



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BOTÁNICA**



Propagación, morfogénesis y conservación *in vitro* de “calabazo”

*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.

**TESIS:**

Para Optar el Título Profesional de Licenciada en Biología – Botánica

**AUTOR:**

Bach. Liliana Ofelia Delgado Alache

**ASESOR:**

Dr. Guillermo E. Delgado Paredes

**LAMBAYEQUE - PERÚ**

**2024**



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BOTÁNICA**



Propagación, morfogénesis y conservación *in vitro* de “calabazo”

*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.

Tesis Para Optar el Título Profesional de Licenciada en Botánica

Bach. Liliana Ofelia Delgado Alache

**INVESTIGADORA**

APROBADO POR:

Dra. Consuelo Rojas Idrogo

**PRESIDENTE**

MSc. Josefa Ecurra Puicon

**SECRETARIA**

Dr. Jorge Víctor Wilfredo Cachay Wester

**VOCAL**

Dr. Guillermo Eduardo Delgado Paredes

**ASESOR**

**LAMBAYEQUE-PERÚ-2024**

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	10
II.	DISEÑO TEÓRICO .....	13
2.1	Antecedentes.....	13
2.2	Bases teóricas .....	15
2.3	Bases conceptuales .....	21
III.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	23
3.1	Diseño de contrastación de hipótesis .....	24
3.2	Población y muestra.....	24
3.3	Técnicas, instrumentos, equipos, materiales .....	26
3.3.1.	Materiales.....	26
3.3.2.	Métodos.....	32
3.3.3.	Procesamiento y análisis de datos.....	34
IV.	RESULTADOS .....	35
4.1.	Establecimiento de cultivo <i>in vitro</i> .....	35
4.2.	Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Lagenaria siceraria</i> .....	35
4.3.	Propagación <i>in vitro</i> .....	37
4.3.1.	Número de nudos.....	37
4.3.2.	Longitud de plantulas.....	38
4.3.3.	Enraizamiento de plantulas.....	40
4.4.	Morfogénesis.....	41
4.4.1.	Organogénesis indirecta.....	41
4.4.2.	Organogénesis directa.....	43
4.5.	Conservación <i>in vitro</i> .....	45
V.	DISCUSIÓN.....	48
VI.	CONCLUSIONES.....	51
VII.	RECOMENDACIONES.....	52
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
IX.	ANEXOS.....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Composición química del medio de cultivo basal MS (Murashige & Skoog, 1962) utilizado en los tratamientos de propagación, morfogénesis y conservación <i>in vitro</i> de <i>Lagenaria siceraria</i> (Molina) Standl.....	28
<b>Tabla 2:</b> Formulación del medio de cultivo para la propagación <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> .....	29
<b>Tabla 3:</b> Formulación del medio de cultivo en la inducción de callos en diversos explantes de <i>L. siceraria</i> .....	30
<b>Tabla 4:</b> Medio de cultivo en la inducción de diversos procesos morfogénicos de <i>L. siceraria</i> (Molina) Standl. Regeneración a partir de callos.....	32
<b>Tabla 5:</b> Formulación del medio de cultivo para la inducción de diversos procesos morfogénicos en <i>L. siceraria</i> .....	32
<b>Tabla 6:</b> Germinación de semillas <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> en medio de cultivo MS.....	35
<b>Tabla 7:</b> Número de nudos en plantas <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> .....	37
<b>Tabla 8:</b> Longitud de plántulas <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> .....	38
<b>Tabla 9:</b> Enraizamiento de nudos <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> , luego de 10, 20 y 30 días de cultivo.....	40
<b>Tabla 10:</b> Inducción de callos en tejido de hojas cotiledonales de <i>L. siceraria</i> , luego de 20 y 40 días de cultivo <i>in vitro</i> .....	42
<b>Tabla 11:</b> Diferenciación de raíces <i>in vitro</i> en callos de <i>L. siceraria</i> , luego de 20 y 40 días de cultivo <i>in vitro</i> .....	42
<b>Tabla 12:</b> Organogénesis directa en <i>L. siceraria</i> , luego de 20 y 40 días de cultivo <i>in vitro</i> .....	44

## RELACIÓN DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación de campo de cultivo de <i>Lagenaria siceraria</i> , Bodegones, Lambayeque. ...	25
<b>Figura 2.</b> Frutos de <i>L. siceraria</i> donadores de semillas, a. Fruto recién cosechado, b. Fruto seco .....	25
<b>Figura 3.</b> Semillas de <i>L. siceraria</i> , seleccionadas para establecimiento <i>in vitro</i> .....	25
<b>Figura 4.</b> Semillas y yemas de <i>L. siceraria</i> cultivadas <i>in vitro</i> , a) Semilla escarificada, b) Yema apical .....	34
<b>Figura 5.</b> Crecimiento de plántulas germinadas <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> .....	36
<b>Figura 6.</b> Proceso de germinación <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> .....	36
<b>Figura 7.</b> Número de nudos en plantas <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> . ....	38
<b>Figura 8.</b> Longitud de plántulas <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> .....	39
<b>Figura 9.</b> Plantulas <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> en el T6 ( <i>KIN</i> 1,0 mg/L y <i>AG3</i> 0,1 mg/L).....	39
<b>Figura 10.</b> Enraizamiento de nudos <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> del tratamiento 4 y tratamiento 6 ....	40
<b>Figura 11.</b> Enraizamiento de nudos <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> del tratamiento 6 luego de 10 y 20 días de cultivada.....	41
<b>Figura 12.</b> Callos <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> inducidos en medio MS suplementado con 2,4-D, luego de 30 días en cultivo.....	43
<b>Figura 13.</b> Callos <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> inducidos en medio MS suplementado con BAP 1,0 mg/L y AIA 0,25 mg/L, luego de 30 días en cultivo .....	44
<b>Figura 14.</b> Organogénesis directa <i>in vitro</i> en <i>L. siceraria</i> , luego de 20 y 40 días de cultivo <i>in vitro</i> , a. Conglomerados celulares, b. Diferenciación de brotes, c. Diferenciación de raíces.....	45
<b>Figura 15.</b> Conservación <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> , luego de uno, dos, tres y cuatro meses de cultivo .....	46
<b>Figura 16.</b> Conservación <i>in vitro</i> de <i>L. siceraria</i> en medio de cultivo MS suplementado con AIA y <i>AG<sub>3</sub></i> (0,02 mg/L), a) Conservación a 30 días, b) Conservación a 120 días, c) Necrosis apical.....	47

## **DEDICATORIA**

Les dedico con todo el corazón, a mis padres, pues sin ellos no lo habría logrado. Su bendición a diario a lo largo de mi vida me protege y me lleva por el camino del bien. Por eso les doy mi trabajo en ofrenda por su paciencia y amor. Los amo Ofelia y Willy.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por darme la vida para poder concluir ésta etapa de mi vida, y a mis padres por apoyarme en cada paso que doy.

Al Dr. Guillermo Delgado, que ha sido parte de mi formación académica, que ha confiado en mí y que sigue día a día impulsando esas ganas por continuar investigando. Gracias por inculcarme la perseverancia, a seguir creciendo, a compartir con entusiasmo, a observar los detalles más pequeños y a soñar en grande. Gracias por esto y muchas cosas de las que me quedaría corta mencionarlas. Gracias querido profesor.

A la Dra. Consuelo Rojas, por ser una inspiración, por enseñarnos con calidez y apoyarme como si fuera una hija más. Por enseñarme a mirar más allá de las cosas y a solucionar con ingenio. Por recordarme que Dios está en cada cosa que uno hace y al que le agradeceré por haberla puesto en mi formación profesional y personal por siempre.

A todos mis profesores de los cursos generales y de los que he tenido el privilegio de ser alumna, los llevo en el corazón.

A mi gran amigo Sergio Alfaro, quien me brindó el material vegetal para hacer realidad todo éste trabajo.

A todas las personas que creen en mí y me aprecian, por animarme en cada momento, por ver en mí más de lo que yo veo, por estar presentes, por enseñarme siempre algo. Los considero mucho.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación sobre propagación, morfogénesis y conservación *in vitro* de “calabazo” *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl, fue desarrollado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pero Ruiz Gallo. *L. siceraria* es una especie cultivada perteneciente a la familia Cucurbitaceae y su importancia está influenciada por factores ambientales, nutricionales y culturales, los mismos que ejercen cierta presión que de algún modo han afectado el cultivo en las últimas décadas. Por esta razón, el objetivo de la presente investigación fue estudiar la propagación, morfogénesis y conservación *in vitro*. El medio de cultivo Murashige y Skoog fue suplementado con reguladores de crecimiento para cada fase del proceso. En la fase de propagación fueron utilizadas citocininas solas o en combinación con ácido giberélico. En la fase de morfogénesis auxinas, en especial en la inducción de callos, y en la fase de conservación *in vitro*, auxinas y giberelinas. Como material vegetal fueron utilizadas yemas apicales de plantas germinadas *in vitro*, así como hojas cotiledonales. La germinación a partir de semillas escarificadas fue de 70% hasta 15 días de establecidas *in vitro*, presentando una tasa de contaminación de 7,5%. En la propagación, a partir de explantes obtenidos de semillas germinadas *in vitro*, el tratamiento (T2) con BAP 1,0 mg/L y AG<sub>3</sub> 0,1 mg/L fue el que originó el mayor número de nudos formados (8,13) a los 30 días de cultivo; sin embargo la mayor longitud de las plántulas se observó en presencia de KIN 1,0 mg/L y AG<sub>3</sub> 0,1 mg/L en el mismo tiempo de cultivo, alcanzando también el mayor enraizamiento (2,8 raíces formadas). En el proceso de morfogénesis, la inducción de callos a 40 días de cultivo alcanzó 64,6%, en presencia de 2,4-D (1,0 y 2,0 mg/L). Fue observado, también, un proceso de organogénesis directa a partir de fragmentos de hojas cotiledonales únicamente en presencia de BAP 1,0 mg/L (T1) en el 40% de los explantes cultivados. La conservación *in vitro* fue sostenida hasta cuatro meses en presencia de AIA y AG<sub>3</sub> (0,02 mg/L), y al cabo de ese tiempo se inició un lento proceso de necrosis apical.

**Palabras claves:** Conservación *in vitro*, *Lagenaria siceraria*, micropropagación, morfogénesis, reguladores de crecimiento



## ABSTRACT

The present research work on propagation, morphogenesis and *in vitro* conservation of “gourd” *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl, was developed in the Plant Tissue Culture Laboratory of the Faculty of Biological Sciences of the Pedro Ruiz Gallo National University. *L. siceraria* is a cultivated species belonging to the Cucurbitaceae family and its importance is influenced by environmental, nutritional and cultural factors, which exert certain pressure that have somehow affected the crop in recent decades. For this reason, the objective of the present investigation was to study the propagation, morphogenesis and conservation *in vitro*. The Murashige and Skoog culture medium was supplemented with growth regulators for each phase of the process. In the propagation phase, cytokinins were used alone or in combination with gibberellic acid. In the morphogenesis phase, auxins, especially in the induction of callus, and in the *in vitro* conservation phase, auxins and gibberellins. Apical buds from plants germinated *in vitro*, as well as cotyledonal leaves, were used as plant material. Germination from scarified seeds was 70% up to 15 days after being established *in vitro*, presenting a contamination rate of 7.5%. In the propagation, from explants obtained from seeds germinated *in vitro*, the treatment (T2) with BAP 1.0 mg/L and AG<sub>3</sub> 0.1 mg/L was the one that caused the greatest number of nodes formed (8.13) after 30 days of culture. However, the greatest length of the seedlings was observed in the presence of KIN 1.0 mg/L and AG<sub>3</sub> 0.1 mg/L in the same culture time, also achieving the greatest rooting (2.8 roots formed). In the morphogenesis process, callus induction after 40 days of culture reached 64.6%, in the presence of 2,4-D (1.0 and 2.0 mg/L). An organogenesis process was also observed direct from cotyledonal leaf fragments only in the presence of BAP 1.0 mg/L (T1) in 40% of the cultured explants. *In vitro* conservation was sustained up to four months in the presence of IAA and AG<sub>3</sub> (0.02) mg/L, and after that time a slow process of apical necrosis began.

**Key Words;** *In vitro* conservation, *Lagenaria siceraria*, micropropagation, morphogenesis, growth regulators.

## I. INTRODUCCIÓN

La familia Cucurbitaceae es un grupo vegetal distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Está reconocida entre las más grandes en el reino vegetal con un alto número de especies comestibles, 8 tribus, 118 géneros y 825 especies reconocidas (Hussain et al., 2017; Kiramana et al., 2017), correspondiendo a los géneros *Cucurbita*, *Cyclanthera* y *Sechium* su origen y domesticación al nuevo mundo (UmoH & Bassey 2021). *Cucurbita* spp. sobre todo, está considerada como un grupo vegetal entre las 10 hortalizas líderes a nivel mundial, cultivado a gran escala y la importancia de sus beneficios, hace que su cultivo continúe en expansión (Himani et al., 2023)

En el Perú, la producción de *Cucurbita* spp. es óptima, en relación a la producción y exportación. Las especies *Cucurbita ficifolia* Bouché “chiclayo”, *C. maxima* Duchesne “zapallo criollo”, *C. moschata* Duchesne Ex Poirt. “loche” y *C. pepo* L. “calabacín”, son las que mayormente se consumen a nivel nacional, además de ser ampliamente distribuidas a diversos países del mundo, sobre todo por sus cualidades gastronómicas y medicinales (Cañedo et al., 2020). Estas especies se consumen diariamente y con alta frecuencia en todos los hogares, en las diferentes regiones del Perú, como componentes de diversos platos típicos.

*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl, especie cultivada en el Centro y Sud América, aun cuando no es nativa de estas regiones, se utiliza desde la época precolombina, tanto como alimento, utensilios, así como por su importancia farmacológica, debido a la presencia de metabolitos hepatoprotectores, cardioprotectores según información etnofarmacológica (Grimaldo-Juarez et al., 2018; Guzmán-Hernández et al., 2016). Últimamente se utiliza como portainjerto potencial para *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai “sandía” por su resistencia frente a *Fusarium* spp., responsable de la pudrición radicular (Suárez-Hernández, 2017).

*L. siceraria* en el Perú es conocida como “mate”, “calabazo”, “checo”. Las primeras referencias de los cronistas indican que el término “mate” proviene del quechua “mati” que es el fruto de la calabaza (Ríos, 2019). Esta planta de flores blancas es anual, probablemente originaria del sur de África, desde donde ha sido difundida por el hombre antiguo desde Asia hacia el continente americano, siendo cultivada en países con clima tropical y subtropical como Ecuador, Perú, Colombia y Cuba (Shah et al., 2010) y es ampliamente utilizada en la actualidad en artesanía. Sin embargo, son pocas las

comunidades que aún la utilizan como utensilio, ya que ha sido reemplazada por los envases de plástico.

Actualmente el cultivo de *L. siceraria* y su producción se ha restringido únicamente a zonas donde se dedican a la artesanía, por lo que su crecimiento y desarrollo se ha limitado a regiones costeras del norte peruano, como Piura, Lambayeque y La Libertad, debido a factores ambientales. En estas áreas, los habitantes han utilizado tradicionalmente sus frutos por lo general para crear artesanías (Gálvez & Murga, 2019), probablemente debido al desconocimiento de su valor en el tratamiento de enfermedades de la piel y el corazón, propiedades antimicrobiana, antidiabética, antioxidante, antihipertensiva, antiinflamatoria, analgésica, hepatoprotectora y anticancerígena (Roopan et al., 2016).

Por otro lado, *L. siceraria* “mate”, como presenta ciertas variedades en su forma, ha permitido ser utilizada también en la elaboración de instrumentos musicales, no sólo los conocidos en la actualidad en el Perú, sino también en otras culturas y civilizaciones de América y África. Prueba de ello, en los museos se exhiben ejemplares importantes de larga data, que muestran ciertas técnicas utilizadas, unas más sofisticadas que otras. Esta información también alimenta la hipótesis que esta especie, junto con otras de la familia Cucurbitácea, se encuentren entre las primeras domesticadas por el hombre cuando nace la agricultura (Fajinmi et al., 2022 ). Asimismo, se debe destacar el arte del burilado en mate en las culturas andinas, donde a través del tiempo se ha desarrollado este arte y se ha transmitido en las familias de padres a hijos, cobrando mucha importancia desde el punto de vista social y cultural. En los grabados, se han plasmado las vivencias de muchos pueblos indígenas, incluyendo los conflictos armados y sociales que se han experimentado en el Perú a través de su historia, permaneciendo como testigos de hechos importantes y transmitidos entre las generaciones (Salazar, 2023).

Asimismo, la no tolerancia a las sequías y las heladas, según las técnicas de cultivo tradicionales, hace que esta especie sea cultivada en lugares protegidos y estratégicos o bien en invernaderos, especialmente durante la primavera, que es la estación propicia para su desarrollo (Upaganlawar & Balaraman, 2009). Sin embargo, se debe destacar la notable resistencia a plagas como la mosca blanca y nemátodos como *Meloidogyne incognita* (Kofoed & White, 1919), así como a hongos como *Fusarium oxysporum* (Levi et al., 2009; Li et al., 2021), quedando pendiente conocer sobre la resistencia a infecciones causadas por virus y bacterias (Li et al., 2016).

Conociendo lo complicado del cultivo de *L. siceraria* por métodos tradicionales, debido a los riesgos que pueden presentarse a lo largo del proceso y el peligro que estaría enfrentando como recurso fitogenético, se recurre a la biotecnología vegetal como una alternativa, utilizando diversas estrategias que conllevan a la propagación, morfogénesis y conservación *in vitro*. El desarrollo de un conjunto de técnicas del cultivo *in vitro* tiene diversas ventajas tales como la rápida y masiva producción de individuos como unidades de siembra, eliminación de enfermedades causadas por distintos microorganismos, no dependiendo de la época del año y otorgando a las plantas un desarrollo vigoroso. Asimismo, permitiendo la conservación de genotipos valiosos y vulnerables.

Son varias las especies de cucurbitáceas en las cuales se ha utilizado cultivo de tejidos y se ha logrado desarrollar sistemas de propagación y organogénesis, sobre todo para resolver problemas de disponibilidad de plantas para producción, ya que muchas especies afrontan dificultades en la germinación de semillas debido a la latencia que presentan. Por otro lado, las especies de propagación vegetativa también tienen problemas con el enraizamiento de esquejes (Dhumal et al., 2020). En las dos últimas décadas especies como *Momordica sahyadrica* (Rajashekharan et al., 2012), *Cucumis melo* (Parvin et al., 2013; Kapadia, 2018), *Cucumis anguria* (Margareate, 2014), *Cucumis hystrix* (Verma et al., 2014), *Citrullus colocynthis* (Rama Krishna & Shashtri 2014), *Luffa acutangula* (Zohura et al., 2013), *C. moschata* y *C. ecuadorensis* (Delgado-Paredes et al., 2023), entre otras especies, han sido estudiadas utilizando diversas técnicas del cultivo *in vitro*.

Por todas estas razones, la presente investigación tuvo como objetivo general desarrollar y establecer un protocolo eficiente, utilizando técnicas desarrolladas en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, que posibilite la propagación, morfogénesis y conservación de germoplasma *in vitro* del “calabazo” *L. siceraria* (Cucurbitaceae).

## II. DISEÑO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes

En las últimas dos décadas numerosas especies vegetales de importancia agrícola, pertenecientes a la familia Cucurbitaceae, han sido abordadas por alguna técnica de la biotecnología, ya sea con fines de propagación o mejoramiento genético. Entre estas se encuentra la especie *Citrullus lanatus*, donde se realizó la propagación clonal con inducción de brotes múltiples concluyendo que es posible la obtención de plantas para propagación y conservación (Gnamien et al., 2013). Asimismo, partiendo de semillas germinadas *in vitro*, en *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad, se indujo callos y posterior organogénesis, utilizando el medio de cultivo MS suplementado con AIB (0,1 a 2,0 mg/L), 2,4-D (0 a 2,0 mg/L) y KIN (0 a 1,0 mg/L), solos o en combinación, observándose un óptimo enraizamiento con AIB 2,0 mg/L y alta formación de callos con 2,4-D 1,0 mg/L y KIN 1,0 mg/L (Tariq et al., 2020).

Por otro lado, Saha et al. (2016) realizaron la estandarización de un protocolo eficiente para la multiplicación masiva *in vitro* de la línea ginoica de *Momordica charantia* L. “calabaza amarga” para uso en la producción de semillas híbridas en India, encontrando que el medio de cultivo basal MS, suplementado con BAP 2,0 mg/L + ANA 0,2 mg/L, fue mejor para la supervivencia *in vitro* (81,3 %) de plántulas cultivadas a través de segmentos nodales, en tanto que el 77,84% correspondió a yemas apicales. La combinación MS/2 + BAP 1,0 mg/L + AIB 0,1 mg/L + AG<sub>3</sub> 0,3 mg/L resultó la más efectiva para la proliferación temprana de brotes (11,9 y 14,62 días para yemas apicales y segmentos nodales, respectivamente). La yema apical y el segmento nodal regeneraron 4,77 y 3,56 brotes/explante en promedio en el mismo medio de cultivo.

En esta misma especie, *M. charantia*, con el mismo objetivo, pero incluyendo tejido radicular, utilizando las mismas sales basales MS, pero variando en los reguladores de crecimiento, observaron que los segmentos nodales, en presencia de BAP 1,0 mg/L y 2,4-D 1,0 mg/L, formaron 95% de callos, en tanto que los segmentos de raíz desarrollaron 85% de callos, en la combinación BAP 2,5 mg/L y ANA 0,6 mg/L. La mayor longitud de brote (5,2 cm) se registró en presencia de BAP 2,5 mg/L y AIA 0,2 mg/L, utilizando segmentos nodales, El enraizamiento (75%) se indujo utilizando BAP 2,0 mg/L, AIB 0,5 mg/L y AG<sub>3</sub> 0,2 mg/L (Kumar et al., 2019). En cambio en *Momordica cymbalaria* Fenzl

ex Naudin, la organogénesis directa se obtuvo en medio de cultivo MS, suplementado con BAP 2,0 mg/L y KIN 3,0 mg/L, así como la longitud de los brotes y el enraizamiento con IBA 1,0 mg/L + ANA 0,1 mg/L, en tanto que en la transferencia de plantas a sustrato, turba de coco resultó la mejor (Devi et al., 2017).

En “calabaza espinosa” (*Momordica dioica* Roxb. ex Willd.), a partir de segmentos nodales esterilizados con  $\text{HgCl}_2$  0,1% y cultivados en medio de cultivo MS suplementado con BAP, AIA y ANA, fueron generados brotes vigorosos, sobre todo en presencia de ANA con BAP 1,0 mg/L, alcanzando una longitud de 5,0 cm (Kapadia et al., 2018). Utilizando este mismo sistema de desinfestación, también fue cultivada una línea de alto rendimiento (IIVRPG-102) de *Trichosanthes dioica* Roxb., con la finalidad de obtener multiplicación a gran escala, encontrando que la adición de los reguladores de crecimiento ANA y TDZ, tuvieron un efecto menor respecto al medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento, donde se alcanzó brotamiento en 81,5% de los explantes y el mayor número de brotes por explante se observó con BAP 1,0 mg/mL (Kumar et al., 2016).

En las investigaciones realizadas por Prusty et al. (2020) en “calabaza puntiaguda” (*T. dioica*), estandarizaron un protocolo eficiente y reproducible para la multiplicación clonal mediante cultivo *in vitro*, se indujeron callos organogénicos de alta frecuencia de segmentos nodales y ápices caulinares, cultivando los explantes en medio de cultivo MS suplementado con 2,4-D 4,0  $\mu\text{M}$ . La máxima regeneración de brotes, a partir de callos (72,47%) y el mayor peso de callos por explante (0,5 g), se registró en la variedad “Nayagarh Local” (genotipo femenino). El mayor número de brotes (3,0) por callo se regeneró a partir de la variedad “Swarna Aloukik” (genotipo femenino), cuando se cultivó en medio de cultivo MS enriquecido con BAP 4,0  $\mu\text{M}$ .

En esta misma especie, *T. dioica* “calabaza puntiaguda”, Saurabh et al. (2017) estudiaron la organogénesis directa, inducción de callos y formación de embriones somáticos, a partir de explantes de hojas y nudos. El medio de cultivo MS suplementado con BA 0,5 mg/L y 2,4-D 0,5 mg/L resultó el más eficaz para la inducción de callos, seguido de KIN 0,5 mg/L y 2,4-D 0,5 mg/L. El callo embriogénico se desarrolló mediante subcultivo de callo de nudos en el mismo medio de cultivo. El análisis con microscopía electrónica de barrido reveló la presencia de grupos de células embriogénicas que sólo llegaron a la fase globular. A través de la organogénesis directa, los explantes de nudos

produjeron plantas genéticamente idénticas a las plantas madres y la presencia de BAP 1,0 mg/L fue eficiente para la proliferación de brotes y AIA 0,5 mg/L para raíces.

Han et al., (2004) utilizaron explantes de cotiledón de plántulas germinadas *in vitro* de *L. siceraria* estableciendo un sistema eficiente de regeneración de plantas a través de la organogénesis. La máxima regeneración de brotes se obtuvo cuando las partes proximales de los cotiledones, de plántulas de cuatro días de edad, se cultivaron en medio de cultivo MS con BA 3,0 mg/L y AgNO<sub>3</sub> 0,5 mg/L bajo fotoperíodo de 16 horas. Después de tres a cuatro semanas de cultivo, entre el 21,9 y el 80,7% de los explantes, de los cinco cultivares ensayados, generaron brotes. Los brotes adventicios enraizaron con éxito en medio de cultivo MS/2 con AIA 0,1 mg/L, al cabo de tres semanas. El análisis de citometría de flujo reveló que la mayoría de las plantas regeneradas, en medio de cultivo con AgNO<sub>3</sub>, eran diploides.

Por otro lado, utilizando fragmentos de tallo y cultivados en medio de cultivo MS suplementado con BAP 2,0 mg/L y ANA 0,5 mg/L, se obtuvo una óptima diferenciación de brotes (4,633±0,084) por explante y en medio de cultivo MS, sin reguladores de crecimiento, se alcanzó un óptimo enraizamiento (Hasbullah et al., 2017).

## **2.2 Bases Teóricas**

### **Taxonomía y características morfológicas de la especie**

Clasificación Taxonómica de *L. siceraria*.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Cucurbitales

Familia: Cucurbitaceae

Subfamilia: Cucurbitoideae

Tribu: Benincaseae

Subtribu: Benincasinae

Género: *Lagenaria*

Especie: *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. 1930

*L. siceraria* es una Cucurbitaceae que mide aproximadamente entre 1 a 2 m de largo, tiene forma elíptica, margen entero y nervadura paralela. El ápice de la planta es agudo, de superficie coriácea de textura firme, color verde oscuro, sabor amargo y olor característico. Las hojas son simples, de hasta 40 cm de largo y 40 cm de ancho, pecioladas largas, base cordada, pubescentes y ligeramente pilosas, de forma acorazonada, no divididas, angulares, lóbulos redondeados, márgenes poco dentados, hojas no aromáticas y zarcillos bífidos. Las flores son pedunculadas (los pedúnculos de las flores femeninas son más cortos que los masculinos), solitarias, unisexuales, axilares, monoicas; 5 pétalos, de color crema o blanco con vetas más oscuras, amarillo pálido en la base, obovados, de hasta 45 mm de largo, que se abren al anochecer, aunque pronto se marchitan. Los frutos son grandes, variables, cilíndricos, en forma de matraz o globosos con una constricción por encima de la mitad; carnosos, densamente pilosos, indehiscents, verde, al madurar de color amarillento o marrón pálido, la pulpa se seca al madurar, dejando un hueco grueso y duro. Las semillas son numerosas, incrustadas en una pulpa esponjosa, comprimida, con dos crestas faciales planas, en algunas variantes más bien irregulares y rugosas (Minocha et al., 2015).

Esta especie es importante por sus propiedades medicinales y el uso de los frutos como recipiente y artesanía (Teppner, 2004; Guzmán-Hernández et al., 2016). El fruto se deja secar al sol para retirar sus semillas y restos de pulpa, después es usado como recipiente para el almacenamiento de agua y granos (Bevacqua, 1994). También es empleado como instrumento musical y artesanalmente es decorado, burilado y comercializado en mercados regionales (Chimonyo y Modi, 2013). Según fuentes orales, al fruto y planta en Lambayeque se le denomina “checo” o “calabazo”.

### **Cultivo de tejidos: Micropropagación, morfogénesis y conservación *in vitro***

El término cultivo de tejidos se utiliza generalmente para el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos y sus componentes bajo condiciones químicas y físicas definidas *in vitro*. Uno de los conceptos básicos consiste en que el cuerpo de la planta se puede diseccionar en partes más pequeñas denominadas "explantes" y cualquier explante se puede desarrollar en una planta completa. Se debe considerar que, el medio de cultivo de tejidos vegetales es un suplemento nutritivo artificial, de nutrientes orgánicos e inorgánicos que se utiliza para el cultivo de medios de tejidos vegetales. Los medios de cultivo utilizados para el cultivo *in vitro* de las células vegetales se componen de tres



componentes básicos: elementos esenciales (iones normales), suplementos orgánicos y una fuente de carbono fijo (Gaikwad et al., 2017).

Cuando se cultivan en un medio apropiado que contiene auxina y citoquinina, los explantes dan lugar a una masa desorganizada de células en crecimiento y división llamada "callo". Las aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales se pueden dividir en las siguientes áreas; Comportamiento celular, modificación de plantas, almacenamiento de germoplasma y plantas libres de patógenos, propagación clonal y forma de producto (Gupta et al., 2020). El éxito de la micropropagación involucra varios factores, como la composición del medio de cultivo, el ambiente de cultivo, el genotipo, entre otros. (Gaikwad et al., 2017).

La micropropagación de plantas es un proceso integrado en el que las células, tejidos u órganos de plantas seleccionadas se aíslan, esterilizan e incuban en un entorno aséptico que promueve el crecimiento para producir muchas plántulas clonadas. La técnica de clonación aislada demostró el hecho de que las células somáticas, en condiciones apropiadas, pueden diferenciarse a una planta completa (Kumar & Reddy, 2011). Este potencial de una célula para crecer y desarrollar un organismo multicelular se denomina totipotencia celular. Este potencial de las células o tejidos para formar todo tipo de células y regenerar una planta es el principio básico de la micropropagación (Gupta et al., 2020).

La morfogénesis es un proceso que conduce a la regeneración de plantas a partir de células cultivadas *in vitro*. La morfogénesis es el resultado de la división y diferenciación de células organizadas, con patrones definidos y, básicamente, depende de la actividad y expresión de determinados genes. La regeneración de plantas *in vitro* se verifica mediante dos vías: la embriogénesis somática, a través de la formación de 4 estructuras de crecimiento bipolar y la organogénesis, a través de la formación de estructuras de crecimiento unipolar como yemas y brotes (Albalat, 2016).

La conservación *in vitro* de germoplasma, mediante el crecimiento a tasas normales, por limitación del crecimiento a tasas mínimas y la supresión total del crecimiento (crioconservación), es utilizada mayormente en especies con semillas recalcitrantes, altamente vulnerables y de propagación vegetativa (Gupta et al., 2020).

## **Proceso general de la micropropagación (Gupta et al., 2020) y por extensión la morfogénesis y conservación *in vitro***

### **a) Preparación del medio nutritivo:**

Preparación de medio de cultivo semisólido en agua destilada que contiene macroelementos, microelementos, aminoácidos, vitaminas, fuente de hierro, fuente de carbono como sacarosa y reguladores de crecimiento.

### **b) Establecimiento de cultivo aséptico:**

El material de partida para el proceso es normalmente una punta de brote en crecimiento activo de una yema axilar o terminal.

### **c) Inoculación:**

La inoculación se lleva a cabo en condiciones asépticas. En este proceso, los explantes o microbrotes se transfieren al medio nutritivo esterilizado.

### **d) Desarrollo de planta en sala de crecimiento:**

Después de la inoculación del tejido vegetal, los recipientes se sellan y transfieren a la sala de crecimiento para desencadenar el proceso de desarrollo bajo luz difusa y humedad.

### **e) Endurecimiento de microplantas:**

Debido a la humedad muy alta dentro del recipiente de cultivo y las condiciones artificiales de desarrollo, las plántulas pasan por una fase de aclimatación en invernadero puesto que no están adaptadas para enfrentar, directamente, a las condiciones de campo (Albalat, 2016).

## **Factores internos que afectan el cultivo de tejidos vegetales**

### **a) Medio de cultivo**

Se ha observado un efecto significativo de los medios de cultivo en la regeneración de plantas de diferentes partes de la planta (Diallo et al., 2008). Se han utilizado varios medios basales como el medio de cultivo de White, Nitsch y Nitsch, B5, entre otros para micropropagación, pero el medio de cultivo más utilizado es el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) debido a que la mayoría de las plantas responden favorablemente a éste ya que contiene todos los nutrientes esenciales para crecimiento de plantas *in vitro*.

#### **b) Nutrición mineral**

Los minerales son componentes importantes del medio de cultivo, en el cual existe una gran variedad de combinaciones de macro- y micro-nutrientes, que son combinaciones de sales (Diallo et al., 2008).

#### **c) Fuente de carbono**

En este caso, la sacarosa es la fuente de carbono más utilizada, debido a que, es barata, fácilmente disponible, relativamente estable a la acción de la esterilización en autoclave y fácilmente asimilable por las plantas. También se pueden utilizar otros carbohidratos como glucosa, maltosa y galactosa, así como los azúcares- alcoholes glicerol y sorbitol. Los hidratos de carbono añadidos al medio de cultivo tienen la función de aportar energía para el metabolismo.

#### **d) Reguladores del crecimiento**

Son compuestos orgánicos sintetizados de forma natural en las plantas superiores, que influyen en el crecimiento y desarrollo. Hay varias clases de reguladores de crecimiento de las plantas, como, por ejemplo, las auxinas, las citoquininas, las giberelinas, el ácido abscísico y el etileno.

Las auxinas están implicadas en la regulación de varios procesos fisiológicos, como, por ejemplo, dominancia apical y formación de raíces laterales y adventicias. Este regulador del crecimiento generalmente induce elongación celular e hinchazón de los tejidos, la división celular (formación de callos) y la formación de raíces adventicias, así como la inhibición de la formación de brotes adventicios y axilares. El AIA es una auxina natural, mientras que 2,4-D y ANA se producen sintéticamente y tienen un efecto similar en comparación con las auxinas naturales.

Las citoquininas más comunes utilizadas son Kinetina, BA y 2iP. También se suelen añadir auxinas (AIA, AIB, ANA o 2,4-D) al medio de cultivo para promover el crecimiento de callos, suspensiones celulares u órganos, y para regular la morfogénesis, especialmente en combinación con citoquinina.

Las giberelinas son un grupo de compuestos que no se utiliza necesariamente en el cultivo *in vitro* de plantas superiores. En algunas especies, estos reguladores de crecimiento son necesarios para estimular y en otras para inhibir el crecimiento. El ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) es la giberelina más utilizada. Induce la elongación de los entrenudos y el crecimiento de meristemos o yemas *in vitro*. Además, el uso de giberelinas en el medio

de enraizamiento puede reducir o prevenir la formación de raíces y brotes adventicios, aunque puede estimular la formación de raíces cuando está presente en bajas concentraciones.

**e) Agentes gelificantes**

Los medios de cultivo pueden clasificarse en líquidos o sólidos. Los medios de cultivo líquidos tienen la ventaja de una preparación más rápida y económica que los sólidos (gelificados). El agar se ha utilizado tradicionalmente como el agente gelificante preferido para el cultivo de tejidos.

**f) Tipo de explante**

El tipo de explante es también uno de los factores importantes en optimizar el protocolo de cultivo de tejidos. El tipo de explantes como hoja, pecíolo, hoja cotiledonar, hipocótilo, epicótilo, embrión, entrenudo y raíz tienen un efecto significativo en el proceso de cultivo de tejidos de las plantas. Esto puede deberse al diferente nivel de hormonas vegetales endógenas presentes en los diferentes órganos de la planta. La hoja es el explante más utilizado para la regeneración debido a la mayor superficie disponible, aunque se ha evidenciado que pueden usarse otras partes de la planta.

**g) Genotipo**

El genotipo es también uno de los factores más importantes que afecta la regeneración. El efecto genotípico sobre la regeneración y elongación de los brotes se ha descrito en muchas especies y podría deberse, en parte, a las diferencias en los niveles de hormonas endógenas, particularmente los niveles de citoquininas durante el período de inducción, aunque el mecanismo preciso aún no está claro.

**Factores ambientales que afectan el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (Basado en Gupta et al., 2020)**

**a) Gases y atmósfera**

La respuesta del cultivo de tejido vegetal *in vitro* puede verse significativamente afectada por los constituyentes gaseosos en el recipiente de cultivo. El dióxido de carbono, el oxígeno y el etileno son los componentes más frecuentemente estudiados de la atmósfera de cultivo. Generalmente se acepta que la humedad relativa en el recipiente sea de aproximadamente de 98 a 100%.

## **b) Luz**

La luz es un factor ambiental importante que controla el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que está relacionada con la fotosíntesis, el fototropismo y la morfogénesis. Las tres características de la luz que influyen en el crecimiento *in vitro* son la longitud de onda, la densidad de flujo y la duración de la exposición a la luz o fotoperíodo.

## **c) Temperatura**

La temperatura influye en los diversos procesos fisiológicos, como la respiración y la fotosíntesis, y es bien conocido y no sorprende que influya profundamente en el cultivo de tejidos vegetales y la micropropagación. El rango de temperatura de cultivo más común ha sido entre 20°C y 27°C, pero las temperaturas óptimas varían ampliamente, dependiendo del genotipo.

## **2.3 Bases conceptuales**

### **2.3.1 Definición de términos básicos**

- a) Explante:** se refiere a cualquier parte de una planta separada de esta, incluyendo tejidos (como fragmentos de hojas, tallos, raíces), estructuras como anteras y ovarios, o incluso células individuales (protoplastos), excluyendo óvulos y polen. La elección adecuada del explante inicial es crucial para obtener mejores resultados en la regeneración de plantas *in vitro*. Generalmente, se seleccionan yemas del tallo principal y brotes axilares, variando según las características morfológicas de cada especie (Caillante, 2017).
- b) Cultivo *in vitro*:** De acuerdo a Ramírez (2001), el cultivo *in vitro* de tejidos consiste en cultivar un explante (como protoplasto, célula, tejido u órgano) en un entorno aséptico con un medio químico definido en recipientes de vidrio o plástico transparente. Estas técnicas implican el cultivo de material vegetal en condiciones controladas de luz y temperatura para simular un ambiente artificial y proporcionarle las condiciones óptimas para un correcto desarrollo.
- c) Medio de cultivo:** Medio nutritivo y en condiciones asépticas que está conformado por agua, sales minerales (macro y micronutrientes), vitaminas, carbohidratos, sustancias complejas, aminoácidos, reguladores de crecimiento,

otros aditivos orgánicos y agentes gelificantes. Este puede ser sólido, semisólido y líquido según el objetivo y la técnica de cultivo *in vitro* a usarse, permitiendo el crecimiento y desarrollo del explante. El medio de cultivo, que puede ser sólido o líquido, contiene nutrientes como sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se usa agar para solidificar el medio, y puede ser suplementado con reguladores de crecimiento y otras sustancias según la etapa de propagación. Este método permite el crecimiento, desarrollo y regeneración de las plantas, y se originó del uso inicial de recipientes de vidrio (Espinoza, 2013).

- d) **Reguladores de crecimiento:** Se refieren a sustancias, algunas de origen natural como las hormonas, y otras sintéticas, que tienen efectos en los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas incluso en concentraciones muy bajas. Por lo general, los tejidos cultivados *in vitro* no producen suficientes cantidades de estos reguladores para satisfacer sus necesidades, por lo que es esencial agregar fuentes externas. Los reguladores de crecimiento comunes incluyen auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Davies, 2004).
- e) **Propagación clonal:** Sistema de propagación asexual que a partir de un explante menor o igual a 1,0 cm de longitud, obtenido de una planta madre, resulta en la propagación masiva de plantas genéticamente idénticas denominadas clones. El método original de propagación clonal, conocido como método Brokaw, es extremadamente meticuloso y exige la aplicación de estándares de calidad muy elevados en todos los procesos e insumos empleados. En el proceso de clonación, se descartan aproximadamente la mitad de las plantas con el fin de garantizar la máxima calidad en la planta final (Castro & Fassio, 2015).
- f) **Morfogénesis:** Este término en el contexto del cultivo *in vitro* se refiere a la habilidad de las células de un explante para generar tejidos, órganos y finalmente una planta completa en condiciones controladas. Esto ocurre debido a la capacidad de las células para diferenciarse, desdiferenciarse y ser totipotentes, ya sea directamente o a través de la formación de callos. La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénicos mediante los cuales es posible regenerar plantas completas en el cultivo *in vitro* (Radice, 2010).

- g) **Yema apical:** Órgano vegetal formado por un meristemo apical protegido por hojas modificadas. Es la yema que se ubica en el extremo del tallo principal y ramas siendo su función la producción de tejidos para el crecimiento longitudinal de la planta (Caillante, 2017).
- h) **Callos:** Células somáticas no diferenciadas de un espécimen vegetal que se encuentran en constante división, no necesariamente homogéneos genéticamente, pueden ser organogénicos, por inducir la formación de brotes o raíces, y embriogénicos, por formar embriones de tipo somático (Caillante, 2017).
- i) **Cotiledones:** Hojas modificadas que almacenan alimentos para nutrir a la plántula al iniciarse la germinación (Davies, 2004).
- j) **Fruto piriforme:** Fruto en forma de pera, globoso en la base y angosto en la parte superior (Powow, 2022)

### III. DISEÑO METODOLÓGICO

#### 3.1 Diseño de contrastación de hipótesis

Para contrastar la hipótesis se utilizó el diseño clásico (Goode & Hatt, 1986), con estímulo creciente, donde se formularon varios tratamientos con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento y uno de ellos actuó como testigo, exento de reguladores, teniendo en cuenta 15 repeticiones para cada concentración.

La variable independiente, constituida por las diferentes formulaciones de medios de cultivo y la variable dependiente, constituida por las respuestas de tejidos y órganos utilizados del “calabazo” *L. siceraria*.

#### 3.2 Población y Muestra

##### a) La población:

La población estuvo constituida por plantas cultivadas de *L. siceraria* ubicadas en los campos de cultivo, en el caserío Bodegones ubicado en el distrito de Lambayeque, provincia de Lambayeque, región Lambayeque. Con ubicación de GPS a los 6°43'20,2" S y 79° 56'20,5" O (**Figura 1**).

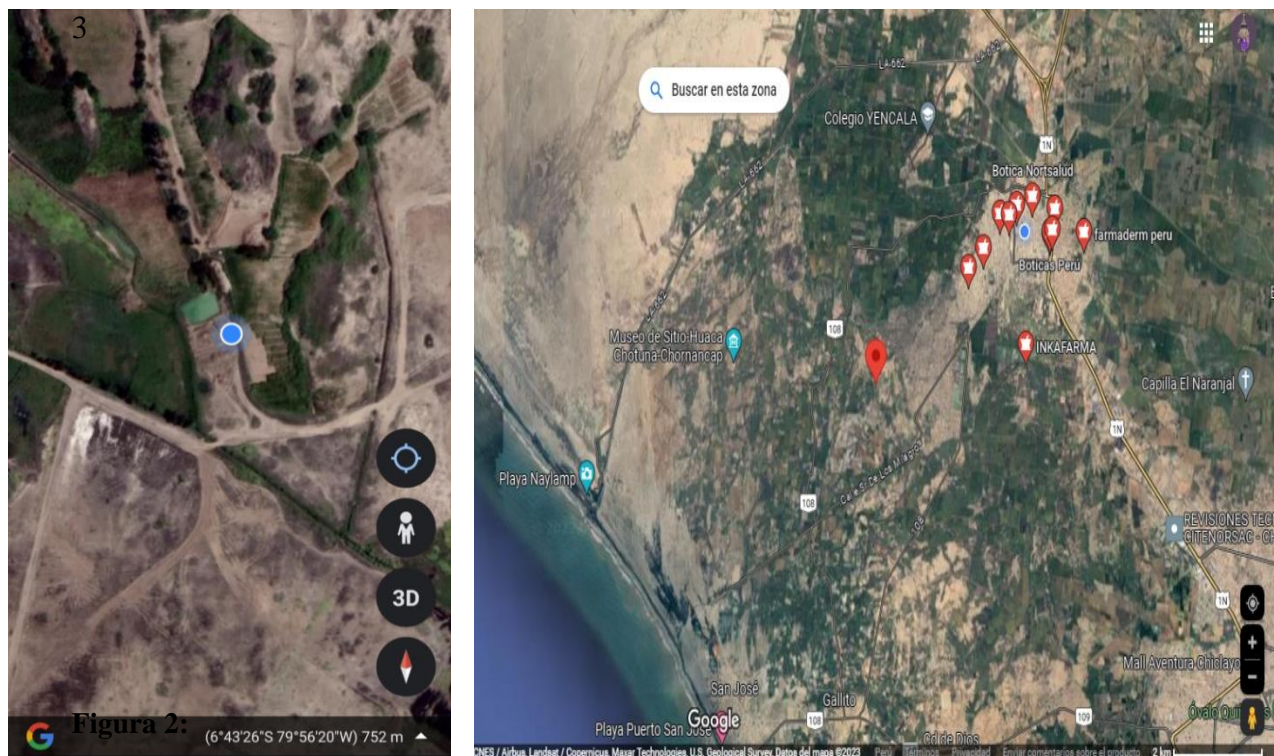
##### b) La muestra:

De acuerdo a la población, se tomó una muestra aleatoria simple, constituida por 100 semillas extraídas de dos frutos piriformes, con dos meses de cosechados, de áreas de cultivo del centro poblado Bodegones en Lambayeque. Este material fue utilizado como fuente inicial para todo el proceso de germinación, propagación, organogénesis y conservación *in vitro* (**Figura 2**).



**Figura 1:**

*Ubicación de plantas de L. siceraria, Bodegones, Lambayeque.*



**Figura 2:**

*Frutos de L. siceraria, donadores de semillas.*



*a. Fruto recién cosechado, b. Fruto seco*

### **3.3 Técnicas, instrumentos, equipos y materiales**

#### **3.3.1. Materiales**

##### **Material Vegetal**

El material botánico estuvo constituido por plantas y frutos piriformes de *L. siceraria*, provenientes de áreas de cultivo del centro poblado Bodegones en Lambayeque. Se rotuló con la fecha y lugar de colecta, antes de ser trasladado al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, donde se desarrolló la investigación.

##### **a) En la germinación:**

Para el proceso de germinación, se utilizaron semillas seleccionadas a partir de frutos secos de aproximadamente dos meses de cosechados, provenientes del centro poblado Bodegones, Lambayeque.

La selección de estas fue teniendo en cuenta el color de la cubierta y grosor de la semilla, almacenándose en bolsas de papel y rotuladas con la fecha en que se extrajo del fruto. En el laboratorio, las semillas fueron seleccionadas teniendo en cuenta la homogeneidad en forma y tamaño para su posterior cultivo *in vitro* (**Figura 3**).

##### **b) En la propagación:**

Para la propagación, el material vegetal estuvo constituido por ápices caulinares y nudos cotiledonales provenientes de plantas germinadas *in vitro* en óptimas condiciones fisiológicas.

##### **c) En la inducción de callos y organogénesis directa:**

El explante estuvo constituido por fragmentos de cotiledones de 1,0 x 1,0 cm de tamaño, obtenidos de plantas germinadas *in vitro*, luego de 15 días de establecido el cultivo.

##### **d) En la conservación de germoplasma:**

El material vegetal estuvo constituido por segmentos nodales de plantas establecidas *in vitro* previamente.

### Figura 3

*Semillas de L. siceraria, seleccionadas para establecimiento in vitro.*



### Medio de Cultivo

#### a) **Formulación y preparación del medio de cultivo para la germinación de semillas *in vitro***

El medio de cultivo para la germinación *in vitro* de semillas de *L. siceraria*, estuvo constituido por las sales minerales de Murashige y Skoog - MS (**Tabla 1**), suplementadas con sacarosa 2%.

Todos los medios de cultivo preparados fueron gelificados con 0,6 % agar-agar y previamente el pH fue ajustado a  $5,7 \pm 0,1$ . Luego de diluido el agar fueron distribuidos en los respectivos tubos de ensayo y frascos de vidrio y tapados con papel aluminio. La esterilización se realizó en autoclave a  $120^{\circ}\text{C}$  x 15 lbp<sup>2</sup> durante 15 a 20 minutos, dependiendo si fueron tubos o frascos de vidrio.

**Tabla 1:**

*Composición química del medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) utilizado como base para los tratamientos de propagación, morfogénesis y conservación in vitro de L. siceraria.*

Solución Madre N°	Constituyentes químicos	Concentración (mg/L)	Volumen de solución madre por litro de medio de cultivo (mg/L)
1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 650	20,0
	KNO <sub>3</sub>	1 900	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	
	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	6,2	
2	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	22,3	1,0
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	
3	KI	0,83	1,0
4	CaC <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	3,0
5	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3	5,0
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	
6	Tiamina.HCl	0,4	2,5
7	Mio-Inositol	100	12,5

#### **b) Formulación y preparación del medio de cultivo de propagación *in vitro***

El medio de cultivo para la propagación *in vitro* de *L. siceraria*, tuvo los mismos componentes basales utilizados para la germinación de semillas, diferenciándose en los reguladores de crecimiento, donde se incorporó 6-bencilaminopurina (0,5 y 1,0 mg/L), 2-isopentiladenina (0,5 y 1,0 mg/L), kinetina (0,5 y 1,0 mg/L) y ácido giberélico (0,1 mg/L), suplementado con sacarosa (2%). Para el caso de la conservación *in vitro*, (Tabla 2).

**Tabla 2**

*Medio de cultivo para propagación in vitro de L. siceraria\**

TRATAMIENTO	REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/L)			
	BAP	2iP	KIN	AG <sub>3</sub>
<b>T1</b>	0,5	-		0,1
<b>T2</b>	1,0	-		0,1
<b>T3</b>	-	0,5		0,1
<b>T4</b>	-	1,0		0,1
<b>T5</b>	-	-	0,5	0,1
<b>T6</b>	-	-	1,0	0,1

*Nota:* BAP, 6-benzilaminopurina; 2iP, 2-isopentil adenina; KIN, kinetina; AG<sub>3</sub>, ácido giberélico

\*15 tubos de ensayo de 150x25 mm/tratamiento

**c) Formulación y preparación del medio de cultivo para conservación *in vitro***

Para la conservación *in vitro* de *L. siceraria*, el medio de cultivo estuvo constituido por los mismos componentes basales utilizados para germinación y propagación, variando unicamente en los reguladores de crecimiento, que para el caso fue utilizado un balance de AIA 0,02 mg/L y AG<sub>3</sub> 0,02g/L.

### Organogénesis:

#### Inducción de callos

El medio de cultivo para inducción de callos de *L. siceraria* estuvo constituido por los mismos componentes del medio de cultivo basal que en los casos anteriores, suplementado con vitaminas y los reguladores de crecimiento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-acético (AIA) en concentraciones de 1,0 y 2,0 mg/L cada uno, además se adicionó 3,0% de sacarosa (**Tabla 3**).

**Tabla 3:**

*Formulación del medio de cultivo en la inducción de callos en diversos explantes de L. siceraria.*

TRATAMIENTO	REGULADORES DE CRECIMIENTO		
	(mg/L)		
	2,4-D	ANA	AIA
<b>T1</b>	1,0	-	-
<b>T2</b>	2,0	-	-
<b>T3</b>	-	1,0	-
<b>T4</b>	-	2,0	-
<b>T5</b>	-	-	1,0
<b>T6</b>	-	-	2,0

*Nota:* 2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético; ANA, ácido 1-naftalenacético; AIA, ácido indol-3-acético

\*15 repeticiones/tratamiento

#### Regeneración de callos:

El medio de cultivo para la inducción de procesos morfogénicos a partir de callos, estuvo constituido por los componentes del medio de cultivo basal, donde se incorporó 6-bencilaminopurina (1,0 mg/L), 2-isopentiladenina (1,0 mg/L), kinetina (1,0 mg/L) y ácido indol-3-acético (0,25 mg/L), suplementado con sacarosa 3,0% y agar-agar 0,6%.

Para la inducción de procesos morfogénicos se utilizaron los callos obtenidos de los tratamientos anteriores, los que habían sido cortados en secciones de 0.5 cm<sup>2</sup> aproximadamente y colocados en medio de cultivo de regeneración para su evaluación frente a diferentes tratamientos de auxinas y citocininas en medio de cultivo basal MS (Murashige & Skoog, 1962) (**Tabla 4**).

**Tabla 4:**

*Medio de cultivo en la inducción de diversos procesos morfogénicos de L. siceraria.*

*Regeneración a partir de callos. \**

TRATAMIENTO	REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/L)			
	BAP	KIN	2iP	AIA
T1	1,0	-		-
T2	1,0	-		0,25
T3	-	1,0		-
T4	-	1,0		0,25
T5	-	-	1,0	-
T6	-	-	1,0	0,25

*Nota: \*15 repeticiones/tratamiento*

#### **Organogénesis directa:**

El medio de cultivo para la inducción de procesos morfogénicos, estuvo constituido por los componentes del medio basal, donde se incorporó 6-bencilaminopurina (1,0 mg/L), 2 -isopentiladenina (1,0 mg/L), kinetina (1,0 mg/L) y ácido indol-3-acético (0,25 mg/L) suplementado con sacarosa 3,0% y agar-agar 0,6% (**Tabla 5**).

Para el medio de cultivo de inducción de procesos morfogénicos se utilizaron cotiledones, los que fueron cortados en secciones de 1,0 cm<sup>2</sup> aproximadamente y colocados en medio de cultivo de regeneración para su evaluación frente a diferentes tratamientos de auxinas y citocininas suplementadas con sacarosa 3,0% y agar-agar 0,6%, en medio de cultivo basal MS (Murashige & Skoog, 1962)

**Tabla 5:**

*Formulación del medio de cultivo para la inducción de diversos procesos morfogénicos en *L. siceraria*.*

TRATAMIENTO	REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/L)			
	BAP	KIN	2iP	AIA
<b>T1</b>	1,0	-	-	-
<b>T2</b>	1,0	-	-	0,25
<b>T3</b>	-	1,0	-	-
<b>T4</b>	-	1,0	-	0,25
<b>T5</b>	-	-	1,0	-
<b>T6</b>	-	-	1,0	0,25

*Nota: 25 repeticiones/tratamiento*

#### **Conservación *in vitro*:**

El medio de cultivo para la conservación, estuvo constituido por bajas concentraciones de AIA y AG<sub>3</sub> (0,02 mg/L), el cual ha permitido conservar *in vitro* algunas especies herbáceas y semileñosa. Es por esto que fue utilizado como estrategia de conservación de germoplasma para experimentar con *L. siceraria*.

### **3.3.2. Metodología**

#### **Colecta de semillas**

Las semillas fueron obtenidas a partir de frutos secos producidos por plantas establecidas en áreas de cultivo del centro poblado Bodegones, Lambayeque.

Se utilizaron dos frutos cosechados de dos meses. Se retiraron las semillas y se seleccionaron, trasladándose luego al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Biológicas en bolsas de papel.

Se tuvo en cuenta el color, grosor y forma de las semillas para su posterior siembre *in vitro*.

#### **a) Preparación de la cámara de flujo laminar de aire esterilizado**

La cámara fue encendida 20 minutos previos a iniciar la sesión de trabajo.

La superficie de las paredes laterales, el fondo y la base fueron desinfectadas con



alcohol etílico 70%. Luego de evaporado, se procedió a encender el mechero de alcohol y realizó la respectiva esterilización de pinzas y bisturíes con el fuego del mechero.

#### **b) Preparación del operador**

El operador procedió al lavado de manos con jabón y agua corriente. Cuando las manos se secaron, se inició el trabajo en cámara, previa desinfección de manos y antebrazos con alcohol etílico 70 %, a una distancia prudente del mechero de alcohol.

El uso de mandil y mascarilla fue imprescindible, así como el recojo del cabello para evitar contaminación del ambiente de trabajo.

#### **Cultivo *in vitro***

##### **c) Siembra de semillas en condiciones *in vitro***

Las semillas fueron desinfestadas con hipoclorito de sodio (lejía comercial 5,0% de cloro activo) y detergente durante 15 minutos y enjuagadas respectivamente para ser trasladadas a cabinas de flujo laminar de aire esterilizado donde el proceso de siembra se realizó con un segundo tratamiento de desinfestación con alcohol etílico 70% por 3 minutos e hipoclorito de sodio concentrado por 30 minutos. Posteriormente, la cubierta de las semillas fue retirada con bisturí N° 22 cuidadosamente para dejar el embrión expuesto y cultivado en el medio de cultivo basal MS(Murashige & Skoog, 1962), suplementado con sacarosa 2,0% (**Figura 4a**).

##### **d) Aislamiento y cultivo de explantes**

El aislamiento de explantes, para los tratamientos de propagación, conservación e inducción de callos y procesos morfogénicos se realizaron en plántulas de 15 cm, germinadas en condiciones *in vitro*.

Para la propagación clonal, los explantes aislados fueron ápices caulinares y nudos cotiledonales y en la conservación *in vitro* se utilizaron segmentos nodales. Secciones de cotiledones de 1x1 cm, fueron utilizadas para la inducción de callos y procesos morfogénicos. Todos estos explantes fueron cultivados en los medios de cultivo formulados y evaluados en periodos de tiempo dependiendo de cada caso. En la germinación de semillas entre 10 y 15 días, en la propagación 10, 20 y 30 días, en la

inducción de callos 20 y 40 días y en la conservación de germoplasma desde uno, dos, tres y cuatro meses (**Figura 4b**).

**e) Condiciones de incubación**

Para la germinación de semillas e inducción de callos, el material cultivado *in vitro* fue incubado bajo influencia de intensidad lumínica de 40 a 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-2}$  y fotoperiodo de 16/8 horas luz y oscuridad.

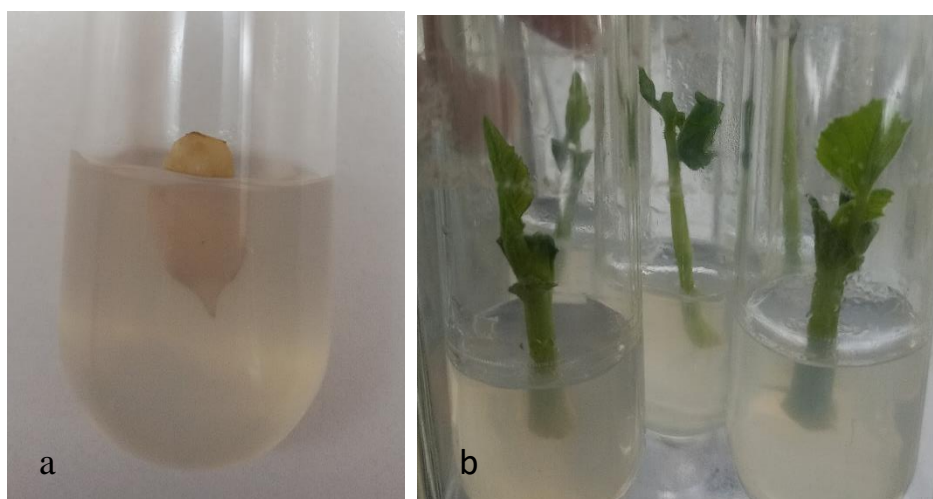
**3.3.3. Procesamiento y análisis de datos**

Los resultados obtenidos en cada tratamiento y días de cultivo de los tejidos vegetales *in vitro* fueron registrados en una hoja de cálculo Excel 2019, donde se realizaron las operaciones respectivas y los resultados expresados en tablas porcentuales y figuras.

Para determinar la relación del tipo de tratamiento y el efecto del tiempo sobre las características evaluadas como número de nudos, longitud de plántulas e inducción de callos se realizó un análisis de varianza factorial de dos factores y luego de determinar la diferencia entre cada tratamiento se realizó la prueba de comparación múltiple de tukey con un nivel de confianza del 95% para lo cual se usó el software Spss versión 18.

**Figura 4**

*Semillas y yemas de L. siceraria cultivadas in vitro.*



**a.** Semilla escarificada, **b.** Establecimiento de un cultivo de yemas apicales.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Establecimiento del cultivo *in vitro*

La fase inicial en todo sistema de propagación *in vitro* es una de las más complejas sobre todo cuando se trabaja con material colectado directamente de campo, debido a la contaminación. Sin embargo, considerando que las semillas se encuentran protegidas por una cubierta (epicarpio) muy consistente del fruto de *L. siceraria*, el grado de contaminación resultó ser relativamente bajo (7,5 %).

### 4.2. Germinación *in vitro* de semillas de *L. siceraria*

Luego de transcurridos cinco días de establecido el cultivo *in vitro*, las semillas iniciaron el proceso de germinación, alcanzando 45% y otro porcentaje similar de no germinadas y apenas el 5% de estas presentaron contaminación. Después de 10 días la germinación se incrementó a 60% y a los 15 días alcanzó 70%, en tanto que la contaminación máxima fue de 7,5% (**Tabla 6**). Fue observado, también, el crecimiento de las plántulas, el mismo que se presentó de manera exponencial, puesto que entre 5 y 10 días de establecido el cultivo, hubo un incremento de 4,8 cm y entre 10 y 15 días 7,2 cm (**Figura 5 y 6**).

**Tabla 6**

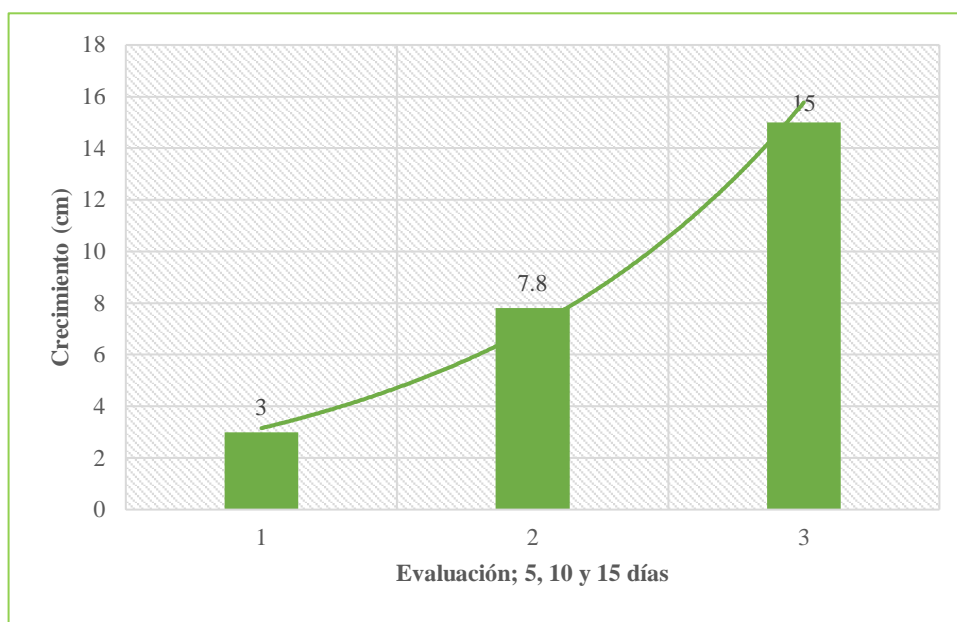
*Germinación de semillas in vitro de L. siceraria en medio de cultivo MS.*

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Germinadas (%/N°)</b>	<b>No germinadas (%/N°)</b>	<b>Contaminadas (%/N°)</b>	<b>Longitud de plántula (cm)</b>
5	47,5	47,5	5,0	3,0
10	60,0	32,5	7,5	7,8
15	70,0	22,5	7,5	15,0

*Nota: 40 semillas utilizadas en el proceso de germinación*

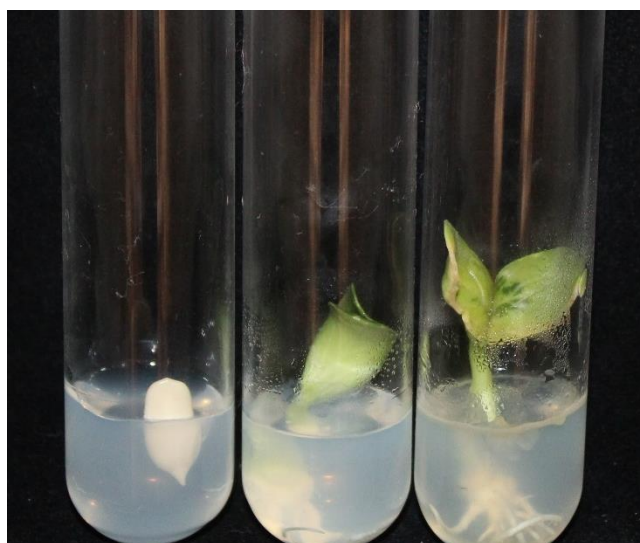
**Figura 5**

*Crecimiento de plántulas germinadas in vitro de L. siceraria.*



**Figura 6**

*Proceso de germinación in vitro de L. siceraria, luego de cultivada, después de 10 días de cultivo.*



### 4.3. Propagación *in vitro*

Las yemas aisladas de 1,0 cm de longitud, a partir de las plántulas obtenidas mediante germinación *in vitro* e instaladas en los diferentes tratamientos, mostraron un desarrollo adecuado, observándose como respuestas la diferenciación de hojas, nudos y raíces, a medida que transcurrió el tiempo de cultivo.

#### 4.3.1 Número de nudos formados

Transcurridos 10 días de establecidas las yemas en los 6 tratamientos formulados, se observó que en el tratamiento T2, que incluyó BAP 1,0 mg/L y AG<sub>3</sub> 0,1 mg/L, fueron diferenciados 4,8±1,57 nudos. Luego de 20 días las plantas presentaron 7,8±3,55 nudos y al cabo de 30 días 8,1±3,91 nudos en promedio, pero presentó también la mayor variación a los 20 días (± 3,55) y 30 días (± 3,91), a igual que los demás; sin embargo, el T1 mantuvo la variación más baja en los tres períodos evaluados, por lo tanto puede ser considerado el de mejor respuesta para número de nudos. (Tabla 7 y Figura 7).

**Tabla 7.**

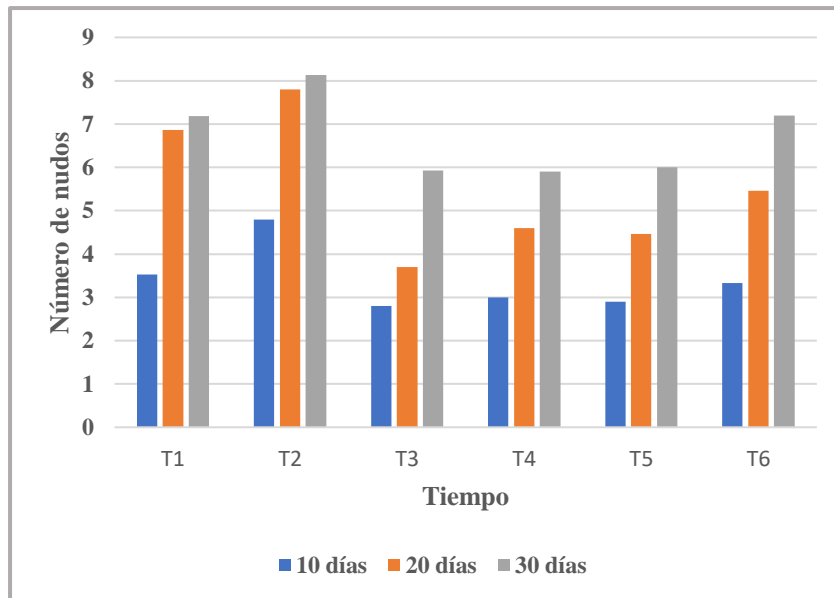
*Número de nudos en plantas in vitro de L. siceraria.*

	BAP	2iP	KIN	AG <sub>3</sub>	Número de nudos			Grupos	
					10 días	20 días	30 días		
<b>T1</b>	0,5	-		0,1	3,5 ±1,36	6,9 ±1,81	7,2 ±1,80	b	c
<b>T2</b>	1,0	-		0,1	4,8 ±1,57	7,8 ±3,55	8,1 ±3,91		c
<b>T3</b>	-	0,5		0,1	2,8 ±1,19	3,7 ±1,44	5,9 ±3,58	a	
<b>T4</b>	-	1,0		0,1	3,0 ±1,25	4,6 ±2,44	5,9 ±3,58	a	b
<b>T5</b>	-	-	0,5	0,1	2,9 ±0,96	4,5 ±1,88	6,0 ±2,83	a	b
<b>T6</b>	-	-	1,0	0,1	3,3 ±0,98	5,5 ±1,99	7,2 ±3,23	a	b
					a	b	c		

*Nota:* 15 repeticiones por tratamiento

**Figura 7.**

*Número de nudos en plantas in vitro de L. siceraria.*



#### 4.3.2 Longitud de plántulas

El crecimiento de las plantas fue armónico desde los 10, hasta los 20 y 30 días, alcanzando  $6,5 \pm 1,71$ ;  $5,8 \pm 1,64$  y  $5,3 \pm 1,82$  cm, respectivamente, en especial en los tratamientos T6, T5 y T3 que incluyeron KIN y AG<sub>3</sub> (1,0; 0,1 y 0,5; 0,1 mg/L); sin embargo, si se observa la variación presentada entre unidades, se puede considerar mejores respuestas a las de T1 y T2, donde la variación en las respuestas individuales fueron menor a uno y en los demás esa variación fue casi el doble. Los demás tratamientos presentaron un crecimiento menor, aunque también importante (Tabla 8 y Figura 8).

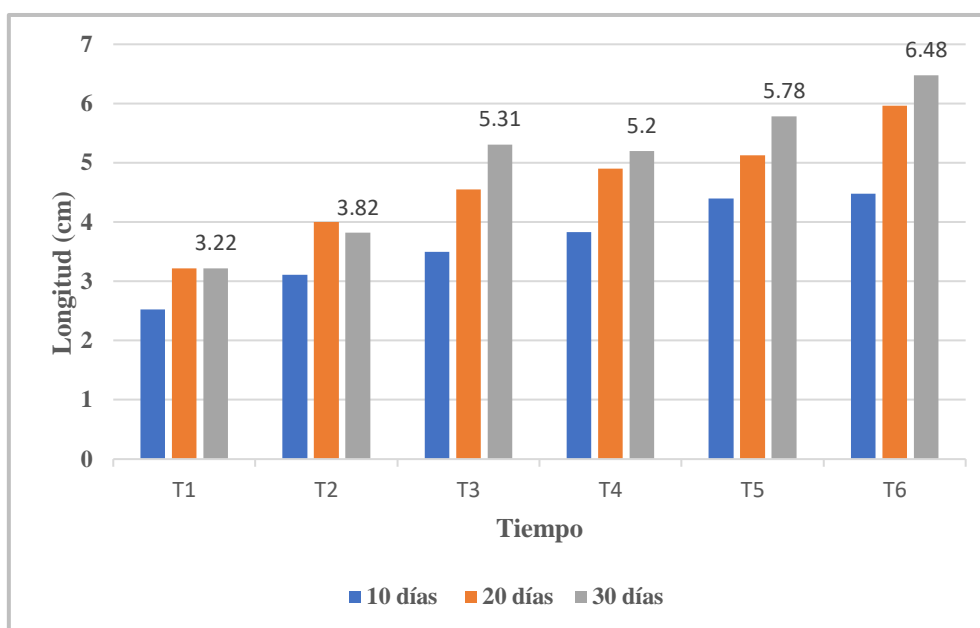
**Tabla 8.**

*Longitud de plántulas in vitro de L. siceraria.*

Trat	BAP	2iP	KIN	AG <sub>3</sub>	Longitud de plántulas (cm)			Grupos
					10 días	20 días	30 días	
T1	0,5	-		0,1	2,5±0,47	3, 2±0,71	3,2±0,71	a
T2	1,0	-		0,1	3,1±0,80	4,0±1,59	4,8±0,72	a b
T3	-	0,5		0,1	3,5±0,87	4,5±1,61	5,3±1,82	b c
T4	-	1,0		0,1	3,8±1,05	4,9±1,94	5,2±1,99	c
T5	-	-	0,5	0,1	4,4±1,14	5,1±1,64	5,8±1,64	c d
T6	-	-	1,0	0,1	4,5±1,09	5,9±1,83	6,5±1,71	d
					a	b	b	

**Figura 8.**

*Longitud de plántulas in vitro de L. siceraria.*



**Figura 9.**

*Plantúlas in vitro de L. siceraria en el tratamiento T6 (KIN 1,0 mg/L y AG<sub>3</sub> 0,1 mg/L).*



### 4.3.3 Enraizamiento de plántulas

Las evaluaciones, realizadas luego de 10, 20 y 30 días de cultivo de los nudos *in vitro* de *L. siceraria*, mostraron que en el tratamiento T6 se inició el enraizamiento desde los 10 días en cultivo, con 0,8 raíces en promedio, incrementándose a 2,4 a los 20 días y 2,8 a los 30 días, respectivamente. En segundo lugar, correspondió al tratamiento T4, donde el enraizamiento se inició a los 20 días del cultivo con 0,5 raíces en promedio y hacia los 30 días 1,4 raíces. En los demás tratamientos sólo se desarrollaron 0,2 raíces hacia los 30 días de cultivo (Tabla 9 y Figuras 10 y 11).

**Tabla 9**

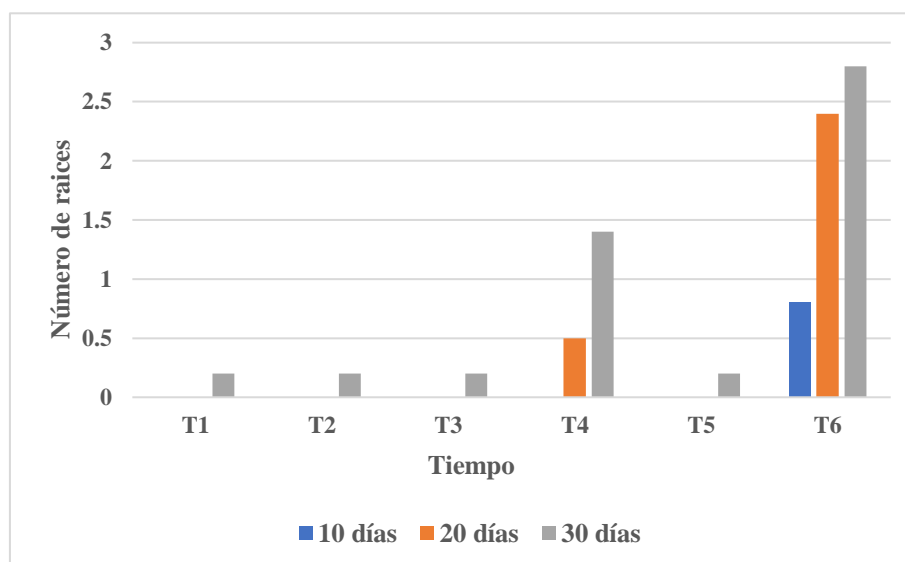
*Enraizamiento de nudos in vitro de L. siceraria, luego de 10, 20 y 30 días en cultivo.*

TRAT.	BAP	2iP	KIN	AG <sub>3</sub>	Número de raíces por plántula		
					10 días	20 días	30 días
<b>T1</b>	0,5	-		0,1	0	0	0,2
<b>T2</b>	1,0	-		0,1	0	0	0,2
<b>T3</b>	-	0,5		0,1	0	0	0,2
<b>T4</b>	-	1,0		0,1	0	0,5	1,4
<b>T5</b>	-	-	0,5	0,1	0	0	0,2
<b>T6</b>	-	-	1,0	0,1	0,8	2,4	2,8

*Nota: 15 repeticiones por tratamiento*

**Figura 10**

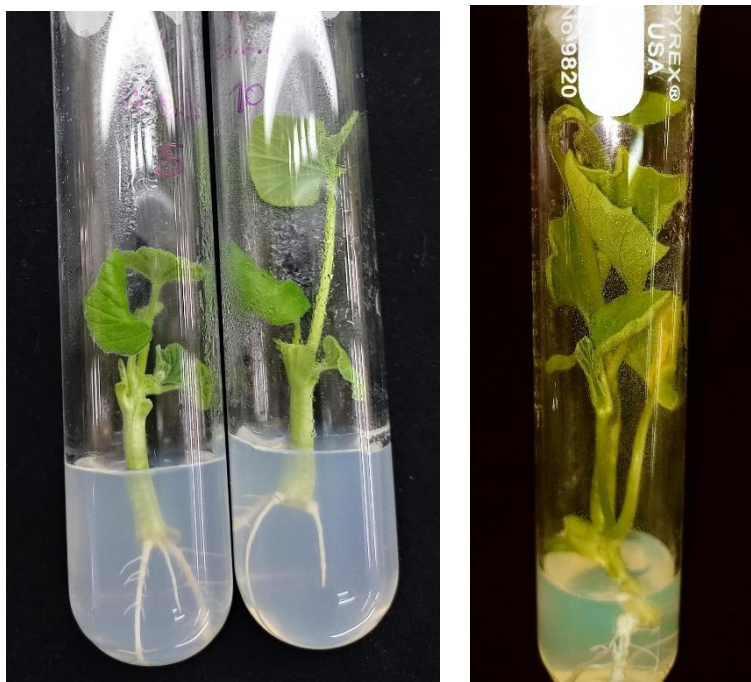
*Enraizamiento de nudos in vitro de L. siceraria, de T4 y T6 luego de 10, 20 y 30 días en cultivo.*





## Figura 11

*Enraizamiento de nudos in vitro de L. siceraria, del T6 luego de 10 y 20 días en cultivo.*



a. Nudos a 10 días de cultivo, b. Nudos a 20 días de cultivo.

## 4.4 Morfogénesis

### 4.4.2 Organogénesis indirecta

Para el proceso de organogénesis fueron optadas dos vías, la vía indirecta iniciada con la inducción de callos y la vía directa. En el primer caso partiendo, de tejido de hojas cotiledonales, al cabo de 20 días de cultivo se inició la formación de callos cremosos, donde sobresalieron los tratamientos T1 y T2, los mismos que incluyeron 2,4-D en 1,0 y 2,0 mg/L, observándose callogénesis en el  $23,3 \pm 13,45\%$  y  $22,0 \pm 10,14\%$  de tejidos cultivados. Transcurridos 40 días de cultivo, se incrementó considerablemente la formación de callos, en estos mismos tratamientos, llegando a formarse en el  $64,6 \pm 17,28$  y  $64,6 \pm 13,58\%$  de los tejidos cultivados, haciendo notar que la variación de respuesta de los tejidos individuales fue bastante alta en relación a los demás ( $\pm 17,20$  y  $\pm 13,58$ ). En los tratamientos restantes la formación de callos ocurrió en menos de 10% de los tejidos cultivados, y la formación de callos se inició a partir de las zonas disectadas del tejido cultivado (Tabla 10).

**Tabla 10**

*Inducción de callos en tejido de hojas cotiledonales de L. siceraria, luego de 20 y 40 días de cultivo in vitro.*

TRAT.	Reguladores de crecimiento (mg/L)			Callos (%)		Grupos
	2,4-D	ANA	AIA	20 días	40 días	
T1	1,0	-	-	23,3±13,45	64,6±17,28	b
T2	2,0	-	-	22,0±10,14	64,6±13,58	b
T3	-	1,0	-	7,3±4,58	8,0±4,14	a
T4	-	2,0	-	9,3±7,99	10,6±7,04	a
T5	-	-	1,0	7,3±7,04	8,6±6,39	a
T6	-	-	2,0	6,0±5,07	8,6±3,52	a

*Nota: 15 repeticiones por tratamiento*

A medida que se incrementaba la formación de callos, también se observó la diferenciación de raíces, sobre todo en los tratamientos que incluían en la formulación las auxinas ANA y AIA, aún cuando fueron esporádicas. En AIA 2,0 mg/L se observó la diferenciación de solamente una raíz en promedio hacia los 40 días en cultivo (**Tabla 11**).

**Tabla 11**

*Diferenciación de raíces in vitro en callos en L. siceraria (Molina), luego de 20 y 40 días de cultivo in vitro.*

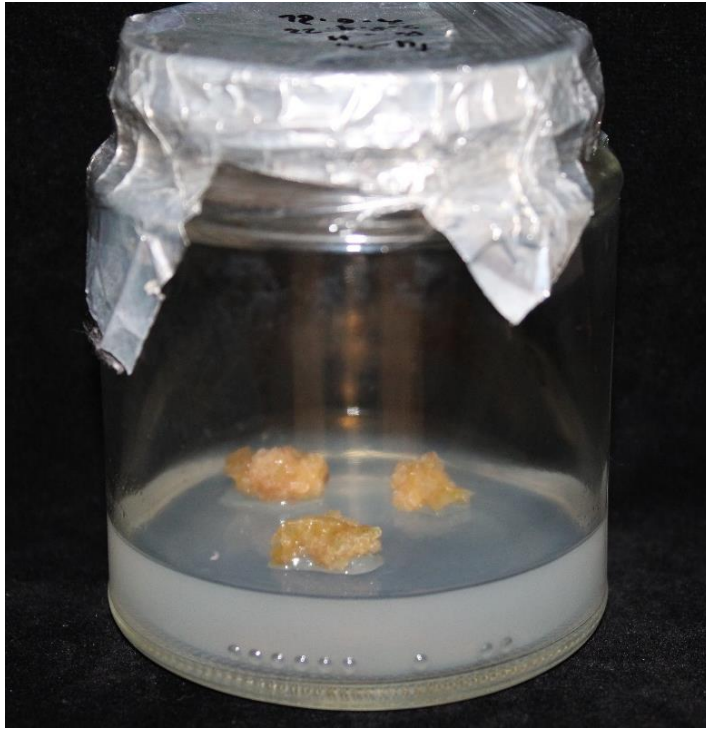
TRAT.	Reguladores de crecimiento (mg/L)			Raíces (N°)	
	2,4-D	ANA	AIA	20 días	40 días
T1	1,0	-	-	0	0
T2	2,0	-	-	0	0
T3	-	1,0	-	0,4	0,5
T4	-	2,0	-	0,3	0,7
T5	-	-	1,0	0,1	0,2
T6	-	-	2,0	0,5	1,0

*Nota: 15 repeticiones por tratamiento*

Los callos ligeramente compactos y de coloración cremosa, generados en presencia de 2,4-D, fueron transferidos a medios de cultivo con las formulaciones que incluían BAP, KIN, 2IP y AIA, con la finalidad de obtener diferenciación de órganos, sin embargo, lo único que se observó fue oxidación celular (**Figura 12**).

## Figura 12

*Callos in vitro de L. siceraria inducidos en medio MS suplementado con 2,4-D, luego de 30 días en cultivo.*



### 4.4.3 Organogénesis directa

En presencia de las mismas formulaciones ensayadas para organogénesis indirecta (BAP, KIN, 2IP y AIA), se ensayó la organogénesis somática directa, utilizando tejidos de hojas cotiledonales, observándose como resultado la formación de callos y al mismo tiempo la diferenciación de brotes y raíces. En cinco tratamientos (T1 a T5) se formaron callos en el 40 y 44 % de tejidos cultivados y en el T6 se formó callo en el 88% de los tejidos cultivados. Debe indicarse que en todos los casos la formación del callo fue observado en el 25% del tejido vegetal cultivado (**Figura 13**).

**Figura 13**

*Callos in vitro de L. siceraria inducidos en medio de cultivo MS suplementado con BAP 1,0 mg/L y AIA 0,25 mg/L, luego de 30 días en cultivo.*



En lo referente a la diferenciación de órganos, únicamente en el tratamiento T1 que incluía BAP 1,0 mg/L se diferenciaron brotes en el 20 % de los explante en promedio, luego de 40 días en cultivo, respectivamente. Asimismo, en el T4 que incluía KIN 1,0 mg/L y AIA 0,25 mg/L se diferenciaron sólo raíces en el 28% de los explante en promedio a los 40 días en cultivo y la diferenciación de brotes varió entre 1 a 3 brotes por explante que respondió positivamente al tratamiento (**Tabla 12 y Figura 14**). Resulta pertinente indicar que en varios explantes se observó la formación de pequeños conglomerados celulares que no llegaron a diferenciar órganos.

**Tabla 12.**

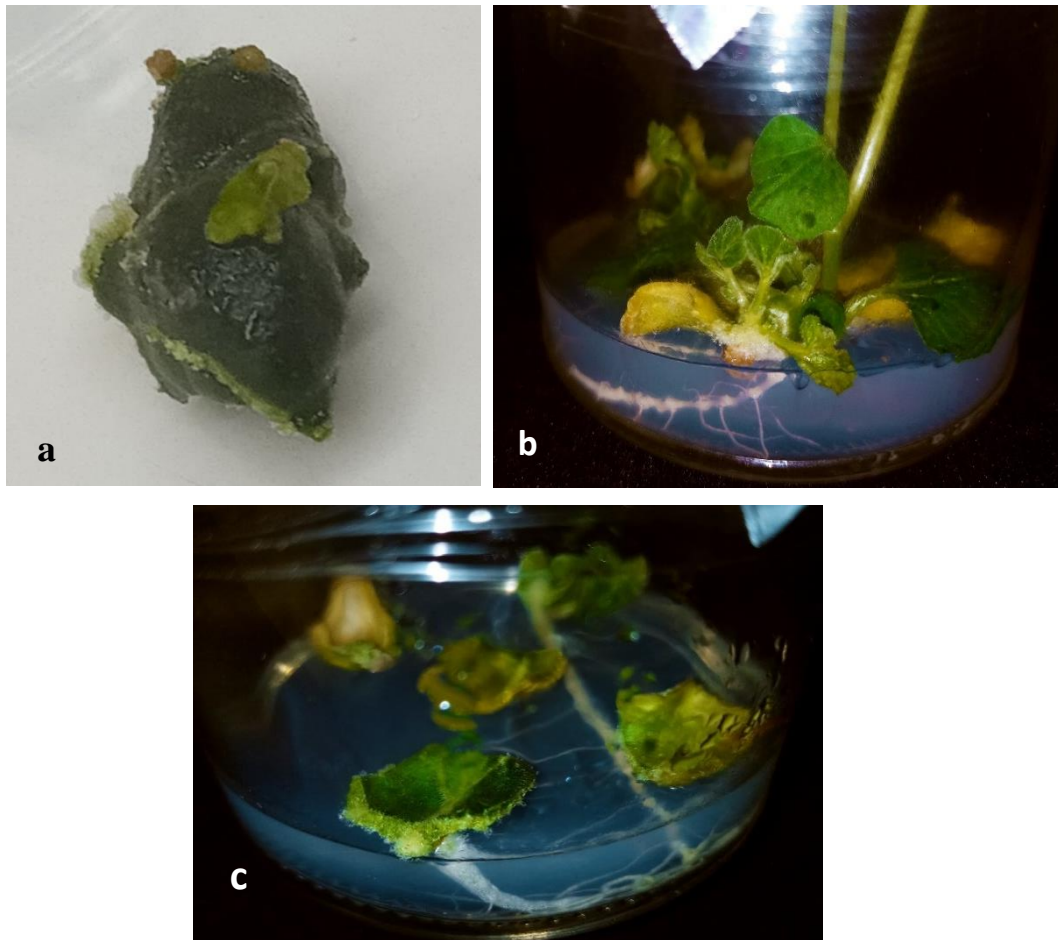
Organogénesis directa en *L. siceraria*, luego de 40 días en cultivo in vitro.

Trat.	Reguladores de crecimiento				Morfogénesis (%)	
	BAP	KIN	2iP	AIA	Callos	Organogénesis directa
						Brotes      Raíces
T1	1,0				40	20      0
T2	1,0			0,25	44	0      0
T3		1,0			40	0      0
T4		1,0		0,25	48	0      28
T5			1,0		40	0      0
T6			1,0	0,25	88	0      0

*Nota: 25 repeticiones por tratamiento*

**Figura 14.**

*Organogénesis directa in vitro en L. siceraria, luego de 40 días de cultivo in vitro.*



**a.** Inducción de callos, **b.** Diferenciación de brotes y **c.** Diferenciación de raíces.

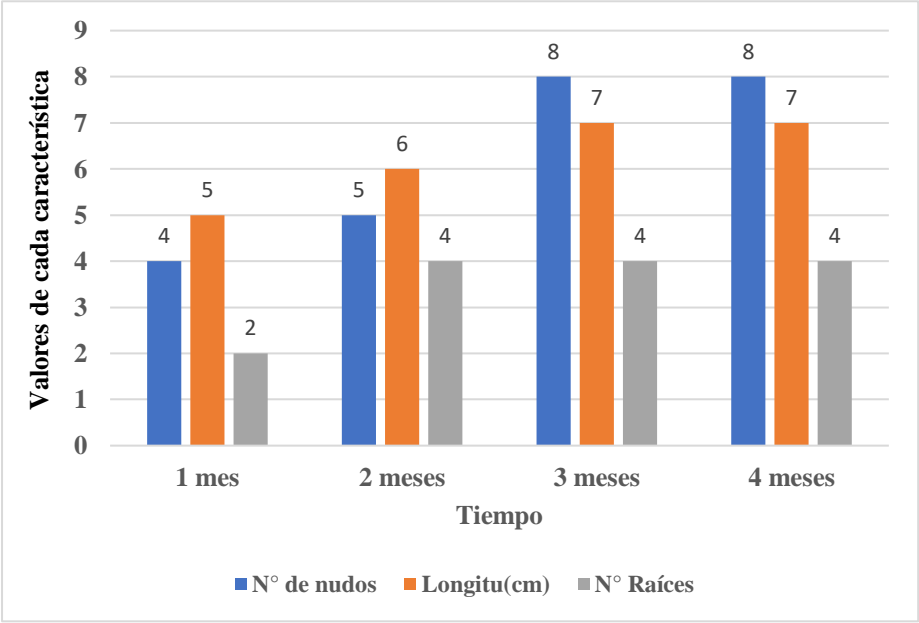
#### **4.5 Conservación *in vitro***

Las bajas concentraciones de AIA y AG<sub>3</sub> (0,02 mg/L) en el medio de cultivo, ha permitido conservar *in vitro* algunas especies herbáceas y semileñosa. Es por esto que fue utilizado como estrategia de conservación de germoplasma para experimentar con *L. siceraria*. Las evaluaciones realizadas, luego de un mes en cultivo de las yemas apicales en medio de cultivo con estos reguladores, se observó que desarrollaron 4 nudos en promedio, las plántulas alcanzaron 5 centímetros de longitud y 2 raíces por explante en promedio. Luego de dos meses de cultivo, los nudos se incrementaron hasta en número de 5, la longitud 6,0 cm y 3,6 raíces por explante. Al cabo de tres meses de cultivo, las plántulas tenían 8 nudos, 7,0 cm de longitud y 4 raíces en promedio. Después de 4 meses en cultivo

ya no incrementó el número de nudos, ni el crecimiento ni el número de raíces formadas, por el contrario, se observó el inicio de necrosis apical (**Figura 15 y 16**).

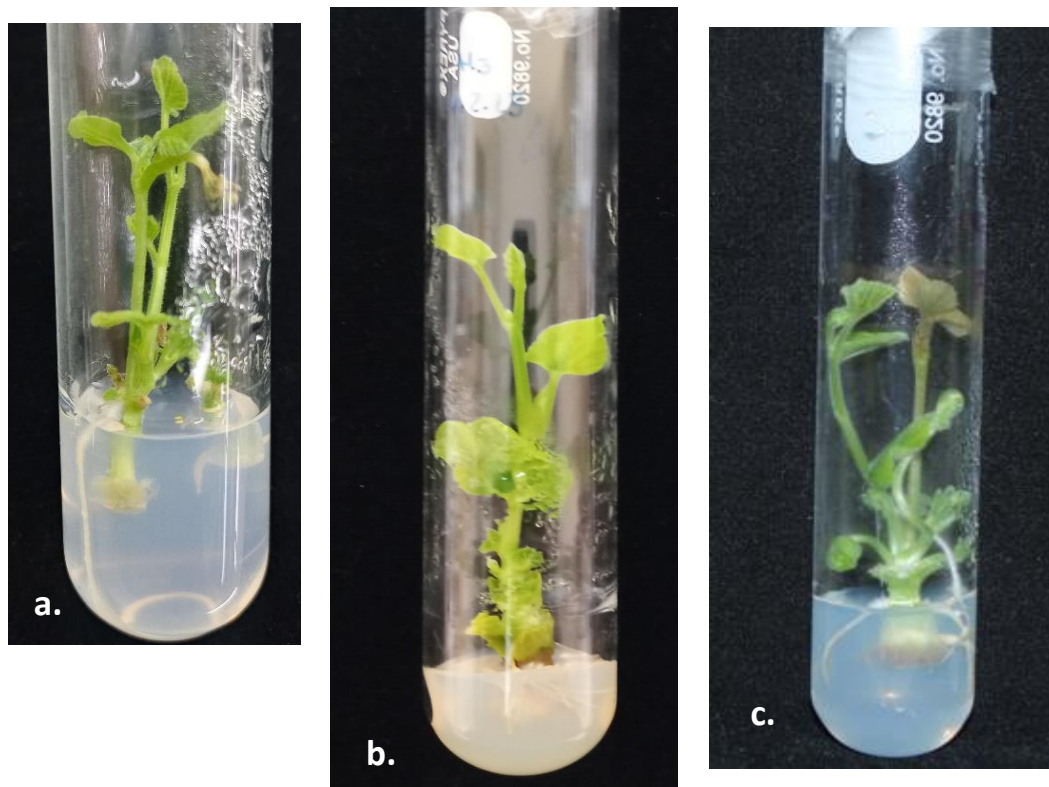
**Figura 15**

*Conservación in vitro de L. siceraria, luego de uno, dos, tres y cuatro meses en cultivo.*



**Figura 16.**

*Conservación in vitro de L. siceraria en medio de cultivo MS suplementado con AIA y AG<sub>3</sub> (0,02 mg/L).*



**a.** Conservación al 1<sup>er</sup> mes **b.** Conservación al 4<sup>to</sup> mes **c.** Necrosis apical



## V. DISCUSIÓN

El establecimiento de las semillas *in vitro* presentó contaminación relativamente baja (7,5%), como ocurre en *C. moschata* “chuyán” (7.2%) (Delgado-Paredes et al., 2023). Probablemente esta contaminación se deba al escarificado ya que estas semillas presentan tegumentos gruesos que sirven de protección. Todas las cucurbitáceas presentan tegumentos protectores gruesos, cuyo grosor varía dependiendo del género, especie, variedad y lugar de cultivo (Ruiz et al., 2021). Asimismo, estas semillas son consideradas ortodoxas por su longevidad en almacenamiento, llegando a tolerar la desecación hasta contener 5% de humedad y enfriamiento a temperaturas menores de 0°C (Kumar et al., 2023). La contaminación fue de tipo bacteriano, pero esto no fue impedimento para que las semillas alcanzaran hasta 70% de germinación al cabo de 15 días en cultivo.

El haber iniciado la propagación a partir de yemas apicales de plántulas establecidas por germinación de semillas *in vitro*, garantizó la asepsia de los tejidos para la propagación, ya que cuando los tejidos proceden directamente de campo o invernadero, la contaminación es alta, como lo reporta Delgado-Paredes et al. (2023) en los estudios realizados en *Cucurbita moschata* “loche”, donde la contaminación persistente fue causada por hongos y bacterias, como consecuencia de la presencia invasiva en los tallos de larvas de *Daphania hyalinata* L. Lepidoptera. En este caso los productos utilizados como desinfectantes frecuentes de tejidos vegetales son poco eficientes, haciendo necesario la utilización de compuestos como el dicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) (Beltrán & Mesa 2014), aun cuando resulte tóxico.

En cuanto a la respuesta en propagación, se observó que la combinación de citocininas y giberelinas estimularon el desarrollo de las plántulas establecidas a partir de yemas apicales de semillas germinadas *in vitro* (seedlings). Se destacó la combinación BAP, AG<sub>3</sub> en 1,0 : 0,1 mg/L, seguida de KIN, AG<sub>3</sub> en las mismas concentraciones, aun cuando 2iP, AG<sub>3</sub> estimularon en menor proporción el desarrollo, también fue significativo, entendiéndose que por desarrollo se considera, altura de plántula, número de nudos, y enraizamiento. Las citocininas y giberelinas juntas generalmente estimulan la diferenciación de brotes como ocurre en *Momordica charantia* (Saha et al., 2016) y en algunas especies sólo es suficiente la presencia de la citocinina BAP ( 1,0 mg/L) para la estimulación de brotamiento *in vitro*, como ocurre en *Trichosanthes dioica* (Kumar et al.,



2016), una Cucurbitácea de alto potencial medicinal y terapéutico, propagada vegetativamente en la India.

A igual que en el caso de *C. ecuadorensis* “chisguin” y *C. moschata* “loche”, la presencia de AIA, BAP y AG<sub>3</sub> en bajas concentraciones en el medio de cultivo (Delgado-Paredes et al., 2023), *L. siceraria*, sólo respondió con crecimiento de las plántulas, no observándose diferenciación de brotes laterales, demostrando que la respuesta estaría modulada por aspectos genéticos en la expresión celular frente a los reguladores de crecimiento utilizados. Este comportamiento sería una clara limitante para la propagación clonal masiva *in vitro* de *L. siceraria*, y de otras especies de cucurbitáceas como se resume en una reciente revisión de Dhumal et al. (2020) sobre aplicación de cultivo de tejidos en especies de esta familia.

En lo correspondiente a la morfogénesis, la inducción de callos, como paso previo para la morfogénesis (formación de órganos o embriones somáticos), en presencia de auxinas 2,4-D, ANA y AIA en concentraciones de 1,0 y 2,0 mg/L, fue observada en todos los tratamientos ensayados. Sin embargo, destacó el 2,4-D, formándose callos 68,6% de los explantes cultivados. Esta auxina es la de mejor respuesta para la multiplicación de células a partir de tejidos que responden a una desdiferenciación, para posteriormente organizarse *de novo*, lo que ha sido demostrado en muchas especies herbáceas y leñosas. En el caso de las cucurbitáceas, especies como *Citrullus colocynthis* (Tariq et al., 2020) y *Trichosanthes dioica* (Prusty et al., 2020) en presencia de 2,4-D 4,0 µM se generaron callos organogénicos; sin embargo, en el caso de *L. siceraria*, en el presente trabajo, los callos presentaron un aspecto friable con pocas características organogénicas, que a medida que pasaba tiempo en cultivo se inició un proceso de oxidación.

En algunos casos a partir de callos inducidos en presencia de 2,4-D y subcultivados a medio carente de la auxina fueron diferenciados embriones (Saurabh et al., 2017). En el caso de *L. siceraria* la diferenciación de órganos a partir de esos callos únicamente fueron raíces; sin embargo, la diferenciación de brotes de manera directa, fue observada en presencia de BAP 1,0 mg/L, como ocurre en *Momordica charantia*, donde el BAP + KIN (0,5 mg/L) estimuló la organogénesis (Naitchede et al., 2022), en tanto que la combinación KIN + AIA 1,0; 0,25 mg/L sólo generó raíces. Si bien la generación de brotes no fue el esperado, lo que se ha conseguido es significativo dentro de la clonación de plantas, asegurando las características en poblaciones futuras a partir de los brotes generados, como ocurre en numerosas especies herbáceas, la organogénesis directa

constituye un buen sistema de multiplicación masiva de plantas, aun cuando se usen hojas cotiledonales (Restrepo et al., 2020), como ocurre en algunos genotipos híbridos de *Cucumis sativus* L. en el mejoramiento genético utilizando tejido partenocárpico (Bhrdwaj et al., 2017)

La literatura no reporta trabajos sobre conservación *in vitro* de *L. siceraria*; sin embargo, los intentos realizados han permitido evaluar el desarrollo y permanencia *in vitro* de plántulas por períodos de uno dos, tres y cuatro meses. Luego de este tiempo, el crecimiento se detuvo, iniciándose un lento proceso de necrosis apical, respuestas observadas también en *C. moschata* y *C. ecuadorensis* cuando las plántulas permanecieron 120 días en cultivo *in vitro* en presencia de AIA +AG<sub>3</sub> (0,02 mg/L) (Delgado-Paredes et al., 2023); por lo que resulta pertinente ensayar otras estrategias de conservación, tanto en la composición del medio de cultivo como en las condiciones ambientales de incubación.

Es probable que el comportamiento ortodoxo de las semillas en su conservación, sea el principal obstáculo para las respuestas de conservación *in vitro*, porque estas características deben obedecer al código genético que determina este comportamiento. La intención de buscar como alternativa a las condiciones *in vitro* para *L. siceraria*, sin duda es la franca pérdida de la diversidad de esta especie debido a la disminución de su utilidad o consumo y a la pérdida de las prácticas ancestrales en la región y el país.

## VI. CONCLUSIONES

1. La propagación *in vitro* de “calabazo” *Lagenaria siceraria* alcanzó la formación de plántulas de  $6,5 \pm 1,71$  cm de altura y  $7,2 \pm 3,23$  nudos, en medio de cultivo MS suplementado con KIN 1,0 mg/L + AG<sub>3</sub> 0,1 mg/L, a partir de yemas apicales de semillas germinadas.
2. La morfogénesis indirecta *in vitro*, permitió la diferenciación de callos en presencia de 2,4-D, en concentraciones de 1,0 mg/L y 2,0 mg/L en el  $64,6 \pm 17,28\%$  y  $64,6 \pm 13,58\%$  de los explantes utilizados.
3. La morfogénesis directa *in vitro* se observó únicamente en presencia de BAP 1,0 mg/L generándose desde aproximadamente 5 brotes por explante (20%), después de 40 días en cultivo, a partir de hojas cotiledonales.
4. En la conservación, solamente se consiguió mantener en condiciones fisiológicamente óptimas, hasta por cuatro meses de cultivo.
5. Entre los problemas fisiológicos observados, se presentó la contaminación en semillas que alcanzó 7.5%, la oxidación en callos a partir de 40 días en cultivo y la necrosis apical de las plantas en conservación luego de cuatro meses en cultivo *in vitro*.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar investigando la incorporación de auxinas, citocininas y otros reguladores de crecimiento, en especial los de última generación, en otras combinaciones, para optimizar la propagación clonal de “calabazo” *Lagenaria siceraria* en condiciones *in vitro*.
2. Continuar investigando la utilización de otras estrategias como es el caso de la incorporación de diversos compuestos químicos al medio de cultivo para evitar la oxidación y necrosis apical de las plantas *in vitro* y poder alargar la vida de las plántulas.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albalat Peraita, V. (2016). Sistemas de alto rendimiento en la regeneración in vitro de melón y pepino. Universidad Politécnica de Valencia, España. <http://hdl.handle.net/10251/76819>
- Beltrán, D.M. & Mesa, N. (2014) El dicloruro de mercurio como desinfectante en la micropropagación del comino (*Aniba perutilis* Hamsley). Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. 16 (1): 203 – 209
- Bevacqua, R. F. (1994). Origin of horticulture in Southeast Asia and the dispersal of domesticated plants to the Pacific Islands by Polynesian voyagers: the Hawaiian Islands case study. 29(11): 1226-1229. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.29.11.1226>
- Bhardwaj, A., Pradeepkumar, T. & Varum Roch, C. (2017). *In vitro* regeneration of parthenocarpic cucumbers (*Cucumis sativus* L.) Int. J. Cuu. Microbiol. App. Sci. 6 (7): 1711 - 1720
- Caillante Ascencio, R. (2017). Establecimiento de medios de cultivo y tipo de explante in vitro plantas de papa variedad huaycha (*Solanum tuberosum* sp.) para mejorar los sistemas de producción de semilla. <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/13590>
- Cañedo, V., Medina, T., Amanzo, J., & Álvarez, J. (2020). Línea de base de la diversidad de la calabaza y el zapallo peruano con fines de bioseguridad (1º Edición). Retrieved from [https://bioseguridad.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2021/03/ldb\\_calabaza\\_zapallo.pdf](https://bioseguridad.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2021/03/ldb_calabaza_zapallo.pdf)
- Castro, M., & Fassio, C. (2015). Innovación, desarrollo y transferencia de tecnología de plantines clonales de palto en Chile. En: Congreso mundial de la palta (Vol. 8, pp. 34-36).
- Chimonyo, V. G. P., & Modi, A.T. (2013). Seed Performance of Selected Bottle Gourd (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.). Journal of Experimental Agriculture International, 3(4): 740-766. <https://doi.org/10.9734/ajea/2013/4114>

- Dasari, R. & Shastree, T. (2015). Adventitious rooting and proliferation from differentiation explants of *Citrullus colocynthis* L. Schrad an endangered medicinally importance Cucurbit. Asian J. of Biotech. Vol 7 (2): 88-95
- Davies P. (1995). The plant hormones: Their nature, occurrence and function. En: Davis J. (Ed.) Plant Hormones, Biosynthesis, Signal Transduction, Action. Springer, Dordrecht, p. 1-15.
- Delgado-Paredes, G.E., Rojas-Idrogo, C. & Vásquez- Díaz, C. (2023) Protocol for *ex vitro* and *in vitro* micropropagation of *Cucurbita moschata* and *C. ecuadorensis*, native to Peru and Ecuador, of nutritional and medicinal importance. Scientia Agropecuaria 14 (1): 127 – 137.
- Devi, T., Rajasree, V., Premalakshmi, V., Hemaprabha, V., & Praneetha, S. (2017). *In vitro* protocol for direct organogenesis in *Momordica cymbalaria* Fenzl. International Journal of Current Microbiology and applied Sciences, 6(4): 2392-2402. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.279>
- Diallo, M. S., Ndiaye, A., Sagna, M., & Gassama-Dia, Y. K. (2008). Plants regeneration from African cowpea variety (*Vigna unguiculata* L. Walp.). African Journal of Biotechnology, 7(16): 2828-2833. Retrieved from <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59170>
- Dhumal, S.S., Naik, B. V. & Nimbalkar M. S. (2020) Advances in Tissue Culture of Cucurbits: A Review .International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences ISSN: 2319-7706 Vol 9 (8): 2887-2910.
- Espinoza, RG. 2013. Biotecnología Agrícola: Introducción a la Biotecnología Vegetal. Esp. 1º ed. BO. Universitaria. 68 p.
- Fajinmi, O.O., Olarewaju, O.O., Authur, G.D., Cooposamy, R.M. & Naidoo, K. (2022) A review of the relevance of bottle gourd in Eastern and Southern African traditional music, and social life, Journal of Medicinal Plants for Economic Development 6(1), a141. <https://doi.org/10.4102/jomped.v6i1.141>

- Gaikwad, A. V., Singh, S. K., & Gilhotra, R. (2017). Plant Tissue Culture: A Review. *SGVU Journal of Pharmaceutical Research & Education*, 2(2): 217-220. Retrieved from [https://www.gyanvihar.org/researchjournals/pharJournals/3.%20Asmita PlantTissueCulture.PDF](https://www.gyanvihar.org/researchjournals/pharJournals/3.%20Asmita%20PlantTissueCulture.PDF)
- Gálvez, C., & Murga, A. (2019). Cántaros de *Lagenaria siceraria*: Alternativas al uso de recipientes cerámicos en la navegación en la costa norte del Perú. *Revista Sociedades de Paisajes Áridos y Semi-Áridos*, 13(1): 10-31. Retrieved from <http://www2.hum.unrc.edu.ar/ojs/index.php/spas/article/view/993>
- Gnamien, Y., Zoro Bi, I., Kouadio, Y., Brostaux, Y. and Baudoin, J. (2013). Medium effects on micropropagation and genetic stability of *Citrullus lanatus* oleaginous type. *Agricultural Sciences*, 4: 32-44. Doi:10.4236/as.2012.47A005
- Goode W. J. & Hatt P. K. (1986). Métodos de la investigación social. Décima cuarta edición. Trilla ed. México. 236 p.
- Grimaldo-Juárez, O., Suárez-Hernández, A. M., Ceceña-Durán, C, & González-Mendoza, D. (2018). Diversidad morfológica de semilla y fruto de diez colectas mexicanas de *Lagenaria siceraria*. *Agronomía Mesoamericana*, vol. 29 (1) <https://doi.org/10.15517/ma.v29i1.28205>
- Gupta, N., Jain, V., Joseph, M. R., & Devi, S. (2020). A Review on Micropropagation Culture Method. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 8(1): 86-93. <https://doi.org/10.22270/ajprd.v8i1.653>
- Guzmán Hernández, E. A., Segura Cobos, D., and López Sánchez P. (2016). Plants present in Mexico with studies in metabolic syndrome. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(6): 95-103. <https://www.plantsjournal.com/archives/?year=2016&vol=4&issue=6&part=B&ArticleId=467>

- Han, J. S., Oh, D. G., Mol, I. G., Park, H. G., & Kim, C.K. (2004). Efficient plant regeneration from cotyledon explants of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* Standl.). *Plant Cell Reports*, 23(5): 291-296. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0846-3>
- Hasbullah, N. A., Lassim, M. M., Mazlan, M. A., Lood, S. Z., & Amin, M. A. M. (2017). Mass propagation of *Lagenaria siceraria* through *in vitro* culture. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, 4(1):92-95. <https://doi.org/10.18178/joaat.4.1.92-95>
- Himani, K. O. G., Mayuri, M.L.A. & Upul, R.A. (2023) Overview of *Cucurbit* spp. (pumpkin) and development of value-added products emphasizing its nutritional and chemical composition. *World Journal of advanced Research and Reviewers*, 18 (2): 1215-1226. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2023.18.2.0938>
- Husain, A., Sofi, S.A., Rafiq, S. (2017) Pumpkin, the functional and therapeutic ingredient: a review. *International Journal of food Science and Nutrition*. 10(10): 168-173
- Kapadia, C., Patel, N., Patel, N., & Ahmad. T. (2018). Optimization of culture medium for higher multiplication and efficient micropropagation of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb.). *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 6(3): 599-605. Doi: 10.18006/2018.6(3).599.605
- Kiramana, J.K. & Khasungu, D. (2017). First detailed morphological characterisation of qualitative traits of extensive naturalized pumpkin germoplasm in Kenya. *International Journal of Development and Sustainability*. 6(7): 500-525.
- Kofoed & White, in GBIF Secretariat (2023). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei>
- Kumar, N., & Reddy, M. P. (2011). *In vitro* plant propagation: A review. *Journal of Forest Science*, 27(2): 61-72. Retrieved from <http://www.koreascience.or.kr/article/JAKO201122350102027.pdf>



- Kumar, S., Singh, H., Pandey, V., & Singh, B. D. (2016). *In vitro* multiplication of pointed gourd (*Trichosanthes dioica*) through nodal explant culture, and testing the genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD markers. *Indian Journal of Biotechnology*, 15(4): 581-588. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/315696526\\_In\\_vitro\\_multiplication\\_of\\_pointed\\_gourd\\_Trichosanthes\\_dioica\\_through\\_nodal\\_explant\\_culture\\_and\\_testing\\_the\\_genetic\\_fidelity\\_of\\_micropropagated\\_plants\\_using\\_RAPD\\_markers](https://www.researchgate.net/publication/315696526_In_vitro_multiplication_of_pointed_gourd_Trichosanthes_dioica_through_nodal_explant_culture_and_testing_the_genetic_fidelity_of_micropropagated_plants_using_RAPD_markers)
- Kumar, V., Singh, N., & Dhiman, M. (2019). *In vitro* propagation from nodal and root segments in *Momordica charantia* (Bitter gourd). *International Journal of Research and Analytical Reviews*, 6(1): 1196-1204. Retrieved from <https://ijrar.org/papers/IJRAR19J1467.pdf>
- Levi, A., Thies, J., Ling, K. S., Simmons, A. M., Kousik, C., & Hassell, R. (2009). Genetic diversity among *Lagenaria siceraria* accessions containing resistance to root-knot nematodes, whiteflies, ZYMV or powdery mildew. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*, 7(3): 216-226. <https://doi.org/10.1017/S1479262109225354>
- Li, J., Zheng, H., Zhang, C., Han, K., Wang, S., Peng, J., Lu, Y., Zhao, J., Xu, P., Wu, X., Li, G., Chen, J., & Yan, F. ) Yan, F. (2016). Different virus-derived siRNAs profiles between leaves and fruits in cucumber green mottle mosaic virus-infected *Lagenaria siceraria* plants. *Frontiers in Microbiology*, 7(1797): 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01797>
- Li, Y., Wang, Y., Wu, X., Wang, J., Wu, X., Wang, B., Lu, Z. & Li, G. (2021). Novel Genomic Regions of Fusarium Wilt Resistance in Bottle Gourd (*Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl.) Discovered in Genome-Wide Association Study. *Frontiers in Plant Science*, 12(1): 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.650157>
- Margaret, S., Maheswari, U., Sivanandhan, A. V. & Selvaraj. (2014). Direct regeneration of multiple shoots from nodal explants of West Indian Gherkin (*Cucumis anguria* L.). *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, (6): 13876-13881.

- Minocha, S., Tiwari, A., Gandhi, S., Sharma, A., & Gupta, A. K. (2015). An Overview on *Lagenaria siceraria* (Bottle Gourd). Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research, 4(3): 4-10. Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Akhilesh-Tiwari-10/publication/349533902\\_Journal\\_of\\_Biomedical\\_and\\_Pharmaceutical\\_Research\\_AN\\_OVERVIEW\\_ON\\_LAGENARIA\\_SICERARIA\\_BOTTLE\\_GOURD/links/6081bb152fb9097c0c01d3cd/Journal-of-Biomedical-and-Pharmaceutical-Research-AN-OVERVIEW-ON-LAGENARIA-SICERARIA-BOTTLE-GOURD.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Akhilesh-Tiwari-10/publication/349533902_Journal_of_Biomedical_and_Pharmaceutical_Research_AN_OVERVIEW_ON_LAGENARIA_SICERARIA_BOTTLE_GOURD/links/6081bb152fb9097c0c01d3cd/Journal-of-Biomedical-and-Pharmaceutical-Research-AN-OVERVIEW-ON-LAGENARIA-SICERARIA-BOTTLE-GOURD.pdf)
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologie Plantarum 15: 473-497.
- Naitechede, L.H., Runo, S. & Nyende, A.B. (2022). *In vitro* rapid regeneration of Bitter Melon (*Momordica charantia* L.) using direct organogéneris in Kenia. Universal Journal of Agricultural Research 10 (5): 514 - 525
- Parvin, S., Kausar, M., Haque, E., Khalekuzzaman, B. & Islam, M. A. (2013). In-vitro propagation of muskmelon (*Cucumis melo* L.) from nodal segments, shoot tips and cotyledonary nodes. Rajshahi University Journal of Life & Earth and Agricultural Science, 41: 71-77.
- Powo (2022). Plants of the World Online.Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Retrieved 03 December 2022. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30000781-2#source-KB>
- Prusty, M., Samal, K. C., Sahu, G. S., Sahoo, T. R., Sahoo, L., & Seth, T. (2020). Indirect organogenesis and plant regeneration in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.), an important perennial vegetable. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 9(7): 2776-2784. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.907.327>

- Radice S. (2010) Morfogenesis *in vitro*. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II, Capítulo 2, Editores: Levitus, G, Echenique, V., Rubinstein, C, Hopp, E. y Mroginski, L. Ed. INTA. Argentina. Disponible en: <http://www.biblioteca.org.ar/libros/150404.pdf>
- Rajasekharan, P. E., Bhaskaran, S. J. K., Koshy, J. P., Antony, V. T. 2012. In-vitro multiplication and conservation of wild *Momordica sahyadrica*. IUP Journal of Biotechnology, 7: 50-56.
- Roopan, S. M., Devi Rajeswari, V., Kalpana, V. N., & Elango, G. (2016). Biotechnology and pharmacological evaluation of Indian vegetable crop *Lagenaria siceraria*: an overview. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(3): 1153-1162. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7190-0>
- Ríos Acuña, S. (2019). Artesanías del Perú: Historia, Tradición e Innovación. ISBN N° 978-612-45764-6-1. Ministerio de Comercio Exterior y Turismo – MINCETUR. 1:11-39. <https://www.mincetur.gob.pe/wpcontent/uploads/documentos/turismo/publicaciones/artesania/2019/Artesania-del-Peru-Historia.pdf>
- Ruiz, J.L., Vilalobos, A., Cetzal, W., Lopez, M., B., Rangel, M., A. & García, J.A. (2020) Análisis proximal de accesiones de calabaza chihua en la península de Yucatán. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 11(8): XX-XX.
- Saha, S., Behera, T., Munshi, A., Singh, S., & Saha, T. (2016). Novel strategy for maintenance and mass multiplication of gynoeceous line in bitter melon through micropropagation. Indian Journal of Horticulture, 73(2): 208-212. <https://doi.org/10.5958/0974-0112.2016.00049.9>
- Salazar, R. (2023) Mate burilado y etno-narrativa del conflicto armado interno en los Andes: presencia militar y subversiva en la comunidad de Cochas. Sílex Vol. 13 (1): 132-162
- Saurabh, S., Prasad, D., & Vidyarthi, A. S. (2017). In vitro propagation of *Trichosanthes dioica* Roxb. for nutritional security. Journal of Crop Science and Biotechnology, 20(2): 81-87. <https://doi.org/10.1007/s12892-016-0059-0>

- Shah, B. N., Seth, A. K., & Desai, R. V. (2010). Phytopharmacological profile of *Lagenaria siceraria*: A Review. Asian Journal of Plant Sciences, 9(3): 152-157. <https://doi.org/10.3923/ajps.2010.152.157>
- Suárez-Hernández, A. M., Grimaldo-Juárez, O. García-López, A. M., Gonzáles-Mendoza, D. & Huirón-Ramírez, M.V. (2017). Influencia del portainjerto en la calidad poscosecha de sandía. Revista Chapingo. Serie horticultura, 23 (1): 50-58 <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.06.019>
- Tariq, A., Afrasiab, H., & Farhat, F. (2020). *In vitro* micropropagation of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad: an endangered medicinal plant. Advancements in Life Sciences, 8(1): 52–56. Retrieved from <https://submission.als-journal.com/index.php/ALS/article/viewFile/841/478>
- Teppner, H. (2004). Notes on *Lagenaria* and *Cucurbita* (Cucurbitaceae) - Review and new contributions. Phytion (Horn.) 44: 245-308. Retrieved from [https://www.zobodat.at/pdf/PHY\\_44\\_2\\_0245-0308.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/PHY_44_2_0245-0308.pdf)
- Teixeira da Silva, J.A. (2020): Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues.Volumes I-IV. Biologia Plantarum. 51: 390-390. 10.1007/s10535-007-0083-z. Without Abstract.
- Umoh, O. T. & Emmanuel, M. (2021) Morphology and distribution of species of the family Cucurbitaceae in Akwa Ibom State, Nigeria. Phytotaxa 508 (2): 107-128. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.508.2.1>
- Upaganlawar, A., & Balaraman, R. (2009). Bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) “A vegetable food human health” - A Comprehensive Review. Pharmacologyonline, 1(1): 209-226. Retrieved from <https://pharmacologyonline.silae.it/files/newsletter/2009/vol1/028.Aman.pdf>
- Verma, A. K., Kumar, M., Tarafdar, S., Singh, R., & Takur, S. (2014). Development of protocol for micropropagation of Gynoecious Bitter Gourd (*Momordica Charantia* L). International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences, 4: 275-280.

## IX. ANEXO

### Propagación, morfogénesis y conservación in vitro de "calabazo" *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.

#### INFORME DE ORIGINALIDAD

12%	11%	4%	4%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

#### FUENTES PRIMARIAS

1	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	1%
2	<b>www.researchgate.net</b> Fuente de Internet	1%
3	<b>repositorio.utn.edu.ec</b> Fuente de Internet	1%
4	<b>www.scielo.sa.cr</b> Fuente de Internet	<1%
5	<b>doaj.org</b> Fuente de Internet	<1%
6	<b>www.coursehero.com</b> Fuente de Internet	<1%
7	<b>Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS</b> Trabajo del estudiante	<1%
8	<b>backup.chapingo-cori.mx</b> Fuente de Internet	<1%
9	<b>mundoagropecuario.com</b> Fuente de Internet	



Dr. Guillermo Eduardo Delgado Paredes

ASESOR

## CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Yo, Guillermo Eduardo Delgado Paredes, Asesor de tesis de la bachiller Liliana Ofelia Delgado Alache titulada: Propagación, morfogénesis y conservación *in vitro* de “calabazo” *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. Luego de la revisión exhaustiva del documento constato que la misma tiene un índice de similitud de 12% verificable en el reporte de similitud de programa Turnitin.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque 17 de octubre del 2024



Guillermo E. Delgado Paredes

DNI 16452609

Asesor





**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN N° 046-2024-FCCBB-UI**

Siendo las 9:00 horas del día 24 de setiembre de 2024, se reunieron los miembros del jurado evaluador de la tesis titulada: **Propagación, morfogénesis y conservación *in vitro* de "calabazo" *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl**, con la finalidad de evaluar y calificar la sustentación de la tesis antes mencionada, conformada por los siguientes docentes:

Dra. Consuelo Rojas Idrogo  
MSc. Josefa Ecurra Puicón  
Dr. Jorge Víctor Wilfredo Cachay Wester  
Dr. Guillermo Eduardo Delgado Paredes

Presidenta  
Secretaria  
Vocal  
Asesor

Acto de sustentación fue autorizado por Resolución N° 297-2024-FCCBB/D, de fecha 18 de setiembre de 2024.

La Tesis presentada y sustentada por la Bachiller **LILIANA OFELIA DELGADO ALACHE** tuvo una duración de 30 minutos. Después de la sustentación y absueltas las preguntas y observaciones de los miembros del jurado; se procedió a la calificación respectiva, otorgándole el calificativo de (MUY BUENO) (18.5) en la escala vigesimal.

Por lo que la Bachiller **LILIANA OFELIA DELGADO ALACHE** queda **APTA** para obtener el título profesional de Licenciada en Biología – Botánica de acuerdo con la Ley Universitaria 30220 y la normatividad vigente de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Siendo las 10:20 se dio por concluido el presente acto académico, dándose conformidad al presente acto, con la firma de los miembros del jurado.

Firman:

Dra. Consuelo Rojas Idrogo  
Presidenta

MSc. Josefa Ecurra Puicón  
Secretaria

Dr. Jorge Víctor Wilfredo Cachay Wester  
Vocal

Dr. Guillermo Eduardo Delgado Paredes  
Asesor