

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE
DIOS
FACULTAD DE INGENIERÍA
CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL
Y MEDIO AMBIENTE



TESIS

“Efecto de las citoquininas en la multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* Bonpl.”

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO FORESTAL Y
MEDIO AMBIENTE:

AUTOR:

Bachiller: MOGROVEJO MONTESINOS,
Wilson Omar

ASESOR: Ph. D.: PEÑA VALDEIGLESIAS, Joel

CO-ASESOR: Dr. ROMÁN DAÑOBEYTIA,
Francisco

CO-ASESOR: MS: ROBLES CUEVA, Henry

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE
DIOS
FACULTAD DE INGENIERÍA
CARRERA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL
Y MEDIO AMBIENTE



TESIS

“Efecto de las citoquininas en la multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* Bonpl.”

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO FORESTAL Y
MEDIO AMBIENTE:

AUTOR:

Bachiller: MOGROVEJO MONTESINOS,
Wilson Omar

ASESOR: Ph. D.: PEÑA VALDEIGLESIAS, Joel

CO-ASESOR: Dr. ROMÁN DAÑOBEYTIA,
Francisco

CO-ASESOR: MS: ROBLES CUEVA, Henry

Dedicatoria

Dedico este trabajo de investigación a mis padres, quienes me han brindado su amor incondicional, apoyo constante y sabios consejos a lo largo de mi formación. A mi familia y amigos, por su aliento y comprensión durante esta travesía académica. A mis profesores y mentores, cuya guía y conocimiento han sido una fuente inagotable de inspiración. A todos aquellos que creyeron en mí y me motivaron a alcanzar este logro. Esta tesis es un tributo a todos ustedes, por formar parte de mi camino hacia el conocimiento y el crecimiento personal.

Agradecimiento

- Agradezco sinceramente la oportunidad de aprender y crecer en este entorno de trabajo/estudio de la carrera profesional de Ingeniería Forestal y Medio Ambiente.
- Expreso mi sincero agradecimiento a mis asesores Ph. D. Joel Peña Valdeiglesias y Ms. Blgo Henry Robles Cueva, así como una consideración especial y profunda gratitud al Ing. Nelson Meléndez por su valiosa orientación y apoyo a lo largo del proceso de elaboración y ejecución de esta tesis. También, quiero reconocer la colaboración del Tec. Olegario Robles Cueva y el personal del laboratorio de micropropagación vegetal, quienes brindaron un apoyo invaluable durante la realización de este trabajo de investigación.
- Agradezco profundamente al CITE Productivo Madre de Dios, CINCIA, WWF Perú y RONAP por su generosidad al permitirme llevar a cabo mi tesis en sus respetables instituciones. Sus facilidades y apoyo fueron fundamentales para la realización de este trabajo de investigación.
- Deseo manifestar mi profundo agradecimiento a mis amigos Jose Rafael y Karina Salas, cuya amistad ha sido fundamental en mi desarrollo profesional. Su apoyo y tiempo dedicado han contribuido significativamente a mi crecimiento, y hoy en día, compartimos el mérito de alcanzar una nueva meta en nuestra carrera profesional.

TURNITIN_WILSON MOGROVEJO MONTESINOS

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%

INDICE DE SIMILITUD

14%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|---|--|-----|
| 1 | repositorio.unas.edu.pe Fuente de Internet | 2% |
| 2 | Submitted to University of Rajshahi Trabajo del estudiante | 1% |
| 3 | repositorio.unamad.edu.pe Fuente de Internet | 1% |
| 4 | repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet | 1% |
| 5 | repositorio.uaaan.mx Fuente de Internet | 1% |
| 6 | docplayer.es Fuente de Internet | 1% |
| 7 | repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet | 1% |
| 8 | www.scielo.sa.cr Fuente de Internet | <1% |
| 9 | proyctofortalecimientodelsinacti.prociencia.gob.pe Fuente de Internet | <1% |

Presentación

La investigación se llevó a cabo como parte del subproyecto titulado "Micropropagación vegetal a partir de yemas terminales de árboles productivos de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) para la recuperación, conservación y aprovechamiento sostenible de sus bosques". Este subproyecto surgió debido a la falta de regeneración natural en los bosques de árboles de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), lo que amenaza la producción de nueces a largo plazo y afecta negativamente al sistema socioeconómico.

La intención fundamental fue determinar cómo las citoquininas afectan la multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* a partir de yemas terminales. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con dos factores: el efecto de los reguladores de crecimiento (citoquininas) y los niveles de concentración de citoquininas. El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de micropropagación vegetal ubicado en las instalaciones del CITE Productivo Madre de Dios.

Además, esta investigación se desarrolló en colaboración con diversas instituciones asociadas al proyecto: Centro de Innovación Científica Amazónica (CIN CIA), el Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), Word Wildlife Fund (WWF) y Recolectores Orgánicos de la Nuez Amazónica del Perú (RONAP).

El objetivo principal de esta investigación es lograr la propagación asexual de (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) mediante técnicas de cultivo de tejidos, lo que contribuirá a la recuperación, conservación y uso sostenible de los bosques de castaña.

Resumen

La castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) es una especie forestal no maderable de gran importancia socioeconómica en la Amazonia de Sudamérica debido a sus beneficios económicos, culturales y nutricionales, especialmente para las poblaciones locales que dependen de su comercialización (MINAM 2014). La explotación y un inadecuado método de aprovechamiento de la especie ha originado un riesgo en la regeneración natural (Reaño 2018). El cultivo *in vitro* se presenta como una técnica que podría mitigar este problema al generar plantas con una elevada estabilidad genética. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de las citoquininas en la multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* a partir de yemas terminales provenientes de plántulas de invernadero, en la etapa de establecimiento se empleó NaClO al 2,5% durante 10 minutos, logrando una reducción del 58,6% en la contaminación. Los explantes viables fueron trasladados a un medio de cultivo de multiplicación, donde se evaluaron los efectos de BAP y KIN en diferentes concentraciones (0,5; 1,5 y 3,5 mg/L). Los resultados indicaron que el uso de 1,5mg /L de BAP promovió la producción de un promedio de 2,21 hojas por explante, mientras que la aplicación de 3,5 mg/L de KIN condujo a la formación de 2,76 nudos por explante y una altura de 2,12 cm en promedio al utilizar 1,5 mg/L de KIN. El regulador de crecimiento BAP influyó en la generación de brotes, mientras que el regulador de crecimiento KIN permitió la generación nudos y altura de los explantes. Finalmente, la presente investigación constituye un instrumento crucial en la propagación vegetativa.

Palabras claves: Micropropagación, citoquininas, asepsia.

Abstract

Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) is a non-timber forest species of great socio-economic importance in the South American Amazon due to its economic, cultural and nutritional benefits, especially for local populations that depend on its commercialisation (MINAM 2014). Exploitation and an inadequate method of harvesting the species has led to a risk to natural regeneration (Reaño 2018). In vitro cultivation is presented as a technique that could mitigate this problem by generating plants with high genetic stability. The aim of this research was to determine the effect of cytokinins on the in vitro multiplication of *Bertholletia excelsa* from terminal buds from greenhouse seedlings. In the establishment stage, 2.5% NaClO was used for 10 minutes, achieving a 58.6% reduction in contamination. Viable explants were transferred to a multiplication culture medium, where the effects of BAP and KIN at different concentrations (0.5, 1.5 and 3.5 mg/L) were evaluated. The results indicated that the use of 1.5 mg/L BAP promoted the production of an average of 2.21 leaves per explant, while the application of 3.5 mg/L KIN led to the formation of 2.76 nodes per explant and a height of 2.12 cm on average when using 1.5 mg/L KIN. The growth regulator BAP influenced shoot generation, while the growth regulator KIN allowed the generation of nodes and explant height. Finally, the present research constitutes a crucial tool in vegetative propagation.

Keywords: Micropropagation, cytokinins, asepsis.

Introducción

La castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) especie forestal perteneciente a la familia botánica Lecythidaceae, es de importancia socio económica del extractivismo en la amazonia de Sudamérica, Ofrecen beneficios económicos, culturales y nutricionales de gran relevancia, especialmente para las comunidades locales que tienen su sustento vinculado al bosque y a diversas regiones amazónicas por la comercialización de sus semillas (nuez-almendra) a los mercados nacionales e internacionales (Guariguata y Rockwell 2015). Se encuentra ubicado en el departamento de Madre de Dios, donde se encuentran árboles de *Bertholletia excelsa* Bonpl. en densidades suficientes; permitiendo la explotación económica de su nuez. Los bosques naturales ocupan aproximadamente 2 638 163 ha, que representan alrededor del 30% de la superficie total (MINAM 2014).

Bertholletia excelsa Bonpl. está catalogado como especie vulnerable a extinción, a través de la Resolución Ministerial N° 00729-81-AG-DGFF (OSINFOR 2018), debido a la intensidad de colecta de los frutos, poniendo en grave peligro la regeneración natural por la sobreexplotación y deforestación a las especies asociadas fitosociológicamente a la *Bertholletia excelsa* Bonpl., reduciendo su rango geográfico de distribución (Reaño 2018).

A efectos de los problemas que se vienen suscitando, se vienen desarrollando estudios de propagación vegetativa en *Bertholletia excelsa* Bonpl., a través de semillas e injertos, lo cual no es rentable, debido a que las semillas son dificultosas de germinar y demanda mucho tiempo el proceso. Seguidamente en campo, son fácilmente atacadas por roedores, generando un costo altamente significativo en las labores de mantenimiento y protección de las áreas reforestadas o enriquecidas con *Bertholletia excelsa* Bonpl. (MINAM 2014).

Es por ello, que en la actualidad se vienen empleando, otras alternativas para el mejoramiento de su producción, entre las cuales tenemos: El uso de técnicas de cultivo *in vitro*, que es una alternativa prometedora para la micropropagación vegetativa, permitiendo la producción masiva de plántulas

libres de enfermedades en el menor tiempo. Por ello, es necesario la utilización de reguladores de crecimiento citoquininas, que permiten la generación de múltiples brotes en los explantes *in vitro*, con una producción masiva y de bajo costo en espacios pequeños.

En este contexto, la investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de las citoquininas en la multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* Bonpl., a partir de yemas terminales. Con la intención de contribuir al proceso de la micropropagación vegetal para esta especie.

Índice

| | |
|--|----|
| Presentación | |
| Introducción | |
| CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 6 |
| 1.1. Descripción del problema | 6 |
| 1.2. Formulación del problema | 8 |
| 1.3. Objetivos..... | 8 |
| 1.3.1. Objetivo general | 8 |
| 1.3.2. Objetivo específico | 8 |
| 1.4. Variables..... | 8 |
| 1.4.1. Variables independientes | 8 |
| 1.4.2. Variable dependiente | 8 |
| 1.5. Operacionalización de variables | 8 |
| 1.6. Hipótesis | 9 |
| 1.7. Justificación | 10 |
| 1.8. Consideraciones éticas..... | 11 |
| 1.8.1. Autorización para el proceso de investigación | 11 |
| 1.8.2. Conducta responsable de investigación..... | 12 |
| CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO | 13 |
| 2.1. Antecedentes de estudio | 13 |
| 2.1.1. Antecedentes internacionales | 13 |
| 2.1.2. Antecedentes nacionales | 14 |
| 2.1.3. Antecedentes locales | 15 |
| 2.2. Modelo teórico (si corresponde) | 15 |
| 2.3. Bases teóricas | 16 |
| 2.3.1. Descripción taxonómica | 16 |
| 2.3.2. Distribución geográfica..... | 16 |
| 2.3.3. Ecología | 16 |
| 2.3.4. Fisiología..... | 17 |
| 2.3.5. Descripción botánica..... | 17 |
| 2.3.6. Métodos de propagación..... | 18 |
| 2.3.7. Cultivo de células y tejido vegetales..... | 19 |
| 2.3.8. Micropropagación..... | 19 |

| | |
|---|----|
| 2.3.9. Etapas de la micropropagación..... | 20 |
| 2.3.10. Medio de cultivo | 21 |
| 2.3.11. Reguladores de crecimiento vegetal | 22 |
| 2.3.12. Mecanismo de acción de los reguladores de crecimiento | 23 |
| 2.3.13. Condiciones ambientales de cultivo | 23 |
| 2.4. Definición de términos | 24 |
| CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN | 25 |
| 3.1. Ubicación del estudio..... | 25 |
| 3.2. Tipo de estudio | 26 |
| 3.3. Diseño del estudio | 26 |
| 3.4. Población y muestra | 28 |
| 3.4.1. Población | 28 |
| 3.4.2. Muestra | 29 |
| 3.5. Métodos y técnicas | 29 |
| 3.5.1. Fase de invernadero | 29 |
| 3.5.2. Fase de laboratorio | 30 |
| 3.6. Tratamiento de los datos | 32 |
| 3.7. Análisis de datos..... | 33 |
| CAPITULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN | 34 |
| 4.1. Validación del protocolo de desinfección..... | 34 |
| 4.1.1. Porcentaje de asepsia en la etapa de establecimiento | 34 |
| 4.1.2. Supervivencia de explantes en la etapa de establecimiento ... | 36 |
| 4.1.3. Porcentaje de asepsia en la etapa de multiplicación..... | 37 |
| 4.1.4. Supervivencia de explantes en la etapa de multiplicación | 39 |
| 4.2. Efecto del regulador de crecimiento bencilaminopurina | 40 |
| 4.2.1. Número de hojas | 40 |
| 4.2.2. Número de nudos..... | 42 |
| 4.2.3. Altura de explantes de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl..... | 43 |
| 4.3. Efecto del regulador de crecimiento kinetina | 45 |
| 4.3.1. Número de hojas | 45 |
| 4.3.2. Número de nudos..... | 46 |
| 4.3.3. Altura de explantes de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl..... | 48 |
| 4.4. Efecto de la interacción de los reguladores de crecimiento | 49 |
| 4.4.1. Número de hojas | 49 |

| | |
|--|----|
| 4.4.2. Número de nudos..... | 53 |
| 4.4.3. Altura de explantes de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl..... | 55 |
| 4.4.4. Fenolización de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. | 57 |
| 4.4.5. Necrosis de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. | 59 |
| 4.4.6. Defoliación de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. | 61 |
| 4.4.7. Callo en <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. | 62 |
| CONCLUSIONES | 63 |
| SUGERENCIAS..... | 64 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 65 |
| ANEXOS..... | 70 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mapa de ubicación del laboratorio de micropropagación vegetal CITEproductivo Madre de Dios | 25 |
| Figura 2. Flujograma del proceso de micropropagación vegetativa..... | 32 |
| Figura 3. Porcentaje de explantes asépticos de <i>Bertholletia excelsa</i> aplicando hipoclorito de sodio..... | 34 |
| Figura 4. Estado aséptico de los explantes | 36 |
| Figura 5. Porcentaje de supervivencia a condiciones in vitro de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl..... | 36 |
| Figura 6. Porcentaje de asepsia de <i>Bertholletia excelsa</i> en la etapa de multiplicación | 38 |
| Figura 7. Porcentaje de supervivencia de <i>Bertholletia excelsa</i> para la etapa multiplicación | 39 |
| Figura 8. Promedio de número de hojas..... | 41 |
| Figura 9. Promedio de número de nudos por tratamiento..... | 42 |
| Figura 10. Promedio de altura por tratamiento de los explantes de castaña | 44 |
| Figura 11. Promedio de número de hojas..... | 45 |
| Figura 12. Promedio de número de nudos por tratamiento..... | 47 |
| Figura 13. Promedio de altura por tratamiento de los explantes de castaña | 48 |
| Figura 14. Promedio de número de hojas respecto a los reguladores de crecimiento | 52 |
| Figura 15. Curva de crecimiento de hojas | 52 |
| Figura 16. Promedio de número de nudos con respecto a los reguladores de crecimiento | 54 |
| Figura 17. Curva de crecimiento para nudos | 55 |
| Figura 18. Curva de crecimiento de altura de los explantes de <i>Bertholletia excelsa</i> | 56 |
| Figura 19. Porcentaje de explantes fenolizados | 58 |
| Figura 20. Porcentaje de explante necrosados de <i>Bertholletia excelsa</i> | 59 |
| Figura 21. Porcentaje de explantes con presencia de defoliación de <i>Bertholletia excelsa</i> | 61 |
| Figura 22. Porcentaje de presencia de callo en explantes de <i>Bertholletia excelsa</i> | 62 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Descripción del proceso de operacionalización de variables | 9 |
| Tabla 2. Condiciones ecológicas | 17 |
| Tabla 3. Ubicación política | 26 |
| Tabla 4. Descripción de los tratamientos | 27 |
| Tabla 5. Distribución de las unidades experimentales respecto a los tratamientos | 28 |
| Tabla 6. Promedio de número de hojas por tratamiento | 40 |
| Tabla 7. Análisis de varianza para número de hojas de <i>Bertholletia excelsa</i> | 41 |
| Tabla 8. Promedio de número de nudos por tratamiento | 42 |
| Tabla 9. Análisis de varianza para número de nudos de <i>Bertholletia excelsa</i> | 43 |
| Tabla 10. Promedio de altura por tratamiento de <i>Bertholletia excelsa</i> | 43 |
| Tabla 11. Análisis de varianza para altura de los explantes de <i>Bertholletia excelsa</i> | 44 |
| Tabla 12. Promedio de número de hojas por tratamiento | 45 |
| Tabla 13. Análisis de varianza para número de hojas de <i>Bertholletia excelsa</i> | 46 |
| Tabla 14. Promedio de número de nudos por tratamiento | 46 |
| Tabla 15. Análisis de varianza para número de nudos de <i>Bertholletia excelsa</i> | 47 |
| Tabla 16. Promedio de altura por tratamiento de <i>Bertholletia excelsa</i> | 48 |
| Tabla 17. Análisis de varianza para altura de los explantes de <i>Bertholletia excelsa</i> | 49 |
| Tabla 18. Promedio de número de hojas por tratamiento | 49 |
| Tabla 19. Análisis de varianza para número de hojas de <i>Bertholletia excelsa</i> | 50 |
| Tabla 20. Pruebas de comparación de medias (tukey) para los tratamientos con respecto al número de hojas | 51 |
| Tabla 21. Promedio de número de nudos por tratamiento | 53 |
| Tabla 22. Análisis de varianza para número de nudos de <i>Bertholletia excelsa</i> | 53 |
| Tabla 23. Prueba de comparación de medias (tukey) para los tratamientos con respecto al número de nudos..... | 54 |
| Tabla 24. Promedio de altura por tratamiento de <i>Bertholletia excelsa</i> | 55 |
| Tabla 25. Análisis de varianza para altura de los explantes de <i>Bertholletia excelsa</i> | 56 |
| Tabla 26. Composición del medio de cultivo para establecimiento..... | 79 |
| Tabla 27. Composición de medios de cultivo para multiplicación. | 79 |

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Descripción del problema

Bertholletia excelsa es la especie bandera de la región Madre de Dios. Estos bosques abarcan una superficie de 2,638,163 hectáreas, lo que equivale al 30% del territorio del departamento (MINAM 2014). El valor económico de la *Bertholletia excelsa* está respaldada por sus niveles de exportación, según ADEX en el 2019, sumó más de US\$ 66 millones 326 mil al término del año 2017 y creció en un 41% más. La producción castañera es fundamental para el bienestar económico de la región, alrededor de 15 mil a 20 mil personas están conectadas a la extracción de este recurso, lo que representa el 22% de la población total del departamento (ADEX 2019).

Dada la importancia de la actividad castañera en Madre de Dios, es necesario sistematizar las experiencias exitosas en investigación, ya que, enfrentan una considerable presión debido al impacto negativo de la deforestación (tala ilegal, cambio de uso de suelo, agricultura migratoria, ganadería extensiva, etc.) y de las actividades antropogénicas que se expanden a un ritmo vertiginoso. La conservación de la cadena ecológica es vulnerable, y esta fragilidad se acentúa con estudios recientes y declaraciones de castañeros locales que señalan una notable falta de regeneración natural de los árboles de castaña, lo que pone en riesgo la producción de nuez en el tiempo (Reaño 2018).

En vista de los problemas de regeneración natural en las últimas décadas, hubo diversas iniciativas para enriquecer los bosques con árboles de *Bertholletia excelsa* por parte de castañeros y proyectos de reforestación. Sin embargo, el costo de mantenimiento es muy alto y el índice de crecimiento de la plántula es baja por la presencia de plagas en el bosque.

Por otro lado, sembrar plantones de *Bertholletia excelsa* una vez que la nuez haya sido absorbida dentro del tallo, tiene poca atracción por los animales herbívoros, para llegar a campo definitivo tarda entre 12 a 14 meses, sumando a esto el material vegetal no tiene la característica productiva, es decir, no tiene la genética que desea un productor, ya sea en cuanto a su producción y/o resistencia a plagas y tipos de suelo.

En otras palabras, los árboles longevos no están siendo sustituidos por nuevos individuos de la misma especie, para garantizar la estabilidad de los bosques productivos de *Bertholletia excelsa* poniendo en riesgo a la especie y por consiguiente a la producción y el aspecto económico de los habitantes de la región (Reaño 2018).

Uno de los aspectos que restringe es la producción de plántulas de *Bertholletia excelsa* por su propagación vegetativa convencional, debido al comportamiento recalcitrante, lenta e irregular germinación (Castro, Alves y De Assis 2016), como causa de ello se puede agregar muchos factores, haciéndose necesario investigarse para buscar diferentes alternativas de propagación vegetativa y su repoblamiento.

Es por ello que la micropropagación vegetativa a condiciones *in vitro*, es una de las técnicas que hace posible la reproducción del material vegetal de forma rápida y libre de patógenos, a su vez, garantiza la procedencia de los explantes (Castillo 2020). Sin embargo, la *Bertholletia excelsa* carece de información local respecto a su micropropagación, lo que amerita una investigación para las fases de la micropropagación tales como el establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación para lograr plantones endurecidos a condiciones ambientales. Cabe recalcar que dicha investigación, sentará las bases para futuras investigaciones en el proceso de la micropropagación vegetal de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

1.2. Formulación del problema

¿Es posible que las citoquininas puedan permitir la multiplicación vegetativa *in vitro* de *Bertholletia excelsa* a partir de yemas terminales?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Determinar el efecto de las Citoquininas en la multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* a partir de yemas terminales.

1.3.2. Objetivo específico

- Validar el protocolo de desinfección aplicado a los explantes de *Bertholletia excelsa*
- Evaluar el efecto de la Bencilaminopurina (BAP) en la multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* Bonpl.
- Evaluar el efecto de la Kinetina (KIN) en la multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* Bonpl.
- Evaluar el efecto de la interacción de los reguladores de crecimientos en la multiplicación *in vitro*

1.4. Variables

1.4.1. Variables independientes

- Niveles de concentración de reguladores de crecimiento
- Tipo de regulador de crecimiento (BAP y KIN)

1.4.2. Variable dependiente

- Explantes establecidos a condiciones *in vitro*

1.5. Operacionalización de variables

En la Tabla 1 se muestra las variables de medición del desarrollo experimental de la presente investigación

Tabla 1. Descripción del proceso de operacionalización de variables

| Definición conceptual | Definición operacional | Dimensiones | Indicadores |
|-----------------------|----------------------------------|---------------------|-------------|
| Independiente | Niveles de concentración | 0,5 mg/L | mg/L |
| | | 1,5 mg/L | mg/L |
| | | 3,5 mg/L | mg/L |
| | Tipo de regulador de crecimiento | BAP | mg/L |
| | | KIN | mg/L |
| Dependiente | Características cuantitativas | contaminación | % |
| | | supervivencia | % |
| | | Altura del explante | cm |
| | | Número de hojas | Nº |
| | | Número de nudos | Nº |
| | | Fenolización | % |
| | | Necrosis | % |
| | | Defoliación | % |
| | Callo | % | |
| | Características cualitativas | Viabilidad | niveles |

1.6. Hipótesis

- Ha: Existe diferencias significativas en desarrollo del explante aplicando citoquininas para la multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* que permitirá la reproducción del material vegetal de forma rápida.

- H0: No existe diferencias significativas en desarrollo del explante aplicando citoquininas para la multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* lo que generará una ausencia de reproducción vegetativa.

1.7. Justificación

Bertholletia excelsa es una especie forestal más trascendentales del extractivismo y la sustentabilidad de los bosques amazónicos en Perú, Bolivia y Brasil. Pues esta especie es importante en la estrategia de conservación porque es menos destructiva en el aprovechamiento, siendo muy apreciada por la nuez y su alto valor económico; asimismo, constituye casi la única fuente de sustento de los habitantes locales durante las épocas de lluvias (Corvera 2014).

En los últimos años los recursos forestales no maderables, vienen enfrentando amenazas, debido a la extracción ilegal y el mal uso que se está dando a las concesiones castañeras, como consecuencia se observa la falta de regeneración natural. Valera y Yucra (2017) señalan que la falta de regeneración natural es por la susceptibilidad a la endogamia, y la sobreexplotación de la nuez amazónica, olvidando dejar semillas para la regeneración natural, recolectando los cocos de castaña por totalidad con el fin de obtener mayor ingreso económico, otro factor que impide su regeneración.

En vista a los problemas que están aconteciendo, se convierte en una opción el uso de herramientas biotecnológicas. Como es el caso del cultivo de tejidos *in vitro*. Debido a la producción masiva de plántulas de genotipo élite en un corto periodo de tiempo, es una herramienta útil para la multiplicación *in vitro*. Un método de cultivo de tejido exitoso significaría una alternativa de propagación vegetativa y ayudaría en la masificación de individuos clonales con características genéticas deseadas, tales como: clones resistentes a enfermedades e insectos (Rodriguez 2018).

Estas técnicas de cultivo de tejido serán empleadas para desarrollar la micropropagación vegetativa de *Bertholletia excelsa* y a su vez, la multiplicación masiva a condiciones *in vitro* de esta y otras especies

forestales, con la finalidad de repoblamiento de áreas que sufrieron desbosque. Es así que tiene como objetivo “Determinar el efecto de los reguladores de crecimiento para la multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* a partir de yemas terminales”.

Bajo este contexto, los estudios de cultivo de tejido para la *Bertholletia excelsa* son escasos para la fase multiplicación *in vitro*, por ello, es necesario realizar una investigación que asegure su propagación asexual sostenible; bajo las metodologías de micropropagación a nivel de laboratorio.

1.8. Consideraciones éticas

1.8.1. Autorización para el proceso de investigación

En la constitución política del Perú, el artículo 66 establece que los RRNN, tanto renovables como no renovables, son propiedad nacional y que el estado tiene la autoridad exclusiva sobre su uso.

El artículo 67 promueve el uso sostenible de los recursos naturales. Además, de conformidad con el artículo 1 de la Ley Silvestre Forestal y de Fauna - Ley N° 29763, toda persona tiene derecho a acceder y utilizar el patrimonio forestal y faunístico según lo establezcan las autoridades nacionales y regionales. Con el fin de preservar el patrimonio y sus componentes, respetando la legislación.

Cabe señalar que el artículo 137 declara de interés nacional la investigación, desarrollo tecnológico, mejoramiento del conocimiento y el seguimiento de la conservación de los bosques y la vida silvestre.

Además, el artículo 140 establece que la autorización es otorgada por la autoridad regional forestal y de vida silvestre con fines de investigación científica.

Es por ello, que el presente trabajo de investigación, cuenta con una autorización de investigación concedida por la Dirección Forestal y Fauna Silvestre – DRFFS, mediante la Resolución Directoral Regional N° 396-2019-GOREMAD-GRRNYGMA-DRFFS, en fecha 20 de junio del 2019, con la

finalidad de cumplir con la normativa que exige el estado para desarrollo de la investigación.

1.8.2. Conducta responsable de investigación

Dentro del marco de los principios y valores que garantizan la integridad en la investigación, la Resolución de Presidencia N° 198-2017-CONCYTEC-P. Este reglamento tiene como propósito principal asegurar que los investigadores actúen de acuerdo a los principios y valores de la ciencia en todas las etapas de sus investigaciones, incluyendo la propuesta, desarrollo, evaluación y reporte de las mismas. Esto contribuye a que la investigación se lleve a cabo de manera honesta, precisa, creíble y exacta (Carrasco 2017: 30).

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de estudio

2.1.1. Antecedentes internacionales

Alonso et al. (2020), utilizaron la técnica de propagación *in vitro* para *Persea americana*, logrando disminuir la contaminación en un 57,8% aplicando una solución de NaClO al 3% con 3 gotas de Tween 20, seguidamente en una solución estéril de 400mg/L de PVP (polivinilpirrolidona), el medio de cultivo para el establecimiento se obtuvo 39% al aplicar MS al 50%. Por otra parte, la oxidación de los explantes se obtuvo un 7,31% al aplicar ácido ascórbico y ácido cítrico.

Indacochea et al. (2018), obtuvieron explantes viables a partir de segmentos nodales provenientes de plantones, al tratar con el desinfectante Povidyn® por 20 minutos + 15% NaClO + 2 gotas Tween por 5 minutos + 0,5% HgCl₂ por 5 minutos, en un 90%, 87% y 88% en las especies *M. balsamum*, *T. crhysantha* y *T. billbergii*. Asimismo, obtuvieron la mayor cantidad de brotes 80%, 82% y 87% en las especies indicadas, utilizando como medio de cultivo MS suplementado con 2 mg/L BAP + 1 mg/L ANA.

Por otro lado, Delgado y Hoyos (2016), utilizaron explantes provenientes de semillas de la especie *Aniba perutilis*, tratado con el desinfectante NaOCl por 15 min, logrando 60% de supervivencia. Del mismo modo el medio WPM, al que se añadieron 3 mg/L de BAP y 1,5 mg/L de AG3, condujo a la formación de un promedio del 60% de brotes.

Asimismo, Haygert- Lencina et al. (2017), en el estudio de micropropagación obtuvieron explantes a partir de segmentos nodales provenientes de la germinación por semillas de *Apuleia leiocarpa*, estableciendo el explante en medio de cultivo WPM por 15 días, luego fueron seccionados en segmentos

nodales para pasarlos a medio de multiplicación de WPM suplementado con 8,8 uM de BAP por 30 días, mostrando como resultado el protocolo para el proceso de establecimiento y multiplicación *in vitro*.

Por otro lado, Santos et al. (2013) desarrollaron la propagación *in vitro* a partir de la inducción de callo, logrando desinfectar con NaClO al 1% por 10 min y luego enjuagado 3 veces con agua estéril. Seguidamente, el material vegetal mostró un desarrollo óptimo en la inducción de callos al emplear 2 mg/L 2,4-D y 3,2 mg/L TDZ en medio WPM.

Carranza et al. (2013), desarrollaron la micropropagación de *Swietenia macrophylla* a partir de segmentos nodales, obteniendo un 95% de sobrevivencia al aplicar 15 g de Ca (ClO)₂ durante 20 min. Seguidamente, la aplicación de MS/2 suplementado con 2 mg/L de BAP en combinación con 1 mg/L de AIB obtuvieron un 70% de brotes.

2.1.2. Antecedentes nacionales

Campos et al. (2020) tuvieron como objetivo establecer una micropropagación de *S. macrophylla* de explantes provenientes de plantones, aplicando como desinfectante hipoclorito de sodio al 3% por 15 min, obteniendo una tasa de sobrevivencia de 87%. En la fase de crecimiento, el medio de cultivo más efectivo resultó ser el WPM, lo que permitió un crecimiento promedio de los brotes de 7,20 mm. En cuanto a la fase de multiplicación, la concentración de 1 mg/L de BAP promovió un aumento promedio en la longitud de los brotes de 8 mm.

Rivero (2016) Desarrollaron ensayos de micropropagación de *Cedrelinga cateniformis* a partir de hojas y yemas provenientes de plantones, logrando obtener una desinfección de hojas y yemas aplicando 2g/L de benomil en el medio de cultivo, permitiendo 0% de contaminación por hongos, para la etapa de multiplicación, obtuvieron 86% de permanencia de callos viables al emplear MS, asimismo, para la producción de callos a partir de yemas se obtuvo mejor resultado empleando b4(1,4 mg/L de Kinetina y 1,05 mg/L de ANA); b5 (1,75 mg/L de Kinetina y 1,75 mg/L de ANA), logrando una producción de 80% y 90%. Para la producción de callos a partir de hojas se

obtuvo mejor resultado empleando T3 (1,05 mg/L de Kinetina y 0,35 mg/L de 2,4D); T4 (1,23 mg/L de Kinetina y 1,4 mg/L de 2,4D); T5 (0,7 mg/L de Kinetina y 1,4 mg/L de 2,4D), logrando una producción de 90%, 90% y 100%.

Huamán (2014) tuvo como objetivo la micropropagación de *Cedrela odorata* a partir de semillas desinfectando con NaOCl 1,5% por 15 min. Sembrados en medio basal (MS). Para la fase de multiplicación se reportó que empleando bajas concentraciones de ANA (0 uM y 0,53 uM) favorecen el crecimiento longitudinal de la raíz e incrementa el número de hojas. Sin embargo, concentraciones de ANA (0,53 uM) y BAP (2,21 uM), actúan sinérgicamente sobre el desarrollo de raíz y tallo logrando obtener un promedio de 4,10 cm de longitud de explantes.

2.1.3. Antecedentes locales

Rafael (2023) se enfocó en la propagación *in vitro* de la castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), donde utilizó yemas apicales de plántulas jóvenes tratadas en invernadero, desinfectadas con agua jabonosa y NaClO al 2,5%. En la fase de multiplicación *in vitro*, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de sales de WPM y sacarosa, junto con reguladores de crecimiento (BAP y ANA). Los resultados mostraron un 86,4% de asepsia y que las concentraciones de sales al 100% de WPM y sacarosa a 30 gr/l promovieron un mejor desarrollo en altura y generación de nudos de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

2.2. Modelo teórico

El modelo lineal del diseño experimental es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} = Una observación cualquiera

μ = Media poblacional

α_i = Efecto de la i-ésima nivel de concentración de regulador de crecimiento

β_j = Efecto de la j-ésima tipo de regulador de crecimiento

$\alpha\beta_{ij}$ = Efecto de la interacción entre concentración x tipo de regulador de crecimiento

e_{ijk} = Error experimental

2.3. Bases teóricas

2.3.1. Descripción taxonómica

Bertholletia excelsa es un árbol de la familia Lecitadaceae, nativo de Sudamérica, fue descrita por Humb. & Bonpl en el año 1807.

La castaña posee la siguiente posición taxonómica.

| | |
|-----------------|--|
| Reino..... | Vegetal |
| Subreino..... | Tracheobionta |
| División..... | Magnoliophyta |
| Clase..... | Magnoliopsida |
| Subclase..... | Dillineidae |
| Orden..... | Lecythidales |
| Familia..... | Lecythidaceae |
| Subfamilia..... | Lecythidoideae |
| Género | Bertholletia |
| Especie..... | <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. Bonpl. |

Fuente: Missouri Botanical Garden (2020).

2.3.2. Distribución geográfica

Se encuentra presente en América del Sur, abarcando la selva amazónica del departamento de Pando en Bolivia, al norte de La Paz, además de Brasil, Colombia, Perú, Venezuela, Guyana y Surinam. En el Perú, su hábitat incluye la Selva Baja, tanto en su estado natural como en cultivo, en las regiones de Madre de Dios, Loreto y Ucayali (Dueñas y Nieto 2010).

2.3.3. Ecología

Las áreas de mayor abundancia de *Bertholletia excelsa* se localizan en la selva baja peruana, boliviana y brasileña, según (MINAM 2014) se desarrolla bajo las siguientes condiciones ecológicas, expresadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones ecológicas

| Características | Parámetros |
|------------------------|-----------------------------|
| Tipo de suelo | Arcilloso o arcillo-arenoso |
| Temperatura media | 24,3 °C - 27,2 °C |
| Temperatura mínima | 19,9 °C – 23,5 °C |
| Temperatura máxima | 30,2 – 32,6 °C |
| Humedad relativa | 66% - 91% |
| Precipitación | 1 400 – 2 800 mm |
| Drenaje | Bueno |
| pH | 4,5 - 6 |
| Terreno | No inundable |
| Altitud | Inferiores a 800 m.s.n.m. |

2.3.4. Fisiología

En su estado natural, *Bertholletia excelsa* se compone de semillas que germinan después de 12 a 18 meses debido a su crecimiento lento con una fase juvenil de más de 12 años. Los árboles pierden sus hojas con el inicio de la estación seca, suele ocurrir entre los meses de agosto y setiembre. El periodo de floración abarca los meses de diciembre a febrero y está directamente relacionado con el pico de precipitación pluvial (MINAM, 2014).

2.3.5. Descripción botánica

Según Reynel et al. (2011), los árboles de *Bertholletia excelsa* Bonpl. presentan las siguientes características:

- Árbol colosal con una altura de 30-50m
- Fuste cilíndrico, recto cónico
- Corteza externa fisurada
- Corteza interna amarillenta fibrosa, secreta mucilagos
- Fuste no presenta modificaciones.

- Hojas simples, alternas, lámina coriácea, oblongas márgenes enteros a ondulados, haz lustroso verde oscuro a verde claro, envés verde claro a verde amarillento, pecíolo ligeramente alado.
- Flores actinomorfas bisexuales, solas o en racimos de color amarillo blanquecino.
- Fruto cápsula indehisciente (pixidio), también conocida como “coco” que es un esférico ligeramente achatado con una cascara leñosa, 9 a 15 cm de diámetro y pesa entre 0,5 a 1,5 kg.
- Semilla: Se encuentra entre 10 a 25 semillas, teniendo una longitud de 3 a 5 cm y pesa cada semilla entre 4 a 10 g. La semilla tiene una cubierta rugosa, dura y leñosa conteniendo una almendra de color blanquecina envuelta de epidermis de color marrón. Podemos decir que dicha especie puede dar una producción de 100 a 120 kg/árbol.

2.3.6. Métodos de propagación

Comúnmente el método de propagación empleado para *Bertholletia excelsa* es a través de semillas empleando almácigos (Ramos 2018).

a) Propagación por semillas

Investigación realizada por Ramos (2018), menciona que la propagación de *Bertholletia excelsa* a través de semilla, ofrece un 67 a 74% de germinación, siendo la propagación por semilla uno de los métodos tradicionales más empleado para la propagación de dicha especie.

b) Propagación por estacas

El método por estaca consiste en coleccionar un trozo de tallo, y conseguir que emita raíces para formar un nuevo individuo, tiene como objetivo principal la reproducción de individuos iguales genotípicamente al progenitor y es posible gracias a la Totipotencia y desdiferenciación, características importantes de la célula vegetal. Huisa (2015) indica que usar reguladores de crecimiento (AIB) en bajas concentraciones para multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* Bonpl., obtiene los valores más altos de supervivencia (21,3%) y brotes (13,75%) en las estaquillas”.

c) Propagación *in vitro*

Se trata de tomar un fragmento de una planta y colocarlo en un medio nutritivo estéril, generalmente gelificado o semisólido, donde la planta crecerá. Martínez et al. (2010), mencionan que la propagación de especies forestales a condiciones *in vitro* brinda beneficios como conservar y micro propagar el material vegetal, asimismo, “Proporciona nuevas herramientas que se suman a la actividad silvicultural, y estas están dentro del ámbito de la gestión forestal, tales como: mantenimiento de la diversidad de los bosques para la conservación, utilización de los recursos genéticos y mejoramiento genético en plantaciones forestales”.

Según Huamán (2014) no se ha encontrado reportes de propagación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* a nivel nacional; debido a la alta contaminación del material vegetal, mal uso de agentes desinfectante que puede llegar afectar o dañar el tejido vegetal.

2.3.7. Cultivo de células y tejido vegetales

Según Calva y Pérez (2005), el cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas destinadas a cultivar células, tejidos u órganos vegetales en condiciones asépticas y controladas, sin presencia de microorganismos, y esta forma de propagación permite preservar la genética del árbol.

2.3.8. Micropropagación

Se refiere al conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos que se utilizan para multiplicar plantas de manera asexual, lo que significa que las nuevas plantas son genéticamente idénticas a la planta madre. Este proceso se lleva a cabo de manera rápida, eficiente y en grandes cantidades. George et al. (2007) mencionan que las micro plantas (plantas obtenidas del cultivo de tejidos) pueden ser derivadas de tres maneras:

- A partir yemas de brotes preexistentes o yemas primordiales (meristemas) que son estimulados a crecer y proliferar.

- A partir morfogénesis u organogénesis de brotes, donde los nuevos brotes son inducidos a tejidos desorganizados o directamente sobre tejidos explantados de la planta madre.
- A partir embriogénesis somática: se refiere al desarrollo de estructuras que se asimilan a los embriones encontrados en las semillas de plantas indemnes, y estos embriones somáticos tienen la capacidad de convertirse en plántulas de la misma manera que lo harían los embriones naturales en las semillas.

La derivación de nuevas plantas a partir de células, se presenta en células diferenciados, células cambiales y células en empalizada de hojas, pero no aquellos que se han convertido en terminales estructuras diferenciadas (por ejemplo, tubos cribosos o traqueidas)

2.3.9. Etapas de la micropropagación

Profesor Murashige de la Universidad de California (Riverside) definió tres pasos o etapas (I-III) en la multiplicación *in vitro* de plantas (Murashige 1974). Estos han sido ampliamente adoptados tanto por investigadores como laboratorios de cultivo de tejidos, porque no sólo describen pasos de procedimiento en la micropropagación, sino que suelen representar puntos hay que cambiar en el ambiente. Algunos investigadores han sugerido que el tratamiento y la preparación de plantas madre deben considerarse como una etapa por separado. Debergh y Maene (1981) citado por George et al. (2007), adopto la propuesta de que tal procedimiento preparatorio debe llamarse Etapa 0 y una cuarta etapa (IV), en la que las plantas son transferidas al ambiente externo. Por lo tanto, las etapas 0-IV se proporcionan a continuación, mientras que la manera en que las Etapas I-III podrían aplicarse a diferentes métodos de micropropagación.

Etapa 0: Selección y preparación de la planta madre:

George et al. (2007), refiere que para que el cultivo *in vitro* tenga éxito, la planta madre debe ser propio de la variedad o especie, aséptico de cualquier enfermedad, incluso pre-tratar la planta madre (o partes de ella) para reducir o eliminar enfermedades bacterianas sistémicas.

Etapa I: Establecimiento del cultivo aséptico.

El propósito de esta fase es que el explante se establezca en el medio de cultivo de forma aséptica. Esta se completa, si se obtiene un número adecuado de explantes con alguna presencia de crecimiento, por ejemplo, formación de brote y/o callos vivos sin contaminación (Wetherell 1982 y George et al. 1984).

Etapa II: Multiplicación o proliferación

El propósito de esta fase es reproducir órganos y estructuras capaces de distinguir nuevas plantas. Wetherell (1982) afirma que el verdadero valor de la propagación *in vitro* es la frecuencia con la que se puede repetir, por lo que se debe encontrar el mejor método para dividir y subcultivar el propágulo o explante.

Etapa III: Enraizamiento

Es necesario que las plántulas comiencen a fotosintetizarse sin ninguna fuente externa de carbohidratos, ya que esto incita el desarrollo de las yemas hasta vástagos bien diferenciados para enraizar. Debido a que los propágulos de la fase anterior son pequeños, no aceptarán una transferencia inmediata al suelo (Villalobos y Thorpe 1984).

Etapa IV: Aclimatación o endurecimiento.

George et al. (1984), menciona que durante el cultivo *in vitro*, la alta humedad y la poca iluminación hacen que las cutículas de las hojas se vuelvan delgadas y que los tejidos vasculares se desarrollen lentamente. Como resultado, cuando las plántulas son transportadas a condiciones externas, son vulnerables a la desecación.

2.3.10. Medio de cultivo

Se requieren diferentes tipos de nutrientes inorgánicos y orgánicos para estimular el crecimiento celular. Entre los inorgánicos (hierro, zinc, cloro, cobre, molibdeno, boro y manganeso). En general, "Las células en crecimiento tienen la capacidad de sintetizar sus componentes orgánicos

utilizando fuentes adecuadas de nitrógeno y carbohidratos. No obstante, existen sustancias orgánicas adicionales que se necesitan en cantidades pequeñas pero que desempeñan un papel crucial en el proceso de crecimiento” (Ertola y Jiménez 1998: 29).

Clasificación de los medios de cultivo de acuerdo a su estado físico:

- Medio de cultivo sólido: Contiene el agente solidificante generalmente agar al 1,5% – 2 %.
- Medio de cultivo líquido: No lleva agente solidificante como el agar.

2.3.11. Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento son moléculas orgánicas difusibles que modulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas, siendo efectivos a bajas concentraciones internas de alrededor de 1 μM . A medida que los investigadores identificaron más reguladores del crecimiento y exploraron sus efectos y concentraciones endógenas, se hizo evidente que las respuestas dependen de la especie, el órgano vegetal, el estado de desarrollo y las concentraciones endógenas (Ertola y Jiménez 1998).

- Citoquininas: Son procedentes de la adenina que suscita a la división celular. Algunas incluyen BA (benciladenina), K (cinetina o 6-furfurilaminopurina), Zea (zeatina) y 2-iP (N-isopenteniladenina). Las dos son citocininas sintéticas, y las dos últimas son naturales. En la planta, las citocininas promueve la división celular, el transporte de soluto hacia las hojas, semillas, flores y frutos, y retrasan la senescencia de la hoja. Cuando los explantes se cultivan en presencia de BA, genera nuevas hojas y yemas axilares, lo que favorece la micropropagación vegetativa eficiente. La inclusión de citocininas en el medio de cultivo permite la formación de callos y estimula el crecimiento de brotes en varias especies vegetales (Ertola y Jiménez 1998).
- Auxinas: Las auxinas son un grupo de sustancias químicas que regulan el crecimiento, la división celular y la diferenciación radicular en cultivos *In vitro*, según (Ertola y Jiménez 1998). Estas sustancias

desempeñan un papel crucial en la atracción hacia la gravedad y la luz, la sumisión apical, el desarrollo de partes florales y la diferenciación de tejidos vasculares en la planta. Algunas de las auxinas más utilizadas incluyen ANA (ácido α -naftalenacético), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), AIB (ácido indolbutírico), pCPA (ácido p-clorofenoxiacético) y BTOA (ácido benzotiazol-2-oxiacético).

2.3.12. Mecanismo de acción de los reguladores de crecimiento

La planta para desarrollarse sufre una consecuencia de un complejo control hormonal (tanto espacial como temporal) mediado por la regulación y expresión de sistemas de genes. Calva y Pérez (2005) “afirman que la complejidad de los efectos pleiotrópicos de los reguladores del crecimiento vegetal podría ser resultado de una acción fitorreguladora o efecto genético”.

2.3.13. Condiciones ambientales de cultivo

El material vegetal sometido a condiciones *in vitro* deben mantener condiciones ambientales similares a las que se encuentran en la naturaleza. Los principales factores ambientales que inciden en los cultivos son la luz, la temperatura y la humedad relativa. Según Castillo (2020) el comportamiento de los cultivos “está influenciado por la calidad de luz, esta afecta a las enzimas involucradas en el desarrollo y metabolismo. La intensidad es de 1 000 a 5 000 lux con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad”.

La temperatura permite acelerar las tasas metabólicas induciendo a la absorción de agua y nutrientes. Por otro lado, las cámaras de cultivo se mantienen generalmente entre 22 y 28 grados centígrados, lo que permite el crecimiento de plantas tanto de clima templado como tropical. Según Hernández (2018), “La temperatura dentro de los recipientes de cultivo es de 1-2°C más alta que la de la cámara durante el período de iluminación, lo que crea un período térmico suave”.

En cuanto a la humedad relativa, permite que el intercambio gaseoso y la fotosíntesis se pueda llevar a cabo, los rangos oscilan de 50% a 75% aunque

varía en función de la temperatura y cierre de los recipientes (Castillo 2020:2).

2.4. Definición de términos

- **Callo:** En respuesta a una herida, prolifera una masa de células indiferenciadas a partir de células vegetales diferenciadas.
- **Propagación clonal:** La reproducción clonal es la reproducción asexual de plantas que son genéticamente idénticas y se originaron a partir de un solo individuo o explante.
- **Clon:** Debido a que un clon no siempre es homogéneo, lo que implica es necesariamente es la uniformidad genética. El término puede aplicarse a plantas propagadas únicamente por medios vegetativos o asexuales, derivados de una única fuente de planta madre.
- **Cultivo de células:** Término utilizado para designar el mantenimiento o cultivo de células "*in vitro*" incluyendo el cultivo de células individuales. Las células no se organizan en tejidos de las mismas.
- **Asepsia:** Sin infección o contaminación de microorganismos
- **Libre de virus:** Se basa en una prueba para determinar la presencia del organismo en cuestión.
- **Lux:** Luminosidad que recibe una superficie, con un flujo luminoso de 1 lumen por m².
- **Necrosis:** se refiere al deceso patológico de células o tejido debido a una lesión grave que no puede ser reparada ni curada.
- **Oxidación fenólica:** El fenómeno de oscurecerse ocurre por las enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas, que se genera cuando los tejidos sufren heridas.
- **Brote:** Hace referencia al pimpollo o vástago nuevo de una planta que pueden incluir tallos, yemas y hojas.
- **Explante:** Fragmento de un tejido extraído de un ser vivo para cultivarlo en un medio artificial.
- **Entrenudo:** Parte del tallo de algunas plantas comprendida entre dos nudos.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

3.1. Ubicación del estudio

La presente investigación se realizó en las instalaciones del CITE productivo Madre de Dios, donde se cuenta con un laboratorio de micropropagación vegetal de castaña, ubicado en km 16,5 carretera Puerto Maldonado – Cusco, distrito y provincia de Tambopata, departamento Madre de Dios, asimismo la Figura 1 y Tabla 3 muestra la ubicación del laboratorio donde se desarrolló la presente investigación.

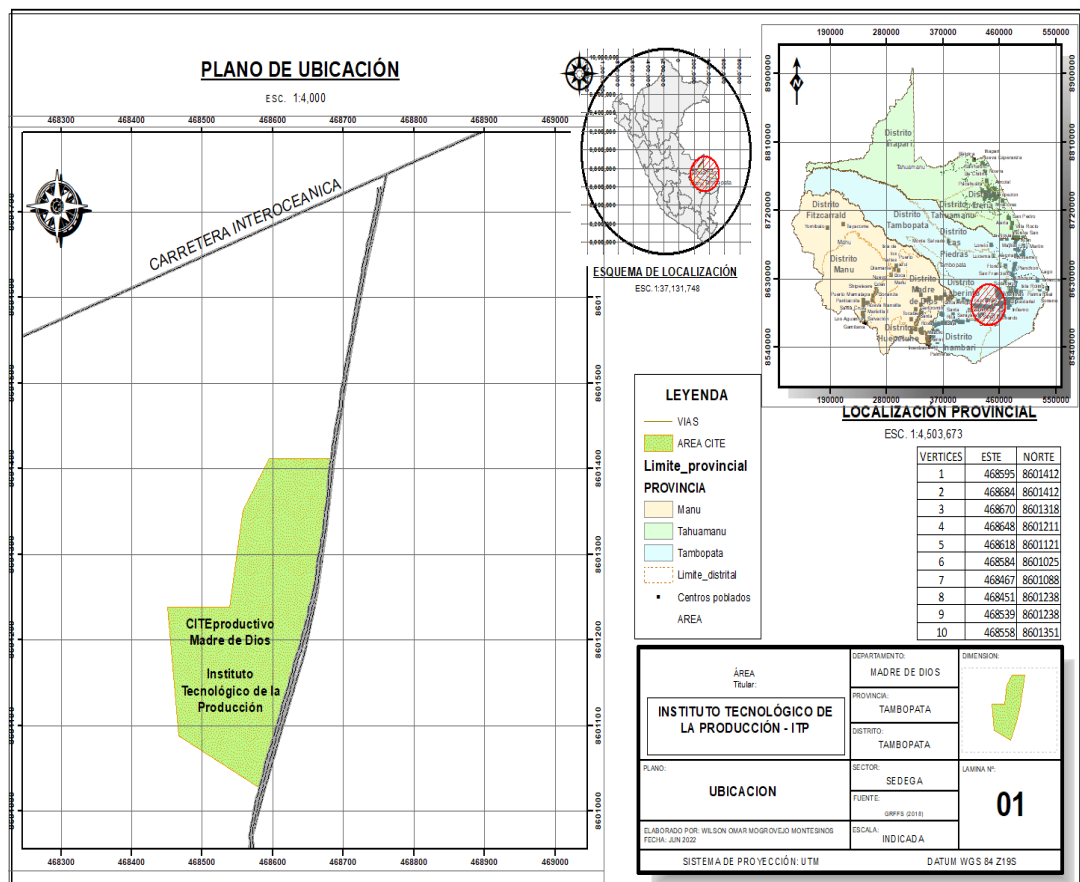


Figura 1. Mapa de ubicación del laboratorio de micropropagación vegetal CITEproductivo Madre de Dios

Tabla 3. Ubicación política

| Ubicación política | |
|---------------------------|------------------------------------|
| Departamento | Madre de Dios |
| Provincia | Tambopata |
| Distrito | Tambopata |
| Ciudad | Puerto Maldonado |
| Nombre de edificación | CITE productivo Madre de Dios |
| Coordenadas UTM | 19 L Este 0478905 Norte 8607585 |
| Altitud | 214 m s.n.m. |

3.2. Tipo de estudio

La investigación es de tipo experimental, debido a que se determinará los efectos de las citoquininas en la etapa de multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* y la descripción del estado fitosanitario del explante

3.3. Diseño del estudio

El estudio se enmarca dentro de la investigación aplicada, con nivel de medición y análisis de la información cualitativa y cuantitativa, debido a que se registrará el desarrollo vegetativo del explante a condiciones *in vitro*.

Se utilizará un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2 x 3, siendo el factor 1: dos tipos de hormonas del grupo citoquininas y el factor 2: tres concentraciones de hormonas del grupo citoquinina, con una distribución aleatoria de las unidades experimentales, los factores y niveles de estudio se ordenan de la siguiente manera:

- a) Factor 1: Hormonas del grupo citoquininas:
 - a1: 6-Bencilaminopurina (BAP)
 - a2: kinetina (KIN)
- b) Factor 2: Diferentes concentraciones hormonales
 - b1: 0,5mg/L

- b2: 1,5mg/L
- b3: 3,5mg/L

En la Tabla 4 se puede apreciar los tratamientos para el estudio:

Tabla 4. Descripción de los tratamientos

| Factor 1 (Regulador de crecimiento del grupo citoquininas) | Factor 2 (Nivel de Concentración) | Combinación | Tratamientos |
|---|--|-------------------------------|---------------------|
| a ₁ | b ₁ | a ₁ b ₁ | 1 |
| | b ₂ | a ₁ b ₂ | 2 |
| | b ₃ | a ₁ b ₃ | 3 |
| a ₂ | b ₁ | a ₂ b ₁ | 4 |
| | b ₂ | a ₂ b ₂ | 5 |
| | b ₃ | a ₂ b ₃ | 6 |

En la Tabla 4, se muestra 6 tratamientos aplicados al experimento, asimismo, se aplicó 10 repeticiones por tratamiento, obteniendo un total de 60 uds experimentales, cada unidad experimental está conformado por 3 individuos, haciendo un total de 180 individuos (explantes), tal como se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Distribución de las unidades experimentales respecto a los tratamientos

| | | BAP | | | KIN | | |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--|
| Repeticiones | 0,5mg/L | 2,5mg/L | 3,5mg/L | 0,5mg/L | 2,5mg/L | 3,5mg/L | |
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | |
| 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 6 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 7 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 8 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 9 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 10 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |

3.4. Población y muestra

3.4.1. Población

La presente investigación contó con una población de 1 000 plantones de castaña producidos en viveros, el cual se ubica en el “Fundo el bosque” de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, Km 16,5 – carretera interoceánica Puerto Maldonado – Iñapari.

3.4.2. Muestra

El muestreo a emplear será el estratificado, donde se optó un total de 210 plantones, se utilizaron yemas terminales de los plantones de castaña para el proceso de multiplicación *in vitro*.

3.5. Métodos y técnicas

3.5.1. Fase de invernadero

a) Selección de planta madre o planta donadora de explantes

Como primera etapa del experimento, se procederá a seleccionar los plantones de castaña con un estado fitosanitario bueno a una edad de 5-6 meses.

b) Tratamiento en invernadero

Una vez seleccionada la planta madre o planta donadora de explantes, se procederá a someterla a un proceso de cuarentana en un invernadero, donde se reducirá la carga microbiana, mediante la aplicación de un tratamiento con fungicida benomil 2g/L, con ayuda de un atomizador, se aplica a cada plántula (2 roseadas por plantón), 4 veces por mes.

c) Colecta de explantes

Se colectarán explantes (yemas terminales) de los 210 plantones; antes de la colecta, se tendrá una tijera previamente esterilizada, alcohol de 70%, agua destilada en pisetas, varias hojas de papel toalla, un recipiente para trasladar los explantes colectados, marcador para rotular el código del explante colectado. Se cortará la parte aérea del plantón a una medida entre 1,5 a 2 cm de longitud y se quita las hojas existentes, cada explante cortado se colocará en una hoja de papel toalla humedecida, rotulada con el código del plantón, y luego será colocados en un recipiente para el traslado de los explantes.

3.5.2. Fase de laboratorio

a) Preparación de medio de cultivo

Un día antes de la colecta de los explantes, se realizará la elaboración de los medios de cultivos, es obligatorio la limpieza/desinfección de los frascos, probetas y otros materiales que utilizaremos para este proceso. Una vez que los frascos estén listos y secos, se procederá a la elaboración de los medios de cultivos.

Para preparar 1000 ml de medio de cultivo se realizará el siguiente proceso: Primeramente, se deberá medir 800 ml de agua destilada en una probeta, de esta cantidad se colocará 200 ml en un beaker de 1 L de capacidad, el cual se colocará en el agitador magnético para luego añadir los siguientes compuestos planteados por tratamiento, según el diseño experimental:

Teniendo la mezcla lista, se ajusta el pH con NaOH y HCL hasta un pH de 5,7, luego se añadirá 5,5 g de agar, colocar dentro del microondas por 11 min hasta disolver completamente el agar. Subsiguientemente se dispensará en el tubo de ensayo (6 ml aprox. para cada tubo) y se colocan sus respectivas tapas a cada tubo de ensayo; luego pasa por un proceso de esterilización en la autoclave durante 15 min a 121°C con 1 atm de presión, culminado el proceso de esterilización se deja enfriar los medios de cultivos para su posterior proceso.

b) Desinfección de explantes

Para introducir al proceso *in vitro* un material vegetal que se ha desarrollado en el exterior es indispensable tomar una serie de medidas enfocadas a eliminar los posibles microorganismos patógenos que puedan estar establecidos en los explantes.

La desinfección de los explantes se realizará en dos fases, la primera que se realiza fuera de la cabina de flujo laminar (desinfección con benomil 2g/L y kasumin 2,5ml/L), y la segunda fase que se realizará dentro de la cabina de flujo laminar, (desinfección con alcohol al 70%, NaClO, agua destilada).

c) Siembra e introducción de explantes a los medios de cultivo

Los pasos previos a la introducción *in vitro* del explante tienen que ver con la asepsia superficial. Para esto se hará una previa desinfección a la mesa de trabajo de la cabina de flujo laminar, con alcohol al 70%, antes y después del proceso de siembra, se ultimaré la desinfección con el encendido de la luz ultravioleta por un tiempo de 15 minutos.

Para el proceso de siembra, es importante tener la indumentaria puesta (mandil y mascarilla), se roseará alcohol sobre las mangas del guardapolvo con la finalidad de cumplir con los protocolos de desinfección en el proceso de siembra; seguidamente se procede a colocar los materiales a utilizarse (material vegetal, mechero, gradilla, medio de cultivo preparado, papel, papel toalla, alcohol, bisturí, recipientes para la desinfección, agua destilada, plástico sin fin, plumón indeleble, pizeta y pinzas), luego se procederá a encender el mechero para la desinfección del bisturí por cada corte al explante; se extraerá el explante del recipiente que lo contendrá para luego pasar a desinfección como se menciona en el ítem “b” (desinfección de explantes) y se realizará el corte biselado final a la yema terminal, para luego ser introducido dentro de un tubo de ensayo que contiene un medio de cultivo. Al finalizar la siembra, se procederá a sellar y etiquetar los tubos de ensayo con los códigos que les correspondan (número de tratamiento/ tipo de planta madre/fecha).

d) Incubación o sala de crecimiento de explantes

Después de la introducción de los explantes al medio de cultivo, los tubos sellados y etiquetados serán llevados al área de crecimiento, donde los parámetros físicos serán controlados/estandarizados: temperatura de 28°C + 2°C, humedad 60%, los tubos de ensayos de cultivo tendrán un fotoperiodo 16/8, es decir 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, estas condiciones serán mantenidas por un periodo de 90 días.

En relación al procedimiento metodológico de la micropropagación, la Figura 2 muestra un esquema del proceso de propagación vegetal en condiciones de laboratorio.

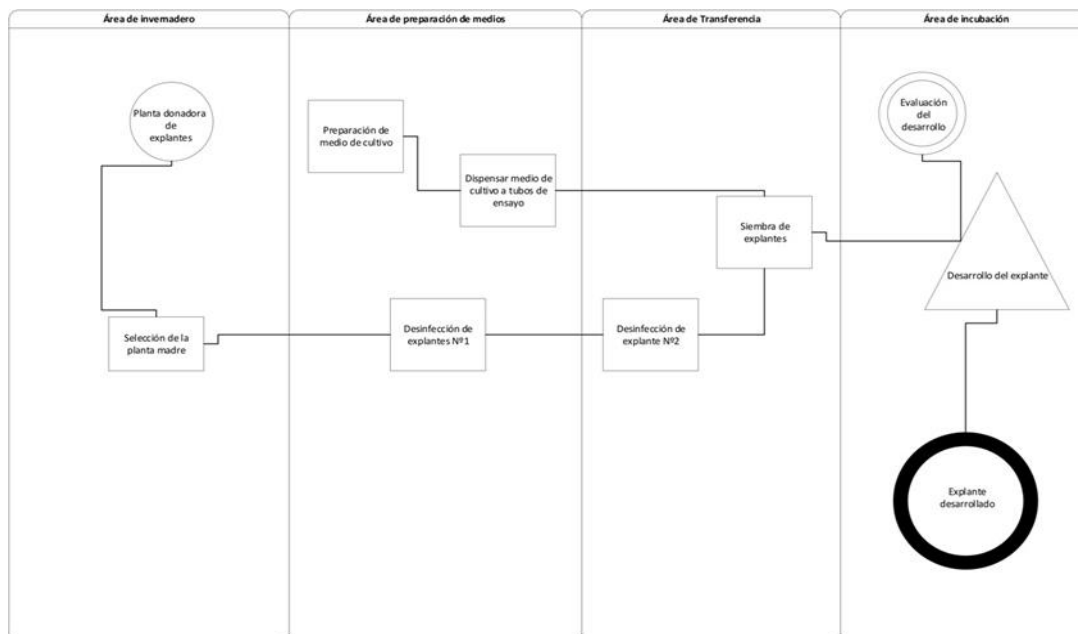


Figura 2. Flujograma del proceso de micropropagación vegetativa

3.6. Tratamiento de los datos

A continuación, se enumeran los principales parámetros evaluados:

- **Porcentaje de contaminación (%):** Se evaluó el porcentaje de contaminación tanto durante como al final de la investigación, calculando la proporción entre el número de explantes contaminados y el total de explantes introducidos.
- **Porcentaje de supervivencia (%):** Se realizó una evaluación en porcentaje tanto durante como al final de la investigación, contabilizando el número de explantes vivos en relación al total de explantes introducidos.
- **Número de hojas/explante:** Se llevó a cabo una evaluación de la proliferación de la parte aérea durante todo el proceso de investigación y al final del mismo, analizando la producción y elongación de hojas y tallos.
- **Nº de nudos/explante:** Se realizó una evaluación al comienzo y al final de la investigación, contabilizando el número total de nudos por explante.

- **Altura del explante:** La altura se midió en centímetros, tomando datos desde el inicio del vástago hasta la parte apical del explante. Estas mediciones se llevaron a cabo tanto durante el transcurso de la investigación como al final de la misma.
- **Viabilidad:** La evaluación se realizó visualmente durante y al final de la investigación, agrupando por lotes (número total de tubos por acceso) utilizando los criterios mencionados por INIA (2019).

3.7. Análisis de datos

Luego de obtener los valores, se llevó a cabo una transformación de datos con el propósito de ajustar la distribución o escala de las variables, con el fin de cumplir con los supuestos de los métodos estadísticos y, al mismo tiempo, mejorar la interpretación de los resultados. Para este propósito, se aplicó la transformación de la raíz cuadrada ($\sqrt{(x+1)}$).

Posteriormente, para analizar los datos transformados provenientes del diseño experimental, que consistió en un diseño completamente al azar con un arreglo factorial, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. En situaciones en las que los factores demostraron significancia estadística, se aplicó la prueba de Tukey para cada caso. El objetivo fundamental fue determinar los tratamientos más efectivos y comprender sus impactos en la micropropagación vegetativa de los explantes de *Bertholletia excelsa*. Estas metodologías proporcionaron una evaluación rigurosa y estadísticamente sólida de los resultados obtenidos, facilitando la identificación de los tratamientos más prometedores para el proceso de micropropagación vegetativa.

CAPITULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

4.1. Validación del protocolo de desinfección

4.1.1. Porcentaje de asepsia en la etapa de establecimiento

Según los resultados obtenidos después de seguir el protocolo de desinfección (Figura 3), se puede observar lo siguiente: a los 5 días de evaluación, se logró alcanzar un nivel limpieza de 92,4%, con un 7,6% de presencia de hongos; en el día 15 de evaluación, se obtuvo un nivel de limpieza del 88,1%, mientras que la presencia de hongos aumentó al 11,9%; por último, en el día 20 de evaluación, se registró un nivel de limpieza del 58,6%, con un 14,3% de hongos y un 27,1% de bacterias. Estos resultados se obtuvieron mediante la aplicación de NaClO al 2,5% durante 10 min.

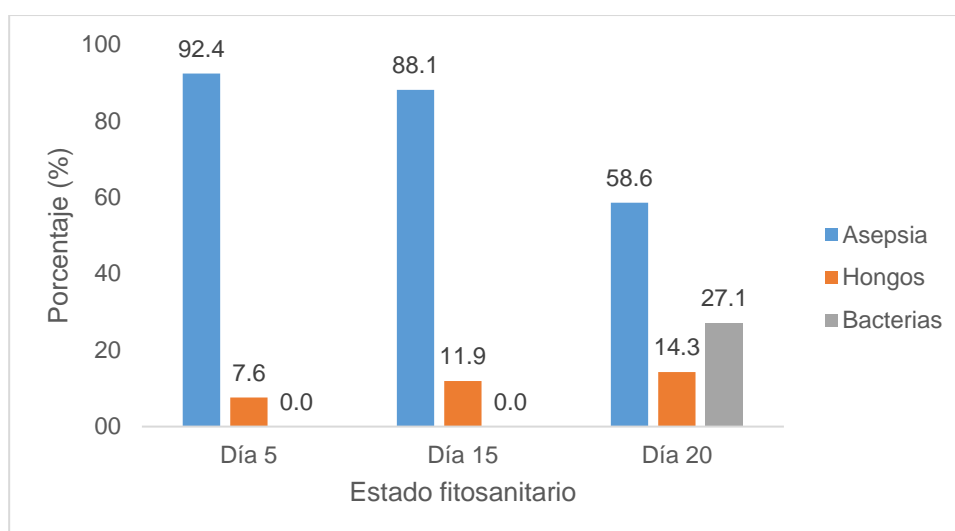


Figura 3. Porcentaje de explantes asépticos de *Bertholletia excelsa* aplicando hipoclorito de sodio

No obstante, los resultados conseguidos por Rafael (2023), fueron superiores al trabajar con muestras de tejido provenientes de la yema terminal de platonos de *Bertholletia excelsa* Bonpl. Utilizó NaClO al 2,5% durante 10 min, logrando una tasa de limpieza del 86,4%. De manera similar, Campos et al. (2020) lograron una tasa de limpieza del 86,6% al emplear NaClO al 3% durante 15 minutos en los tejidos de *Swintenia macrophylla* King. A su vez, Alonso et al. (2020) adoptaron la técnica de propagación *in vitro* para *Persea americana*, reduciendo la contaminación en un 57,8% mediante la aplicación de una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 3 minutos.

Indacochea et al. (2018) lograron tasas de limpieza del 100% en las especies *M. balsamum*, *T. crhysantha* y *T. billbergii* al utilizar segmentos nodales de platonos. Emplearon Povidyn® durante 20 minutos, seguido de un tratamiento con 15% de NaClO, 2 gotas de Tween durante 5 minutos y finalmente 0,5% de HgCl₂ durante 5 minutos.

Delgado y Hoyos (2016) emplearon explantes obtenidos de semillas de *Aniba perutilis*. Tras sumergirlos en una solución de 15% de NaOCl durante 15 minutos, lograron que el 60% de los explantes quedaran libres de contaminación bacteriana y fúngica. En otro estudio Rivero (2016) desarrolló ensayos de micropropagación *in vitro* de *Cedrelinga cateniformis* Ducke utilizando hojas y yemas de platonos. Al sumergirlas en una solución de NaClO al 2,5% durante 5 minutos y agregar 2g/L de fungicida al medio de cultivo, lograron una desinfección total del material.

Carranza et al. (2013) llevaron a cabo una micropropagación de *Swietenia macrophylla* a partir de segmentos nodales. Al exponer los tejidos a 15 g de Ca (ClO)₂ durante 20 minutos, consiguieron una tasa de supervivencia del 100%.

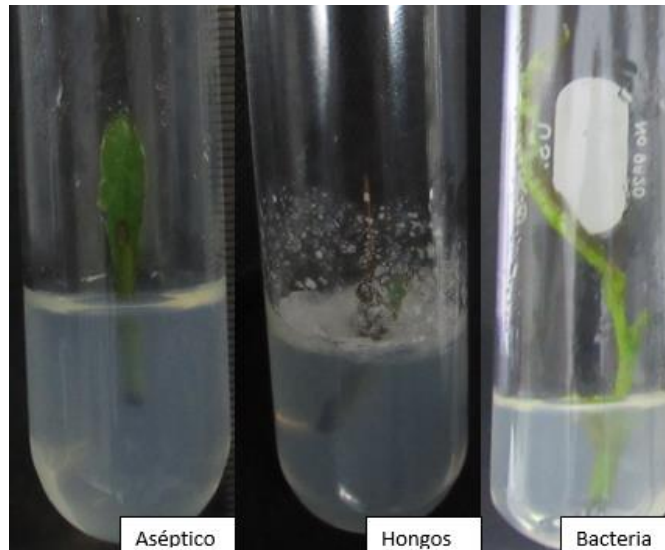


Figura 4. Estado aséptico de los explantes

4.1.2. Supervivencia de explantes en la etapa de establecimiento

La Figura 5 representa la supervivencia de los explantes durante la etapa de establecimiento *in vitro*. Después de 20 días en esta fase, se logró un 83,3% de explantes que se mantuvieron viables, mientras que la tasa de explantes no viables alcanzó el 16,7%. Esta supervivencia de explantes se atribuye al estado fitosanitario y fisiológico que afecta al medio de cultivo por consiguiente inhibe el desarrollo de los explantes.

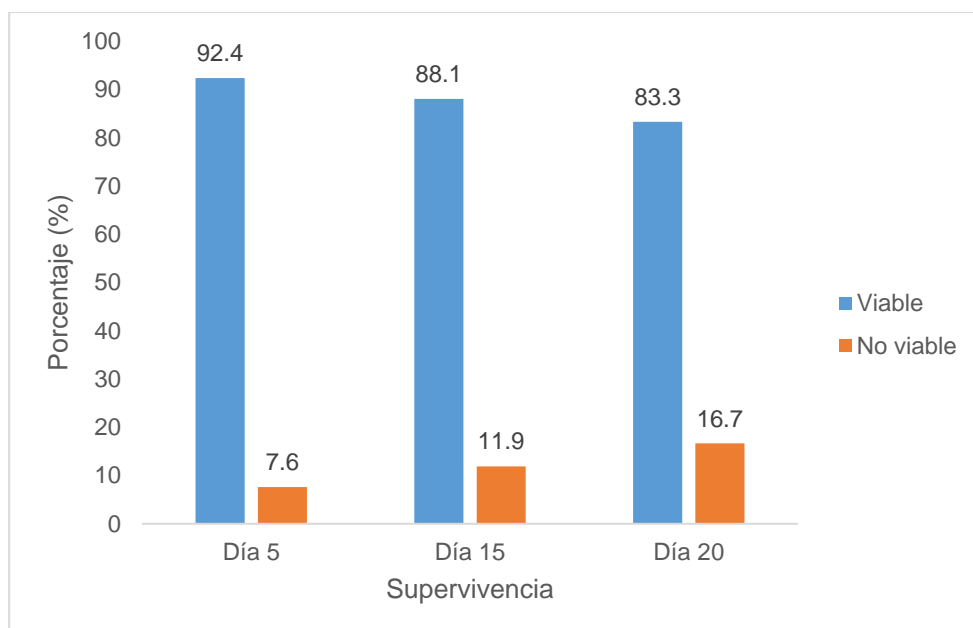


Figura 5. Porcentaje de supervivencia a condiciones *in vitro* de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

En el trabajo de Rafael (2023) logró una tasa de supervivencia del 87,2% al trabajar con tejido de yemas terminales de plántones de *Bertholletia excelsa* Bonpl., evaluada después de 30 días de la siembra. Campos et al. (2020) obtuvieron un porcentaje de supervivencia del 86,67% en los tejidos de *Swietenia macrophylla* King, evaluados a los 15 días desde la siembra. Ese mismo año, Alonso et al. (2020) emplearon la técnica de propagación *in vitro* en *Persea americana*, logrando una supervivencia del 47,5% después de dos semanas de la siembra. Indacochea et al. (2018) obtuvieron tasas de supervivencia del 90%, 87% y 88% al utilizar segmentos nodales de plántones de las especies *M. balsamum*, *T. crhyantha* y *T. billbergii*, respectivamente, evaluadas a los 30 días de la siembra. Delgado y Hoyos (2016) emplearon explantes derivados de semillas de *Aniba perutilis*, obteniendo una supervivencia del 66,67%. En un estudio paralelo Rivero (2016) realizó ensayos de micropropagación de *Cedrelinga cateniformis* Ducke utilizando hojas y yemas de plántones, y obtuvo una alta tasa de supervivencia del 94%. Finalmente, Carranza et al. (2013) llevaron a cabo la micropropagación de *Swietenia macrophylla* empleando segmentos nodales, y obtuvieron una tasa de supervivencia del 95% después de 21 días de evaluación.

4.1.3. Porcentaje de asepsia en la etapa de multiplicación

En la etapa de multiplicación, se mantuvo un seguimiento constante del estado fitosanitario durante un período de 90 días, contados desde la fecha de siembra. Los resultados registrados fueron los siguientes: al cabo de 8 días de evaluación, se pudo observar un nivel de aséptico del 82,4%, mientras que se detectó un 11% de presencia bacteriana y un 6,7% de hongos. Estos mismos patrones se mantuvieron en los sucesivos intervalos de evaluación, culminando en la última revisión a los 90 días, donde se alcanzó un 67,6% de explantes aséptico, un 20% de bacterias y un 12,4% de hongos según se observa en la Figura 6.

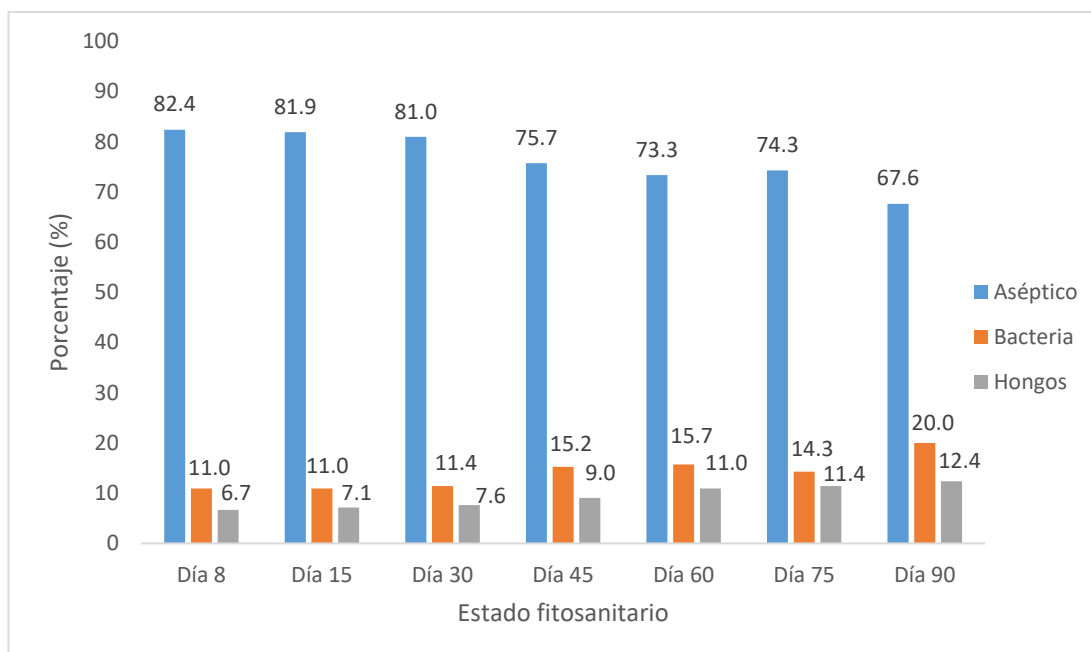


Figura 6. Porcentaje de asepsia de *Bertholletia excelsa* en la etapa de multiplicación

Es fundamental resaltar que la aparición de hongos en esta fase se asocia a la presencia de patógenos en el entorno, mientras que la presencia de bacterias se origina debido a una contaminación endógena inherente a la yema terminal, manifestándose gradualmente con el transcurso del tiempo. Esto se refleja en los resultados logrados por Indacochea et al. (2018), quienes registraron un promedio de 0,04 en cuanto a la presencia de bacterias y 0,17 en la presencia de hongos en los explantes de *Myroxylon balsamum*; en un siguiente estudio observaron un promedio de 0,05 en la presencia de bacterias y 0,17 en la presencia de hongos en los explantes de *Tabebuia crhyantha*, en un último estudio, obtuvo una media de 0,012 con presencia de bacterias y 0,18 con presencia de hongos en los explantes de *Tabebuia billbergii*. Por otro lado, Rivero (2016), en su primer ensayo de multiplicación de yemas, detectó un 6% de presencia de hongos y un 9% de presencia de bacterias, mientras que en su segundo ensayo sobre callogénesis en hojas, se evidenció un 12% de hongos y un 2% de bacterias al emplear material vegetal de la especie *Cedrelinga cateniformis*. Carranza et al. (2013), por su parte, obtuvo un promedio de 0,05 en la presencia de

bacterias y 0,15 en la presencia de hongos en la especie *Swietenia macrophylla* King.

4.1.4. Supervivencia de explantes en la etapa de multiplicación

En esta fase, se continuó evaluando y monitoreando la supervivencia de los explantes (Figura 7), teniendo en cuenta el tipo de regulador de crecimiento utilizado, que incluía BAP y KIN. Los resultados revelaron un notable porcentaje de supervivencia, con un 60% para aquellos tratados con el regulador de crecimiento BAP, y un 37,8% para el regulador de crecimiento KIN. Es importante mencionar que la inviabilidad de algunos explantes se atribuye a la presencia de patógenos en el entorno, lo que conduce a la contaminación del medio de cultivo *in vitro*, así como también el estado fisiológico de los explantes, que se ve afectado por la adaptación a las condiciones *in vitro* y puede resultar en la muerte de las yemas terminales. Estas evaluaciones se llevaron a cabo 90 días después de la siembra a condiciones *in vitro*.

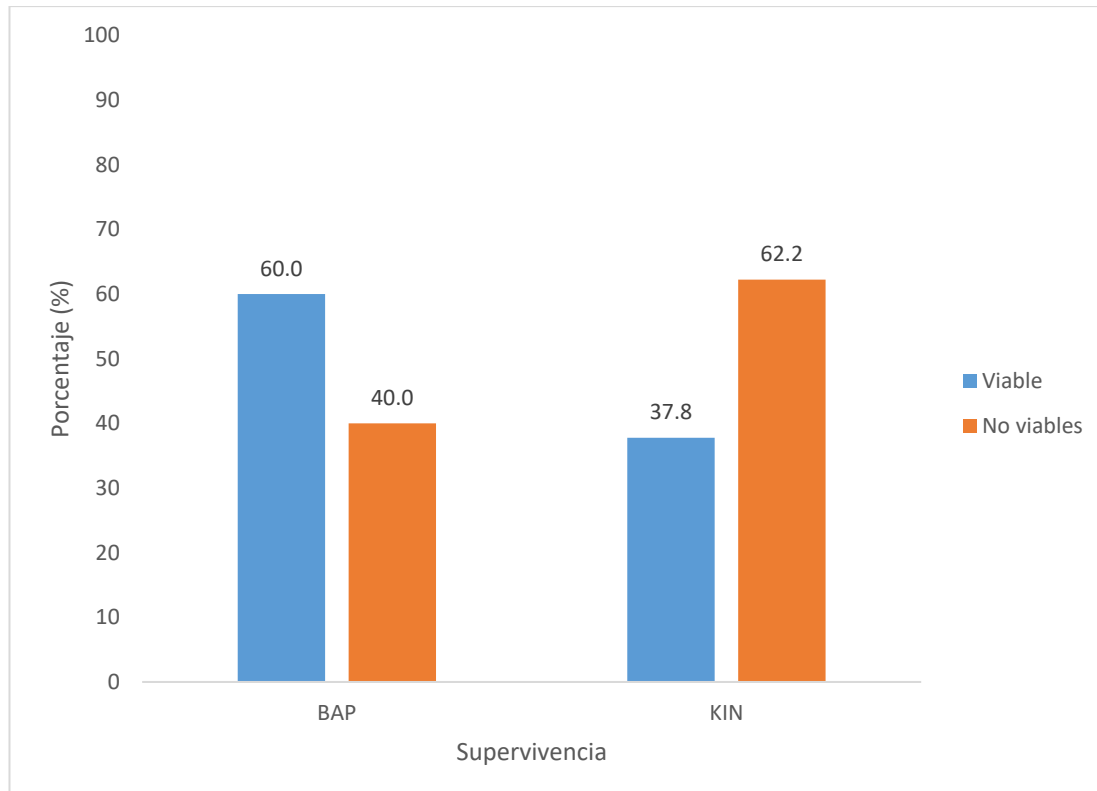


Figura 7. Porcentaje de supervivencia de *Bertholletia excelsa* para la etapa multiplicación

Respecto a los resultados expresados en la Figura 7, Indacochea et al. (2018) informó una tasa de supervivencia del 80% para la especie *Myroxylon balsamum*. En investigaciones posteriores, observaron un 82% de supervivencia para la especie *Tabebuia crhysantha* y, en su estudio más reciente, alcanzaron una tasa de supervivencia del 87% para la especie *Tabebuia billbergii*. Por otro lado, en el ensayo 1 sobre multiplicación de yemas de *Cedrelinga cateniformis* Duck, Rivero (2016) logró una impresionante supervivencia del 94% de un total de 100 explantes. Carranza et al. (2013), también obtuvo un destacado 70% de supervivencia en esta fase al micropropagar segmentos nodales de *Swietenia macrophylla* King.

4.2. Efecto del regulador de crecimiento bencilaminopurina

4.2.1. Número de hojas

La Tabla 6 y Figura 8 presenta los promedios de números de hojas resultantes de cada tratamiento, evaluados durante un período de hasta 45 días, previo al proceso se procedió a realizar la transformación de los datos $\sqrt{(x+1)}$.

Tabla 6. Promedio de número de hojas por tratamiento

| Tratamiento | Combinación | N° de explantes | Promedio |
|-------------|----------------|-----------------|----------|
| T1 | BAP + 0,5 mg/L | 30 | 2,12 |
| T2 | BAP + 1,5 mg/L | 30 | 2,21 |
| T3 | BAP + 3,5 mg/L | 30 | 2,15 |

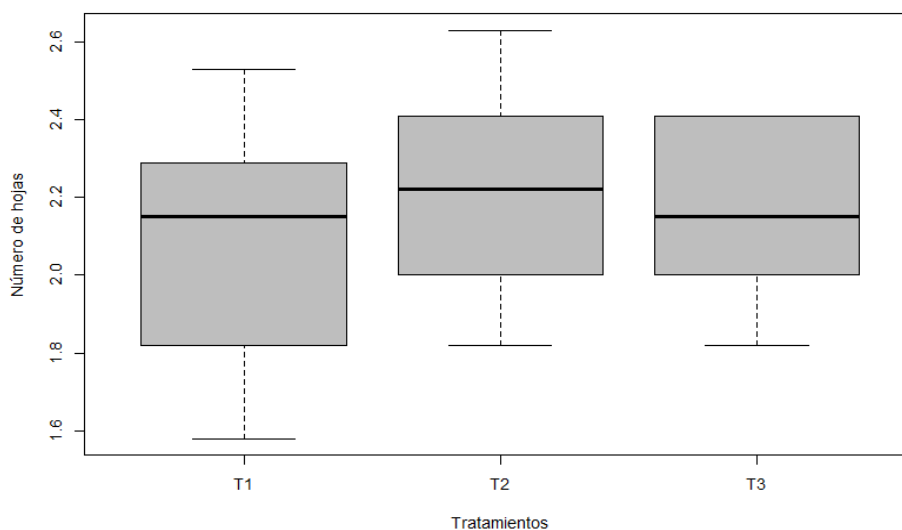


Figura 8. Promedio de número de hojas

La Tabla 6 y Figura 8, presenta los resultados de tres tratamientos (T1, T2, T3) aplicados a explantes bajo diferentes condiciones de combinación de BAP y concentraciones específicas. Cada tratamiento se llevó a cabo en 30 explantes, y los valores promedio se registraron como medida representativa. Los tratamientos exhiben diferencias numéricas en los valores promedio, siendo T2 (BAP + 1,5 mg/L) el que presenta el valor más alto (2,21), seguido por T3 (BAP + 3,5 mg/L) con un valor de 2,15, y T1 (BAP + 0,5 mg/L) con un valor de 2,12. Estas variaciones sugieren posibles efectos diferenciados en los explantes.

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla 7), se encontró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos empleando el regulador de crecimiento BAP bajo tres concentraciones diferentes.

Tabla 7. Análisis de varianza para número de hojas de *Bertholletia excelsa*

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | F calculado | P-valor | Significancia |
|------------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------|---------|---------------|
| Nivel de concentración | 2 | 0,0458 | 0,02289 | 0,332 | 0,72 | ns |
| Error | 27 | 1,8601 | 0,06889 | | | |

ns = No significativo, *** = Altamente significativo, * = Significativo

4.2.2. Número de nudos

La Tabla 8 y la Figura 9 presenta los promedios de números de nudos resultantes de cada tratamiento, evaluados durante un período de hasta 45 días, previo al proceso de análisis se procedió a realizar la transformación de los datos $\sqrt{(x+1)}$.

Tabla 8. Promedio de número de nudos por tratamiento

| Tratamiento | Combinación | N° de explantes | Promedio |
|-------------|----------------|-----------------|----------|
| T1 | BAP + 0,5 mg/L | 30 | 2,08 |
| T2 | BAP + 1,5 mg/L | 30 | 2,30 |
| T3 | BAP + 3,5 mg/L | 30 | 2,17 |

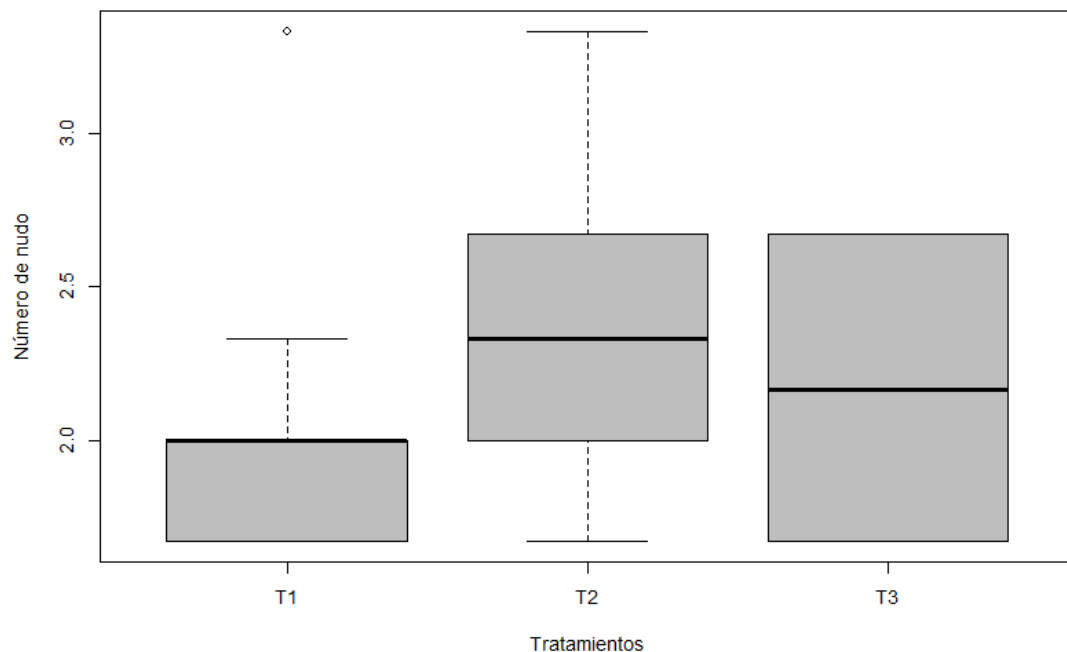


Figura 9. Promedio de número de nudos por tratamiento

La Tabla 8 y Figura 9, presenta los resultados de tres tratamientos (T1, T2, T3) aplicados a explantes bajo diferentes condiciones de combinación de BAP y concentraciones específicas. Cada tratamiento se llevó a cabo en 30 explantes, y los valores promedio se registraron como medida representativa. Los tratamientos exhiben diferencias numéricas en los

valores promedio, siendo T2 (BAP + 1,5 mg/L) el que presenta el valor más alto (2,30), seguido por T3 (BAP + 3,5 mg/L) con un valor de 2,17, y T1 (BAP + 0,5 mg/L) con un valor de 2,08.

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla 10), se encontró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos empleando el regulador de crecimiento BAP bajo tres concentraciones diferentes.

Tabla 9. Análisis de varianza para número de nudos de *Bertholletia excelsa*

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | F calculado | P-valor | Significancia |
|------------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------|---------|---------------|
| Nivel de concentración | 2 | 0,273 | 0,1365 | 0,606 | 0,553 | ns |
| Error | 27 | 6,080 | 0,2252 | | | |

ns = No significativo, *** = Altamente significativo, * = Significativo

4.2.3. Altura de explantes de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

En la Tabla 10 y Figura 10, se muestra los valores promedios de altura de castaña por cada uno de los tratamientos evaluados.

Tabla 10. Promedio de altura por tratamiento de *Bertholletia excelsa*

| Tratamiento | Combinación | N° de explantes | Promedio |
|-------------|----------------|-----------------|----------|
| T1 | BAP + 0,5 mg/L | 30 | 1,96 |
| T2 | BAP + 1,5 mg/L | 30 | 2,00 |
| T3 | BAP + 3,5 mg/L | 30 | 2,00 |

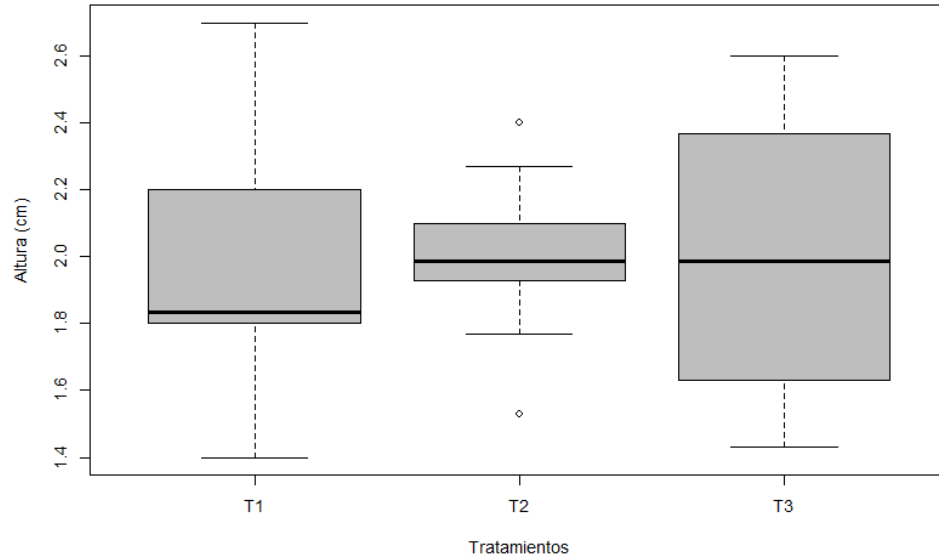


Figura 10. Promedio de altura por tratamiento de los explantes de castaña. La Tabla 10 y Figura 10, presenta los resultados de tres tratamientos (T1, T2, T3) aplicados a explantes bajo diferentes condiciones de combinación de BAP y concentraciones específicas. Cada tratamiento se llevó a cabo en 30 explantes, y los valores promedio se registraron como medida representativa. Los tratamientos exhiben diferencias numéricas en los valores promedio, siendo T2 (BAP + 1,5 mg/L) el que presenta el valor más alto (2,00), seguido por T3 (BAP + 3,5 mg/L) con un valor de 2,00, y T1 (BAP + 0,5 mg/L) con un valor de 1,96.

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla 11), se encontró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos empleando el regulador de crecimiento BAP bajo tres concentraciones diferentes.

Tabla 11. Análisis de varianza para altura de los explantes de *Bertholletia excelsa*

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | F calculado | P-valor | Significancia |
|------------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------|---------|---------------|
| Nivel de concentración | 2 | 0,009 | 0,00444 | 0,037 | 0,964 | ns |
| Error | 27 | 3,263 | 0,12083 | | | |

ns = No significativo, *** = Altamente significativo, * = Significativo

4.3. Efecto del regulador de crecimiento kinetina

4.3.1. Número de hojas

La Tabla 12 y Figura 11 presenta los promedios de números de hojas resultantes de cada tratamiento, evaluados durante un período de hasta 45 días, previo al proceso se procedió a realizar la transformación de los datos $\sqrt{(x+1)}$.

Tabla 12. Promedio de número de hojas por tratamiento

| Tratamiento | Combinación | N° de explantes | Promedio |
|-------------|----------------|-----------------|----------|
| T4 | KIN + 0,5 mg/L | 30 | 1,99 |
| T5 | KIN + 1,5 mg/L | 30 | 1,95 |
| T6 | KIN + 3,5 mg/L | 30 | 1,87 |

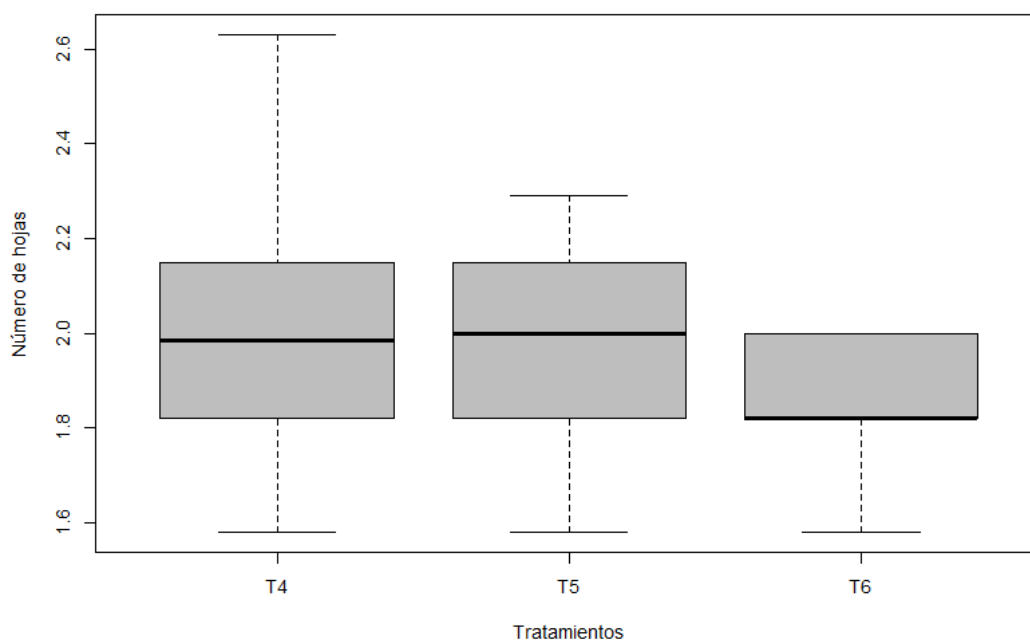


Figura 11. Promedio de número de hojas

La Tabla 12 y Figura 11, presenta los resultados de tres tratamientos (T4, T5, T6) aplicados a explantes bajo diferentes condiciones de combinación de KIN y concentraciones específicas. Cada tratamiento se llevó a cabo en 30 explantes, y los valores promedio se registraron como medida

representativa. Los tratamientos exhiben diferencias numéricas en los valores promedio, siendo T4 (KIN + 0,5 mg/L) el que presenta el valor más alto (1,99), seguido por T5 (KIN + 1,5 mg/L) con un valor de 1,95, y T6 (KIN + 3,5 mg/L) con un valor de 1,87. Estas variaciones sugieren posibles efectos diferenciados en los explantes.

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla 13), se encontró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos empleando el regulador de crecimiento KIN bajo tres concentraciones diferentes.

Tabla 13. Análisis de varianza para número de hojas de *Bertholletia excelsa*

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | F calculado | P-valor | Significancia |
|------------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------|---------|---------------|
| Nivel de concentración | 2 | 0,0886 | 0,04430 | 0,699 | 0,506 | ns |
| Error | 27 | 1,7107 | 0,06336 | | | |

ns = No significativo, *** = Altamente significativo, * = Significativo

4.3.2. Número de nudos

La Tabla 14 y la Figura 12 presenta los promedios de números de nudos resultantes de cada tratamiento, evaluados durante un período de hasta 45 días, previo al proceso de análisis se procedió a realizar la transformación de los datos $\sqrt{(x+1)}$.

Tabla 14. Promedio de número de nudos por tratamiento

| Tratamiento | Combinación | N° de explantes | Promedio |
|-------------|----------------|-----------------|----------|
| T4 | KIN + 0,5 mg/L | 30 | 2,23 |
| T5 | KIN + 1,5 mg/L | 30 | 2,46 |
| T6 | KIN + 3,5 mg/L | 30 | 2,77 |

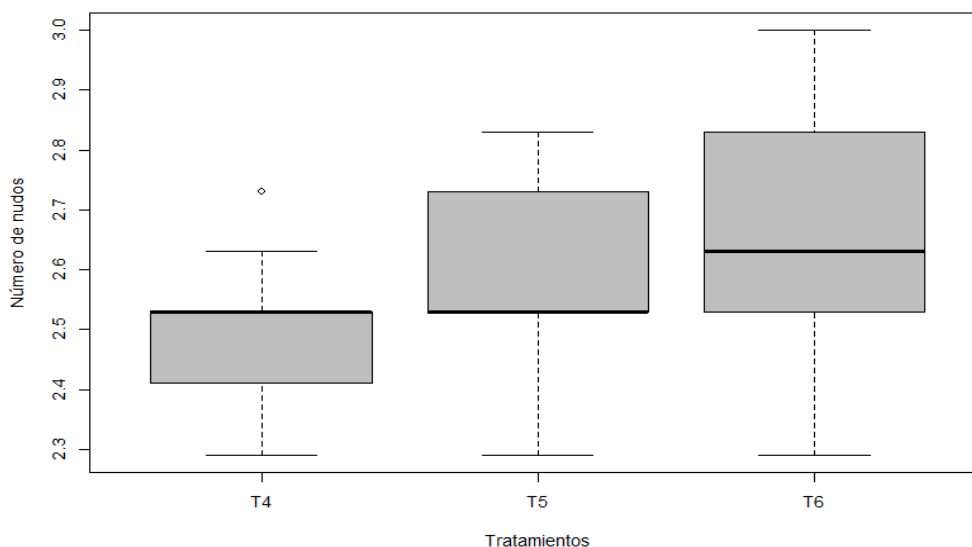


Figura 12. Promedio de número de nudos por tratamiento

La Tabla 14 y Figura 12, presenta los resultados de tres tratamientos (T4, T5, T6) aplicados a explantes bajo diferentes condiciones de combinación de KIN y concentraciones específicas. Cada tratamiento se llevó a cabo en 30 explantes, y los valores promedio se registraron como medida representativa. Los tratamientos exhiben diferencias numéricas en los valores promedio, siendo T6 (KIN + 3,5 mg/L) el que presenta el valor más alto (2,77), seguido por T5 (KIN + 1,5 mg/L) con un valor de 2,46, y T4 (KIN + 0,5 mg/L) con un valor de 2,23.

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla 15), se encontró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos empleando el regulador de crecimiento KIN bajo tres concentraciones diferentes.

Tabla 15. Análisis de varianza para número de nudos de *Bertholletia excelsa*

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | F calculado | P-valor | Significancia |
|------------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------|---------|---------------|
| Nivel de concentración | 2 | 1,434 | 0,7170 | 2,408 | 0,109 | ns |
| Error | 27 | 8,039 | 0,2977 | | | |

ns = No significativo, *** = Altamente significativo, * = Significativo

4.3.3. Altura de explantes de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

En la Tabla 16 y Figura 13, se muestra los valores promedios de altura de explantes de castaña por cada uno de los tratamientos evaluados durante un período de hasta 45 días.

Tabla 16. Promedio de altura por tratamiento de *Bertholletia excelsa*

| Tratamiento | Combinación | N° de explantes | Promedio |
|-------------|----------------|-----------------|----------|
| T4 | KIN + 0,5 mg/L | 30 | 1,82 |
| T5 | KIN + 1,5 mg/L | 30 | 2,12 |
| T6 | KIN + 3,5 mg/L | 30 | 1,99 |

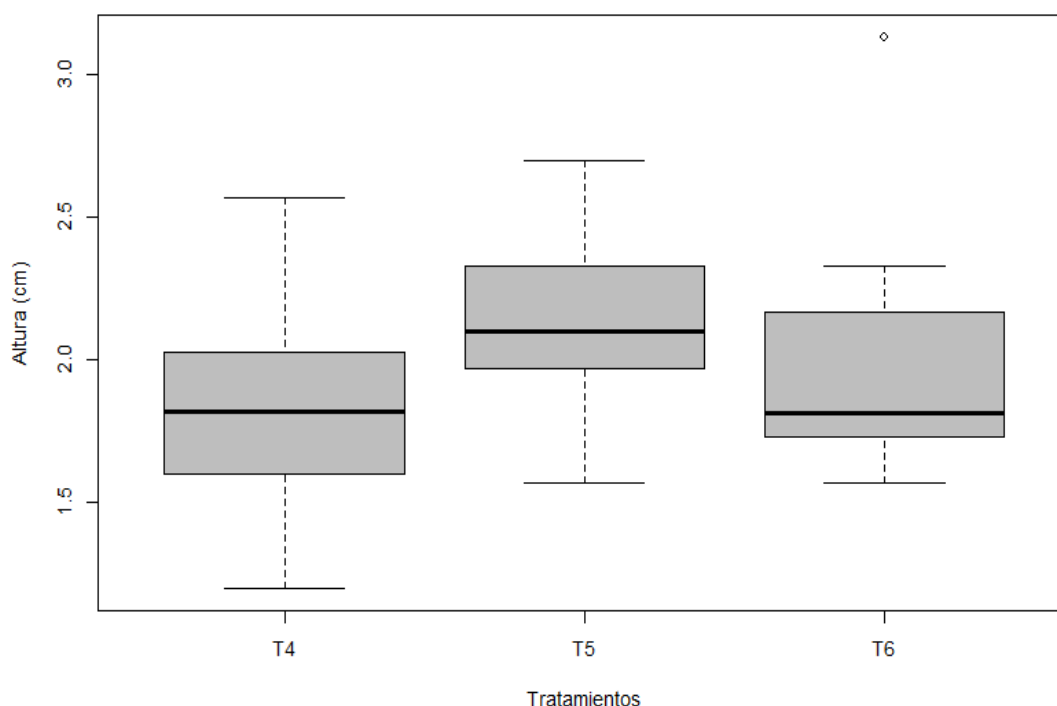


Figura 13. Promedio de altura por tratamiento de los explantes de castaña. La Tabla 16 y Figura 13, presenta los resultados de tres tratamientos (T4, T5, T6) aplicados a explantes bajo diferentes condiciones de combinación de KIN y concentraciones específicas. Cada tratamiento se llevó a cabo en 30 explantes, y los valores promedio se registraron como medida

representativa. Los tratamientos exhiben diferencias numéricas en los valores promedio, siendo T5 (KIN + 1,5 mg/L) el que presenta el valor más alto (2,12), seguido por T6 (KIN + 3,5 mg/L) con un valor de 1,99, y T4 (KIN + 0,5 mg/L) con un valor de 1,82.

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla 17), muestra que no existe diferencias significativas entre los tratamientos empleando el regulador de crecimiento KIN bajo tres concentraciones diferentes.

Tabla 17. Análisis de varianza para altura de los explantes de *Bertholletia excelsa*

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | F calculado | P-valor | Significancia |
|------------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------|---------|---------------|
| Nivel de concentración | 2 | 0,448 | 0,2240 | 1,426 | 0,258 | ns |
| Error | 27 | 4,241 | 0,1571 | | | |

ns = No significativo, *** = Altamente significativo, * = Significativo

4.4. Efecto de la interacción de los reguladores de crecimiento

4.4.1. Número de hojas

La Tabla 18 presenta los promedios de números de hojas resultantes de cada tratamiento, evaluados durante un período de hasta 45 días, previo al proceso se procedió a realizar la transformación de los datos $\sqrt{(x+1)}$.

Tabla 18. Promedio de número de hojas por tratamiento

| Tratamiento | Combinación | N° de explantes | Promedio |
|-------------|----------------|-----------------|----------|
| T1 | BAP + 0,5 mg/L | 30 | 2,12 |
| T2 | BAP + 1,5 mg/L | 30 | 2,21 |
| T3 | BAP + 3,5 mg/L | 30 | 2,15 |
| T4 | KIN + 0,5 mg/L | 30 | 1,99 |
| T5 | KIN + 1,5 mg/L | 30 | 1,95 |
| T6 | KIN + 3,5 mg/L | 30 | 1,87 |

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla 19), se identificó que existe diferencias significativas en los reguladores de crecimiento utilizados.

Por otra parte, no hubo diferencias significativas para el factor niveles de concentración de reguladores de crecimiento y su interacción.

Tabla 19. Análisis de varianza para número de hojas de *Bertholletia excelsa*

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | F calculado | P-valor | Significancia |
|---|--------------------|-------------------|------------------|-------------|---------|---------------|
| Regulador de crecimiento | 1 | 0,717 | 0,7172 | 10,846 | 0,00175 | *** |
| Nivel de concentración | 2 | 0,060 | 0,0302 | 0,457 | 0,63592 | ns |
| Regulador de crecimiento x Nivel de concentración | 2 | 0,074 | 0,0370 | 0,560 | 0,57469 | ns |
| Error | 54 | 3,571 | 0,0661 | | | |

ns = No significativo, *** = Altamente significativo, * = Significativo

En la comparación de promedios de número de hojas (Tabla 20 y Figura 14), se observó que los reguladores BAP a una concentración de 1,5 mg/L mostró un mejor efecto en el desarrollo de hojas con un promedio de 2,21 hojas, mientras el regulador de crecimiento KIN a una concentración de 3,5mg/L solo obtuvo un promedio de 1,87 hojas.

Tabla 20. Pruebas de comparación de medias (tukey) para los tratamientos con respecto al número de hojas

| Tratamiento | Promedios (hojas) | Grupos |
|-------------|-------------------|--------|
| T2 | 2,21 | a |
| T3 | 2,15 | ab |
| T1 | 2,12 | ab |
| T4 | 1,99 | ab |
| T5 | 1,95 | ab |
| T6 | 1,87 | b |

Sin embargo, Rafael (2023) en su estudio sobre micropropagación de *Bertholletia excelsa* Bonpl., logró obtener con un promedio de 2,01 hojas al aplicar 3mg/L de BAP. Mientras, Campos et al. (2020) en su investigación sobre la micropropagación *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King logró obtener un promedio de 5,40 hojas por explante al emplear 0,5 ppm de BAP. Sumado a ello, Indacochea et al. (2018) desarrollo estudios de cultivo *in vitro* para tres especies forestales: *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii* obteniendo un promedio de 2,45; 2,60 y 2,60 hojas por explante para cada especie al aplicar 2 mg/L de BAP + 1 mg/L ANA. A continuación, Delgado y Hoyos (2016) logro 0,6 brotes de hojas por plántulas al emplear 3 mg/L de BAP aplicados en *Aniba perutilis* Hemsl. Asimismo, Huamán (2014), logro obtener 3,46 hojas por explantes al utilizar 1 mg/L de BAP aplicado en *Cedrela Odorata* L. Seguidamente, Carranza et al. (2013), logro obtener 70% de explante con presencia de brotes al aplicar 2mg/L de BAP para la especie *Swietenia macrophylla* King.

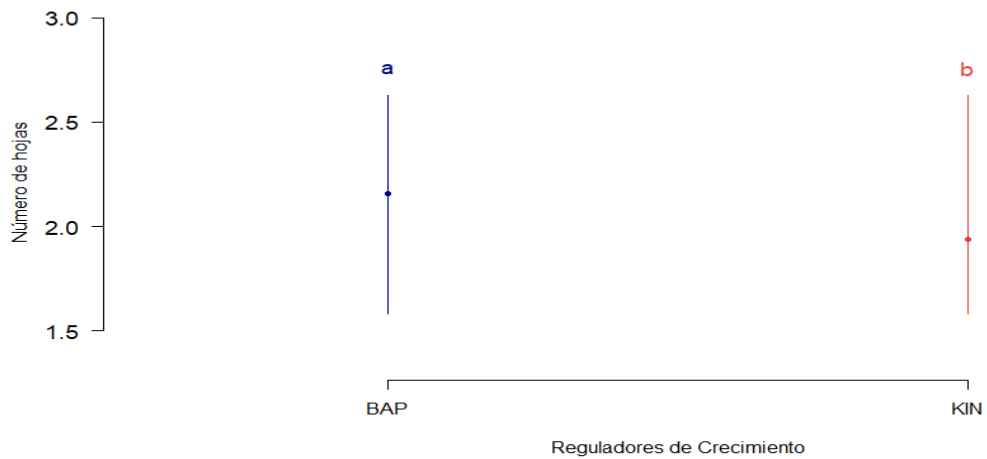


Figura 14. Promedio de número de hojas respecto a los reguladores de crecimiento

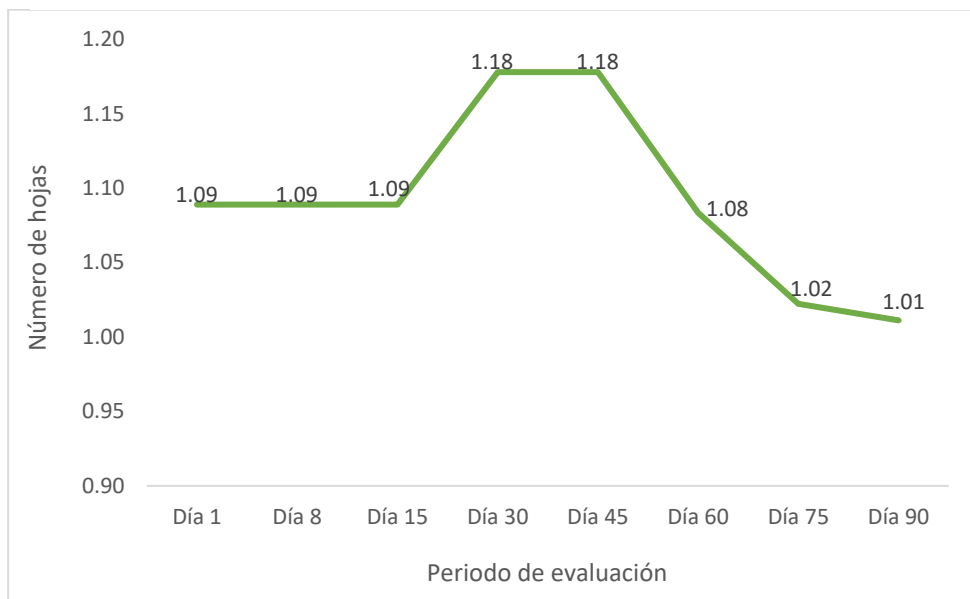


Figura 15. Curva de crecimiento de hojas

La Figura 15 muestra comportamiento en la producción de hojas. A partir de los 15 días se inició la fase de crecimiento exponencial hasta aproximadamente los 45 días, donde se produjo un aumento acelerado en la producción de hojas. A partir de los 30 hasta los 45 días se presentó una fase de crecimiento lineal. Después de los 45 días, la producción de hojas cesó y comenzó un decrecimiento brusco, lo cual pudo ser causado por el estado fisiológico y/o fitosanitario de los explantes.

4.4.2. Número de nudos

La Tabla 21 presenta los promedios de números de nudos resultantes de cada tratamiento, evaluados durante un período de hasta 45 días, previo al proceso de análisis se procedió a realizar la transformación de los datos $\sqrt{(x+1)}$.

Tabla 21. Promedio de número de nudos por tratamiento

| Tratamiento | Combinación | N° de explantes | Promedio |
|-------------|----------------|-----------------|----------|
| T1 | BAP + 0,5 mg/L | 30 | 2,067 |
| T2 | BAP + 1,5 mg/L | 30 | 2,300 |
| T3 | BAP + 3,5 mg/L | 30 | 2,168 |
| T4 | KIN + 0,5 mg/L | 30 | 2,233 |
| T5 | KIN + 1,5 mg/L | 30 | 2,465 |
| T6 | KIN + 3,5 mg/L | 30 | 2,767 |

Conforme al análisis de varianza (Tabla 22), se identificó que existen diferencias significativas en los reguladores de crecimiento.

Por otra parte, no hubo diferencias significativas para el factor niveles de concentración de reguladores de crecimiento y la interacción entre sí.

Tabla 22. Análisis de varianza para número de nudos de *Bertholletia excelsa*

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | F calculado | P-valor | Significancia |
|---|--------------------|-------------------|------------------|-------------|---------|---------------|
| Regulador de crecimiento | 1 | 1,441 | 1,4415 | 5,513 | 0,0226 | * |
| Nivel de concentración | 2 | 1,081 | 0,5403 | 2,066 | 0,1365 | ns |
| Regulador de crecimiento x Nivel de concentración | 2 | 0,626 | 0,3132 | 1,198 | 0,3097 | ns |
| Error | 54 | 14,119 | 0,2615 | | | |

ns = No significativo, *** = Altamente significativo, * = Significativo

En la comparación de promedios de producción de nudos (Tabla 23 y Figura 16), se observó que los reguladores KIN a una concentración de 3,5 mg/L (T6) mostró un mejor efecto en el desarrollo de nudos con un promedio de 2,77 nudos, mientras el regulador de crecimiento BAP a una concentración de 0,5mg/L (T1) solo obtuvo un promedio de 2,07 nudos.

Tabla 23. Prueba de comparación de medias (tukey) para los tratamientos con respecto al número de nudos

| Tratamiento | Promedios | Grupos |
|-------------|-----------|--------|
| T6 | 2,77 | a |
| T5 | 2,46 | ab |
| T2 | 2,30 | ab |
| T4 | 2,23 | ab |
| T3 | 2,17 | ab |
| T1 | 2,07 | b |

Rafael (2023) logro una respuesta por debajo al presente estudio, obteniendo 2,68 nudos por explante al emplear 3 mg/L de BAP en la micropropagación de *Bertholletia excelsa* Bonpl. Seguidamente Huamán (2014) en su estudio de propagación *in vitro* de *Cedrela odorata* L., logro obtener 2,69 nudos por explantes al aplicar 2 mg/L de BAP.

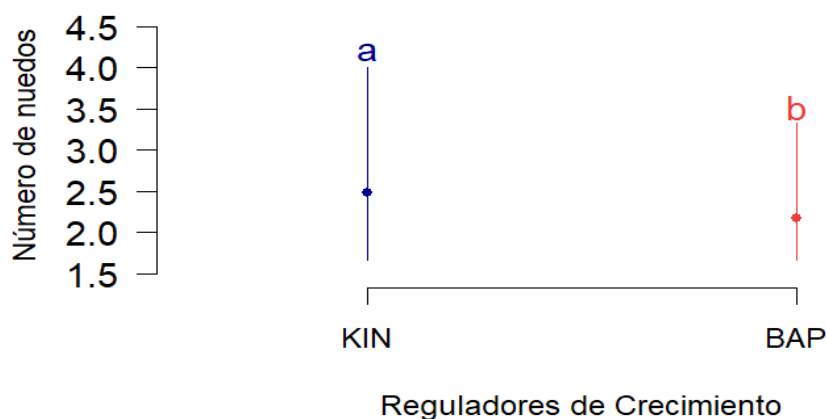


Figura 16. Promedio de número de nudos con respecto a los reguladores de crecimiento

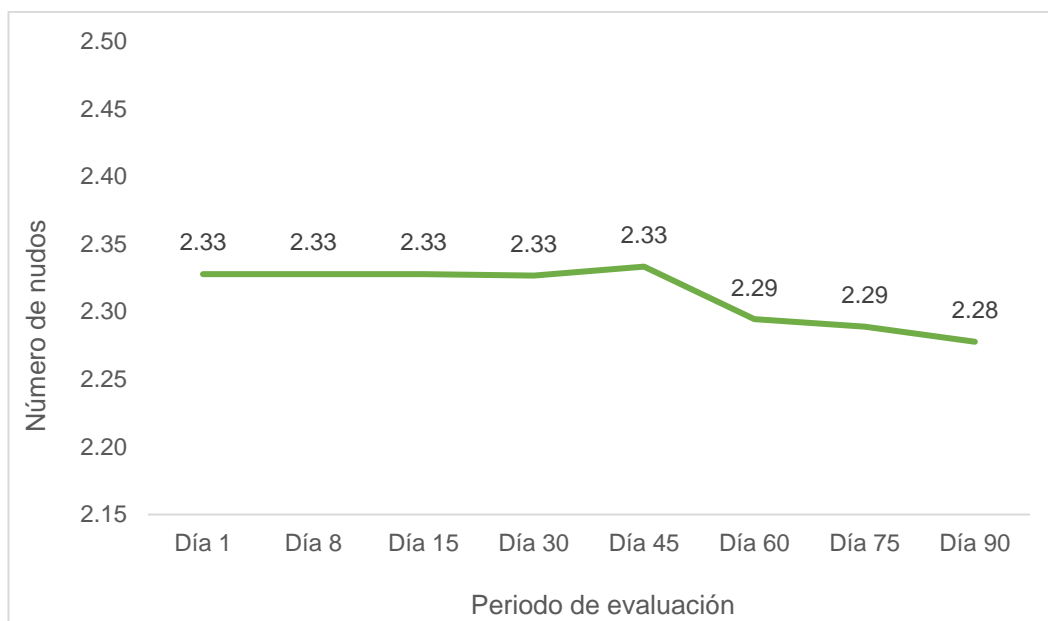


Figura 17. Curva de crecimiento para nudos

De acuerdo a la Figura 17, a partir del día 1 hasta los 45 días se observa una fase de crecimiento lineal, después de los 45 días la producción de nudos cesó y comenzó un decrecimiento brusco, lo cual pudo ser causado por el estado fisiológico y/o fitosanitario de los explantes.

4.4.3. Altura de explantes de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

En la Tabla 24, se muestra los valores promedios de altura de castaña por cada uno de los tratamientos evaluados.

Tabla 24. Promedio de altura por tratamiento de *Bertholletia excelsa*

| Tratamiento | Combinación | N° de explantes | Promedio |
|-------------|----------------|-----------------|----------|
| T1 | BAP + 0,5 mg/L | 30 | 1,96 |
| T2 | BAP + 1,5 mg/L | 30 | 2,00 |
| T3 | BAP + 3,5 mg/L | 30 | 2,00 |
| T4 | KIN + 0,5 mg/L | 30 | 1,82 |
| T5 | KIN + 1,5 mg/L | 30 | 2,12 |
| T6 | KIN + 3,5 mg/L | 30 | 1,99 |

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla 25), se encontró que no existen diferencia significativa al aplicar los reguladores de crecimiento BAP y KIN, así como también no existe diferencias significativas en los niveles de concentración, así como, su interacción entre regulador de crecimiento y los niveles de concentración.

Tabla 25. Análisis de varianza para altura de los explantes de *Bertholletia excelsa*

| Fuentes de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Cuadrados medios | F calculado | P-valor | Significancia |
|---|--------------------|-------------------|------------------|-------------|---------|---------------|
| Regulador de crecimiento | 1 | 0,002 | 0,00171 | 0,012 | 0,912 | ns |
| Nivel de concentración | 2 | 0,285 | 0,14262 | 1,026 | 0,365 | ns |
| Regulador de crecimiento x Nivel de concentración | 2 | 0,172 | 0,08585 | 0,618 | 0,543 | ns |
| Error | 54 | 7,504 | 0,13896 | | | |

ns = No significativo, *** = Altamente significativo, * = Significativo

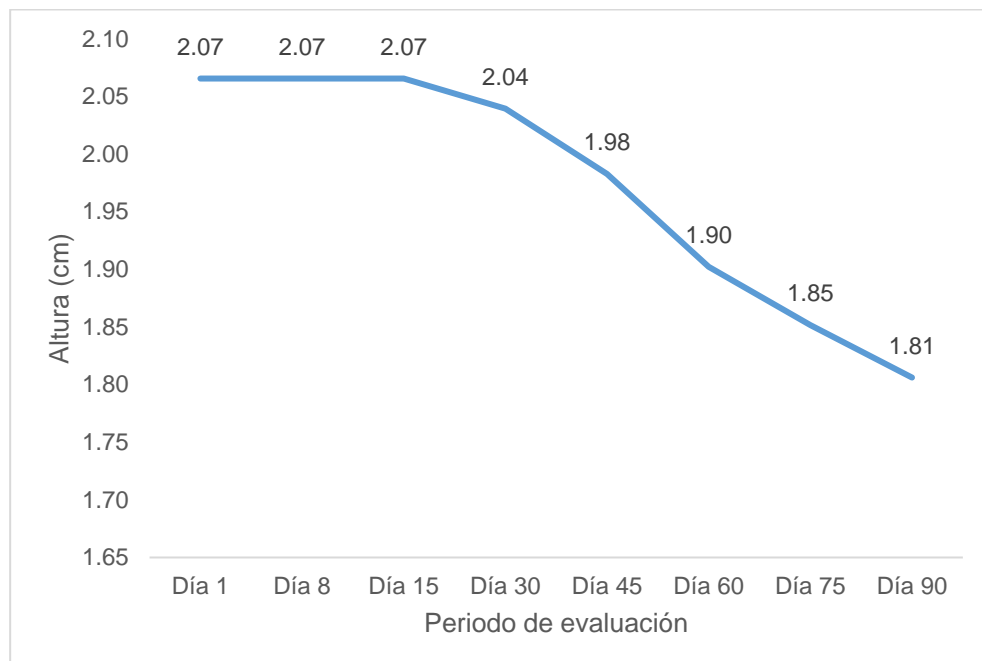


Figura 18. Curva de crecimiento de altura de los explantes de *Bertholletia excelsa*.

Cabe comentar, a partir del día 1 hasta el día 15 se observa un crecimiento lineal, después de los 15 días, el crecimiento de altura de los explantes cesó y comenzó un decrecimiento brusco, lo cual pudo ser causado por el estado fisiológico y/o fitosanitario; se muestra la curva de crecimiento para tener una referencia del comportamiento del explante a condiciones *in vitro*.

Podemos decir que el tratamiento cinco (T5) obtuvo una altura promedio de 2,12 cm al aplicar 1,5 mg/L de KIN. Estos resultados son superiores a lo obtenido por Rafael (2023), logrando 2,43 cm de altura al aplicar 3 mg/L de BAP a yemas terminales de *Bertholletia excelsa*. Campos et al. (2020) obtuvo una altura de promedio de 8 mm al aplicar 1 mg/L de BAP en *Persea americana*, Indacochea et al. (2018) en su investigación de micropropagación de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y *Tabebuia billbergii* logro una longitud promedio por explante de 0,16cm, 18 cm y 17 cm de altura respectivamente al aplicar 2mg/L de BAP; por otro lado, Delgado y Hoyos (2016) en su estudio de multiplicación clonal *in vitro* de *Aniba pertilis* Hemsl, logro obtener una longitud de promedio de 0,82 cm; otros estudios desarrollado por Huamán (2014) en su estudio de propagación *in vitro* de *Cedrela odorata* L., obtuvo 4,34 cm altura promedio de los explantes al utilizar 0,5 mg/L de BAP. Seguidamente en un estudio desarrollado por Carranza et al. (2013) desarrollo la micropropagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* obteniendo una media de 0,17 cm de longitud al aplicar 2 mg/L de BAP.

4.4.4. Fenolización de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

Durante el proceso de acondicionamiento del explantes a condiciones *in vitro* los tejidos vegetales cortados principalmente las plantas leñosas, excretan compuestos fenólicos oxidados, presenta un pardeamiento alrededor de la superficie de corte del tejido. En la Figura 19 presenta el porcentaje de niveles de fenolización respecto a los periodos de evaluación, obteniendo 20,56% de explantes libre de fenolización, 42,78% de explantes con presencia de fenolización leve, 14,44% con presencia de fenolización media y por ultimo 22,22% explante con fenolización alta

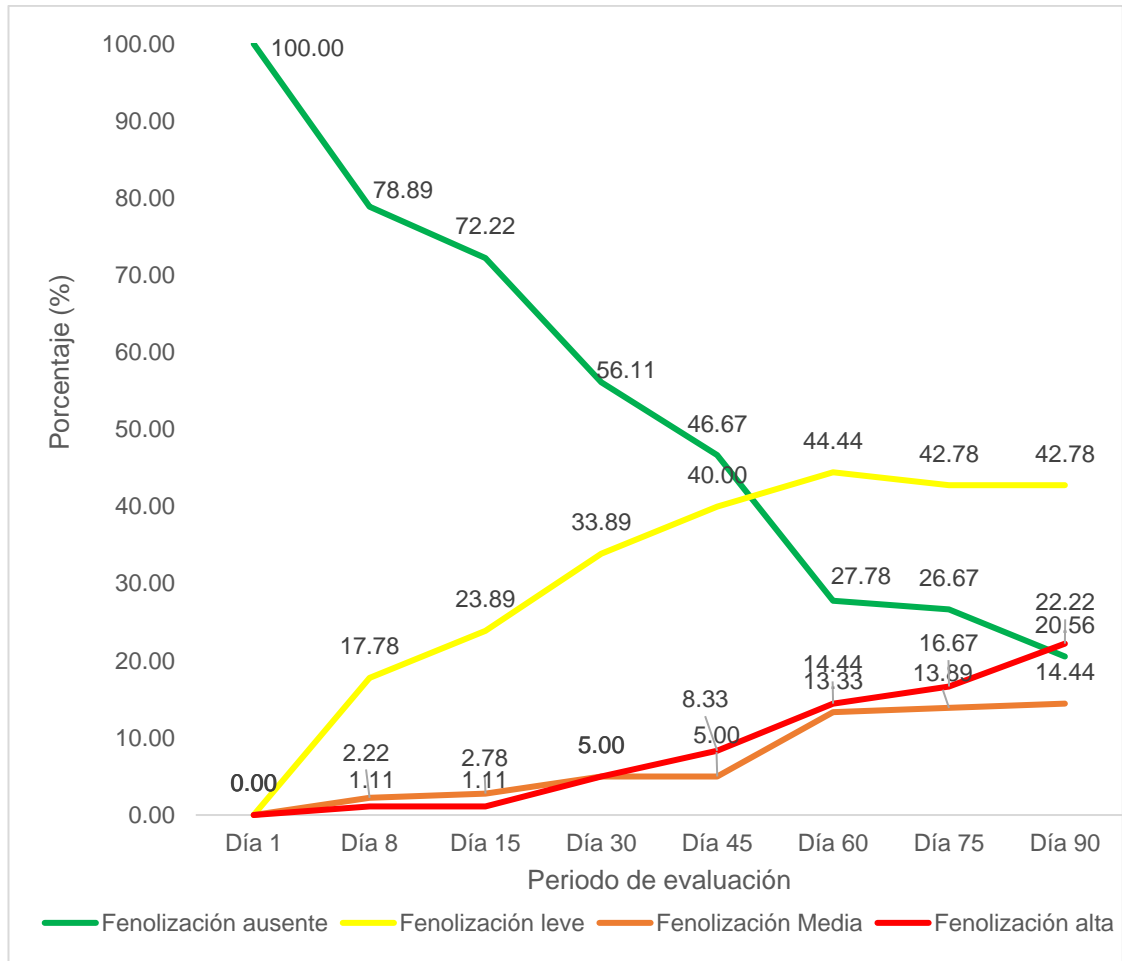


Figura 19. Porcentaje de explantes fenolizados

Cabe mencionar, Alonso et al. (2020) en su estudio de establecimiento *in vitro* de *Persea americana*, logro obtener una oxidación de 7,31% al emplear ácido ascórbico y ácido cítrico. El estudio de Campos et al. (2020) señala que varios investigadores han logrado utilizar con éxito el cloro en material vegetal donde la contaminación y la fenolización del tejido representan desafíos para el establecimiento de los explantes. Esto se debe a que han logrado encontrar un equilibrio en el efecto del cloro como agente controlador de contaminantes sin que cause daño a los tejidos. Indacochea et al. (2018) sobre el cultivo *in vitro* de *Tabebuia crhyantha* y *Tabebuia billbergii* identificó que se produjo oxidación en los medios de cultivo afectando a todos los explantes desinfectados. Además, se observó una significativa pérdida de material vegetal, ya que esta oxidación inhibió su crecimiento y, en última instancia, condujo a la muerte de los explantes.

4.4.5. Necrosis de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

En general, la Figura 20 muestra el porcentaje de necrosis, donde se ha obtenido una necrosis alta de 0,56%, seguido de la necrosis media con 1,11%, finalmente se evidencio un 26,67% de necrosis leve. Es decir, que el 28,33% de los explante presenta necrosis y el 71,67% de los explante están libres de necrosis.

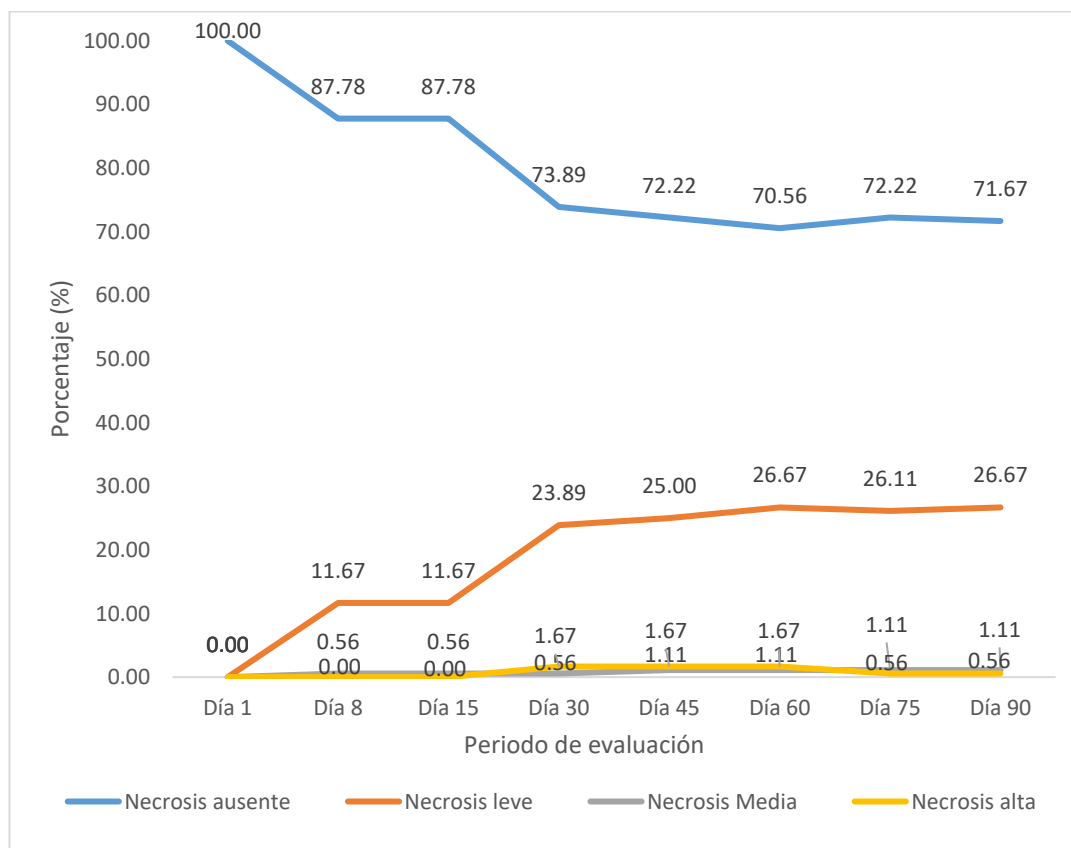


Figura 20. Porcentaje de explante necrosados de *Bertholletia excelsa* INIA 2019, la necrosis se refiere a las lesiones oscuras que se forman debido a la presencia de células muertas y a la oxidación de compuestos fenólicos. Este proceso es catalizado por la enzima polifenol oxidasa, que genera quinonas, que son sustancias químicas altamente reactivas y expuestas a causar daño e incluso la muerte de las células. Campos et al. (2020), en su estudio de cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King, obtuvo explantes asépticos de 0% pero al mismo tiempo presentan una elevada necrosis de 53,33% al aplicar $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ por 20 min. Indacochea et al. (2018), en su estudio de cultivo *in vitro* de *Myroxylon balsamum*, *Tabebuia crhysantha* y

Tabebuia billbergii obtuvo una asepsia de 90%, 87% y 88%, sin embargo, en estas especies se observó gran pérdida de material por necrosis. Según Delgado y Hoyos (2016), la necrosis tiene el efecto de inhibir la capacidad de las células para desarrollarse de manera normal y puede resultar en una falta de respuesta en el desarrollo del explante. En algunos casos, un alto nivel de necrosis puede llevar a la muerte de los explantes.

Rivero (2016) en su ensayo N°1 sobre multiplicación de yemas y el ensayo N°2 sobre callogenesis en hojas de *Cedrelinga cateniformis* Ducke, obtuvo el 2% de explantes con presencia de necrosis. Seguidamente, realizó un tercer ensayo sobre protocolo de desinfección combinatorio, es decir, aplicar ciertas concentraciones de un fungicida sistémico (benomil) al medio de cultivo (MS), obteniendo un 30% de necrosis, esto debido a que contenían mayor concentración de fungicida, podemos decir que los explantes de tornillo no soportan cuantiosas concentraciones de fungicida. Carranza et al. (2013) en su estudio sobre propagación *in vitro* para *Swietenia macrophylla* King, obtuvo explantes libre de necrosis, esto al aplicar 10 g Ca(ClO)₂ por 15 min, así como también 15 g Ca(ClO)₂ por 20 min.

4.4.6. Defoliación de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

La Figura 21, muestra los porcentajes de defoliación obtenidos durante el periodo de evaluación hasta los 90 días, registrado una ausencia de defoliación de categoría alta y media, pero existe un 16,11% de defoliación leve. Haciendo una síntesis, de los explantes establecidos el 83,89% de los explantes presenta ausencia de defoliación.

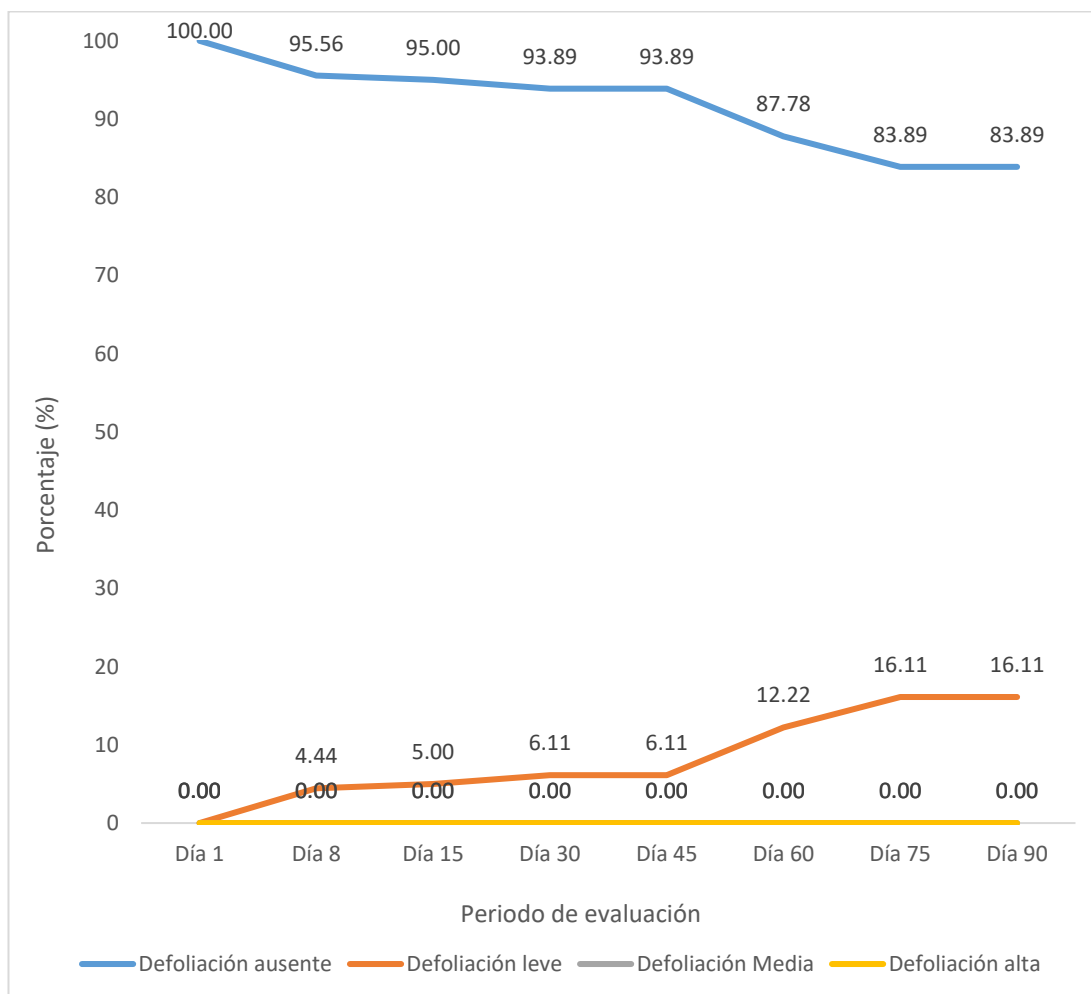


Figura 21. Porcentaje de explantes con presencia de defoliación de *Bertholletia excelsa*

El INIA (2019) explica que la defoliación se refiere al amarillamiento y caída de hojas en los cultivos. Este fenómeno puede ser causado por varios factores, como enfermedades, agentes químicos o una deficiencia de hierro en el medio nutritivo. Es importante retirar los cultivos antes de que experimenten una defoliación completa.

4.4.7. Callo en *Bertholletia excelsa* Bonpl.

Como puede observarse en la Figura 22, a partir de los 30 días empieza a generar callos en la parte basal de los explantes, obteniendo un 13,33% de explantes con presencia de callos al emplear 0,5 mg/L de ANA

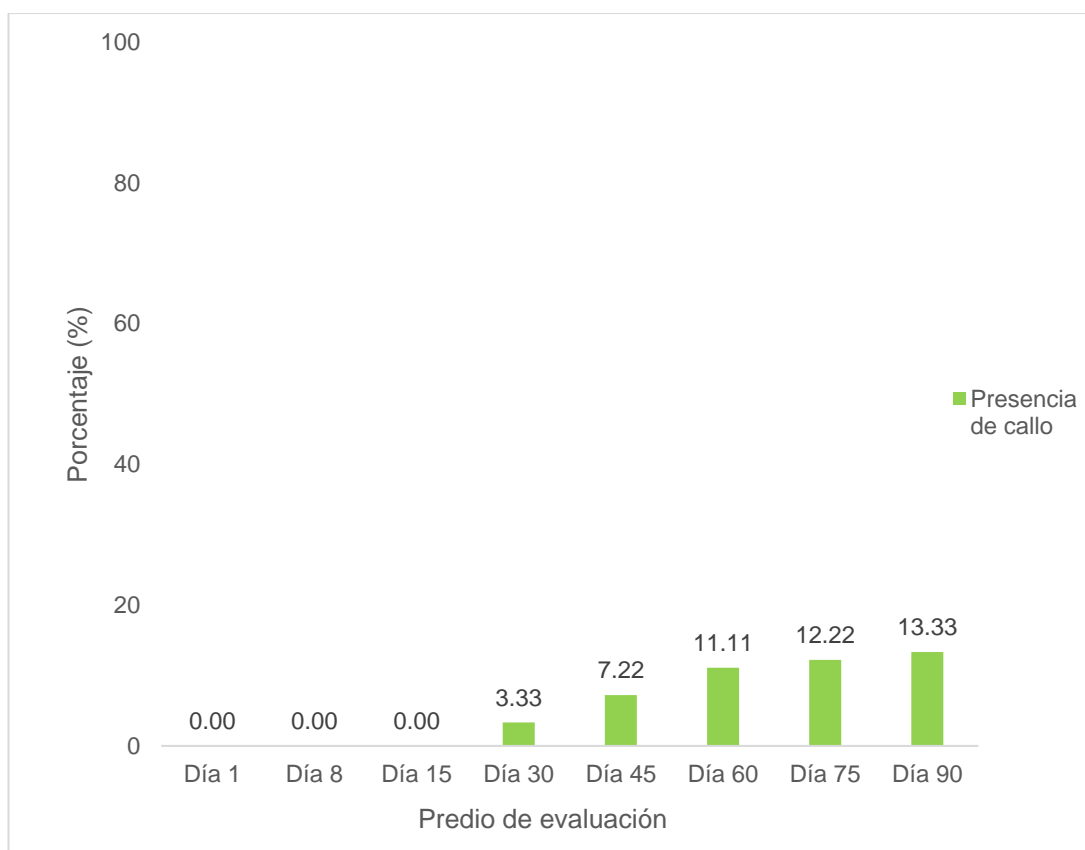


Figura 22. Porcentaje de presencia de callo en explantes de *Bertholletia excelsa*

Indacochea et al. (2018) en su estudio de cultivo *in vitro* de *Tabebuia crhysantha*, obtuvo presencia de callos de 45% en lugar de brotes, al emplear 2 mg/L BAP + 1 mg/L de ANA. Rivero (2016) en su estudio de propagación *in vitro* de *Cedrelinga cateniformis* Ducke, en su ensayo N°1, obtuvo 100% de presencia de callo al utilizar MS con 1,4 mg/L de Kinetina y 1,05 mg/L de ANA, así como también, MS con 1,75 mg/L de Kinetina y 1,75 mg/L de ANA. En su ensayo N°5, obtuvo 100% de presencia de callo al emplear 1,05 mg/L de Kinetina y 0,35 mg/L de ANA, así como también, 2,45 mg/L de Kinetina y 1,05 mg/L de ANA.

CONCLUSIONES

- En conclusión, el cultivo *in vitro* de *Bertholletia excelsa* Bonpl. resalta su importancia socioeconómica y ecológica en la región amazónica de Sudamérica. El empleo de citoquininas en el cultivo *in vitro* ha demostrado ser prometedor, con resultados significativos en la producción de hojas, formación de nudos y altura de los explantes. Además, el protocolo de desinfección aplicado ha sido efectivo en la reducción de la contaminación. Este estudio proporciona una herramienta valiosa para la conservación y el manejo sostenible de *Bertholletia excelsa*.
- El protocolo de desinfección aplicado en la etapa de establecimiento de los explantes de *Bertholletia excelsa* Bonpl. logró una desinfección efectiva del 58,6% al utilizar una solución de NaClO al 2,5% durante 10 minutos.
- En la etapa de multiplicación, se observó que tratamiento 2 (BAP + 1,5 mg/L) mostró un mejor efecto la producción de hojas de *Bertholletia excelsa* Bonpl.
- La aplicación del tratamiento 6 (KIN + 3,5 mg/L) permitió generar mayor número de nudos.
- No existe diferencias significativas en cuanto a la interacción de los reguladores de crecimiento, respecto a los niveles de concentración. Pero si existe diferencias entre la aplicación de los tipos de reguladores de crecimiento, por ende, se acepta la hipótesis alterna ya que existe diferencias significativas en el desarrollo de explantes aplicando citoquininas para la multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* que permitirá la reproducción del material vegetal. Se acepta la hipótesis alterna ya que existe diferencias significativas en el desarrollo de explantes aplicando citoquininas para la multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* que permitirá la reproducción del material vegetal

SUGERENCIAS

- Para asegurar una desinfección eficaz de las yemas apicales de *Bertholletia excelsa* Bonpl., es esencial realizar un pretratamiento en invernadero a los plántones donadores de explantes.
- Se recomienda llevar a cabo investigaciones adicionales enfocadas en el desarrollo de protocolos de desinfección que equilibren eficazmente la eliminación de contaminantes sin causar daños al tejido vegetal.
- Se recomienda llevar a cabo una investigación enfocada en identificar los agentes contaminantes endógenos que afectan a la especie en estudio.
- Se sugiere la realización de investigaciones adicionales que exploren combinaciones de citoquininas y auxinas con el objetivo de promover una mayor proliferación de hojas y nudos en los explantes de *Bertholletia excelsa* Bonpl.
- Se recomienda llevar a cabo estudios orientados a reducir la incidencia de explantes fenolizados en el proceso de micropropagación vegetal.
- Desarrollar un protocolo completo para todas las etapas de la micropropagación vegetal (establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación) de plántulas de *Bertholletia excelsa* Bonpl., con el objetivo de abordar las brechas en la regeneración de esta especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, A., BELTRÁN, M., GELVEZ, J. Y MARTINEZ, J. (2020). Evaluación de dos protocolos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de portainjertos de aguacate (*Persea americana*) var. Criollo. Fomentando el desarrollo sostenible y la competitividad. II Simposio Nacional de Investigación en Ciencias Pecuarias y Agro empresariales del Magdalena. La Dorada (Caldas), Colombia.
- ASOCIACIÓN DE EXPORTADORES, Boletín semanal. 2019. pp.3. Lima.
- CALVA, G. y PÉREZ, J., 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria [en línea], vol. 6, no. 11, pp. 1-16. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a.htm%5CnResumen%5Cnhttp://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r102683.PDF>.
- CAMPOS, J., ARTEAGA M Y CAMPOS, S. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación *in vitro* de “caoba” *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Arnaldoa*, 27 (1), 141-156.
- CARRANZA, M., REYES, H., MORAN, W., CEVALLOS, O., ESCOBAR., CADME, M., NIETO, J Y MORANTE, J. (2013). Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (CAOBA). *Ciencia y Tecnología*, 6 (2),1-8. Doi: 10.18779/cyt.v6i2.133.
- CARRASCO, J., 2017. Curso Taller: Conducta Responsable en la Investigación Científica para Docentes de la UNJFSC. *Incresciendo* [en línea], no. 1, pp. 30-40. Disponible en: <http://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/aprueban-el-reglamento-de-calificacion-y-registro-de-invest-resolucion-n-198-2017-concytec-p-1602543-1/>.
- CASTILLO, A., 2020. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*.
- CASTRO, I., ALVES, O. y DE ASSIS, F., 2016. Enraizamiento de estacas

juveniles de *Bertholletia excelsa* Bonpl. con diferentes concentraciones de ácido indol-butírico. *Agrociencia*, pp. 227-238.

ERTOLA, H. y JIMENEZ, D., 1998. Cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemistry* [en línea], vol. 4, no. 3, pp. 28-42. Disponible en:

http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4__Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6.

CORVERA, G.R., 2014. Servicio para la integración de la información del estado actual de la diversidad biológica y genética de la castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) en el Perú. Puerto Maldonado - Madre de Dios.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. Un esquema para la propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo de tejidos. *Scientia horticultrae*, 1981, vol. 14, nº 4, pág. 335-345.

DELGADO, L., Y HOYOS, R. (2016). Multiplicación clonal *in vivo* e *in vitro* de la especie forestal nativa *Aniba perutilis* Hemsl.. *Acta Agronómica* , 65 (2),190-196. doi: 10.15446/acag.v65n2.42808.

DUEÑAS, H Y NIETO, C. (2010). "Estudio y caracterización dendrológica de las principales especies forestales de la amazonía peruana. Puerto Maldonado. Perú. Alfa Servicios Gráficos. 244p.

GEORGE, E., SHERRINGTON, P. (1984). Propagación de plantas por cultivo de tejidos. Eversley, G. B. Exegética. pp 709.

GEORGE E, SOMERSET, HALL, M AND DE KLERK, G. (2007). *Planta Propagación por cultivo de tejidos. Los países bajos. Springer. 491p.*

GUARIGUATA, M.R. y ROCKWELL, C.A., 2015. La producción de castaña (*Bertholletia excelsa*) en el contexto de la extracción de madera en Madre de Dios, Perú: Implicaciones para promover un manejo integrado del bosque. [en línea], vol. 127, no. 127, pp. 8. DOI 10.17528/cifor/005747. Disponible en:

<http://www.cifor.org/library/5747/la-produccion-de-castana->

bertholletia-excelsa-en-el-contexto-de-la-extraccion-de-madera- en-
madre-de-dios-peru-implicaciones-para-promover-un-manejo-
integrado-del-bosque/.

HAYGERT-LENCINA, K., ANTÔNIO-BISOGNIN, D., KIELSE, P. Y PIMENTEL, N. (2017). Rooting and acclimatization of *Apuleia leiocarpa* plantlets. *Agrociencia*, 51 (8), 909-920.

HUAMÁN, G. (2014). Propagación in vitro de cedro (*Cedrela odorata* L.) vía organogénesis. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú.

HUISA MANOL, Hilario. Ensayo de propagación vegetativa de *Bertholletia excelsa* hbk" castaña" mediante enraizamiento de estaquillas en cámaras de subirrigación en la provincia de Tambopata, Madre de Dios-Perú. 2015.

INDACOCHEA, B., PARRALES, J., HERNÁNDEZ, A., CASTRO, C., VERA, M., ZHINDÓN, A., GABRIEL, J. (2018). Evaluación de medios de cultivo *in vitro* para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 63-89.

INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA. Manual de Conservación *in vitro* en el Banco de Germoplasma del INIA, 2019.

LLOYD, Gregory, et al. Micropropagación comercialmente factible de laurel de montaña, *Kalmia latifolia*, mediante el uso de cultivo de puntas de brotes. Micropropagación comercialmente factible de laurel de montaña, *Kalmia latifolia*, mediante el uso de cultivo de puntas de brotes., 1980, vol. 30, pág. 421-427.

MARTINEZ, et al. Propagación *in vitro* de *Sprekelia formosissima* Herbert., planta silvestre con potencial ornamental. *Revista fitotecnia mexicana*, 2010, vol. 33, no 3, p. 197-203.

MINISTERIO DEL AMBIENTE., 2014. La castaña amazónica regalo de la biodiversidad. Editorial. Lima: s.n.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2020. Tropicos | Name - *Bertholletia excelsa* Bonpl. Tropicos.org [en línea]. [Consulta: 18 octubre 2020]. Disponible en: <http://legacy.tropicos.org/Name/17900013>.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 1962, vol. 15, no 3, p. 473-497.

ORGANISMO DE SUPERVISIÓN DE LOS RECURSOS FORESTALES Y DE FAUNA SILVESTRE, O. de S. de los R.F. y de F.S., 2018. Aprovechamiento Forestal Maderable en Concesiones de Castaña [en línea]. Lima: s.n. ISBN 9786124761812. Disponible en: <https://www.osinfor.gob.pe/publicaciones/aprovechamiento-forestal-maderable-en-concesiones-de-castana/>.

RAMOS ROBLES, Luis Miguel. Influencia del régimen de perturbación de los bosques con castaña en la calidad de las semillas y el vigor de las plántulas de Castaña (*Bertholletia excelsa* HBK) en Madre De Dios, 2018.

RAFAEL QUILLE, Jose Luis. Efecto de los niveles de sacarosa y sales en la multiplicación *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) Puerto Maldonado – Madre de Dios – 2023.

REAÑO, P.W., 2018. Madre de Dios : Castañas para todo el mundo Los bosques de Madre de Dios podrían abastecer la demanda de un mercado mundial en crecimiento . Servicios en comunicación Intercultural - SERVINDI, pp. 1-9.

REYNEL, C., PENNINGTON, R.T., FLORES, C. y DAZA, A., 2011. Árboles útiles de la Amazonía Peruana y sus Usos. Lima: s.n.

RIVERO, J. (2016). Determinación de un protocolo para la regeneración *in vitro* de yemas y hojas de tornillo (*Cedrelinga cateniformis* Ducke (Ducke)). Tesis de pregrado. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María, Perú.

RODRIGUEZ, M., 2018. Cultivo *in vitro*: alternativa al cultivo tradicional de

plantas medicinales. Universidad Complutense [en línea], pp. 1-20. Disponible en: [http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MIGUEL RODRIGUEZ AMARO.pdf](http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MIGUEL%20RODRIGUEZ%20AMARO.pdf).

SANTOS, A., FERRERIRA, M Y CARVALHO, S. (2013). Callus induction in *Bertholletia excelsa* immature seeds. Journal of biotechnology and biodiversity, 4 (4), 283-89. doi: 10.20873/jbb.uft.cemaf.v4n4.santos.

VALERA TITO, J.F. y YUCRA SALAS, J.J., 2017. Evaluación del rol de los árboles semilleros en la regeneración de castaña (*Bertholletia excelsa* H.B.K) entres concesiones castañeras en el sector de Aleria-Tambopata-Madre de Dios.

VILLALOBOS, V Y THORPE, T (1984). La Micropropagación: Conceptos, metodologías y resultados. Fundamentos y aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura. Ed. por W. Roca. Cali - Colombia. CIAT. 127 - 140 p.

WETHERELL, D. (1982). Introduction to *in vitro* propagation. Wayne N. J. Avery Publishing Group. 87 p.

YASUDA, Takeshi; FUJII, Yoko; YAMAGUCHI, Tadashi. Inducción de callos embriogénicos a partir de explantes de hojas de *Coffea arabica* por benciladenina. Fisiología vegetal y celular, 1985, vol. 26, no 3, p. 595-597.

ANEXOS

ANEXO 1. Esquema metodológico de la investigación

a. Selección y colecta de material vegetal



b. Proceso de preparación de medio de cultivo.



c. Proceso de desinfección dentro de cabina de flujo laminar



d. Proceso de siembra de explantes a condiciones *in vitro*.



e. Material vegetal en cámara de incubación.

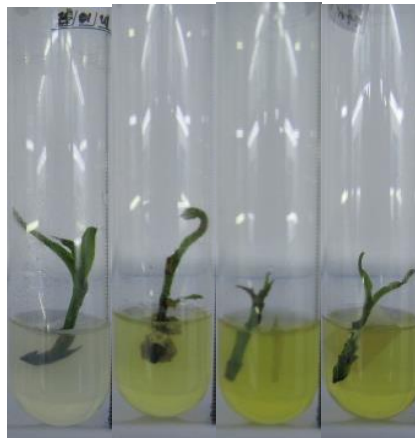


ANEXO 2. Resultados obtenidos por tratamiento

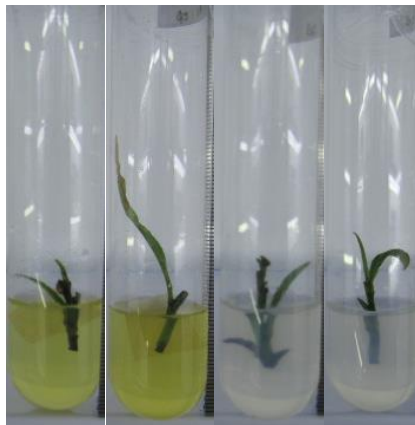
- Tratamiento 1: BAP 0,5 mg/L



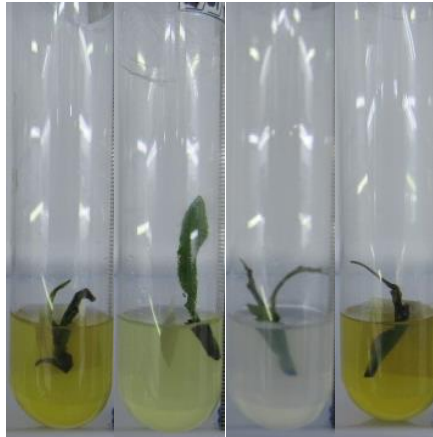
- Tratamiento 2: BAP 1,5 mg/L



- Tratamiento 3: BAP 3,5 mg/L



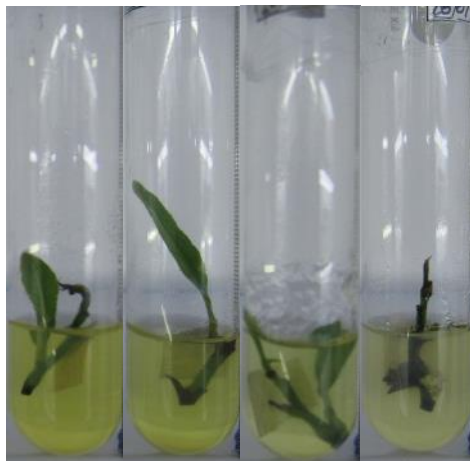
- Tratamiento 4: KIN 0,5 mg/L




- Tratamiento 5: KIN 1,5 mg/L




- Tratamiento 6: KIN 3,5 mg/L



Anexo 3: Constancia de identificación botánica de la especie ensayada.



UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZONICA DE MADRE DE DIOS
 Centro Investigación del Herbario Alwyn Gentry
 "Madre de Dios, Capital de la Biodiversidad del Perú"
 Año del Fortalecimiento de la soberanía Nacional



CONSTANCIA

En mi calidad de Director del Centro de Investigación Herbario "Alwyn Gentry" de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios,

HACE CONSTAR:

Que las muestras botánicas han sido presentadas en marco de la tesis de pregrado del Bach. **Wilson Omar Mogrovejo Montesino**. Titulado "EFECTO DE LA CITOQUININAS EN LA MULTIPLICACION IN VITRO DE *Bertholletia excelsa* Bonpl." para optar el título de Ingeniero Forestal en la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios.


El ejemplar ha sido entregado a la colección del herbario y constan de **01** especimen que proviene del sector Loboyoc, ubicado en la Provincia Tambopata, distrito Las Piedras, región Madre de Dios, Las cuales fueron verificadas e identificadas en este Centro de enseñanza e Investigación HAG-UNAMAD. A continuación, se adjunta el cuadro de información de la especie.

| N° | Código de Colecta | Nombre científico | Familia Segun APG IV (2016) | Coordenada UTM 19L |
|----|----------------------|------------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 1 | W. O Mogrovejo - 001 | <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. | Lecythidaceae | E-485085 N-8621206 |

Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que considere conveniente.

Puerto Maldonado, 17 de junio de 2022.

Atentamente



Ing. Safer Baez Quispe
 DIRECTOR DEL HERBARIO

Cc:
Archivo

Ciudad Universitaria – Puerto Maldonado – Madre de Dios
 Av. Jorge Chavez N° 1160

Anexo 4: Autorización de estudio.



GOBIERNO REGIONAL DE MADRE DE DIOS
GERENCIA REGIONAL DE RECURSOS NATURALES Y GESTIÓN DEL AMBIENTE
DIRECCIÓN REGIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE



"Año de la Lucha Contra la Impunidad y la Corrupción"
 "Madre de Dios Capital de la Biodiversidad Biológica"

RESOLUCIÓN DIRECTORAL REGIONAL N° 396 - 2019-GOREMAD-GRRNYGMA-DRFFS

Puerto Maldonado, **20 JUN 2019**

VISTO:

La solicitud de autorización con fines de investigación denominado "Micropropagación vegetal a partir de yemas terminales de árboles productivos de Castaña (*Bertholletia excelsa*) para la recuperación, conservación y aprovechamiento sostenible de sus bosques" Ingresado con expediente N°3737 fecha 04 de junio del 2019, presentado por el señor Herlis Iván Berru Correa, estudio que se realizara en la sede CITE Productivo Madre de Dios del ITP, ubicado en la Jr. Junín C-11 esquina con 15 de agosto del distrito y provincia de Tambopata – MDD, y;

El informe técnico N°025-2019-GOREMAD-GRRNYGMA-DRFFS/ECO-CON/brcr, de fecha 17 de junio del 2019, en el cual recomienda Aprobar mediante Resolución Directoral Regional la Autorización para realizar el estudio de presentado señor Herlis Iván Berru Correa, y;

CONSIDERANDO:

Que, el artículo 66° de la Constitución Política del Perú, define que los recursos naturales, renovables y no renovables, son patrimonio de la Nación y que el Estado es soberano en su aprovechamiento, añadiendo en su artículo 67° que además promueve el uso sostenible de los mismos;

Que, mediante la Resolución Ministerial N° 0301-2010-AG, se declara por concluido el proceso de efectivización de la transferencia de funciones en materia agraria correspondientes a los literales "e" y "q" del artículo 51° de la Ley N° 27867, del Gobierno Nacional al Gobierno Regional de Madre de Dios;

Que, el Gobierno Regional de Madre de Dios mediante Ordenanza Regional N° 007-2012-GRMDD/CR de fecha 18 de abril del 2012, aprobó los nuevos documentos de gestión institucional como el Reglamento de Organización y Funciones (ROF), que en su artículo 136° dispone el cambio de denominación de Programa Regional de Manejo de Recursos Forestales y Fauna Silvestre por el de Dirección Regional Forestal y Fauna Silvestre, el cual es un órgano de línea de tercer nivel organizacional, la cual depende jerárquica y administrativamente de la Gerencia Regional de Recursos Naturales y Gestión del Ambiente, es responsable de administrar el ordenamiento y aprovechamiento racional y sostenible del patrimonio forestal y de fauna silvestre con participación de los actores involucrados, controlar la aplicación de las normas y estrategias en concordancia con la política nacional y la conservación de los ecosistemas para mejorar la calidad de vida de la población;

Que, la ley Forestal y Fauna Silvestre, Ley N°29763, en el Artículo 1° indica que toda persona tiene el derecho de acceder al uso aprovechamiento y disfrute del patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación de acuerdo a los procedimientos establecidos por la autoridad nacional y regional y a los instrumentos de planificación y gestión del territorio; además de participar en su gestión. Toda persona tiene el deber de contribuir con la conservación de este patrimonio y de sus componentes respetando la legislación aplicable

Que en el artículo 137° de la precitada ley, declara de interés nacional la investigación, el desarrollo tecnológico, la mejora del conocimiento y el monitoreo del estado de conservación del patrimonio forestal y de fauna silvestre de la nación.





GOBIERNO REGIONAL DE MADRE DE DIOS
GERENCIA REGIONAL DE RECURSOS NATURALES Y GESTIÓN DEL AMBIENTE
DIRECCIÓN REGIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE



"Año de la Lucha Contra la Impunidad y la Corrupción"
"Madre de Dios Capital de la Biodiversidad Biológica"

Que a su vez, el artículo 140° de la citada ley, señala que la **autoridad regional forestal y de fauna silvestre, otorga autorizaciones de para extracción de los recursos forestales y de fauna silvestre con fines de investigación científica**, salvo cuando se trate de especies categorizadas como amenazadas, especies consideradas en los apéndices de la Convención Sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre –CITES o cuando la investigación científica involucre el acceso de los recursos genéticos, en cuyo caso la autorizaciones otorgada por el SERFOR.

Que el decreto supremo N°018-2015-MINAGRI que aprueba el reglamento para la gestión forestal y el Decreto Supremo N°019-2015-MINAGRI que aprueba el reglamento para la gestión de fauna silvestre, han regulado el procedimiento de otorgamiento de autorizaciones con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre, estableciendo para tal efecto los requisitos y consideraciones para su otorgamiento, de acuerdo a los lineamiento aprobados por el SERFOR, así como las obligaciones materia de cumplimiento por parte del titular de la autorización.

Que el artículo 99° del Decreto Supremo N°021-2015-MINAGRI, que aprueba el reglamento para la gestión forestal y de fauna silvestre en comunidades nativas y comunidades campesinas, refiere que los estudios con fines científicos que involucren acceder al conocimiento colectivo, sobre las propiedades, usos y características de la flora y fauna silvestre debe contar con el consentimiento informado previo y escrito de la comunidad, respaldado en acta que contenga el acuerdo de asamblea comunal según sus estatutos. Así mismo precisa, que el acceso a los conocimientos colectivos con fines de aplicación comercial, deben contar con el consentimiento informado previo y por escrito por la comunidad y cumplir además con lo establecido en la ley N°27811, ley que establece el régimen de protección de los conocimientos colectivos de los pueblos indígenas vinculados a los recursos biológicos, y otras normas vinculantes.

Que mediante la Resolución de Dirección ejecutiva N°060-2016-SERFOR /DE, de fecha 01 de abril del 2016, se aprueba los lineamientos para el otorgamiento de la autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre.

Que, mediante Resolución Ejecutiva Regional N°013-2019-GOREMAD/GR, del 16 de enero del 2019, se designa al Ingeniero Agrónomo Tania Margot Yábar Villarroel en el cargo de Director Regional Forestal y Fauna Silvestre-DRFFS del Gobierno Regional de Madre de Dios-GOREMAD.

Que, la Carta S/ N° Ingresado con expediente N°3737 fecha 04 de junio del 2019, el señor Herlis Iván Berru Correa, solicita Autorización para investigación denominado **"Micropropagación vegetal a partir de yemas terminales de árboles productivos de Castaña (*Bertholletia excelsa*) para la recuperación, conservación y aprovechamiento sostenible de sus bosques"** estudio que se realizara en la sede CITE Productivo Madre de Dios del ITP, ubicado en la Jr. Junín C-11 esquina con 15 de agosto del distrito y provincia de Tambopata – MDD".

Que, el informe técnico N°025-2019-GOREMAD-GRRNYGMA-DRFFS/ECO-CON/brccr, de fecha 17 de junio del 2019, en el cual recomienda Aprobar mediante Resolución Directoral Regional la Autorización para realizar el estudio de investigación, presentado por **Herlis Ivan Berru Correa** y concluye que:

- La solicitud presentada por Herlis Ivan Berru Correa, cumple con las condiciones mínimas para el otorgamiento de la autorización de investigación a realizar en la sede CITE Productivo Madre de Dios del ITP, ubicado en la Jr. Junín C-11 esquina con 15 de agosto del distrito y provincia de Tambopata – MDD, de acuerdo al lineamiento para el otorgamiento de autorizaciones de investigación científica de flora y fauna Silvestre





GOBIERNO REGIONAL DE MADRE DE DIOS
GERENCIA REGIONAL DE RECURSOS NATURALES Y GESTIÓN DEL AMBIENTE
DIRECCIÓN REGIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE



"Año de la Lucha Contra la Impunidad y la Corrupción"
 "Madre de Dios Capital de la Biodiversidad Biológica"

aprobado mediante la Resolución de Dirección ejecutiva N°060-2016-SERFOR /DE, de fecha 01 de abril del 2016.

- La solicitud cumple con los requisitos siguiente: presentación de hoja de vida del investigador principal y de sus colaboradores, plan de investigación, carta de presentación del investigador y participantes expedidas por las instituciones académicas y científica nacional y extranjera, cuenta con el respaldo del instituto de investigación de la amazonia peruana IIAP.
- El periodo de estudio y cronograma de trabajo se hace mención de 24 meses desde marzo del 2019 a marzo del 2021, pero teniendo en cuenta que el expediente fue presentado en junio del 2019, el tiempo será determinado desde la notificación de la resolución que apruebe la autorización.
- La investigación requiere la colecta 1.5 a 2 cm de longitud y una cantidad de 3000 tejidos vivos separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento (explante), estos explantes serán extraído de los 03 clones de castaña que han sido desarrollados dentro del instituto de investigación de la amazonia peruana IIAP, el cual son árboles desarrollados y aptos para los fines de investigación, por lo que el estudio no afectara a la población de especies de flora o fauna Silvestre en su hábitat natural u otros recursos naturales.
- La autorización de investigación científica denominado "Micropropagacion vegetal a partir de yemas terminales de árboles productivos de Castaña (*Bertholletia excelsa*) para la recuperación, conservación y aprovechamiento sostenible de sus bosques" se realizará en el ámbito de la región de madre de dios provincia y distrito de Tambopata, siendo esta autorización de alcance regional.

En uso de las atribuciones y competencias conferidas por la Resolución Ministerial N° 0301-2010-AG, de las Ordenanzas Regionales N° 033-2009-GRMDD/CR; N° 034-2009-GRMDD/CR N° 007-2012-GRMD/CR; N° 026-2012-GRMDD/CR Ordenanza Regional N° 001-2014-GOREMAD/CR, de la Resolución Ejecutiva Regional N°013-2019-GOREMAD/GR, de la Ley Forestal y Fauna Silvestre N°29763 y su Reglamento para la Gestión Forestal aprobado por decreto supremo N°018-2015-MINAGRI y de la Ley de Procedimiento Administrativo General - Ley N° 27444;



RESUELVE:

Artículo 1°. - **Otorgar** la Autorización con Fines de Investigación Científica de Flora Silvestre con colecta fuera de las áreas naturales protegidas al señor **Herlis Ivan Berru Correa**, correspondiéndole el código de Autorización **N°17-MAD/AUT-IFL-2019-002** en virtud de las consideraciones expuestas en la presente resolución.



Artículo 2°.- La presente autorización indicada en el artículo precedente, comprende la colecta 1.5 a 2 cm de longitud y una cantidad de 3000 tejidos vivos separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento (explante), estos explantes serán extraído de 03 clones de castaña que han sido desarrollados dentro del instituto de investigación de la amazonia peruana IIAP, el cual son árboles desarrollados y aptos para los fines de investigación, por lo que el estudio no afectara a la población de especies de flora o fauna Silvestre en su hábitat natural u otros recursos naturales. Dicha investigación se realizará en el ámbito de la región de Madre de Dios provincia y distrito de Tambopata, siendo esta autorización de alcance regional, fuera de áreas naturales protegidas, por un periodo de veinticuatro (24) meses, contados a partir del día siguiente



GOBIERNO REGIONAL DE MADRE DE DIOS
GERENCIA REGIONAL DE RECURSOS NATURALES Y GESTIÓN DEL AMBIENTE
DIRECCIÓN REGIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE



"Año de la Lucha Contra la Impunidad y la Corrupción"
 "Madre de Dios Capital de la Biodiversidad Biológica"

| NOMBRES Y APELLIDOS | FUNCION | NACIONALIDAD | DOC | NUMERO |
|-----------------------------------|------------------------|--------------|-----|----------|
| Francisco José Román Dañobeytia | Investigador Principal | Peruana | DNI | 25839262 |
| Cesar Enrique Álvarez Sánchez | Co-investigador | Peruana | DNI | 45953480 |
| Nelson Wiltembug Gutiérrez Carpio | Coi-nvestigador | Peruana | DNI | 40999037 |
| Henry Robles Cueva | Co-investigador | Peruana | DNI | 43814807 |
| Karina Nelissa Salas Perea | Tesista | Peruana | DNI | 40905590 |
| Julissa Jallya Barrios Condori | Tesista | Peruana | DNI | 75889506 |
| Herlis Ivan Berru Correa | Personal Técnico | Peruana | DNI | 45095622 |

Artículo 3°.- El titular de la autorización deberá cumplir con las obligaciones:

- No extraer especímenes ni muestras biológicas de flora silvestre no autorizadas, no ceder el mismo a terceros personas, ni utilizarlos para fines distintos a lo autorizado.
- Entregar a la Dirección Regional Forestal y Fauna Silvestre del Gobierno Regional de Madre de Dios, una copia del informe final incluyendo versionen digital como resultado de la autorización otorgada, copias del material fotográfico u otros.

Artículo 4°.- El titular de la autorización se compromete a:

- No contactar ni ingresar a los territorios comunales sin contar con la autorización de las autoridades comunales correspondientes.
- Retirar todo el material empleado para la ejecución del presente estudio una vez terminado el trabajo de campo y el levantamiento de información.
- Comunicar a la Dirección Regional Forestal y Fauna Silvestre el inicio de las investigaciones en campo con la debida anticipación.
- Solicitar ante la DRFFS y dentro del plazo otorgado cualquier cambio en las características del proyecto de investigación que demande la modificación de la presente resolución.
- Indicar el número de la resolución en las publicaciones generadas a partir de la autorización concedida.

Artículo 5°.- El titular del mencionado estudio deberá implementar todas las medidas de seguridad y eliminación de impactos que se puedan producir por las actividades propias de las actividades de las fases de campo, como toma de datos, transporte de muestras, transporte de equipos, personal etc.

Artículo 6° La Dirección Regional Forestal y Fauna Silvestre del GOREMAD, no se responsabiliza por accidentes o daños sufridos por los investigadores mencionados en el artículo N°2 durante la ejecución del proyecto, asimismo, se reserva el derecho de demandar del proyecto de investigación los cambios a que hubiese lugar en caso se formulen ajustes sobre la presente autorización.

Artículo 7°.- El titular autorizado del presente proyecto se encuentra sujeto al cumplimiento de las obligaciones y compromisos establecidos para la presente autorización con fines de investigación científica otorgada.

Artículo 8°.- Notificar la presente resolución al señor Herlis Ivan Berru Correa, así como a la Gerencia Regional de Recursos Naturales y Gestión del Medio Ambiente, al Organismo de Supervisión de los Recursos Forestales y de Fauna Silvestre-OSINFOR, y al Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre-SERFOR para su registro, conocimiento y cumplimiento.

Regístrese, Notifíquese y Archívese



GOBIERNO REGIONAL DE MADRE DE DIOS
 GERENCIA REGIONAL DE RECURSOS NATURALES Y GESTIÓN DEL MEDIO AMBIENTE
 DIRECCIÓN REGIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE

Tania Margaret Yabar Villarroel
 Ing. Tania Margaret Yabar Villarroel
 DIRECTORA REGIONAL

Anexo 5: Composición del medio de cultivo.

Tabla 26. Composición del medio de cultivo para establecimiento

| Componentes | Medio de cultivo (WPM 100 %) |
|------------------------|------------------------------|
| Woody Plant Medium | 2,41 g/L |
| Pantotenato (2000 ppm) | 1 mg/L |
| Sacarosa | 20 g/L |
| ZEATINA | 0,5 mg/L |
| ANA | 0,5 mg/L |
| AG3 (1000 ppm) | 0,1 mg/L |
| Ácido Ascórbico | 200 mg/L |
| Gentamicina | 2 ml/L |
| Agar | 5,5 g/L |
| pH | 5,7 |

Tabla 27. Composición de medios de cultivo para multiplicación.

| Componentes | BAP | | | KIN | | |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | T ₁ | T ₂ | T ₃ | T ₄ | T ₅ | T ₆ |
| WPM | 2,41 g/L | 2,41 g/L | 2,41 g/L | 2,41 g/L | 2,41 g/L | 2,41 g/L |
| BAP | 0,5 mg/L | 1,5 mg/L | 3,5 mg/L | - | - | - |
| KIN | - | - | - | 0,5 mg/L | 1,5 mg/L | 3,5 mg/L |
| ANA | 0,5 mg/L | 0,5 mg/L | 0,5 mg/L | 0,5 mg/L | 0,5 mg/L | 0,5 mg/L |
| AG3 | 0,1 mg/L | 0,1 mg/L | 0,1 mg/L | 0,1 mg/L | 0,1 mg/L | 0,1 mg/L |
| Sacarosa | 30 g/L | 30 g/L | 30 g/L | 30 g/L | 30 g/L | 30 g/L |
| Agar | 5,5 g/L | 5,5 g/L | 5,5 g/L | 5,5 g/L | 5,5 g/L | 5,5 g/L |
| pH | 5,7 | 5,7 | 5,7 | 5,7 | 5,7 | 5,7 |

Anexo 6: Matriz de Consistencia.

PROYECTO: “Efecto de las citoquininas en la multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* BONPL. Puerto Maldonado - Madre de Dios - 2022”

| PROBLEMAS | OBJETIVOS | HIPÓTESIS | VARIABLES | METODOLOGÍA | INDICADORES |
|---|--|---|--|---|--|
| Problema general | Objetivo general | Hipótesis alterna | Variables dependientes | Nivel de investigación: Experimental. | Porcentaje de contaminación: Se realizó, contando el número de plántulas contaminadas por bacterias y hongos. |
| ¿Los reguladores de crecimiento permitirá la multiplicación vegetativa <i>in vitro</i> de <i>Bertholletia excelsa</i> a partir de yemas terminales? | <ul style="list-style-type: none"> Determinar el efecto de los reguladores de crecimiento para la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Bertholletia excelsa</i>, a partir de yemas terminales). | <p>Ha: Existe diferencias significativas en desarrollo del explante aplicando citoquininas para la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Bertholletia excelsa</i> que permitirá la reproducción del material vegetal de forma rápida.</p> | Explantes establecidos y con presencia de brotes | <p>Diseño de investigación: DCA con arreglo factorial AXB con 10 repeticiones.</p> <p>Población: 1000 plantones presentes fundo el bosque de la UNAMAD – Km 16,5.</p> <p>Muestra: 3 explantes por unidad experimental, total 180.</p> <p>Muestreo: Al azar por unidad experimental.</p> | <p>Porcentaje de supervivencia: Se determinaron en unidades de explantes vivos en relación del total de explantes que se introdujeron inicialmente.</p> <p>Altura del explante: La longitud se determinó en centímetros con la ayuda de una regla, los datos se tomaron desde inicio del vástago hasta el ápice.</p> <p>Número de hojas por explante: Se evaluó durante y al final de la investigación, la proliferación de la parte aérea (producción y elongación de hojas y tallos).</p> <p>Número de nudos: Se evaluó al inicio y al final del experimento, contando el total de nudos por explante.</p> |
| | Objetivo específico | Hipótesis nula | Variables independientes | <p>Recolección de datos: Observación y medición de variables (cualitativa y cuantitativa).</p> <p>Procesamiento de datos: Análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confiabilidad del 95%, y para la comparación de medias se empleó “Tukey”. Los softwares estadísticos libre R y R studio.</p> | <p>Viabilidad: Se evaluó durante y al final de la investigación, en forma visual por lote (número total de tubos por accesión) bajo los criterios mencionados por INIA,2019.</p> |

