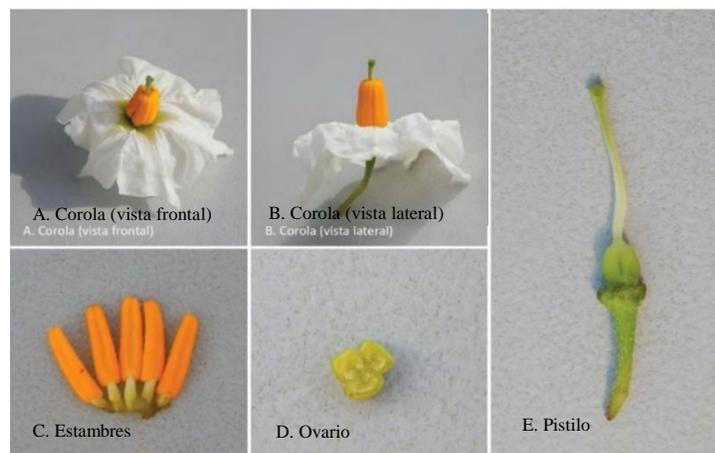
La reproducción de la papa puede ser tanto sexual como asexual. La reproducción sexual implica la combinación de nuevo material genético de dos individuos diferentes, mediante la intervención del polen y el pistilo, seguida de la polinización y la formación de bayas (Ordoñez et al., 2016). La flor hermafrodita, con una estructura compleja, desempeña un papel crucial en este proceso de polinización y formación de semillas (Cañedo Torres et al., 2019). Por otro lado, en la reproducción asexual interviene el mismo explante de la planta, que suele ser el tubérculo,

estolones, yemas o brotes, obteniendo un individuo idéntico a la planta donadora a través de la mitosis (Ordoñez et al., 2016). Para esta forma de reproducción, se suele emplear la propagación vegetativa utilizando tubérculos o estolones, así como técnicas in vitro (Cañedo Torres et al., 2019).

La morfología floral de la papa contiene 5 estambres, y cada uno de ellos está compuesto por una antera que alberga los granos de polen. Estos granos de polen se esparcen durante la polinización mediante poros ubicados en la punta de la antera, lo que permite la transferencia del polen hacia otras flores o el pistilo de la misma flor (Cañedo Torres et al., 2019).

El pistilo es una parte fundamental del sistema reproductivo de la flor, y en el caso de la papa, es conocido como gineceo. Este gineceo está compuesto por el ovario y el estilo. Dentro del ovario, los granos de polen germinan y se produce la fecundación, dando lugar a la formación de semillas. Estas semillas contienen la información genética que contribuye a la diversidad y adaptación de las plantas de papa a diferentes ambientes y condiciones de cultivo (Ordoñez et al., 2016).

Figura 1. Estructura floral de la papa (Ordoñez et al., 2016)



La estructura floral de papa (*Figura 1*), posee la corola, estambres que serán cultivados (*figura 1c*) *in vitro* el ovario pertenece al pistilo y el pistilo que pertenece a la parte femenina de la flor y se encuentra rodeada de las anteras (Ordoñez et al., 2016).

El proceso de reproducción sexual en las papas es crucial para mantener la variabilidad genética y la evolución de la especie. Además, la propagación vegetativa mediante tubérculos y estolones, así como las técnicas de cultivo *in vitro*, son estrategias utilizadas para la multiplicación y propagación de variedades de papa seleccionadas por sus características deseables (Rodríguez, 2010).

1.3.5 Genética de la *Solanum stenotomum*

La *Solanum stenotomum* se encuentra secuenciada en la base de datos NCBI con el ID de taxonomía 172797, posee dos sub especies que son la *Solanum stenotomum* subsp. *Goniocálix* y *Solanum stenotomum* subsp. *Estenotomía*.

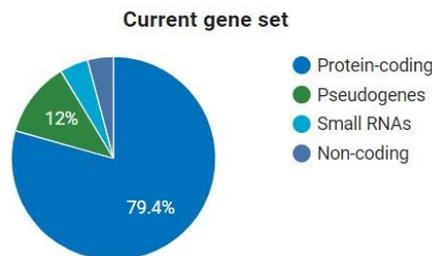
El tamaño de su genoma es de 846,2 MB, su genoma sin espacios es de un tamaño de 748,1 MB, en su estado haploide posee 12 cromosomas y al ser diploide su carga cromosómica completa es de 24 cromosomas, el número de andamios es de 17.083 esta indica los fragmentos que se han utilizado para ensamblar el genoma de la *Solanum stenotomum* y su porcentaje de GC es de 34.5%, los datos fueron obtenidos a partir de plántulas de *Solanum stenotomum* de 4 semanas que crecieron a partir de semillas en invernaderos con la técnica de secuenciación de Illumina HiSeq, en su anotación mostro que la especie posee 37.551 genes, codifica 29.808 proteínas (Xichang University, 2021).

Figura 2. Desglose de la calidad del ensamblaje genómico (Xichang University, 2021).



El desglose de la calidad del ensamblaje genómico en términos de la representación de diferentes tipos de genes, la sección de color azul “Single-copy 96.1%” indica que el 96.1% de los genes que se analizaron son genes de copia única, la de “Duplicated 2.6%” son los genes que consideran duplicados, en la “Fragmented 0.3%” son las secuencias de genes que no se han ensamblado en una secuencia continua y los “Missing 1.0%” son las secuencias que no se han identificado en el ensamblaje (Xichang University, 2021).

Figura 3. Ensamblaje del genoma de *Solanum stenotomum*. NCBI. PMC8496330. (Xichang University, 2021)



El conjunto de genes (*Figura 3*) del genoma de *Solanum stenotomum*, el 79.4% consiste en proteínas codificadas lo que sugiere que la especie contiene una cantidad considerable de genes (Xichang University, 2021).

1.3.6 Microsporogénesis de papa del género *Solanum*

Como se mencionó anteriormente la papa es una Angiosperma, por lo que presenta dos generaciones en su ciclo de vida: la generación esporofita y la generación gametofítica. La generación esporofita corresponde a la planta adulta que se origina a partir de la semilla, mientras que la generación gametofítica tiene dos fases que conducen a la formación del microgametofito maduro (Pintos et al., 2014) y comprende el proceso de la microsporogénesis (Ordoñez et al., 2016).

El proceso de la microsporogénesis, consiste en la formación del polen, se lleva a cabo en el órgano masculino de la planta, las anteras. En este proceso, los microsporocitos primarios o la célula madre del polen, que es diploides ($2n$), experimentan dos divisiones celulares meióticas. La primera división genera microsporocitos secundarios haploides (n), y la segunda división produce cuatro micrósporas haploides, dando lugar a la formación de micrósporas unicelulares haploides, que son los granos de polen inmaduros (Pintos et al., 2014).

En la microgametogénesis, las micrósporas unicelulares se desarrollan para convertirse en microgametofitos maduros, es decir, el polen maduro. Durante este proceso, ocurre una división mitótica asimétrica conocida como mitosis del polen. Esta mitosis genera un grano de polen bicelular que contiene dos tipos de células: la célula vegetativa y la célula generativa. La célula generativa pasará por una segunda mitosis para dar lugar a dos células gaméticas haploides (Pintos et al., 2014).

Cuando ocurre la polinización, uno de los gametos haploides se fusiona con la ovocélula haploide, lo que da lugar a la formación de un embrión. Mientras tanto, la otra célula gamética se fusiona con dos núcleos polares haploides del saco embrionario, formando un tejido nutritivo triploide conocido como endosperma (Pintos et al., 2014).

1.3.7 Mejoramiento genético de la papa

Existen variedades de papa híbridas, por lo que es de necesidad y prioridad usar un método de bajo costo y rápido para la obtención de líneas homocigotas por lo que se suele usar técnicas de clásicas en el que se realizan rondas sucesivas de autofecundación y selección que puede tardar varios años y ser costoso. El uso de enfoques biotecnológicos en el fitomejoramiento de la papa representa un avance significativo en la optimización del proceso de obtención de líneas homocigotas, lo que a su vez contribuye al mejoramiento genético y al aumento de la productividad de este importante cultivo. La aplicación de estas técnicas promete un futuro promisorio para la industria de la papa, ya que facilita la creación de variedades más resilientes y nutritivas, lo que beneficiará tanto a los agricultores como a los consumidores (Seguí-Simarro et al., 2011).

1.3.8 Incompatibilidad cromosómica en la papa

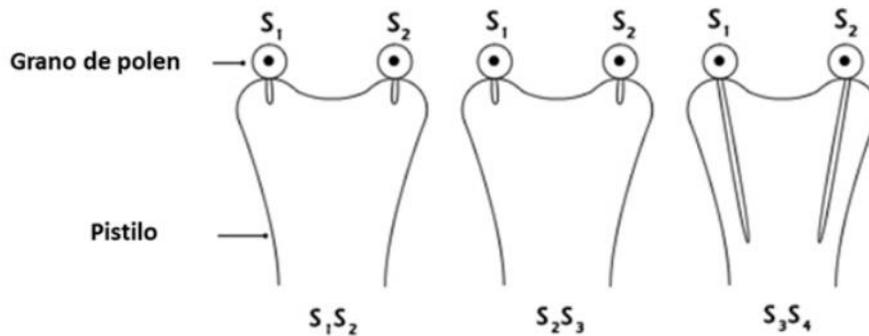
La incompatibilidad cromosómica se refiere a un mecanismo que previene el cruzamiento entre genotipos relacionados, promoviendo, en su lugar, la variabilidad genética en la población a través de la heterocigosidad. Esto contribuye a la generación de una mayor diversidad de híbridos y ayuda a evitar la depresión endogámica (Ordoñez et al., 2016).

En las angiospermas, aproximadamente el 40% de las especies presentan este fenómeno, y se ha identificado en más de 3000 especies de plantas con flores. La incompatibilidad

cromosómica es un proceso determinado genéticamente y puede manifestarse en diferentes niveles de intensidad en diferentes especies (Ordoñez et al., 2016).

Esta la incompatibilidad esporofítica, en el que el genotipo diploide es el factor para que se dé la especificidad para reconocer el polen, suele no darse por la mutación de alelos o por cambios en el ambiente natural, lo que suele permitir las autofecundaciones (Ordoñez et al., 2016).

Figura 4. Sistema esporofítico de incompatibilidad (Ordoñez et al., 2016)



1.3.9 Producción de plantas haploides

El término “haploides” se utiliza para plantas con un número cromosómico gamético (n), mientras que en especies poliploides, los haploides (n) se denominan polihaploides debido a que tienen más de un juego de cromosomas. Existen dos tipos de haploides: los androgénicos, de origen masculino y los ginogénicos, de origen, femeninos (Pintos et al., 2014). La aplicación de la técnica de haploidización tiene como objetivo producir embriones somáticos que darán lugar a líneas homocigotas a partir de parentales heterocigotos, lo que reduce considerablemente el tiempo necesario en comparación con el mejoramiento convencional, donde las líneas homocigotas se desarrollan después de varias generaciones de autofecundación (Germana, 2006); también permite obtener una mejor eficiencia y precisión en la selección al tenerlos en los

invernaderos considerando marcadores morfológicos y moleculares, la técnica acelera la creación de productos al combinar rápidamente los alelos beneficiosos de múltiples características genéticas, como la productividad y la resistencia al estrés, que son difíciles de mezclar utilizando métodos tradicionales de agricultura y reduce las actividades de mantenimiento de las líneas (Prasanna et al., 2013).

La obtención de líneas haploides mediante cultivo de anteras en plantas de la familia *Solanaceae*. Se menciona que se logró por primera vez en *Datura innoxia*, y luego se produjeron haploides en tabaco (*Nicotiana spp.*). En el caso de la papa, se mencionan intentos iniciales sin éxito, pero luego se logró la regeneración de brotes en papas tetraploides y diploides. Además, se señala que el cultivo de anteras tiene mejores resultados en especies de papas silvestres en comparación con la papa cultivada. Finalmente, se destaca que la inducción haploide en otras plantas importantes de la familia *Solanaceae* aún requiere mejoras para igualar la eficiencia lograda en especies modelo (Seguí-Simarro et al., 2011).

Las plantas haploides pueden obtenerse de forma espontánea, pero esta ocurrencia es poco frecuente. Sin embargo, existen varios métodos para inducir la formación de plantas haploides. Uno de ellos es la partenogénesis haploide, en la cual se forma un embrión a partir de un óvulo no fecundado, este proceso puede ser inducido mediante la polinización con granos de polen triploides o inactivos mediante tratamientos físicos o químicos. Otro método es la hibridación distante seguida de la eliminación cromosómica. Este proceso se basa en el cruzamiento de dos especies relativamente distantes, durante el cual, en la etapa temprana de embriogénesis, se eliminan los cromosomas de una de las especies para formar un embrión en condición haploide. La ginogénesis *in vitro* es otra técnica utilizada en especies que no responden al cultivo de anteras. Se basa en la formación de embriones que poseen únicamente

los cromosomas maternos, ya que no se produce la fusión con los gametos masculinos. Por último, está la embriogénesis del polen *in vitro*, que implica el cultivo de anteras o micrósporas aisladas en medios nutritivos que estimulan la división celular de las micrósporas para luego regenerar la planta haploide (Pintos et al., 2014).

El uso de estas técnicas de haploidización ha revolucionado el proceso de mejoramiento genético en la papa y otras especies vegetales. La obtención rápida y efectiva de líneas homocigotas haploides ha permitido avanzar significativamente en la creación de nuevas variedades con características deseables, lo que contribuye a mejorar la productividad y adaptabilidad de los cultivos agrícolas en beneficio de la seguridad alimentaria y el desarrollo sostenible (Pintos et al., 2014).

Los haploides son producidos a partir de especies diploides con un número cromosómico ($2n=2x$). Los monoploides, en la fase esporofita, contienen solo un conjunto de cromosomas ($2n=x$). Sin embargo, las plantas monoploides son infértiles y más pequeñas en comparación con las diploides, por lo que es necesario restaurar su fertilidad mediante una duplicación cromosómica. Durante este proceso de duplicación, también es posible eliminar genes que expresan una fuerte depresión endogámica, lo que puede mejorar la calidad y el vigor de las plantas. Existen varios factores que pueden afectar la inducción de haploides y la regeneración de embriones (Murovec et al., 2012):

- El genotipo de las plantas
- Condición fisiológica de la planta donante

- Composición del medio de cultivo (bajo en hambruna o concentración normal),
presencia ausencia de hormonas, medio solido o liquido

- Factores físicos, como las condiciones de estrés, luz, temperatura.

La especie de papa *Solanum stenotomum* es diploide, al obtener explantes a partir del cultivo *in vitro* de anteras, serian monohaploides ($x=12$), la constitución básica de la carga cromosómica de la papa, la progenie monohaploide es usada para deshacerse de genes letales no deseable e identificar genes benéficos, que al doblar los cromosomas con la técnica de los dobles haploides se obtendrá diploides homocigotos, facilitando el mapeo molecular con los marcadores (Maluszynsky et al., 2003).

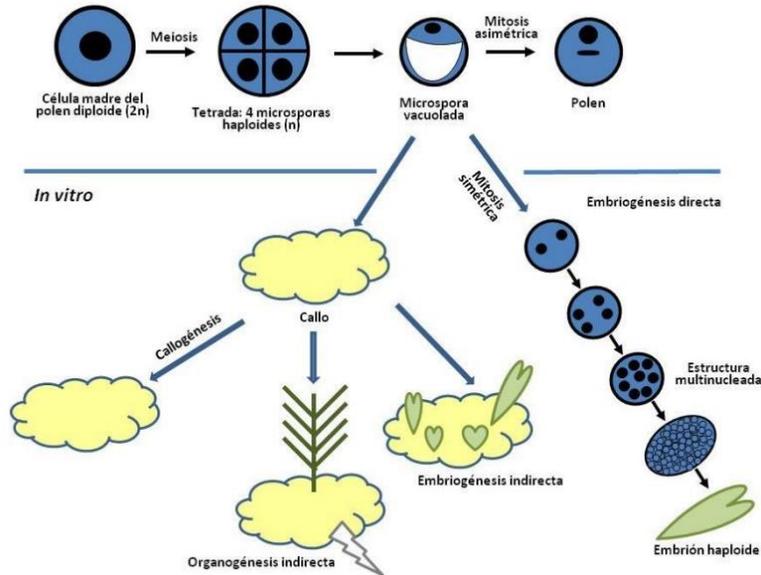
Es importante tener en cuenta que las plantas experimentan dos etapas distintas en su ciclo de vida. La primera etapa ocurre en las estructuras sexuales de la planta, como los ovarios y las anteras presentes dentro del botón floral. Esta etapa se denomina esporofítica y se caracteriza por tener una carga cromosómica haploide (esporofita) con un número cromosómico gamético n (Pintos López et al., 2014).

1.3.10 Inducción de haploides paternos- androgénesis

El cultivo de anteras *in vitro* es un método altamente eficiente y ampliamente utilizado para producir haploides androgénicos (HA) en el contexto de la técnica de fitomejoramiento conocida como androgénesis. Esta técnica se fundamenta en la inducción de granos de polen inmaduros, conocidos como micrósporas, para que desvíen su vía normal gametofítica, en la cual se convertirían en granos de polen maduros, hacia la vía esporofítica con el fin de regenerar *in vitro* callos y/o embriones que posteriormente se inducirán a brotar (Seguí-Simarro Editor, 2021).

La etapa de desarrollo de las anteras en el botón floral es crucial para la inducción de callos y/o embriones, siendo la etapa uninucleada tardía o binuclear la más óptima. En esta etapa, el gameto masculino (micróspora) se desdiferencia del proceso gametofítico y entra en embriogénesis directa u organogénesis indirecta. Para que la micróspora abandone su programa de desarrollo gametofítico y forme un callo o embrión, debe someterse a un proceso de estrés externo. Este estrés puede ser de naturaleza física (mediante la extracción del botón floral y el cultivo de la antera), térmica (aplicando calor o frío), o química (mediante estrés hídrico o inanición). Durante este proceso, las micrósporas acumulan más RNA y proteínas (Germana, 2006). La clave para lograr una respuesta androgénica adecuada radica en el tratamiento adecuado del estrés, ya que este detendrá el desarrollo de las micrósporas en su vía gametofítica, desviándolas hacia la vía esporofítica, y el desarrollo se desencadena mediante la embriogénesis, lo que promueve la formación de estructuras multicelulares contenidas en la exina. Finalmente, los embriones se liberan de la pared de exina debido a factores desencadenantes de estrés (Pintos et al., 2014).

Figura 5. Fuente: Embriogénesis del polen (embriogénesis gamética). (Pintos et al., 2014)



La célula madre del polen (*Figura 5*), ubicada en la antera, en estado haploide va pasando a la etapa de tétrada y luego a la microspora vacuolada, en esta etapa la antera se encuentra en el botón floral cerrado, exactamente en esta etapa el polen se encuentra en la ruta gametofítica, pero al inducir estrés en el botón floral, este cambia su dirección normal hacia la ruta esporofítica o embriogénica para formar calogénesis o embriogénesis (Pintos et al., 2014).

Una vez aplicados los tratamientos de estrés, se inicia la ruta esporofítica y las microsporas experimentan un proceso de reorganización en su estructura celular, afectando el citoplasma, vacuola y núcleo. En esta etapa, las vacuolas se fragmentan en ocho o más vacuolas más pequeñas, mientras que el núcleo migra hacia el centro, al mismo tiempo que se forman ramificaciones citoplasmáticas en el citoplasma condensado. Este fenómeno se observa en células estresadas durante el estado uninucleado tardío y binuclear temprano de la antera, dando lugar a microsporas estrelladas que se denominan microsporas embriogénicas. Estas microsporas

embriogénicas atraviesan un desarrollo esporofítico bajo los efectos del estrés (Pintos et al., 2014).

Guha et al., (1964) fueron los primeros en describir todo este proceso de embriogénesis utilizando la especie *Datura innoxia*. Sometieron las anteras a un choque térmico y luego las cultivaron en un medio de cultivo con caseína, AIA y kinetina. A partir de la séptima u octava semana, se observaba la aparición de callos y/o embriones.

Los callos producidos a partir de las anteras cultivadas suelen ser no morfogénicos o muy embriogénicos, y crecen a partir de dos lóbulos diferentes de la antera. En ciertos casos, como en cítricos, estos callos se consideran fiables (Pintos et al., 2014). El proceso de inducción de callos representa una combinación de dediferenciación y diferenciación celular que depende de diversos factores, como el tipo de explante, el genotipo, el medio de cultivo y los reguladores de crecimiento utilizados (Rodríguez Beraud et al., 2014).

La embriogénesis gamética del polen, las micrósporas normalmente se desarrollan en granos de polen mediante el proceso de microgametogénesis. Sin embargo, cuando se induce el cultivo del polen *in vitro* mediante hormonas, vitaminas o sacarosa, las micrósporas abandonan el desarrollo gametofítico y siguen la ruta esporofítica o embriogénica, lo que resulta en la formación de plantas haploides. Este proceso se conoce como "embriogénesis gamética" (Pintos et al., 2014).. El método básico para la inducción de haploides por androgénesis consiste en la esterilización de los botones florales previamente tratados y la escisión de las anteras en condiciones asépticas. Luego, estas anteras se inoculan y cultivarán *in vitro* en medios sólidos, semisólidos, líquidos o de doble fase, asegurándose de evitar la interferencia del tejido esporofítico materno (Murovec et al., 2012).

Si bien la inducción de haploides por androgénesis es una técnica bien establecida para el mejoramiento de plantas, también presenta ciertos inconvenientes, como la dependencia del genotipo de la especie. Este aspecto suele ser más relevante en especies agrícolas importantes, como plantas leñosas, leguminosas y *Arabidopsis thaliana* (Murovec et al., 2012).

En el caso específico de la papa, el genotipo es el factor más significativo que afecta el cultivo de anteras. Se han identificado diferentes categorías para el genotipo de la papa en términos de su capacidad de respuesta al cultivo de anteras, clasificándolas como "No responde", "Moderadamente receptiva" y "Altamente receptiva". Este método presenta la ventaja de ser efectivo en papas androestériles, lo que permite realizar análisis de herencia de rasgos importantes en la especie (Pintos López et al., 2014; Sánchez-Enciso et al., 2005).

El proceso de regeneración vegetal del explante que viene a ser la antera puede seguir dos rutas principales: la organogénesis, que incluye la formación de estructuras como tallos o raíces (caulogénesis o rizogénesis), y la embriogénesis. Estas dos rutas permiten obtener plantas haploides con fines de mejora genética en la investigación (Jiménez Barreto et al., 2009).

Fitohormonas reguladoras

La inducción de formación de callos, embriones y generación de brotes *in vitro*, es crucial la presencia de hormonas en diferentes concentraciones y combinaciones en el medio de cultivo. Estas hormonas son fundamentales para guiar y estimular el proceso de organogénesis, que puede variar dependiendo del genotipo de la especie y puede incluso diferir entre diferentes variedades de una misma especie. Por tanto, es necesario establecer una relación adecuada entre las hormonas auxina y citoquinina para favorecer la organogénesis, y algunos estudios también

han incorporado el uso de giberelinas para promover la regeneración (Jiménez Barreto et al., 2009).

Entre las hormonas involucradas, se destaca la auxina, conocida como la "Sustancia promotora de crecimiento" debido a su papel fundamental en la regulación del desarrollo y crecimiento de las plantas. Un ejemplo bien conocido de auxina es el AIA (ácido indolacético), cuya síntesis ocurre en los meristemos apicales, hojas jóvenes y frutos en desarrollo (Jordán et al., 2006). Las auxinas ejercen diversos efectos fisiológicos, como estimular el crecimiento y la formación de raíces, ya que influyen en la división, crecimiento y diferenciación celular. También promueven el crecimiento de los tallos y la formación de raíces secundarias. Además, las auxinas juegan un papel en el tropismo, dirigiendo el crecimiento de tallos y raíces hacia el estímulo de la luz, lo que resulta en curvaturas hacia la fuente lumínica. Otra función relevante de las auxinas es la dominancia apical, donde su distribución en gradiente desde el ápice hasta la base de la planta contribuye al desarrollo de brotes axilares. Por último, las auxinas también están asociadas con el crecimiento y elongación celular, promoviendo la expansión celular y el aumento en el tamaño de los tejidos. Las auxinas sintéticas más eficientes son la AIA que es usada para la formación de raíces laterales y estimular el crecimiento de raíces en esquejes (Jiménez Barreto et al., 2009).

Por otro lado, niveles bajos de citoquininas junto con altos niveles de auxinas provocan la formación de masas celulares no organizadas llamadas callos y la formación de raíces con gradientes mayores de auxinas. Los efectos fisiológicos de las citoquininas incluyen la promoción de la división celular, la iniciación de brotes, la organogénesis y la androgénesis. Además, causan dominancia apical con brotación y crecimiento de yemas axilares para inducir la formación de nuevos brotes. En conjunto con las auxinas, las citoquininas impulsan la formación

de callos que, a su vez, pueden dar lugar a la formación de brotes o raíces. También contribuyen a la formación de embriones somáticos que luego se desarrollan en plantas completas. En la regeneración de plantas, una adecuada combinación y concentración de citoquinina y auxina son fundamentales, y esta estrategia suele utilizarse en la formación de individuos haploides a través del cultivo de anteras (Jiménez Barreto et al., 2009).

Por otro lado, el ABA (ácido abscísico) es una hormona sintetizada y almacenada en la semilla, especialmente en el endospermo. Se cree que el ABA se importa al embrión cigoto para que desempeñe su función, por lo que, si existe un déficit de esta hormona, se puede compensar mediante la adición de ABA externo al medio de cultivo. Esto fue confirmado en estudios realizados por Jordán y Casaretto (2006).

Las citoquininas en combinación con las auxinas regulan la formación de brotes, raíces y callos, así como la regeneración de plantas completas a partir de embriones somáticos. Por otro lado, el ABA desempeña un papel importante en el desarrollo de las semillas y puede ser complementado externamente para garantizar un adecuado desarrollo embrionario. Estos conocimientos sobre las hormonas y su influencia en el cultivo *in vitro* son fundamentales para el mejoramiento del tema investigación que se está realizando Jordán y Casaretto (2006).

CAPITULO II:

Materiales y Métodos

2.1 Materiales

2.1.1 Área de Estudio

Ubicación espacial:

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Agraria – Andenes ubicado en el distrito de Zurite en la provincia de Anta- Cusco Perú, a una altura de 3391m. de altitud.

Ubicación temporal:

El estudio se ejecutó desde el mes de junio del 2022 hasta el mes octubre del 2023.

2.1.2 Material Biológico

Se usaron las anteras, extraídas de la especie *Solanum stenotomum*, entre un tamaño de 4mm a 6mm sembradas en el invernadero del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Agraria – Andenes

2.1.3 Equipos y materiales de Laboratorio

- Portaobjetos y cubreobjetos
- Placas Petri
- Envases de vidrio de 50ml
- Ventilador (160 watts, con pedestal)

- Microscopio (Olympus)
- Esteroscopio (Olympus)
- Destiladora (AlquimiaLab)
- Estufa (IndumeLab)
- Refrigeradora (Samsung)
- Autoclave
- Cabina de flujo laminar (Indelab)
- Sala de incubación

2.1.4 Reactivos

- Cloro 4% (Clorox)
- Alcohol 90% (Coderal)
- Hielo
- Agua destilada
- Phytigel (Caison)
- Medio de cultivo M&S (whit vitamins- Caison)
- Fitotohormona Auxina: ANA y 2,4D (Sigma)
- Fitotohormona Citoquina: Kinetina (Sigma)
- Agua de coco (natural)

2.1.5 Material de campo

- Invernadero
- Pinzas
- Maceteros

- Nevera portátil
- Tijera
- Timer (temporalizador)
- Tres focos tipo luz del día
- Cable de extensión, 15 metros
- Manguera de 3 metros
- Film de polietileno de alta densidad 5 metros
- Hi nitro (fertilizante)
- Sustrato de tierra negra

2.2 Tipo de investigación y Metodología

2.2.1 Tipo de Investigación

Es de tipo descriptivo, transversal y experimental con enfoque mixto (cualitativo y cuantitativo).

- Descriptivo: El estudio requirió la toma de datos descriptivos que contenían características morfológicas del material biológico.
- Transversal: Los datos obtenidos se recopilaron en un transcurso de tiempo de acuerdo a la respuesta de las anteras en 45 días.
- Enfoque mixto: Los datos recopilados para la estadística fueron cualitativos y cuantitativos.

Área de conocimiento: Ciencia, tecnología y ambiente - CTA

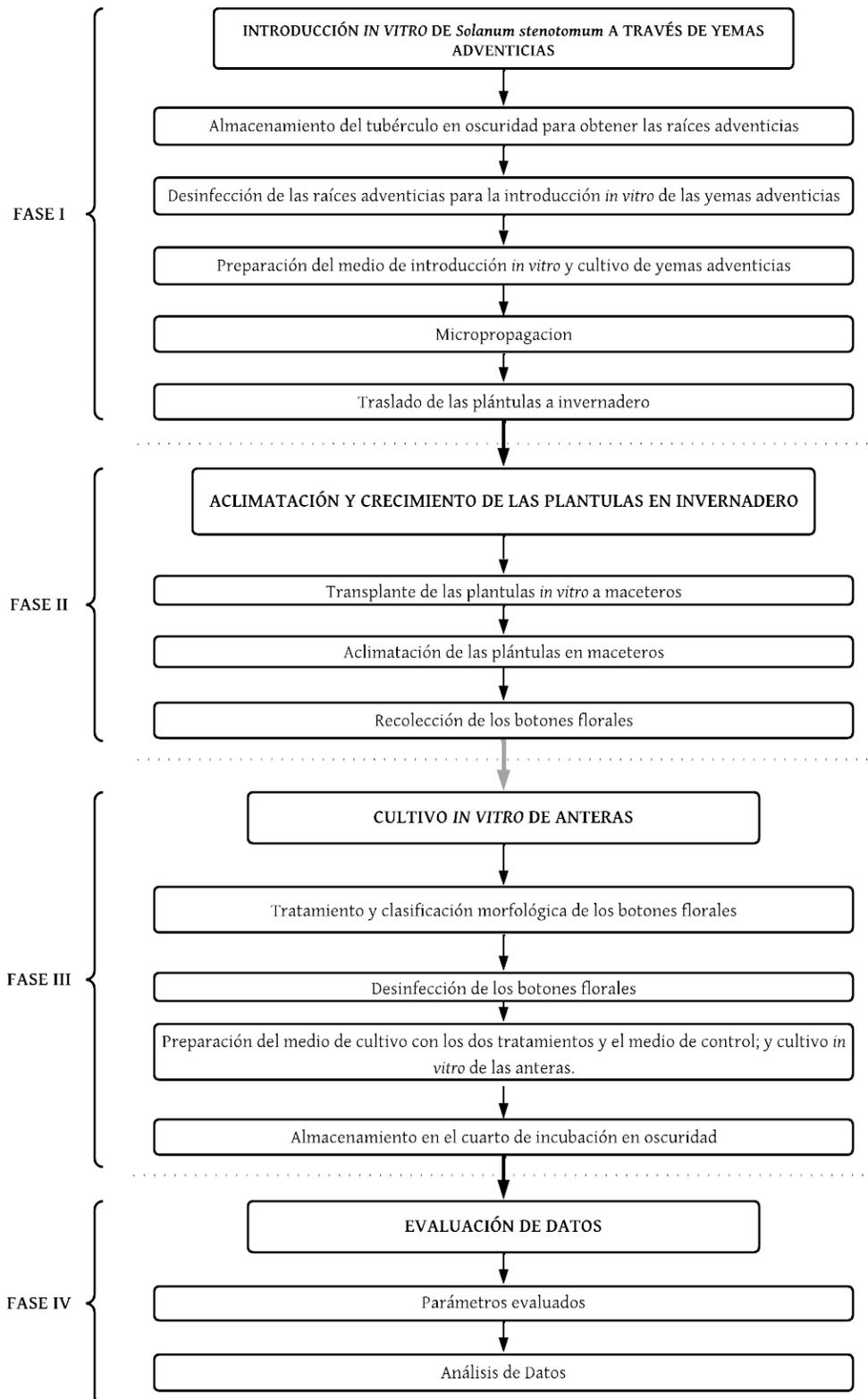
Líneas de investigación de la UNSAAC: Optimización de recursos agrícolas; y Biodiversidad agrícola y germoplasma.

2.2.2 Metodología

Figura 6. Procedimiento general con las técnicas empleadas en la investigación



Figura 7. Flujoograma de la investigación. Según modelo Lucidapp.com



2.2.2.1 Introducción *in vitro* de *Solanum stenotomum* a través de yemas del estolón

2.2.2.1.1 Almacenamiento del tubérculo de *Solanum stenotomum* para obtener estolones con yemas

Se obtuvo 7 tubérculos de la especie *Solanum stenotomum* en la Estación Experimental Andenes- Cusco, los tubérculos fueron almacenados en bolsas de papel a una temperatura constante de 10°C, manteniéndolos en total oscuridad durante el período de un mes con el propósito de inducir el desarrollo de los estolones y extracción de brotes. Después de un mes, se extrajo de las yemas.

Se desinfectó las yemas para la introducción *in vitro* de las yemas; se aplicó el protocolo de desinfección de los brotes que se tiene en el laboratorio (Protocolo del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Andenes- Cusco, el protocolo no está disponible públicamente, se proporciona información bajo solicitud a la institución).

El procedimiento de desinfección implicó poner las yemas en una solución de jabón y agua del grifo, durante ocho minutos. Posteriormente, se realizó cinco enjuagues, durante cuatro minutos cada uno, con agua del grifo para eliminar residuo de espuma de jabón. En la cabina de flujo laminar, se transfirió las yemas a una solución de cloro al 1%, durante un período de cuatro minutos, luego, a una solución de alcohol al 70% durante tres minutos por tres ocasiones. Por último, las yemas se sometieron a un proceso de enjuague con agua destilada esterilizada durante tres minutos, también por tres ocasiones.

Figura 8a. Extracción de las yemas y Figura 8b. Desinfección de yemas del tubérculo



2.2.2.1.2 Preparación del medio de introducción *in vitro* y cultivo de yemas

El medio de cultivo que se usó para la introducción *in vitro* de las yemas fue establecido por Espinoza et al., (2012), se esterilizo en la autoclave a una presión de 15psi a 120°C el cual es un medio solido que consta con los componentes descrito en la *tabla 1*, después las yemas se cultivaron en las placas con el medio de cultivo y se sellaron con parafilm, para luego mantenerlas en la sala de incubación con un fotoperiodo de 16hrs de luz por 8 de oscuridad, y a la segunda semana del cultivo se le realizo un control para observar el crecimiento de brotes.

Tabla 1. Componentes del medio de cultivo para introducción *in vitro* de yemas de papa, (Espinoza et al., 2012)

Sacarosa	25 gr/L
pH	5.7
Phytigel	3 gr/L
AG3	100ul/L
M&S con vitaminas	4.43gr/L
AG3 (Ácido gliberelico), M&S (Murashige y Skoog)	

Figura 9. Yemas en el medio de cultivo, con crecimiento de brotes



Se cultivaron las yemas en 5 placas petri y cada placa petri contenía 14 yemas. Durante los 18 días de cultivo se realizó un control para observar la contaminación.

2.2.2.1.3 Micropropagación

Se propago vegetativamente por brotes en un medio de cultivo de propagación usando el protocolo establecido por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Andenes- Cusco, en la *tabla 2* se indica los componentes.

Las plántulas *in vitro* se repicaron en frascos de vidrio que contenían el medio de introducción, luego se pasaron a la sala de incubación con un fotoperiodo de 16hrs luz por 20 días, alcanzando el tamaño ideal de trasplante a invernadero.

Tabla 2. Componentes del medio de cultivo *in vitro* para propagación de papa (INIA - EEA - Cusco)

Sacarosa	30 gr/L
pH	5.7
M&S con vitaminas	4.43gr/L
Phytigel	3gr /L
Agua de coco	10ml/L
M&S (Murashige y Skoog) con vitaminas	

Figura 10. Cortes de los brotes, brotes cultivados en los frascos y crecimiento de los brotes



2.2.2.1.4 Traslado de las plántulas a invernadero

A los 20 días los brotes crecieron hasta el tope del frasco, siendo el tamaño ideal para ser llevados al invernadero.

Figura 11. Plántulas de *Solanum stenotomum* con 20 días de crecimiento.



2.2.2.2 Aclimatación y crecimiento de las plántulas en invernadero

2.2.2.2.1 Trasplante de las plántulas *in vitro* a maceteros

Las plántulas *in vitro*, se extrajeron de los frascos e inmediatamente se transfirieron a maceteros con sustrato preparado en los invernaderos; la transferencia se separó en 2 lotes, el primer lote se trasplanto la mitad del total de plantas, con un total de 75 plántulas en macetero en el mes de abril.

El segundo lote de plantas se transfirió en mayo, con un total de 72 plántulas en 35 maceteros.

2.2.2.2.2 Aclimatación de las plántulas en maceteros

El ambiente del invernadero se aclimato con 3 focos con luz del día, programado con un timer que mantuvo los focos encendidos durante 16 hrs para complementar las pocas horas de luz; después se aisló los maceteros con plástico para evitar que la temperatura baje demasiado durante las noches, ya que durante los meses de mayo a junio fueron de días cortos y fríos, al 2do mes de cultivo se agregó el fertilizante Peters Professional Hi-Nitro en una proporción de 3gr/L, al mismo tiempo se aporco las raíces de las plántulas de *Solanum stenotomum*.

2.2.2.2.3 Recolección de los botones florales

Se recolectaron los botones florales de la especie *Solanum stenotomum* al 4to mes, una vez que brotaron. Los botones florales se recolectaron cortando una porción del pedúnculo y se colocó en una magenta con cubos de hielo para ser transportados al laboratorio. El proceso fue realizado en 10 min desde que se cortó el botón floral hasta llegar al laboratorio, todos los días de recolección fueron entre las 9am a 10:00 am (Zhang et al., 2023).

2.2.2.3 Cultivo *in vitro* de las anteras

2.2.2.3.1 Tratamiento y clasificación morfológica de los botones florales

Los botones florales que se recolectados en invernadero fueron inmediatamente colocados en el refrigerador a una temperatura de 5°C durante un período de tres horas, resguardados en placas Petri. Una vez transcurrido este tiempo, se llevó a cabo la clasificación de los botones florales en función de su tamaño, dividiéndolos en categorías de 4 mm, 5 mm, 6 mm y 7 mm, conforme a los estándares establecidos por Méndez-Hernández et al. (2019) y Gonzales-Zavaleta et al. (2018)

2.2.2.3.2 Desinfección de los botones florales

La desinfección de los botones florales se realizó siguiendo la metodología descrita por (Méndez-Hernández et al. (2019) y Araque Barrera, (2020), se realizó cambios en los tiempos y concentraciones, con la reducción en la concentración de cloro del 2% al 0.5%, ya que los botones florales se encontraban en invernadero y no en campo por lo que la carga contaminante era reducida y los botones resultaron dañados por todo el proceso de desinfección, también se redujo el tiempo del uso de alcohol para evitar quemar los botones de 5 min a 3 min.

Para el protocolo de desinfección de los botones florales se lavaron los botones florales en un con agua del grifo y jabón, por 3 minutos. Se realizo cinco enjuagues, con una duración de cinco minutos cada uno. Posteriormente, en la cabina de flujo laminar, se tranfirio los botones florales a una solución de cloro al 0.5%, durante ocho minutos. Seguidamente, se transfirió a una solución de alcohol al 70%, durante un período de tres minutos. Finalmente, se enjuago utilizando agua destilada estéril, con una duración de cinco minutos, por tres ocasiones.

2.2.2.3.3 Preparación de los tratamientos para inducir la androgénesis en las anteras y cultivo *in vitro* de anteras

Se usaron dos tratamientos con concentraciones diferentes de fitohormonas (tabla 3) basados en los resultados obtenidos por Araque Barrera, (2020) para el tratamiento 1 (T1) y Méndez-Hernández et al. (2019) para tratamiento 2 (T2), pero cabe recalcar que se le realizo una modificación de la zeatina por la kinetina, ya que ambas son citoquininas; para poder inducir la androgénesis en las anteras.

Tabla 3. Componentes de fitohormonas, en el medio de cultivo, para inducir androgénesis

Tratamiento	Reguladores mg/L	Fuente
T1 (Tratamiento 1)	ANA (2) + Kin (4)	Araque Barrera, (2020)
T2 (Tratamiento 2)	2,4D (1) + Kin (1)	Méndez-Hernández et al. (2019)
Control	-	-

Citoquininas: Z (Zeatina), BAP(6-Bencilaminopurina) y Kin (kinetina)
 Auxinas: 2,4D (2,4 – diclorofenoxiacético), ANA (Ácido naftalenacético)
 pH 5.7

Se preparo el medio de cultivo basado en la bibliografía mencionada pero se realizaron cambios a los otros componentes, se redujo en la concentración del Phytigel de 3gr/L a 1.40/L para tener un medio semisólido y la antera quede suspendida, el M&S que se uso es Murashige & Skoog whit vitamins (Lab Caisson) se redujo la concentración al 75% para inducir estrés en la antera (Seguí-Simarro Editor, 2021), el contenido del medio de cultivo básico de anteras esta resumido en la *tabla* . Ya que la privación de sacarosa y nitrógeno genera estrés (Murovec et al., 2012).

Tabla 4. Componentes del medio de cultivo para el cultivo de anteras

Sacarosa	30 gr/L
pH	5.7
M&S	3.101 gr/L
Phytigel	1.40 gr /L

Una vez que el medio de cultivo fue preparado, se procedió a su esterilización a una presión de 125 psi durante un lapso de 20 minutos. Finalmente, el medio esterilizado se vertió en las placas Petri y se aguardó a que se enfriaran antes de proceder a su sellado, posteriormente las placas que no se usaron se sellaron con cinta Parafilm para ser almacenados en la refrigeradora a 4°C.

Ya teniendo el medio de cultivo preparado y los botones florales estériles, en la cabina, se procedió a retirar los sépalos con un estilete para aislar a las anteras, se cultivaron 5-6 anteras por

placa y se mantuvieron en la sala de incubación en completa oscuridad a una temperatura entre 18 a 20°C.

Se cultivaron un total de 638 anteras, de los cuales se usaron 301 anteras para el Tratamiento 1 (T1: ANA (2) + Kin (4)), 301 anteras para el Tratamiento 2 (T2: 2,4D (1) + Kin (1)) y 36 para el control. Ya cultivados las anteras en las placas se procedió con el sellado con Parafilm y el rotulo correspondiente.

2.2.2.3.4 Almacenamiento en la sala de incubación

Las placas petri con anteras fueron llevadas a la sala de incubación, en completa oscuridad, hasta la formación de callos y embriones.

Cuando la antera formo callos y/o embriones, estas se trasplantaron a una placa diferente con el mismo tratamiento de donde provino, y se almacenaron en la sala de incubación con un fotoperiodo de 16hrs de luz y 8 de oscuridad a una temperatura de 18-20°C Seguí-Simarro (2021).

2.2.2.4 Evaluación de datos

2.2.2.4.1 Parámetros evaluados

Para determinar la eficiencia de cada tratamiento se evaluó en función de la variable "Anteras que formaron callos y embriones", para esto, se tuvieron en cuenta las variables dependientes que fueron el Tratamiento 1 (T1) y el Tratamiento 2 (T2), mientras que las variables independientes incluyeron el Color de la antera (variable nominal), el Aspecto de la

antera (variable nominal) y el Tiempo de cultivo requerido para la formación de callos y/o embriones.

Cada variable contiene diferentes categorías para evaluar los cambios morfológicos de la antera que se indica con más detalle en la tabla 5.

Tabla 5. Variables evaluadas para determinar el mejor tratamiento para la formación de callos y embriones

Variables	Categorías
Tratamientos	Tratamiento1: T1 (ANA (2) + Kin (4)), Tratamiento 2: T2 (2,4D (1) + Kin (1)) y Control
Aspecto	Hidratado, Grumos, Callo, Embrión y/o Muerto
Color	Café y/o Verde
Tiempo de cultivo (Días)	1, 15, 25, 35, y 45

Se realizó un seguimiento a las anteras cultivadas durante 45 días, en el primer día se tomaron los datos del estado inicial de la antera que era color verde y aspecto hidratado, de acuerdo pasaban los días, las anteras presentaron cambios morfológicos en el color y el aspecto.

2.2.2.4.2 Diseño experimental

Se estableció como unidad experimental cada antera de papa de la especie *Solanum stenotomum*, por lo que el tratamiento 1 (T1) tubo 301 unidades experimentales y/o anteras, el tratamiento 2 (T2) 301 unidades experimentales y/o anteras; y la prueba control 31 unidades experimentales y/o anteras.

Se realizaron controles por 5 ocasiones hasta el día 45; desde que se realizó el cultivo *in vitro* de las anteras, la primera revisión fue el primer día de cultivo considerado como día 1, después se realizó el control los días 15, 25, 35 y 45.

El diseño experimental fue completamente al azar en el que se cultivó las anteras el mismo día que los botones florales fueron colectados del invernadero, los tamaños que se repitieron para cada tratamiento fueron de 4mm, 5mm, 6mm y 7mm según bibliografía de Gonzales-Zavaleta et al. (2018) y Méndez-Hernández et al. (2019).

Durante el procedimiento experimental todas las plantas fueron cultivadas cada una en un macetero y crecieron bajo las mismas condiciones; para la colección de los botones florales y el cultivo *in vitro* se usaron los mismos procedimientos, fue del mismo modo durante la conservación en cámara de cultivo en completa oscuridad, teniendo como única variable diferente el tratamiento 1 y 2.

2.2.2.4.3 Análisis de Datos

Se realizó una estadística descriptiva en la que se incluyó gráficos de correlación e histogramas para observar la correlación entre las variables y la formación de embriones en

relación a las variables Color, Aspecto, Días y Tratamiento, para poder realizar los gráficos se les asigno valores numéricos a cada categoría de las variables

Después para poder corroborar los gráficos descriptivos se analizó los datos con la estadística inferencial para observar la influencia de los diferentes tratamientos de las hormonas de regulación en la respuesta del cultivo de anteras.

Para el análisis estadístico inferencial se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk con *pValor* de 0.05, para evaluar si los datos siguen una distribución normal; la prueba de Shapiro-Wilk es usada, en general, para muestras relativamente pequeñas observaciones, en caso sea paramétrico y los datos tengan una distribución normal, continuamos con ANOVA para comparar las medias; en caso los datos no sean paramétricos se procede a realizar la prueba de Levene test para determinar si las varianzas de los datos son estadísticamente iguales o si existen diferencias significativas en las varianzas entre los tratamientos, para luego seguir con la prueba de Kruskal Test para determinar si existe diferencias estadísticamente significativas entre tres o más grupos independientes en una variable dependiente, con *pValue* de 0.05 y si el resultado es menor a 0.05 significa que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existen diferencias estadísticamente significativas entre al menos dos de los grupos en la variable dependiente. Para finalmente usar la prueba de Wilcox Test, para realizar una comparación múltiple. El análisis de datos se trabajó en el programa Rstudio (versión 15,0 para Windows), (toma de datos: diseño completo al azar DCA).

CAPITULO III

Resultados y Discusión

Se estableció un protocolo para la obtención de embriones haploides *in vitro*, la parte decisiva del protocolo fueron los tratamientos que indujeron la embriogénesis, por lo que se estableció dos tratamientos los cuales son el Tratamiento 1:T1 (ANA (2) + Kin (4)) de la bibliografía de Araque Barrera, y el Tratamiento 2: T2 (2,4D (1) + Kin (1)) de la Méndez-Hernández et al. (2019), con la modificación de la hormona Zeatina por la Kinetina, para observar la respuesta en la formación de embriones y/o callos.

3.1 Introducción *in vitro* de la especie *Solanum stenotomum* a través de yemas de los estolones

Ya cultivado las yemas, previamente extraídas de los estolones del tubérculo de *Solanum stenotomum*, se prosiguió a realizar un control.

Se realizó un cuadro control (*Tabla 6*) y se determinó que la eficacia de la batería de desinfección fue del 10% de los individuos cultivados que tuvo resultados exitosos. Lo cual es suficiente para extraer el primer brote y repicarlo las veces que sean necesarias para obtener cientos de plántulas.

El control efectuado implicó la cuantificación del número de yemas contaminadas por cada placa, así como el registro de cuántas yemas lograron generar un brote al final del proceso. La contaminación de algunas yemas se debió a una carga bacteriana excesiva. No obstante, es

importante señalar que no es factible aumentar las concentraciones de cloro y alcohol en el proceso de desinfección, ya que esto podría resultar en la desnaturalización del tejido y, en última instancia, la muerte de la yema. También cabe mencionar que algunos brotes que no resultaron contaminados no lograron generar un brote.

Tabla 6. Control del cultivo *in vitro* de las yemas de *Solanum stenotomum* a los 18 días

PLACAS CON YEMAS	N° YEMAS/ PLACA	N° DE YEMAS CONTAMINADAS/ PLACA	N° DE BROTES
Placa 1	14	3	0
Placa 2	14	0	2
Placa 3	14	1	2
Placa 4	14	2	1
Placa 5	14	3	2
	70		7 = 10%

Figura 11a. Tubérculo de *Solanum stenotomum* y Figura 11b. Brotes cultivados a partir de las yemas



Los brotes que salieron de las yemas fueron repicados en un medio de cultivo de propagación para obtener más explantes, se realizó este proceso 4 veces, hasta obtener 15 frascos en el que cada frasco poseía 20 plántulas, teniendo un total de 300 plántulas (Figura 12); a los 15 días las plántulas crecieron lo suficiente para la fase de aclimatación.

Figura 13. Plántulas *in vitro* con 20 días de crecimiento



3.2 Aclimatación en invernadero de la plántula *in vitro* de *Solanum stenotomum* para la obtención de botones florales

Las plántulas *in vitro* se transfirieron en 2 tiempos, el primer lote se transfirió un total de 150 plántulas a maceteros con sustrato preparado el 3 de marzo del 2023, el clima en el que se encontraban las plántulas fue inestable, durante el día un promedio de 18C° y de noche 2°C con días cortos, el 8 de mayo ocurrió un evento inesperado, cayo nevada en Anta- Zurite y el 14 de junio a los 4 meses de haberlas plantado, no florecieron y presentaron señales de haber abortado, teniendo así el primer lote perdido; el segundo lote se transfirió el 19 de abril, fueron un total de 72 plántulas en 35 maceteros de los cuales se infectaron con chupadera y quedaron 18 maceteros, el ambiente del invernadero se aclimato con 3 focos luz del día, para complementar las 15 hrs de luz al día y se aislaron con plástico para evitar que la temperatura baje demasiado durante las noches, también se les agrego el fertilizante Peters Professional Hi-Nitro en una proporción de 3gr/Lt para aumentar la respuesta de la plántulas en su crecimiento.

El segundo lote presento resultados positivos, el 7 de agosto salieron los primeros botones florales en todas las plántulas de los maceteros. En todo este proceso resaltamos la importancia en la aplicación del fertilizante Peters Professional Hi-Nitro que estimulo el crecimiento vegetativo, promoviendo el crecimiento de las hojas, frutos y en nuestro caso flores, también está el factor del fotoperiodo ya que según reportes de Almekinders et al., (1996) y Maluszynsky et al., (2003) las plantas de papa presentan ausencia de flores en días cortos y por el cambio de clima brusco.

Figura 14a. Plántulas *in vitro* para invernadero y Figura 14b. Plantas de papa en invernadero



En etapa de la recolección de anteras para el cultivo *in vitro*, se llevó a cabo un análisis detallado de las condiciones de cultivo en invernadero de la especie *Solanum stenotomum*. En primer lugar, se consideraron las condiciones edafoclimáticas óptimas necesarias para asegurar el éxito del cultivo *in vitro*. Cabe mencionar que las condiciones climáticas jugaron un papel crucial en el proceso, particularmente en lo que respecta a la formación de los botones florales. Se identificó que la temperatura ejerció una influencia significativa en este proceso, siendo una limitante crítica. Las plantas de papa muestran ser sensibles a temperaturas menores a -2°C (Vignola et al., 2017).

El control de la temperatura resultó ser un desafío en sí mismo. Mientras la bibliografía de Seguí-Simarro Editor, (2021) recomienda una temperatura de 17°C durante el día y 12°C durante la noche para las plantas donadoras de anteras, la temperatura en Cusco tubo un cambio extremo, una ola de frío inusual cayo durante todo el mes de mayo en Cusco, lo que nos llevó a realizar ajustes en el invernadero. Para contrarrestar esta situación climática adversa, se tomó la decisión de aumentar la temperatura dentro del invernadero. Para lograrlo, se implementó el

aislamiento de los maceteros con plástico, manteniendo así una temperatura mínima de 3-4°C durante las noches.

La luminosidad también se reveló como un factor esencial para el éxito del cultivo. Las recomendaciones para asegurar el desarrollo de las flores, son la presencia de un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, junto con una intensidad lumínica de 300 a 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Maluszynsky et al., 2003), pero, en nuestro proyecto, este factor se vio alterado por las condiciones climáticas inusuales. En el mes de mayo, cuando se trasplanto el primer lote de plántulas a invernadero, hubo una disminución del fotoperiodo natural debido a los días cortos en los meses de mayo a junio, con 13 horas de luz, por lo que esto planteó un nuevo desafío. En respuesta, se optó por la instalación de focos de luz de 7 watts para cumplir con el fotoperiodo requerido.

La interacción entre la temperatura y la luminosidad se mostró como un aspecto clave en la formación de los botones florales. Investigaciones previas (Almekinders et al., 1996) destacaron que temperaturas cálidas favorecían la iniciación floral, aunque temperaturas superiores a 23°C durante 24 horas podían retrasar este proceso. Alineado con estos hallazgos, para el segundo lote de cultivos, las plántulas se mantuvieron a un rango de temperatura de 18-22°C durante el día y 1-4°C durante la noche en el invernadero durante el cultivo de las plántulas, teniendo resultados positivos para a las 16 semanas de haberlas pasado a invernadero (se plantó el 16 de abril y se notificó las primeras anteras el 7 de agosto).

Por lo tanto, la recolección de anteras para el cultivo *in vitro* se llevó a cabo considerando cuidadosamente las condiciones edafoclimáticas y los desafíos climáticos específicos. La manipulación de la temperatura y la luminosidad resultó fundamental para la formación exitosa

de botones florales en las variedades de papa estudiadas, aportando valiosos conocimientos para futuras investigaciones en el campo de la mejora genética de la papa.

3.3 Tratamiento del botón floral para la introducción *in vitro* de anteras

Los marcadores morfológicos evaluados para la recolección de los botones florales, en invernadero, se centraron principalmente en la ausencia de aperturas en los ápices de los sépalos y en el rango de tamaño de los botones florales que se colectaron fue entre los 4 mm y los 7 mm ya que en ese tamaño el polen se encuentra en la etapa binuclear temprana. Estos marcadores son esenciales para establecer el estadio óptimo en la recolección de los botones florales para el proceso de obtención de embriones somáticos. Las anteras del tamaño de 4, 5 y 6 mm poseían un color verde mientras que las de 7mm eran de color amarillo, coincidiendo con los resultados reportados por Araque Barrera, (2020) en la especie *Solanum Phureja*. Mientras que para (Araque Barrera, 2020) los botones deben tener un tamaño de entre 5-6mm pues en esos tamaños se encuentra la antera en la etapa de micróspora uninucleada jóvenes o tétradas y también considera como otra característica las anteras de color verde, mientras que las anteras de color amarillos ya tienen una etapa más avanzada con micrósporas tardías y granos de polen.

Cada día se extrajo y se trabajó entre 10-20 botones florales durante un mes. Las anteras colectadas fueron almacenadas por 3 horas en el refrigerador a 4°C para estimular la embriogénesis, además que los tamaños de los botones florales con los que se trabajó fueron de 4mm, 5mm, 6mm y 7mm tamaño recomendado por Sánchez-Enciso et al., (2005), Méndez-Hernández et al. (2019) y Araque Barrera, (2020).

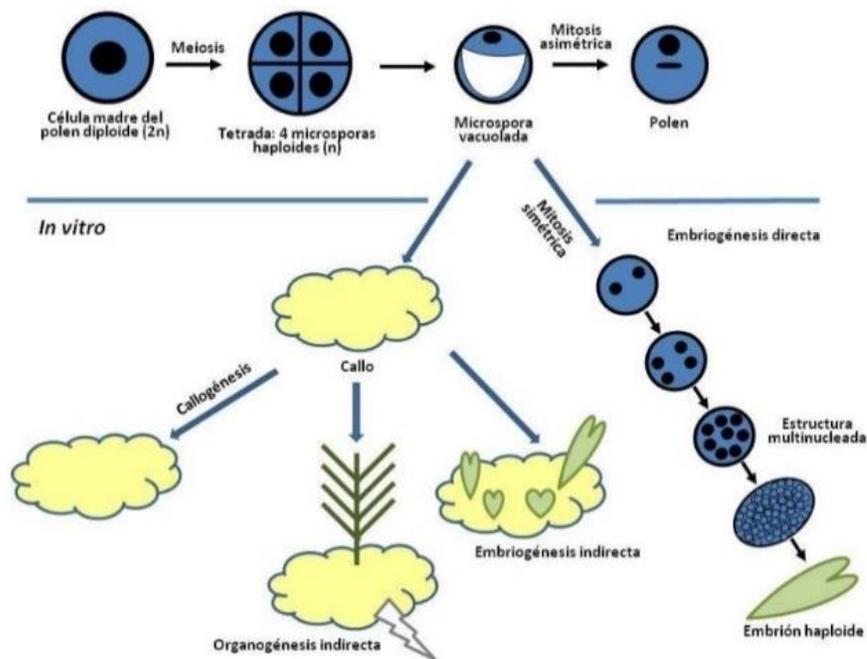
Para inducir la embriogénesis y callogenesis, en esta etapa, los botones florales pasaron por procesos físicos que inducen la vía gametofítica mediante factores de estrés. De acuerdo con las investigaciones de Germana (2006), se ha señalado que los factores extrínsecos juegan un papel crítico en la inducción de la vía gametofítica en las microsporas, estos factores pueden manifestarse en forma de estímulos físicos, térmicos o químicos. En este caso de los botones florales, se optó por someterlos a un tratamiento térmico, manteniendo las anteras a una temperatura de 5°C durante un período de 3 horas, proceso que reduce el índice de callogenesis y aumenta el índice de embriogénesis Méndez-Hernández et al. (2019). El shock térmico permitió que la antera entrara en embriogénesis.

Según M. Blasco et al. (2012) las anteras cultivadas con un pretratamiento con un shock de frío tuvieron una frecuencia del 6% de formación de callos con la hormona NAA (1), mientras que las anteras que formaron callo sin pretratamiento del shock de frío tuvieron una frecuencia del 83% con NAA (0.5); en nuestra investigación se optó usar el pretratamiento con shock de frío para estimular la embriogénesis, guiándonos en los reportes de (Murovec et al., 2012) ya que el que el shock de frío redirecciona con mayor éxito a la embriogenesis que a la callogenesis pero un exceso en el tiempo del shock térmico podría disminuir las probabilidades de la obtención de embriones y a la vez aumentar a la formación de callos, según reportes de Gonzales-Zavaleta et al. (2018). Aplicar el shock térmico fue esencial para aumentar la frecuencia de embriones por antera, aunque disminuyo la frecuencia de callos por antera.

Este enfoque considera los dos momentos críticos en los que la microspora (uninucleada) puede desviar su desarrollo ontogenético normal, redirigiendo así la diferenciación desde la vía esporofítica hacia la vía gametofítica. En este proceso, las anteras tienen la capacidad de diferenciarse siguiendo la ruta de la embriogénesis o callogénesis, gracias al potencial

androgénico intrínseco de las mismas. Es relevante resaltar que la aplicación de estrés inducido por los factores mencionados impulsa la síntesis y acumulación de ARN y proteínas en las microsporas, y los genes responsables de esta síntesis están estrechamente vinculados con la respuesta al estrés (Araque Barrera, 2020). Por lo que aplicar el shock térmico fue esencial para aumentar la frecuencia de embriones por antera, aunque disminuyó la frecuencia de callos por antera.

Figura 15. Embriogénesis gamética, (Pintos et al., 2014).



Nota 1. La Figura 15 muestra de forma esquemática Desviación en el proceso oncogénico de la célula madre del polen, que se transformaría en polen, en la fase de microspora uninucleada hacia la calogénesis o embriogénesis, la desviación ocurre por cualquier tipo de estrés en la antera.

Por último los botones florales fueron sometidos a un protocolo de batería de desinfección que fue modificada a partir de los protocolos descritos por Araque Barrera, (2020), Méndez-Hernández et al. (2019) y Maluszynsky et al., (2003) en el que se bajó la concentración de cloro de 2% a 0.5% ya que los botones florales provenían de invernaderos y no de campo por lo que carga bacteriana era mucho menor, también se redujo el tiempo del cloro de 15 minutos a 8 minutos para evitar quemaduras en las anteras; al cultivarlos *in vitro* el total de 150 botones florales cultivados, 3 se contaminaron con bacterias, mostrando así un porcentaje de eficacia de 98%.

Figura 16a. clasificación de los botones por tamaño y *Figura 16b.* Desinfección de los botones florales



En la etapa de la selección y preparación de los botones florales y anteras, se tomaron en consideración distintos protocolos y enfoques. Según el protocolo de M. Maluszynsk, (2003), se optó por seleccionar botones florales, de la especie *Solanum tuberosum* ssp. *Andigena*, con una longitud de 4-6 mm en la etapa binucleada tardía. Estos botones florales fueron sometidos a un estrés térmico a 4-6°C durante 72 horas sobre papel húmedo, seguido de una desinfección que

involucró sumergirlos en un 70% de alcohol durante 30 segundos, exponerlos a una solución del 10% de Javex-12 (Cl 10.85% w/w) durante 15 minutos y finalmente enjuagarlos con agua destilada estéril para extraer las anteras. Paralelamente, Seguí-Simarro Editor, (2021) propuso un enfoque para obtener microsporas en la etapa uninucleada en papas *Solanum tuberosum*, recomendando un tamaño preferible de 4-6 mm para los botones florales para las anteras, usando el mismo rango de tamaño que Maluszynsk, (2003). Su protocolo de desinfección involucró el uso de hipoclorito de sodio al 2%, seguido de un enjuague con etanol al 70% durante 2 minutos, y posteriormente tres enjuagues con agua destilada, mientras que para la Kiwicha el protocolo de desinfección que uso fue hacer uso de alcohol al 96% por un minuto, lejía al 25% durante 5 minutos, y finalmente un enjuague con agua destilada 3 veces (Porras Mija, 2019).

Por otro lado, el estudio de (Zhang et al., 2023) presentó un enfoque diferente en *Solanum tuberosum L.*, en este caso, los botones florales se recolectaron en un intervalo de tiempo específico, entre las 9:00 am y las 10:00 am, y se mantuvieron en refrigeración a 4°C durante 48-72 horas. El proceso de desinfección consistió en enjuagues con agua de caño durante 10 minutos, seguidos de 4-5 enjuagues con agua destilada durante 8 minutos cada uno; mientras que, para Chirinos et al., (2006) en anteras de yuca, estas se sometieron a 5°C por más de 7 días observando la no formación de callos, pero efectivamente es necesario someterlas a bajas temperaturas para aumentar la respuesta callogenica o/y embriogenica.

Por lo que la selección y el tratamiento de los botones florales y anteras se abordó mediante una combinación de enfoques basados en protocolos establecidos y adaptaciones específicas. La variabilidad en los tamaños de botones florales y los procedimientos de estrés térmico y desinfección contribuyeron al logro de un proceso eficiente y de alta pureza, esencial para el éxito de los experimentos.

3.4 Tratamiento óptimo para la inducción de embriogénesis y callogenesis en las anteras cultivadas

En el marco de nuestra investigación, el mejor resultado para la inducción de callos y/o embriones se alcanzaron mediante el tratamiento 2 o T2 (Kin (1) + 2,4D (1)), manteniendo una proporción equilibrada entre la citoquinina y la auxina. Esta relación entre las fitohormonas en el medio de cultivo demostró ser crucial para estimular con éxito la formación de callos y/o embriones en mayor proporción.

Estos resultados están en línea con las conclusiones obtenidas por Méndez-Hernández et al. (2019), quienes sugieren que concentraciones de hormonas en el rango de 0.02 mg/L a 0.2 mg/L son óptimas para el cultivo de anteras. Además, su estudio destacó que concentraciones más elevadas de ANA condujeron a la formación de callos de mayor tamaño. Es relevante señalar que, a diferencia de lo observado en explantes de yemas, los tratamientos con auxinas en explantes de anteras no lograron inducir la formación de callos en el mismo período de tiempo. Nuestros resultados también concuerdan con los de Araque Barrera, (2020).

Otros autores que usaron diferentes concentraciones y combinaciones de hormonas reportaron resultados positivos, como Chirinos et al., (2006) que trabajó en la yuca, usó dos tratamientos siendo el más efectivo el que contenía las fitohormonas ANA (2) + Kin (0.5); una relación de Auxina > Citoquinina, contrario al nuestro Tratamiento 2 Auxina = Citoquinina. En el reporte de Zhang et al. (2023) en *Solanum tuberosum* emplearon un medio de cultivo principal con M&S normal, conteniendo sacarosa (30 g/L), agar (4 g/L) con las fitohormonas ANA (0.5) +

2,4-D (1) + kinetina (1). Es importante destacar que la combinación de auxinas y citoquininas promueve la desdiferenciación de los tejidos vegetales (Gonzales-Zavaleta & Chico-Ruiz, 2018).

Un reporte hecho por Porras Mija, (2019) en la Kiwicha, uso las hormonas BAP (2), ANA (1.5) y 2,4-D (0.5) que genero respuestas morfológicas a los 15 días de cultivo.

Mientras que Maluszynsky et al., (2003) uso las fitohormonas AG3, tiamina HCL, con una frecuencia de 1.18% de regeneración. También menciona que las hormonas 2,4D, zeatina, GA3 y ABA no son efectivos para promover la embriogénesis en frutales, pero podemos observar que, en nuestra investigación, la combinación de 2,4D + KIN son efectivos al ser una Solanacea. Adicionalmente, en un artículo reciente de Zhang et al. (2023), se describe el uso de un medio de cultivo basado en el uso de M&S (Murashige y Skoog) normal, sacarosa de 30 g/L, agar de 4 g/L, y una combinación de hormonas compuesta por el ácido naftalenoacético NAA (0.5), 2,4-D (1) y kinetina (1).

Por otro lado, en investigaciones previas, se han propuesto diferentes combinaciones hormonales para la inducción de callos en distintos tipos de explantes en papa, las combinaciones recomendadas para la inducción de callos recomiendan las auxinas 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y AIA (ácido indolacético); y las citoquininas BA (6-bencilaminopurina) y TDZ (thidiazuron). Esto subraya la influencia de las auxinas y las citoquininas en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática, donde la proporción adecuada de estas hormonas resulta crucial.

Estos hallazgos subrayan la relevancia de las combinaciones y concentraciones de las fitohormonas, las condiciones de cultivo y la especie de donde provienen los explantes en la exitosa inducción de callos y/o embriones en estudios de cultivo de tejidos vegetales.

En el transcurso de este estudio, se realizaron observaciones detalladas a lo largo de 45 días (Tabla 5). El primer punto de control se llevó a cabo el mismo día en que se realizaron los cultivos *in vitro* de las anteras (día 1). Luego, se realizaron seguimientos en los días 15, 25, 35 y 45. En el día 1, se registró el estado natural de las anteras, observando que todas presentaron un color verde intenso, un aspecto hidratado y superficie lisa.

En el segundo control, que se realizó después de 15 días, se observaron cambios morfológicos en las anteras. Algunas de ellas experimentaron un cambio en su color, pasando de verde a café, comenzando desde la base. Al mismo tiempo, algunas anteras mantuvieron su aspecto original, conservando su hidratación y superficie lisa y empezaron algunas anteras a formar callos.

Al llegar al día 25, aumento el numero de anteras que se tornaron de color café, y las que habían cambiado de color el día 15 empezaron a mostrar una superficie con grumos, lo que provocó una deformación en la capa lisa de las anteras y a partir de este día empezaron a formarse los embriones, sin embargo, en una proporción menor, mientras algunas anteras no sobrevivieron y cambiaron su color a uno café, perdiendo su aspecto hidratado y no mostraron ningún crecimiento.

A los 35 días, se observó que el 70% de las anteras habían adquirido un color marrón con una superficie irregular y aspecto grumoso, y no experimentaron un crecimiento adicional. En contraste, las anteras que se mantuvieron verdes, mantuvieron la apariencia hidratada y superficie lisa y crecieron hasta alcanzar los 2 mm de tamaño.

El cambio de color de las anteras se produce como resultado de la respuesta de la enzima polifenol oxidasa. Esta enzima se activa cuando el tejido de las anteras sufre daño, como cuando

se corta. Cuando se activa, la enzima oxida los fenoles presentes en el tejido, lo que lleva a la formación de compuestos de color marrón. (Murovec et al., 2012).

Las estructuras callosas que se formaron eran de tipo friable de color blanco. Esta característica se debió a que se formaron en un entorno completamente oscuro, con un tamaño promedio de 1mm, generando un callo por cada antera. No obstante, al ser trasladados a un ambiente con luz, comenzaron a llevar a cabo la fotosíntesis y adquirieron un color verde intenso. Además, durante la segunda semana de exposición a un fotoperiodo de 16 horas de luz, su tamaño se duplicó. Es importante señalar que algunos callos necesitaron hasta 2 semanas para cambiar su color a verde. Además de los callos verdes, también se observaron callos fenólicos de color café.

En lo que respecta a los embriones formados, se encontraban en la etapa globular y exhibían un marcado tono verde. No obstante, durante la primera semana de exposición a la luz, no se observaron cambios sustanciales en su desarrollo. También es relevante destacar que los callos se originan en la zona de corte de las anteras.

Desde el primer día del cultivo, se observaron cambios morfológicos en las anteras que siguieron un orden específico. Inicialmente, experimentaron un estado de hidratación, seguido por una fase en la que algunas anteras presentaron una apariencia grumosa y, en algunos casos, se registró la muerte de la antera. Posteriormente, a partir del estado con grumos, culminó en la formación de callos y embriones. Este proceso secuencial sugiere una progresión definida en el desarrollo de las anteras durante el periodo de cultivo, señalando una culminación exitosa con la generación de callos y/o embriones (*Tabla 8*).

Tabla 7. Evaluación de las variables Color y Tiempo con respecto a los tratamientos T1 y T2

VARIABLES	T1 (Tratamiento 1)	T2 (Tratamiento 2)	Tiempo de cultivo (Días)
Color	Verde 100%	Verde 100%	1
	Café 0%	Café 0%	
	Verde 80.7%	Verde 90.1%	15
	Café 19.2%	Café 39.8%	
	Verde 72.4%	Verde 44.1%	25
	Café 27.5%	Café 55.8%	
	Verde 61.4%	Verde 31.2%	35
	Café 27.5%	Café 68.7%	
	Verde 54.8%	Verde 23.2%	45
	Café 45.1%	Café 76.7%	

Tabla 8. Evaluación de las variables Aspecto y Tiempo con respecto a los tratamientos T1 y T2

VARIABLES	T1 (Tratamiento 1)	T2 (Tratamiento 2)	Tiempo de cultivo
	Hidratado 100%	Hidratado 100%	1
	Hidratado 89%	Hidratado 71%	
	Grumos 9%	Grumos 14%	
	Callo 1%	Callo 3%	15
		Muerto 12%	
	Hidratado 74%	Hidratado 46%	
	Grumos 22%	Grumos 36%	
Aspecto	Callo 1%	Callo 3%	25
	Embrión 1%	Embrión 1%	
	Muerto 2%	Muerto 14%	
	Hidratado 65%	Hidratado 34%	
	Grumos 30%	Grumos 46%	35
	Callo 2%	Callo 4%	
	Embrión 1%	Embrión 1%	
	Muerto 2%	Muerto 15%	
	Hidratado 57%	Hidratado 18%	
	Grumos 32%	Grumos 48%	45
	Callo 4%	Callo 10%	
	Embrión 2%	Embrión 5%	
	Muerto 5%	Muerto 19%	

Figura 17. Cambios morfológicos de las anteras durante el cultivo *in vitro*, imágenes con aumento.

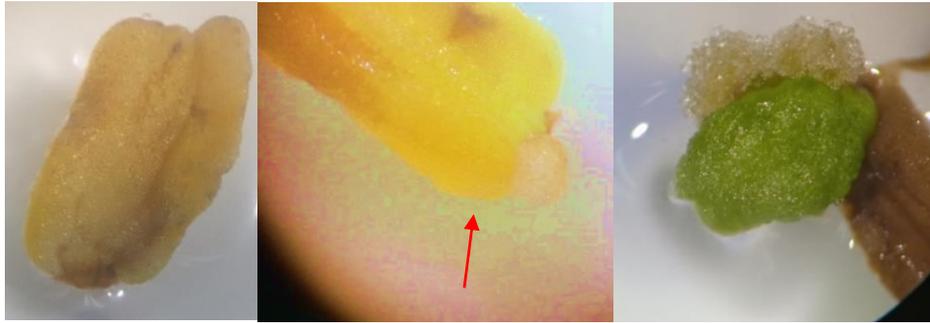


Figura 17a. Antera hidratada

Figura 17b. Callo

Figura 17c. Callo

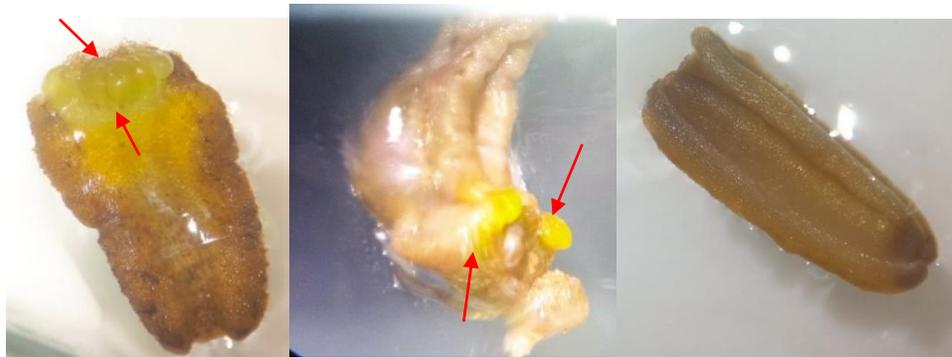


Figura 17d. Embrion

Figura 17e. Embrion

Figura 17f. Antera muerta



Figura 17g. Callogenesis en flor

Figura 17h. Embrion

Nota2. Las figuras muestran los cambios morfológicos de las anteras durante el cultivo *in vitro*, tenemos la *Figura 17a.* que muestra una antera hidratada a la segunda semana de cultivo *in vitro* y con aspecto grumoso. La *Figura 17b.* muestra un callo friable con un tamaño de 1mm, en la *Figura 17c.* muestra un callo compacto de color verde a la 1ra semana de estar bajo luz, y a su lado un callo friable. La *Figura 17d.* muestra embriones en la etapa globular en anteras con 25 días de cultivo *in vitro*, la antera tiene un aspecto grumos y es de color café. En la *Figura 17e.* vemos embriones en una antera con 35 días de cultivo *in vitro*, con un aspecto mucho grumoso. La *Figura 17f.* muestra una antera muerta, sin grumos ni hidratada. La *Figura 17g.* muestra un caso especial en el que la antera floreció dentro de la placa, por lo que vemos un pétalo, además posee un aspecto con grumos (índice de formación de callo) y la *Figura 17h.* muestra una antera con formación de embriones en la parte basal y un tejido con grumos en la superficie, ya por formar un callo.

Los cambios morfológicos de las anteras fueron diferentes, a pesar de su origen común en el mismo botón floral, pues se esperaba que las anteras que provenían de un mismo botón floral respondiesen de la misma forma. Estas variaciones en las respuestas de las anteras del mismo botón floral se explican por las hormonas utilizadas, los tratamientos externos aplicados y por el fenómeno de dimorfismo del polen. En este proceso, los granos de polen más grandes siguen un desarrollo gametofítico para convertirse en granos de polen maduros, mientras que los granos de polen más pequeños tienen una tendencia innata hacia el desarrollo morfogénico, dando lugar a la formación de estructuras multicelulares.

Este hallazgo nos lleva a afirmar que tanto la callogenesis como la embriogénesis están influenciadas por estos factores. Este fenómeno de dimorfismo del polen no es exclusivo de esta especie y se ha observado en varias otras. Indica una predisposición intrínseca en la capacidad de los granos de polen para desarrollarse de manera morfogénica, lo que explica las diversas respuestas morfológicas observadas en las anteras procedentes del mismo botón floral Méndez-Hernández et al. (2019).

Esta predeterminación genética implica la participación de genes que reciben señales de reguladores del crecimiento, como la metilación del ADN y las vías de señalización de auxinas. Estos genes, a su vez, desencadenan una cascada de eventos que afecta la señalización de los brasinoesteroides, un proceso clave en la regulación del crecimiento, el desarrollo y la respuesta de las plantas a diversas condiciones ambientales. Además, también influyen en el metabolismo del ácido jasmónico, una hormona que desempeña un papel crucial en la respuesta de las plantas a situaciones de estrés, como el ataque de herbívoros y otros patógenos, especialmente en condiciones ambientales desfavorables. (Elhiti et al., 2013).

Por lo que la variación en los cambios morfológicos de las anteras, a pesar de su origen común, se atribuye a la influencia de hormonas, tratamientos externos y el fenómeno de dimorfismo del polen. Este fenómeno, observado en varias especies, refleja una predisposición genética influenciada por reguladores del crecimiento y señalización hormonal.

En nuestros resultados, observamos que en el tratamiento 1, todas las anteras (100%) presentaban un aspecto inicial de hidratación. Hasta el día 45, algunas anteras mantuvieron su característico color verde, mientras que alrededor del 52.49% experimentaron un cambio en su

coloración, adquiriendo un tono café. De manera similar, en el tratamiento 2, se obtuvieron resultados comparables, con aproximadamente el 63.12% de las anteras exhibiendo un cambio de coloración de verde a café.

Estos hallazgos se asemejan a un estudio previo realizado por Hernández Amasifuen & Díaz Pillasca (2019) en la especie *Solanum goniocalyx*. En dicho estudio, se observó que, a los 9 días de cultivo, las anteras experimentaron un engrosamiento y cambio en la coloración, seguido de formaciones hiperhídricas a los 15 días y la formación de callos de color marrón a los 21 días, los cuales posteriormente adquirieron una apariencia friable. En relación con nuestra investigación, se pudo observar que en el tratamiento 2 se formaron callos en la segunda semana, con un porcentaje de regeneración del 9.63% mientras que el porcentaje de regeneración de callos por antera en el maíz fue del 8 al 10% (Prasanna et al., 2013).

Es relevante destacar que los resultados de nuestro estudio coinciden con el informe de Araque Barrera (2020), donde también se notó una hinchazón de anteras y un aumento en su turgencia a los 15 días de cultivo. Sin embargo, es importante señalar una diferencia clave en el presente estudio: la disparidad en los resultados podría atribuirse a variaciones en las condiciones experimentales o a diferencias inherentes entre las especies de plantas estudiadas. Estos hallazgos proporcionan una comprensión más completa y contextualizada de los procesos observados en nuestro estudio.

3.5 Análisis de Datos

3.5.1 Análisis dinámico

Para facilitar una comprensión más dinámica del análisis de datos, llevamos a cabo un análisis estadístico descriptivo utilizando la herramienta Excel y Rstudio. Asignamos valores

numéricos a las categorías de las variables nominales, tal como se muestra en la *Tabla 9* para el procesamiento de los datos.

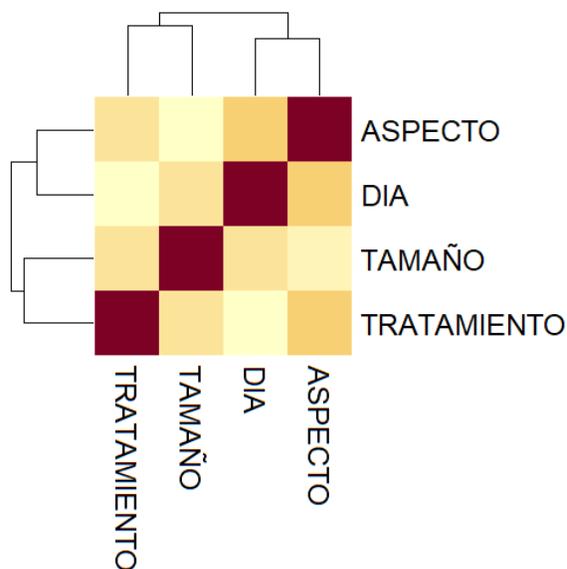
Tabla 9. Asignación de valores numéricos a las categorías de las variables cualitativas

	Variables	Valor numérico asignado
Tratamientos	T1	1
	T2	2
	Control	3
Aspecto	Hidratado	1
	Grumos	2
	Callo	3
	Embrión	4
	Muerto	5
Color	Verde	1
	Café	2
Tiempo de cultivo (Días)	1	1
	15	2
	25	3
	35	4
	45	5

Se realizó un gráfico de correlación en Rstudio para poder observar cómo se relacionan entre sí todas las variables y si existe alguna dependencia entre ellas y así observar si alguna variable influye sobre otra.

En nuestra matriz de correlación (*Figura 7*) podemos observar que la línea central en diagonal es de un color rojo intenso ya que existe una correlación perfecta entre las mismas variables, la relación entre DIA – ASPECTO y TRATAMIENTO – ASPECTO es de un color naranja claro lo que indica que existe una ligera correlación entre esas variables, por lo que podemos decir que el aspecto va cambiando de acuerdo a los días en los que hizo el control, igualmente hubo una correlación entre el cambio del aspecto de la antera en relación al tratamiento usado; mientras que los sectores con colores cerca al blanco indica que esas variables son independientes en relación a las otras. Esta matriz de correlación no muestra del todo las relaciones posibles entre las variables, sin embargo, nos brinda una idea que rumbo están tomando la relación de los datos.

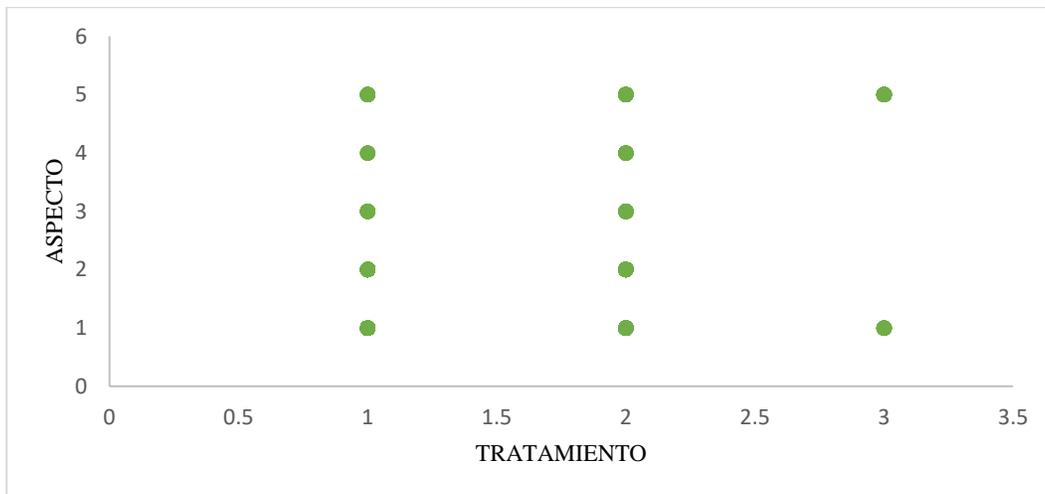
Figura 18. Correlación entre las cuatro variables evaluadas



Nota 3. Los cuadrantes de color rojo son los que se correlacionan con ellos mismos por eso el color rojo intenso, mientras que los cuadrantes de color naranja claro indican una correlación ligera.

En el gráfico de correlación entre la variable TRATAMIENTO y ASPECTO observamos que si existe alguna relación entre estas 2 variables, observamos que el tratamiento T1 y T2 si presentaron cambios en el aspecto hidratado, grumo, callo, embrión y muerto, mientras que para el CONTROL observamos que ningún individuo paso por la etapa de callo y embrión, ya que durante la experimentación se observó que el CONTROL presento hidratación hasta los 15 días; y después deshidratación y muerte, debido a que solo contenía un medio básico sin hormonas lo que implico que no presentara ningún cambio, por lo que podríamos decir que la presencia de las hormonas si influyo en la obtención de callos y embriones en las anteras.

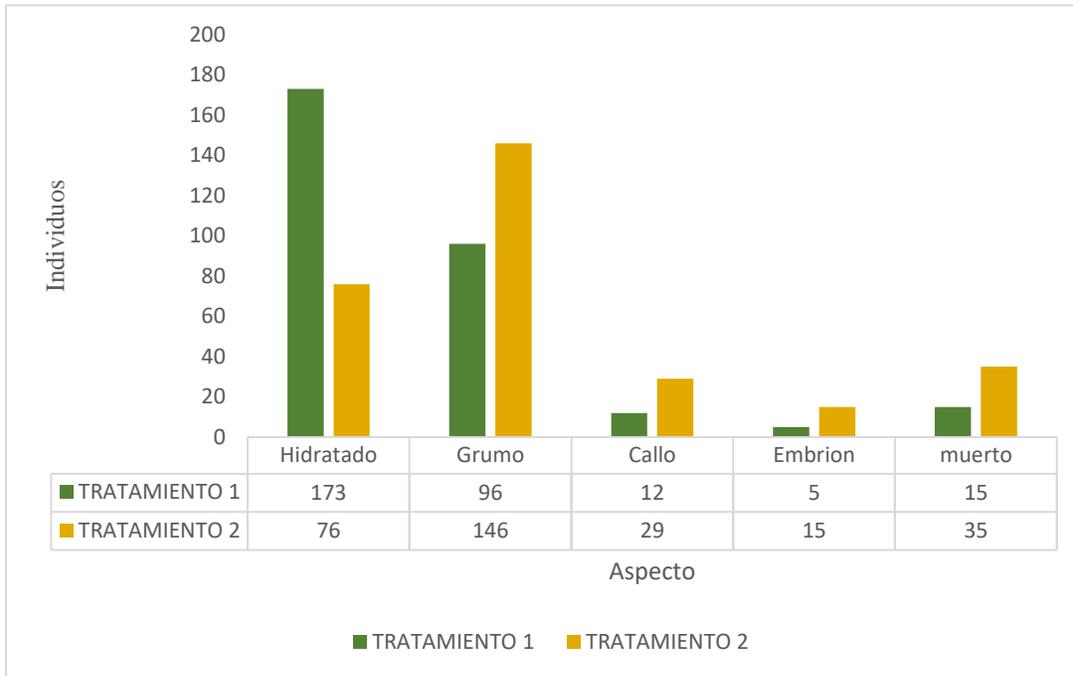
Figura 19. Correlación entre el tratamiento y la respuesta Aspecto



Se muestra la correlación entre los tratamientos T1, T2 y el CONTROL con el ASPECTO. Al realizar la tabla se le asignó valores numéricos a las variables categóricas; T1: 1, T2:2 y CONTROL:3, mientras que a los valores de aspecto se le asignó, Hidratado: 1, Grumo:2, Callo:3, Embrion:4 y Muerto:5.

Se realizó un gráfico de barras para observar los cambios que tuvieron los individuos (anteras), por lo que podemos observar que el tratamiento 2 posee mayor número de anteras que formaron callo y embriones a comparación del tratamiento 1, también que el tratamiento 2 tuvo mayor cantidad de anteras que formaron grumos son mayores a la del tratamiento 1, por lo que podemos decir que el tratamiento que generó un aspecto grumoso en las anteras es quien más produjo callos y embriones, por lo que si existiría una relación entre el aspecto grumoso con la formación de callo y embriones. También podemos observar el tratamiento 1 tuvo mayor cantidad de anteras que se mantuvieron en su estado inicial “Hidratadas”, no presentaron ningún cambio morfológico para transformarse en callos o embriones.

Figura 20. Formación de callos y embriones en el tratamiento 1 y 2 hasta el día 45 (resultado final)



Nota 4. Figura 19 presenta los resultados finales del día 45 en relación de la variable ASPECTO de las anteras. Observamos que, de un total de 301 anteras en el Tratamiento 1 (T1), 173 se mantuvieron hidratadas, 96 presentaron un aspecto grumoso, 12 desarrollaron callos, 5 generaron embriones, y 15 murieron, lo que suma 301 anteras en total. Por otro lado, en el Tratamiento 2 (T2), 76 anteras se mantuvieron en su estado hidratado principal, 96 presentaron un aspecto grumoso, 29 generaron callos, 15 anteras formaron embriones, y 35 se perdieron, dando un total de 301 anteras.

Los callos en el tratamiento 1 y 2 empezaron a formarse desde el día 15, mientras que los embriones desde el día 25; la diferencia es que el tratamiento 2 presentó mayor número de anteras con callos desde los 15 días mientras que el tratamiento 1 presentó un aumento en la

formación de callos desde los 35 días; en el caso de los embriones estos empezaron a formarse desde los 25 días en ambos tratamientos, pero en menor proporción.

Para observar el resumen de resultados del día 45, de arriba, de forma más gráfica y representativa se hizo el resumen con el grafico de Pay para mostrar la proporción de cada categoría de la variable ASPECTO.

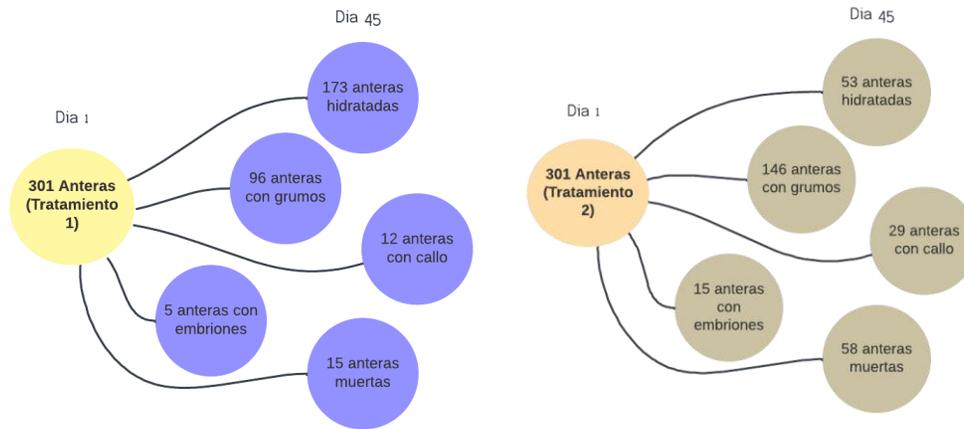
Figura 21a. Resultados del T1 con respecto a la variable ASPECTO y *Figura 21b.* Resultados del T2 con respecto a la variable ASPECTO



Nota 5. *Figura 21.A* y *Figura 21.B* muestran los resultados del Tratamiento 1 y el Tratamiento 2 con respecto a la variable ASPECTO.

Cabe recalcar que las 301 anteras cultivadas para cada tratamiento 1, 173 permanecieron con el aspecto hidratado, 96 con un aspecto grumoso, 12 formaron callos, 5 embriones y 15 murieron mientras que para el tratamiento 2 53 anteras mantuvieron su aspecto hidratado, 146 con grumos, 29 formaron callos, 15 formaron embriones y 58 murieron.

Figura 22. Cambios morfológicos evaluados en las anteras a los 45 días



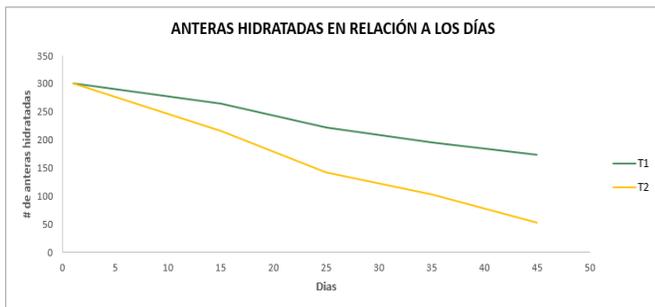
Se muestra de forma gráfica (Figura 22) como de las 301 anteras iniciales, estas fueron cambiando morfológicamente hasta el día 45 quedando en con un aspecto de hidratado, con grumos, callo, embrión y muertos (Figura 21).

Posteriormente se realizó un análisis descriptivo en relación a las variables DIA y ASPECTO para cada Tratamiento. El ASPECTO hidratado es el aspecto inicial de la antera, al momento de ser cultivada *in vitro*, y al permanecer así por más de 15 días, implica que el medio de cultivo las mantiene vivas, pero en la Figura 23a observamos que a partir de los 15 días la curva las anteras hidratadas empiezan a decaer, esto se debe a que están cambiando su aspecto a grumoso, también observamos que el T1 es quien mantuvo más anteras hidratadas hasta el día 35 a diferencia del T2 que tuvo menos anteras hidratadas. En la Figura 23b. observamos la relación entre los Días y el aspecto Grumoso, los grumos se deben a que el tejido de la antera se está diferenciando para formar callos u embriones o también podría simplemente quedarse como tejido grumoso que no llega a diferenciarse por completo, esto se debe a la presencia de las hormonas de cada tratamiento, en el gráfico podemos observar que el T2 es quien presentó mayor número de anteras con grumos hasta el día 35. En la Figura 23c. observamos la relación

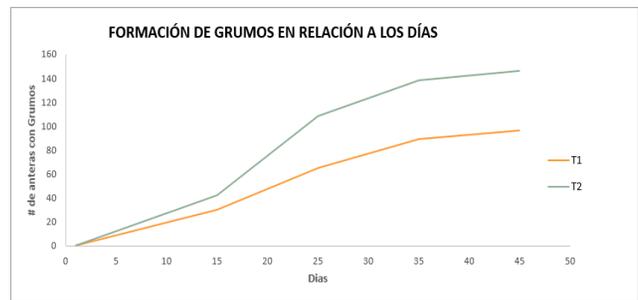
entre los Días y las anteras que formaron Callos, podemos observar que el T2 empezó a formar callos desde el día 15 mientras que T1 formo solo 2 callos al dia15, ya para los 34 días. En la *Figura 23d.* observamos la relación entre los Días y la formación de Embriones, podemos observar que los embriones empezaron a formarse y a aparecer a partir de los 21 días y que la cantidad que se formaron fueron muy bajas, y que el T2 es quien obtuvo mayor cantidad de embriones a comparación del T1 que solo formo 5 embriones.

Por lo que señalamos que T2 es quien genero cambios morfológicos más acelerados y en mayor proporción en las anteras, algo para destacar es que en la formación de callos y embriones, T2 produjo más explantes y en menor tiempo a comparación de T1, por lo que podemos decir que el tratamiento T2 es el más afectivo ya que produce callos y embriones en mayor proporción y menor tiempo en relación al T1.

Figura 23a, b, c y d. Correlación entre la variable DIA y las categorías de la variable ASPECTO

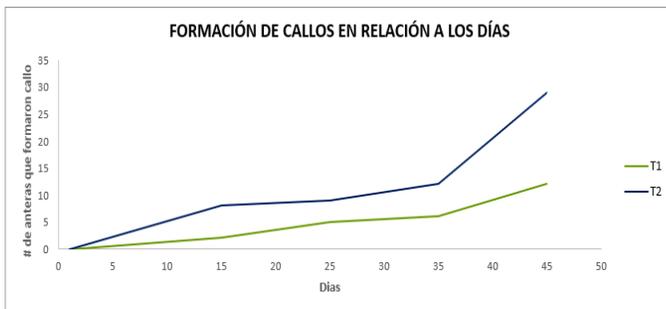


a.

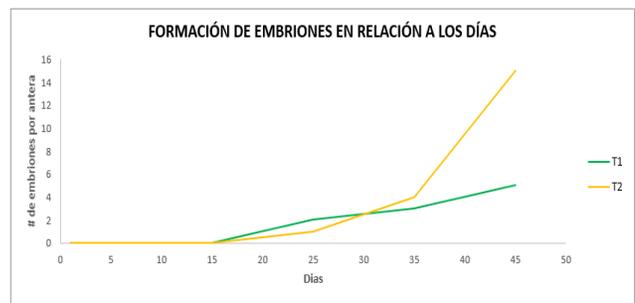


c.

b.



c.



d.

Nota 6. La *Figura 23a, b, c y d* muestran los gráficos de correlación entre la Variable DIA y las categorías de la variable ASPECTO, que son Hidratado, Grumos, Callo y Embriones, donde en el eje Y se muestra el número de anteras y en el eje X los DIAS. La *Figura 23a.* es el estado inicial, en el día 1, mientras que la *Figura 23b.* es el estado de las anteras al día 45.

Un análisis de correlación, en el estudio de Araque Barrera (2020) en *Solanum tuberosum* Grupo Phureja y la de Gonzales-Zavaleta y Chico-Ruiz (2018) en la especie *Carica papaya* L. variedad Criolla (papaya), entre el color de las anteras y la formación de callos arrojó resultados interesantes. Se encontró una ligera correlación entre aquellas anteras que cambiaron su color de verde a café y una mayor propensión a formar callos, mientras que las anteras con tono verde no mostraron esta tendencia. Este hallazgo sugiere una posible relación entre la hiperhidratación y el cambio de color a café como un indicativo del potencial desarrollo de callos.

Pero para validar de forma más precisa los gráficos de la estadística descriptiva, se realizó un análisis estadístico inferencial en la que usamos pruebas paramétricas o no paramétricas.

3.5.2 Análisis estadístico inferencial

Los datos recopilados con los que se trabajó fueron los resultados del día 45, la tabla 7 contiene los datos de las variables: Tratamiento, Color, Aspecto con sus categorías Hidratado, Grumos, Callo, Embrión y Muerto; la tabla se subió a un Excel para luego ser importados en Rstudio versión 3.0.1.

Se empezó suponiendo que los datos presentan una distribución normal por lo que realizamos una prueba ANOVA, en la que comparamos los 2 tratamientos y el control en función

de las variables Color con sus categorías Café y Verde; y Aspecto con sus categorías Hidratado, Grumos, Callo, Embrión y Muerto para Aspecto, obteniendo el resumen del análisis:

Tabla 10. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) de los tratamientos en función a las variables COLOR y ASPECTO

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
datos_finales\$TRATAMIENTO	2	0.242	0.1212	3.834	0.0221 *
Residuals	635	20.066	0.0316		
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ' ' '1

Del resumen de la tabla 7, podemos decir que:

- El **Df** muestra los grados de libertad, y podemos observar que el factor tratamiento posee 2 grados de libertad y 635 los residuos.
- El **Sum Sq** es la suma de los cuadrados, para el factor tratamiento la suma de cuadrados es 0.242, lo que indica cuánta variabilidad se debe a las diferencias entre los tratamientos, mientras que para los residuos el valor es de 20.066 que representa la variabilidad no explicada por los tratamientos.
- El **Mean Sq** es la suma de cuadrados dividida por los grados de libertad, para el factor tratamiento el promedio es 0.1212, que es una medida de la variabilidad promedio entre los tratamientos.
- El **F value** es la estadística de prueba del ANOVA e indica si las diferencias entre los tratamientos son estadísticamente significativas, con un valor de es 3.834, el

valor es un poco alto por lo que podemos decir que si hay diferencia significativa entre los 2 tratamientos.

- El $\Pr(>F)$ es la probabilidad asociada con el valor F, ósea el *pValue*, que es 0.0221 lo que sugiere que hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula

Por lo que podemos afirmar que, si existe evidencia significativa de que al menos dos de los tratamientos, de la base de datos, son diferentes entre sí.

Después se procedió el uso de los residuos de la prueba ANOVA para trabajar la prueba de Shapiro Wilk con un $p < 0.05$ y observar si los datos presentan una distribución normal, los resultados se planteó en la *Tabla 9*

Tabla 11. Resultados del test de normalidad de Shapiro-Wilk de los tratamientos en función a las variables Color y Aspecto

Shapiro-wilk normality test

Data: anova_embrión\$residuals

W = 0.24328, *p-value* < 2.2e-16

Podemos observar que el valor de *pValue* es muy pequeño, casi 0, por lo que rechazamos la hipótesis nula, ya que el resultado indica que los datos no siguen una distribución normal por lo que no se ajustan a una distribución Gaussiana.

En los resultados de Araque Barrera (2020) al realizar una prueba de normalidad voto un valor de *p-value* = 0.7814 mostrando que no existe diferencias significativas entre los

tratamientos. Estos resultados paralelos respaldan la consistencia de las observaciones realizadas en nuestra investigación y sugieren una tendencia general en la relación entre el estado de hidratación y el cambio de color en las anteras pues nuestros resultados al realizar análisis e normalidad obtuvimos un p-valor, no normal.

Al no presentar nuestros datos una distribución normal, se procedió a realizar las pruebas no paramétricas, por lo que se hizo la prueba de Levene Test para observar la homogeneidad de varianzas y determinar si las varianzas de los grupos son iguales o diferentes. Los resultados se plantearon en la *Tabla 10*

Tabla 12. Resultados del test de normalidad de Levene's Test de los tratamientos en función a las variables Color y Aspecto

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")

	Df	F value	Pr(>F)
group	2	3.8343	0.02212 *
	635		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

- El **Df (grado de libertad)** es de 2 y los residuos son de 635.
- El **F value (Valor F)** es 3.8343, indica si las diferencias entre los tratamientos son estadísticamente significativas.

El **Pr(>F) (Valor p)**, es de 0.02212 lo que sugiere que hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula de que las varianzas son iguales entre los grupos.

Podemos afirmar que el valor de *pValue* es de $0.02212 < 0.05$ lo que sugiere que hay evidencia suficiente para concluir que al menos una de las varianzas es diferente de las demás, lo que significa que las diferencias en las varianzas entre los grupos son reales y no se deben simplemente a la variabilidad aleatoria.

Luego se procedió con la prueba de Kurskal Test, que es una prueba no paramétrica que va a comparar los tratamientos en función a la variable Embrión (número de embriones formados por tratamiento). Los resultados se plantearon en la *Tabla 11*

Tabla 13. tabla de resultados del test de Kurskal- Wallis de los tratamientos en función a la variable Embrión

kruskal-wallis rank sum test

data: datos_finales\$EMBRION by datos_finales\$TRATAMIENTO

kruskal-wallis chi-squared 7.6009, df = 2, p-value = 0.02236

- El Df (Grados de libertad), es 2.
- El *p-value* (Valor p) es $0.02236 > 0.05$
- El *pValue*, de la mediana entre la variable Embrión, 0.02236 es menor al *pValue* > 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis nula de que no hay diferencias significativas entre los grupos en la variable Embrión, lo que significa que la prueba de Kruskal-Wallis indica que al menos dos de los grupos en la variable

Tratamiento tienen medianas diferentes en la variable Embrión, y estas diferencias son estadísticamente significativas, lo que indica que el factor Tratamiento tiene un efecto estadísticamente significativo en la variable Embrión.

Finalmente usamos la prueba de Wilcoxon para la variable EMBRION entre los grupos de tratamiento control, T1 y T2, teniendo el resumen en una matriz en la que se comparó por pares entre los grupos, los valores en la matriz son los *pValue*:

Tabla 14. Resultados del test de Wilcoxon Rank de los tratamientos en función a la variable Embrion

```

Pairwise comparisons using wilcoxon rank sum test with continuity
correction

data:          datos_finales$EMBRION and datos_finales$TRATAMIENTO

      Control      T1
T1      0.439      -
T2      0.315      0.044

P value adjustment method: holm

```

- El valor 0.439 es el *pValue* entre el control y el T1; y así sucesivamente.
- El guion en la matriz indica que no se realiza una comparación entre los mismos controles
- En **value adjustment method: holm**, indica que se usó el método de ajuste de Holm para controlar el error de tipo I debido a múltiples comparaciones.

Al haber comparado ambos tratamientos T1 y T2 observamos que si existe una diferencia significativa con la variable Embrión; también podemos observar que al comparar el T2 con el T1 presenta un *pValue* de 0.044 el cual es un valor cercano a 0.05, además que T2 muestra una diferencia estadística ligeramente más favorable en comparación con el grupo de control en términos de la variable EMBRION en comparación con T1. Por lo que podemos decir que el T2 es ligeramente mejor al T1 y al control.

Las librerías que se usaron para correr el script fueron:

- Library("stats"), el cual es útil para estadísticas descriptivas, como la media, la mediana, los cuartiles, la desviación estándar, también proporciona funciones para realizar análisis de varianza.
- Library("agricolae"), es una librería desarrollada en la Universidad Nacional La Molina y es específica para análisis de experimentos agrícolas, facilita el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre tratamientos; y realizar comparaciones múltiples entre tratamientos utilizando diferentes métodos, como la prueba de Tukey, la prueba de Scheffé, la prueba de Duncan.
- Library("pgirmess"), proporciona herramientas para realizar análisis de datos multivariantes y exploratorios y también permite realizar análisis de componentes principales para reducir la dimensionalidad de los datos y explorar las relaciones entre variables.

Conclusiones

1. Se introdujo *in vitro* la especie *Solanum stenotomum* a través del cultivo de yemas aplicando la batería de desinfección con un éxito de regeneración del 10%. Al 7mo día salieron los primeros brotes que luego fueron repicados hasta la obtención de la plántula.
2. Las plántulas obtenidas *in vitro* se aclimataron en invernaderos con aislamiento de film de polietileno de alta densidad para mantener los maceteros en entre 14°C – 20°C durante el día y de 2°C-14°C en la noche; y con 16 horas y 8hrs de obscuridad. Se agrego el compuesto Nitro para estimular la floración y aumentar el vigor en las plantas aun cuando las plantas no crecieron más de 15 cm a comparación del primer lote, que aborto los botones florales, y crecieron más de 30 cm. Se obtuvo el cultivo de plántulas y se recolecto las anteras a los 4 meses de cultivo.
3. Los botones florales de 4 mm a 7 mm, fueron óptimos para la obtención de anteras con la capacidad de formar embriones somáticos y callos, junto con la presencia de aperturas en los sépalos que fue un marcador importante para la selección. El impacto del estrés térmico a las anteras fue a 5°C durante 3 horas, lo que permitió la inducción de embriogénesis y callogenesis desviando el desarrollo ontogenético normal de las anteras hacia la vía gametofítica.

4. Se indujo la callogenesis y embriogénesis con el T1 (ANA (2) + Kin (4)) y T2 (2,4d (1) + Kin (1)), ambos demostraron ser efectivo en la inducción de cambios morfológicos en las anteras. El T2 mostró una mejor respuesta en la formación de callos y embriones con el 9.36% de callos y 4.98% de embriones del total de 301 anteras cultivadas, en comparación con el T1 que formo 3.99% de callos y 1.66% de embriones del total de 301 anteras cultivadas. Los callos verdes y cafés se identificaron como indicadores de embriogénesis y/o organogénesis siendo las anteras de color café las que tuvieron mayor posibilidad de formar callos y/o embriones. A pesar de provenir de un mismo botón floral y crecer en la misma placa, las anteras mostraron respuestas morfológicas variables.

Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios en la que compare los tiempos del shock térmico para reportar si el tiempo de estrés térmico afecta en la producción de callos y embriones para observar una correlación entre estas variables.

Se recomienda regenerar plántulas o brotes a partir de los callos y embriones.

Bibliografía

Almekinders, C. J. M., & Struik, P. C. (1996, August). Shoot development and flowering in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Research*, 39, 581–607.

Araque Barrera, E. J. (2020). Regeneración adventicia a través del cultivo de anteras en papa amarilla diploide (*Solanum tuberosum* Grupo Phureja). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

Calderón Torres, S. N., Ascencios Roca, E. F., Contreras Chalan, E. G., Huanuqueño Coca, E. H., Jiménez Dávalos, J. E., Palacin Falcón, F. A., Saldaña Zavala, I., Tello Villavicencio, M. N., & Zolla Benites, G. E. M. (2021). Utilización de la técnica de dobles haploides en el aprovechamiento de la biodiversidad del maíz peruano para su uso como alimento nutracéutico. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Cañedo Torres, D., Medina Hinostraza, T., Palomino Ayquipa, C., Aguirre Asturrizaga, C., Tello Fernández, H., Amanzo Alcántara, J., & Álvarez Alonso, J. (2019). Línea de base de la diversidad genética de la papa peruana con fines de bioseguridad. Ministerio del Ambiente (MINAM)

Chirinos, M., Velasquez, R., Noguera, A., Perez, M., Mata, J., & Polanco, D. (2006). Cultivo de anteras en dos clones de yuca. *Scielo*, 56(4), 633–641.

Espinoza, N., Lizarraga, R., Sigueñas, C., Buitron, F., Bruan, J., & Dodds Jhon. (2012). Cultivo de Tejidos: Micropropagación, Conservación y Exportación de Germoplasma de Papa. Centro Internacional de La Papa (CIP).

Elhiti, M., Stasolla, C., & Wang, A. (2013). Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. DOI: 10.1007/s11627-013-9547-3. The Society for In Vitro Biology. Received: 24 January 2013 / Accepted: 9 July 2013 / Editor: Prakash Lakshmanan

Fock, I., Collonnier, C., Lavergne, D., Vaniet, S., Ambroise, A., Luisetti, J., Kodja, H., & Sihachakr, D. (2007). Evaluation of somatic hybrids of potato with *Solanum stenotomum* after a long-term in vitro conservation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(3–4), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.02.004>

Germanà, M. A. (2006). Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 131–146. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9088-0>

Gonzales-Zavaleta, O., & Chico-Ruiz, J. (2018). Efecto del ácido naftalenacético y 6-bencilaminopurina en la inducción de callos embriogénicos en anteras de *Carica papaya* L. variedad criolla. *Revista de Investigaciones Altoandinas -Journal of High Andean Research*, 20(4), 401–408. <https://doi.org/10.18271/ria.2018.417>

Guha, S., & Maheshwari, S. C. (1964). In vitro Production of Embryos from Anthers of *Datura*. *Nature*, 204(4957), 497–497. <https://doi.org/10.1038/204497a0>

Hernández Amasifuen, A. D. (2019). Inducción in vitro de callo embriogénico a partir del cultivo de anteras en “papa amarilla” *Solanum goniocalyx* Juz. & Bukasov (Solanaceae). *Arnaldoa*, 26(1). <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.261.26111>

Hillers, K. J., Jantsch, V., Martinez-Perez, E., & Yanowitz, J. L. (2017). Meiosis (26694509th ed.). WormBook.

Huanuqueño, H., Zolla, G., & Jimenez, J. (2021). Selección de líneas S1 de maíz morado (*Zea mays* L.) var. reventón basado en el análisis de segregación de caracteres de valor. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 535-543. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.058>

Jenderek, M. M., Ambruzs, B. D., Tanner, J. D., & Bamberg, J. B. (2023). High regrowth of potato crop wild relative genotypes after cryogenic storage. *Cryobiology*, 111, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2023.03.006>

Jenny P. Jiménez Barreto, Alejandro Chaparro Giraldo, & Jennifer Blanco. (2009). Evaluación de diferentes combinaciones fitohormonasles en la regeneración de *Solanum tuberosum* (solanaceae) var. Pastusa Suprema a partir de explantes internodales. *Colombia Biotecnología*, 2, 66–74.

Jordán, M., & Casaretto, J., et al. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En M. Jordán & J. Casaretto (Eds.), Capítulo XV. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

Lassaga, S., Bretón, A., Gioco, L., Milisich, H., & Dittrich, A. (2010). Cultivo in vitro de anteras de lino (*Linum usitatissimum* L.). *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 21(40), 215-233.

M. Blasco, MM. Naval, & ML. Badenes. (2012). Embriogenesis a partir del cultivo de anteras en Nispero (*Eriobotrya japonica* Lindl.).

Maluszynsky, M., otros, & otros. (2003). Doubled Haploid Production in Crop Plants. In Potato Reseach Centre Frederiction (Ed.), IAEA (pp. 229–234).

Murovec, J., & Bohanec, B. (2012). Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding. www.intechopen.com

Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-La-Peña, C., & Loyola-Vargas, V. M. (2019, February 7). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>

Ochoa, C. M. (1999). *Las papas de Sudamérica*. Centro Internacional de La Papa.

Ordoñez, B., Orrillo, M., & Bonierbale, M. (2016). *Biología reproductiva y citológica de la papa*.

Paola, J., Barreto, J., Chaparro-Giraldo, A., & Blanco, J. (2009). Evaluación de diferentes combinaciones fitohormonales en la regeneración de *Solanum tuberosum* (Solanaceae) Var. Pastusa Suprema a partir de explantes internodales Evaluating different phytohormone combinations in regenerating *Solanum tuberosum* (Solanaceae) ar. Pastusa Suprema from intermodal explants. In *Rev. Colomb. Biotecnol*: Vol. XI (Issue 2).

Pintos, B., Martin, L., & Gomez, A. (2014). Embriogénesis del polen (embriogénesis gamética). *ResearchGate*, 7, 19–33. <https://www.researchgate.net/publication/271071973>

Porras Mija, I. M. (2019). *Inducción de callos mediante cultivo in vitro de anteras y ovarios de la Kiwicha (Amaranthus caudatus L.)*. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Prasanna, B. M., Chaikam, V., & Mahuku, G. (2013). *Dobles haploides en el mejoramiento de maíz: Teoría y práctica*

Raigond, P., Jayanty, S. S., Parmar, V., Dutt, S., Changan, S. S., Luthra, S. K., & Singh, B. (2023). Health-Promoting compounds in Potatoes: Tuber exhibiting great potential for human health. *Food Chemistry*, 424, 136368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136368>

Rodríguez, F., Ghislain, M., Clausen, A. M., Jansky, S. H., & Spooner, D. M. (2010). Hybrid origins of cultivated potatoes. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(6), 1187–1198. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1422-6>

Rodríguez Beraud, M. M., Latsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 15-20.

Rodríguez, L. E. (2010). Origen y evolución de la papa cultivada. *Universidad Nacional de Colombia Colombia*, 28, 9–17.

Seguí-Simarro Editor, J. M. (2021). Doubled Haploid Technology. In J. K. Walker, Cell Biology Group - COMAV Institute, Universitat Politècnica de Valencia, & S. Valencia (Eds.), *Methods in Molecular Biology (Springer Science, Vol. 2)*. Springer Science. <http://www.springer.com/series/7651>

Sánchez-Enciso, D., Rodríguez J., Zárate-de Lara, P., López-Herrera, A., Barrales-Domínguez, S., & González-de la Cruz, G. (2005). Embriogenesis somática en papa Cvs. *Atlanticity Fritolay-1867 (Vol. 11, Issue 2)*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60911206>

Valkonen, J. P. T., Moritz, T., Watanabe, K. N., & Rokka, V.-M. (1999). Dwarf (di)haploid pito mutants obtained from a tetraploid potato cultivar (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) via anther culture are defective in gibberellin biosynthesis. *Plant Science*, 149(1), 51–57. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00141-7)

Vignola, R., Leclerc, G., Morales, M., Gonzalez, J., (2017). Leadership for moving the climate change adaptation agenda from planning to action. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 26–27, 84-89. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2017.03.005>

Xichang University. (2021, July 9). Genome assembly *Solanum stenotomum*. NCBI.

Anexos

Introducción *in vitro* de *Solanum stenotomum*



Figura a1. Semilla de *Solanum stenotomum* Figura a2. Brotes a partir de yemas de *Solanum stenotomum*

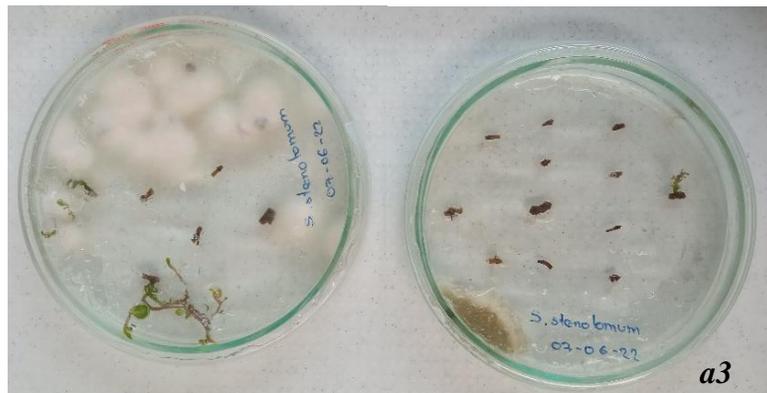


Figura a3. Placas con yemas de *Solanum stenotomum* contaminadas con hongos

Nota 7. En la Figura a1. se observa tubérculos de *Solanum stenotomum*. En la Figura a2. se observa los explantes cultivados con brotes a los 18 días. En la Figura a3. se observa placas contaminadas con hongos, cultivadas con los explantes *in vitro* de *Solanum stenotomum*.

Aclimatación y crecimiento de las plantas en invernadero



Figura b1. Plántulas de *Solanum stenotomum* con 20 días de crecimiento



Figura b2. Plántulas de *Solanum stenotomum* en macetero (1er lote)



Figura b3. Plántulas de *Solanum stenotomum* (1er lote) al 3er mes



Figura b4. Plántulas de *Solanum stenotomum* en macetero (1er lote) al primer día



Figura b5. Plántulas de *Solanum stenotomum* (2do lote) aisladas 3er mes



Figura b6. Botones florales de *Solanum stenotomum*

Nota 8. En la *Figura b1.* se observa las plántulas *in vitro* que fueron llevados a los invernaderos. En la *Figura b2.* se observa las plántulas del primer lote en crecimiento. En la *Figura b3.* se observa las plántulas del segundo lote en crecimiento, con una diferencia del primer lote que se encuentran en el fondo. En la *Figura b4.* se observa las plantas del primer lote con síntomas de haber abortado los botones florales. En la *Figura b5.* se observa las plántulas del segundo lote aisladas con paredes de film de polietileno de alta densidad y focos con luz de día. En la *Figura b6.* se observa el primer botón floral del segundo lote.

Colección y tratamiento de los botones florales



Figura c1. Shock termino en los botones florales

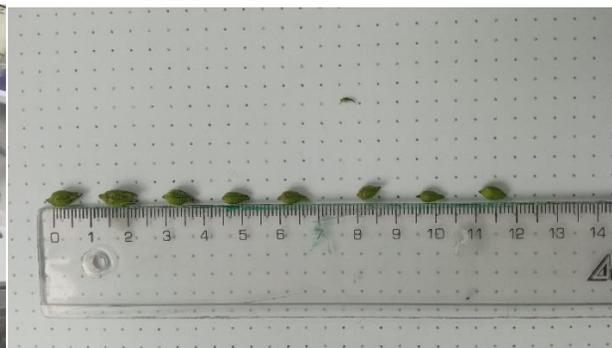


Figura c2. Clasificación taxonómica de los botones florales



Figura c3. Desinfección de los botones florales

Nota 9. En la *Figura c1.* se observa el pretratamiento térmico con un shock de frío de las anteras. En la *Figura c2.* se observa la clasificación morfológica de las anteras. En la *Figura c3.* se observa el proceso de la esterilización de las anteras con la batería de desinfección.

Cultivo *in vitro* de anteras



Figura d1. Cultivo in vitro de las anteras

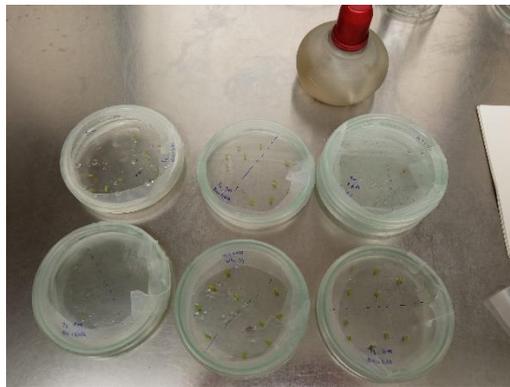


Figura d2. Anteras cultivadas en las placas



Figura d3. Sala de incubación

Nota 10. En la *Figura d1.* se observa el cultivo *in vitro* de las anteras. En la *Figura d2.* se observa las anteras cultivadas y selladas. En la *Figura d3.* se observa la sala de incubación donde fueron trasladadas al formar callos.

Observación de los cambios morfológicos de las anteras y obtención de callos y embriones



Figura e1.
Observación de las
anteras en el
macroscopio



*Figura e2. Embrión en la
fase globular*



*Figura E.3. Embrión en la fase
globular*



Figura e4. Embrión



Figura e5. Callogenesis en un pétalo que broto de la antera



Figura e6. Callo friable



Figura e7. Antera con superficie grumosa



Figura e8. Antera arrugada



Figura e9. Antera con callo friable expuesto a un fotoperiodo con 16 hrs de luz



Figura e10. Antera con callo friable expuesto a un fotoperiodo con 16 hrs de luz

Nota 11. En la *Figura e1.* se observa el uso del macroscopio por donde se observaron las anteras. En la *Figura e2.* se observa embriones en la etapa globular de proveniente de anteras de color café. En la *Figura e3.* se observa embriones de anteras provenientes de antera de color verde. En la *Figura E.4.* se observa embriones de anteras cafés. En la *Figura e5.* se observa un pétalo que floro dentro de la placa, y con una superficie grumosa, marcador morfológico para ser callo. En la *Figura e6.* se observa un callo friable de la antera. En la *Figura e7.* se observa una antera con toda la superficie grumosa por lo que en unos días más será callo. En la *Figura e8.* se observa anteras arrugadas. En la *Figurae.9e.* se observa un callo con una semana con fotoperiodo de 16hrs con luz, que cambio su aspecto de color blanco a verde. En la *Figura e10.* se observa otro callo de color verde con una semana bajo condiciones de luz.

