

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



“EFECTO DE LOS NIVELES DE SACAROSA Y SALES EN LA  
MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE CASTAÑA (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) -  
PUERTO MALDONADO - MADRE DE DIOS - 2020”

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Rafael Quille, José Luis". The signature is written in a cursive style and is positioned above a light blue rectangular box.

**Tesis presentado por:**

**Bachiller:** RAFAEL QUILLE, José  
Luis

**Para optar el título profesional de:**  
Ingeniero Forestal y Medio Ambiente

**Asesor:** Ph. D.: PEÑA VALDEIGLESIAS,  
Joel

**Co asesor:** M. Sc. Blgo: ROBLES  
CUEVA, Henry

Puerto Maldonado, 2022

UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE  
DIOS

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL  
Y MEDIO AMBIENTE



“EFECTO DE LOS NIVELES DE SACAROSA Y SALES EN LA  
MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE CASTAÑA (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) -  
PUERTO MALDONADO - MADRE DE DIOS - 2020”

**Tesis presentado por:**

**Bachiller:** RAFAEL QUILLE, José

Luis

**Para optar el título profesional de:**

Ingeniero Forestal y Medio Ambiente

**Asesor:** Ph. D.: PEÑA VALDEIGLESIAS,

Joel

**Co asesor:** M. Sc. Blgo: ROBLES

CUEVA, Henry

Puerto Maldonado, 2022

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a Dios, a mis padres Edwin y Epifania por su constante apoyo y ser el pilar fundamental en el desarrollo de nuestra educación académica, de la vida y su incondicional apoyo.

A mis hermanos Yenny Yoselin, Cliver Dante y a mi novia Elizabeth quienes han mantenido su fe en mí, la cual fue reflejada en todo momento al estar siempre atentos a nuestras necesidades y requerimientos que nos permitieron lograr un paso más en nuestro desarrollo profesional.

También quiero dedicarle mi trabajo de investigación a los docentes de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios quienes en los diversos niveles de estudio con cada enseñanza me fueron puliendo hasta convertirme en un excelente profesional.

## **Agradecimiento**

- Expreso mi agradecimiento a los docentes de la Facultad de Ingeniería Forestal y Medio Ambiente de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, por compartir sus saberes y experiencias durante nuestra formación profesional y personal.
- A mis asesores Ph. D. Joel Peña Valdeiglesias y M. Sc Blgo Henry Robles Cueva por la asesoría durante la elaboración y ejecución de la tesis.
- Al CITE Productivo MDD por habernos permitido realizar la tesis en su de digna institución.
- Al Tec. Olegario Robles Cueva y al personal de trabajo del laboratorio de micropropagación vegetal, que nos brindó apoyo durante la ejecución de la tesis.
- A mis amigos Omar y Karina que a través de su amistad permitieron un mutuo avance en mi desarrollo profesional, por medio de sus consejos y tiempo brindado, que hoy en día son parte responsable de llegar a una meta más como profesionales.

## Presentación

El presente proyecto de investigación se desarrolló en el marco del subproyecto “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”, el cual surge, a raíz de la ausencia de regeneración natural en los bosques de árboles de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), lo que pone en riesgo la producción de nueces a lo largo del tiempo, generando como consecuencia un conflicto socio-económico.

En tal sentido, el objetivo de la presente investigación fue: Determinar el efecto de los niveles de sacarosa y sales en la multiplicación *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.). El diseño estadístico que se empleó fue un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial (dos concentraciones de sales Woody Plant Medium x tres niveles de sacarosa). El desarrollo de la investigación se realizó en el módulo de laboratorio de micropropagación vegetal en la sede del CITE productivo Madre de Dios.

Asimismo, la presente investigación se desarrolló de manera articulada con las siguientes instituciones asociadas al proyecto: «Centro de Innovación Científica Amazónica (CIN CIA), Instituto Tecnológico de la Producción (ITP), World Wildlife Fund (WWF) y Recolectores Orgánicos de la Nuez Amazónica del Perú (RONAP)».

## Resumen

*Bertholletia excelsa* Bonpl., es una especie forestal de gran importancia económica a nivel local, nacional e internacional. Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden coadyuvar una alternativa para la propagación de esta especie más rápida y controlada que los métodos convencionales empleados en vivero, así como para la obtención de plantas élite. Sin embargo, se debe realizar una elección apropiada de la composición del medio de cultivo en función a la especie, es por ello que se desarrolló la presente investigación con el objetivo de determinar el efecto de tres niveles de sacarosa y dos concentraciones de sales en la multiplicación *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.). El estudio se realizó a partir de yemas apicales que provienen de plántulas jóvenes tratadas en invernadero. La desinfección se realizó a base de solución de agua jabonosa y NaClO al 2,5% durante 10 minutos. Para la etapa de establecimiento se empleó el medio de cultivo WPM suplementado con reguladores de crecimiento (BAP y ANA) y agar como gelificante. En la etapa de multiplicación se estudió el efecto de dos concentraciones de sales de Woody Plant Medium (50 y 100%) combinadas con sacarosa (30, 40 y 50 gr/l), BAP, ANA y agar 5,5 gr/l. Los resultados muestran que el porcentaje de asepsia obtenido fue del 86,4%. En la etapa de multiplicación, se optimizó que la concentración de sales de WPM 100% permitió obtener mejores resultados en el desarrollo *in vitro* de *Bertholletia excelsa* Bonpl., la sacarosa 30 gr/l influenció mayor crecimiento en altura y generación de nudos. Finalmente se concluye que este estudio servirá como base para otras investigaciones.

**Palabras claves:** Micropropagación, citoquininas, auxinas, asepsia.

## Abstract

*Bertholletia excelsa* Bonpl., is a forest species of great economic importance at local, national and international levels. In vitro culture techniques can contribute to an alternative for the propagation of this species that is faster and more controlled than the conventional methods used in the nursery, as well as for obtaining elite plants. However, an appropriate choice of the composition of the culture medium must be made based on the species, which is why the present investigation was developed with the objective of determining the effect of three levels of sucrose and two concentrations of salts in the in vitro multiplication of chestnut (*Bertholletia excelsa* Bonpl.). The study was carried out from apical buds that come from young seedlings treated in the greenhouse. Disinfection was carried out using a solution of soapy water and 2,5% NaClO for 10 minutes. For the establishment stage, the WPM culture medium supplemented with growth regulators (BAP and ANA) and agar as gelling agent were used. In the multiplication stage, the effect of two concentrations of Woody Plant Medium salts (50 and 100%) combined with sucrose (30, 40 and 50 gr/l), BAP, ANA and 5,5 gr/l agar was studied. The results show that the percentage of asepsis obtained was 86,4%. In the multiplication stage, it was optimized that the concentration of WPM salts 100% allowed to obtain better results in the *in vitro* development of *Bertholletia excelsa* Bonpl., sucrose 30 gr/l influenced greater growth in height and generation of nodes. Finally, it is concluded that this study will serve as a basis for other investigations.

**Keywords:** Micropropagation, cytokinins, auxins, asepsis.

## Introducción

El árbol de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) pertenece a la familia Lecythidaceae, simboliza la piedra angular del prototipo de la preservación a través de la utilización que ha permitido la protección de millones de hectáreas de bosque tropical húmedo en el bioma amazónico. Guariguata et al. (2017) menciona que las semillas de *Bertholletia excelsa* Bonpl. son comercializadas a nivel mundial recolectada del medio silvestre por recolectores forestales en toda la cuenca de Amazonas.

MINAM (2014) considera a la castaña como una de las especies forestales más fundamentales en la economía de la región Madre de Dios, su recolección genera emblemas al país mediante la venta de sus nueces al mercado mundial. Se estima que sus bosques ocupan aproximadamente 2,5 millones de ha., es decir, el 30% de la superficie de la región. Por otra parte, MINAM (2016) considera a la castaña un producto emblema de la región Madre de Dios, ya que beneficia aproximadamente al 20% de la población local.

En los últimos años, los árboles de castaña muestran el dilema de acortamiento de las mismas, debido a las actividades antropogénicas como la tala, quema, agricultura migratoria, minería aurífera, plagas y enfermedades durante la instauración de los cultivos. Por otro lado, se han sometido a diferentes estudios de propagación vegetal a través de semillas, injertos, estaquillas, cuyos resultados no fueron satisfactorios. También se percibe que los plantones en campo son fácilmente atacados por roedores y el mantenimiento del área plantada es muy costoso. Debido a la dificultad en su propagación por métodos convencionales, la micropropagación (cultivos *in vitro*) se presenta como una opción halagüeña para multiplicar y lograr plantones élites a fin de mantener sus poblaciones.

En tal sentido, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de tres niveles de sacarosa y dos concentraciones de sales en la multiplicación *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.). A fin de contribuir en la obtención de mejores resultados en el desarrollo del cultivo *in vitro* de esta especie. El estudio se desarrolló dentro del marco del

Sub proyecto de Investigación Aplicada y Desarrollo Tecnológico, Proyecto de Investigación Multidisciplinario / Contrato N°168-2018-FONDECYT-BM-IADT-MU, con número de registro 60865, denominado “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”, que ejecuta Centro de Innovación Científica Amazónica (ACIN CIA), teniendo como entidades asociadas a «Recolectores Orgánicos de la Nuez Amazónica del Perú (RONAP), World Wildlife Fund (WWF)- PERÚ e Instituto Tecnológico de la Producción (ITP-CITE productivo – MDD)».

## Índice

Presentación	
Introducción	
CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	6
1.1. Descripción del problema .....	6
1.2. Formulación del problema .....	7
1.3. Objetivos.....	7
1.3.1. Objetivo general .....	7
1.3.2. Objetivo específico.....	7
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 .....	8
1.7. Justificación .....	9
1.8. Consideraciones éticas.....	10
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	12
2.1. Antecedentes de estudio .....	12
2.1.1. Antecedentes internacionales .....	12
2.1.2. Antecedentes nacionales .....	16
2.1.3. Antecedentes locales.....	17
2.2. Modelo teórico (si corresponde).....	17
2.3. Marco teórico.....	17
2.3.1. Descripción taxonómica de la especie .....	17
2.3.2. Descripción botánica.....	18
2.3.3. Micropropagación.....	18

2.3.4.	Etapas de la micropropagación.....	18
2.3.5.	Cultivo de tejidos vegetales.....	19
2.3.6.	Propagación <i>in vitro</i> .....	19
2.3.7.	Medios de cultivo.....	20
2.3.8.	Reguladores de crecimiento.....	20
2.3.9.	Fuentes de carbono.....	21
2.3.10.	Asepsia.....	21
2.3.11.	Agua.....	21
2.3.12.	Factores externos del cultivo.....	22
2.4.	Definición de términos.....	22
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN.....		24
3.1.	Lugar de desarrollo de la investigación.....	24
3.2.	Materiales, equipos e insumos.....	25
3.3.	Tipo de estudio.....	26
3.4.	Diseño del estudio.....	26
3.5.	Población y muestra.....	27
3.5.1.	Población.....	27
3.5.2.	Muestra.....	28
3.6.	Métodos y técnicas.....	28
3.6.1.	Fase de invernadero.....	28
3.6.2.	Fase de laboratorio.....	29
3.7.	Tratamiento de los datos.....	32
3.8.	Análisis de datos.....	32
CAPITULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....		33
4.1.	Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	33
4.1.1.	Porcentaje de asepsia de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	33
4.1.2.	Porcentaje de supervivencia de explantes <i>in vitro</i> de castaña. ....	34

4.2. Multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	35
4.2.1. Número de hojas de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	35
4.2.2. Altura de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	38
4.2.3. Número de nudos de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	41
CONCLUSIONES.....	46
SUGERENCIAS.....	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48
ANEXOS .....	55

## Índice de figuras

Figura 1. Mapa de ubicación del laboratorio de micropropagación CITE productivo MDD. ....	24
Figura 2. Flujograma del proceso de micropropagación. ....	31
Figura 3. Porcentaje de asepsia de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	33
Figura 4. Porcentaje de supervivencia de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	34
Figura 5. Supervivencia de explantes de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	35
Figura 6. Promedio de número de hojas en las sales Woody Plant Medium. ....	37
Figura 7. Promedio de altura en las sales Woody Plant Medium. ....	39
Figura 8. Promedio de altura en la interacción de sales WPM y niveles de sacarosa. ....	40
Figura 9. Promedio de número de nudos en las sales Woody Plant Medium. ....	43
Figura 10. Promedio de número de nudos en los niveles de sacarosa. ....	44
Figura 11. Promedio de número de nudos en la interacción de sales WPM y niveles de sacarosa. ....	45

## Índice de tablas

Tabla 1. Descripción del proceso de operacionalización de variables. ....	8
Tabla 2. Ubicación política. ....	25
Tabla 3. Las diferentes combinaciones de los factores de estudio. ....	27
Tabla 4. Promedio de número de hojas por tratamiento de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	36
Tabla 5. Análisis de varianza para número de hojas de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	36
Tabla 6. Prueba de comparación de promedios (t de Student) para sales Woody Plant Medium. ....	37
Tabla 7. Promedio de altura por tratamiento de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	38
Tabla 8. Análisis de varianza para altura de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	38
Tabla 9. Prueba de comparación de promedios (t de Student) para sales Woody Plant Medium. ....	39
Tabla 10. Prueba de comparación de promedios (t de Student) para la interacción de sales WPM y niveles de sacarosa. ....	40
Tabla 11. Promedio de número de nudos por tratamiento de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	41
Tabla 12. Análisis de varianza para número de nudos de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. ....	42
Tabla 13. Prueba de comparación de promedios (t de Student) para sales Woody Plant Medium. ....	42
Tabla 14. Prueba de comparación de promedios (t de Student) para niveles de sacarosa. ....	43
Tabla 15. Prueba de comparación de promedios (t de Student) para la interacción de sales WPM y niveles de sacarosa. ....	44
Tabla 16. Composición del medio de cultivo para establecimiento. ....	65
Tabla 17. Composición de medios de cultivo para multiplicación. ....	65

## CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1. Descripción del problema

La castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) es un árbol prodigioso de la selva amazónica que genera nueces de forma productiva en Perú, Bolivia y Brasil; Madre de Dios, es la región del Perú que cuenta con árboles de castaña en densidades idóneas para generar beneficios a sus poblaciones. Pieter (2003) la producción de sus nueces es primordial como fuente de ingreso económico en las regiones donde existen grandes densidades de bosques naturales que contienen estos árboles. Rockwell et al. (2015) es una de las especies no maderables de mayor importancia económica del mundo extraída casi en su totalidad de los bosques naturales de la cuenca del Amazonas.

Delfín (2021) a nivel regional su cosecha beneficia a más de 20,000 familias de forma directa e indirecta, además de formar el 67% del total de los ingresos de las familias vinculadas a la labor castañera. Ramos (2018) los diferentes niveles de participación antropogénica en los bosques con castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) afectan en la condición de las nueces, dejándose percibir en el cambio morfológico. La tasa de la productividad ha descendido debido a la tala indiscriminada de las mismas, la emigración de los recolectores de castaña, la inundación de las áreas castañaes y debido a la eliminación de los polinizadores causados por la quema.

En los últimos años se han desarrollado diversos estudios sobre la propagación de la castaña amazónica aplicando las técnicas de injerto y semillas. El sembrado en campo no es factible, por la difícil germinación de las semillas, simplemente son arremetidos por roedores y por la inversión que implica los trabajos de mantenimiento. Arias y Rondón (2010) todas las pruebas desarrolladas con el cultivo de castaña no evolucionaron naturalmente, prácticamente no respondieron.

Figueiredo y Carvalho (2002) indican que “la propagación por semilla de *Bertholletia excelsa* Bonpl. es reducida por una merma de su viabilidad, provocado por su comportamiento recalcitrante, la germinación lenta e irregular de hasta seis meses y presenta obstáculos en la obtención del sistema radicular”. Cusi (2013) otra de las desosiegas es la productividad de plántones en vivero, esto se debe a la carencia de tecnología reciente que puedan optimizar la productividad y el aumento de plántones de castaña. Es importante la aplicación de nuevas metodologías que nos permitan asegurar una producción eficaz y continua de plántones. Una de las alternativas es la biotecnología, por medio de la técnica de cultivos *in vitro* que genera alternativas viables para conseguir plantas libres de enfermedades, altos niveles de productividad y con las mismas características genéticas, representando una alternativa de reproducción para la posterior conservación de la especie.

## **1.2. Formulación del problema**

¿Cuál es el efecto de los niveles de sacarosa y sales en la multiplicación *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.)?

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1. Objetivo general**

- Determinar el efecto de tres niveles de sacarosa y dos concentraciones de sales en la multiplicación *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.).

### **1.3.2. Objetivo específico**

- Determinar los parámetros de asepsia favorables morfológicamente en la multiplicación *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.).
- Evaluar el efecto respuesta de los niveles de sacarosa y sales en la multiplicación *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.).
- Determinar la concentración óptima de sacarosa en la multiplicación *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.).

## 1.4. Variables

### 1.4.1. Variables independientes

- Niveles de sacarosa
- Concentraciones de sales (Woody Plant Medium)

### 1.4.2. Variable dependiente

- Plantones establecidos *in vitro*

## 1.5. Operacionalización de variables

Tabla 1. Descripción del proceso de operacionalización de variables.

Variable	Indicadores	Dimensión	Índice
Independiente	Niveles de sacarosa	30 gr	gr
		40 gr	gr
		50 gr	gr
	Concentraciones de sales (Woody Plant Medium)	50%	%
		100%	%
Dependiente	Características cuantitativas	% de contaminación	%
		% de supervivencia	%
		Altura del explante	cm
		Número de hojas	Nº
		Número de nudos	Nº
	Características cualitativas	Viabilidad	niveles

## 1.6. Hipótesis

- Ha: Existen diferencias significativas en el efecto de los niveles de sacarosa y sales en la multiplicación *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.).

- Ho: No existen diferencias significativas en el efecto de los niveles de sacarosa y sales en la multiplicación *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.).

### 1.7. Justificación

La labor de erradicación y procesamiento de la castaña es de interés económica, social y cultural para la región de Madre de Dios, abarca a 6,500 familiares, y es una labor simbólica de la Amazonía peruana Álvarez (2006). Madre de Dios es la región en la que se localizan árboles de castaña en densidades idóneas que posibilitan económicamente factible su explotación, actualmente la productividad se presenta inconstante que oscilan entre 1,8 a 4,5 mil toneladas anuales.

Luque (2021) en los últimos años, la región de Madre de Dios está enfrentando una severa deforestación y degradación de sus bosques, generados por la actividad humana, como ser tala ilegal con fines de aprovechamiento comercial, la expansión de tierras de uso agrícola, la ganadería, la minería ilegal y el narcotráfico. Además, prevaleciendo aspectos negativos como la pérdida de biodiversidad, contribuyendo al cambio climático.

Estudios recientes, así como la experiencia general de los pobladores, han demostrado que en los bosques castañeros, existe una limitada regeneración natural de la especie, Rockwell et al. (2015) reportan que la regeneración natural de la castaña en Madre de Dios es relativamente escasa, lo cual pone en severo peligro la productividad de nueces en el largo plazo. Por otra parte, hay indicios de tendencia a la baja producción de castaña en la región, lo cual en conjunto con la falta de regeneración natural podría disminuir el importante papel de la producción sostenible de castaña. Reaño (2018) indica que los árboles maduros no están siendo sustituidas por plántones recientes lo idóneamente dinámico como para que se respalde el equilibrio de los castañales.

La demanda comercial nacional e internacional de las nueces de castaña y la limitada regeneración natural de sus bosques, genera el interés de buscar nuevas metodologías que replacen el uso convencional, para asegurar el

re poblamiento, conservación y la capacidad de producción a largo plazo. Actualmente existen circunstancias limitantes en la producción de plantones de castaña mediante procesos convencionales, debido al comportamiento recalcitrante y germinación lenta de la especie. De acuerdo a las limitaciones mencionadas, tenemos como alternativa la técnica de micropropagación vegetal. Delgado et al. (2008) mencionan que a través del uso de las técnicas de cultivo *in vitro* se generaría rápidamente el número de individuos y de material vegetal genéticamente estable.

Sin embargo, el comportamiento de los organismos a condiciones *in vitro* es heterótrofos y por esta razón es indispensable añadir una fuente de carbono. Aguirre, Pierre y Leigue (2016) consideran que los cultivos *in vitro* muestran una baja tasa fotosintética, por lo que deben tener de una fuente de carbohidrato, generalmente en forma de sacarosa.

### **1.8. Consideraciones éticas**

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

Cabe mencionar, el artículo 67 promueve el uso sostenible de los RRNN. Además, de conformidad con el artículo 1 de la Ley Forestal y de Fauna Silvestre - 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 de sus componentes, respetando la legislación.

El artículo 137 declara de interés nacional la investigación, desarrollo tecnológico, mejoramiento del conocimiento y el seguimiento de la protección 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.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes de estudio

#### 2.1.1. Antecedentes internacionales

Suarez, Pérez y Lopez (2020) desarrollaron la “evaluación de sacarosa y GA<sub>3</sub> en un cultivo *in vitro* de brotes de *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae)”, sobre el número y longitud del brote, número y longitud de raíces y número de hojas. Cultivaron en medio MS complementado con sacarosa (30, 45 y 60 mg/l) y GA<sub>3</sub> (0,0; 0,25; 0,5; 0,75 y 1,0 mg/l). Se detectaron que el empleo de GA<sub>3</sub> suplementado con sacarosa influyó estadísticamente a todas las variables estudiadas; Además, el aumento de sacarosa incitó mayor número de brotes, y los brotes en presencia de GA<sub>3</sub> mostraron una mayor longitud.

Rojas y Hine (2019) desarrollaron estudios sobre la “micropropagación de clones superiores de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de segmentos nodales”, alcanzaron a fijar los segmentos nodales en condiciones *in vitro*, al utilizar Ca (ClO)<sub>2</sub> al 15% por un lapso de 20 minutos. El mejor medio fue MS adicionado con 3% de sacarosa alcanzando el 55% de nudos establecidos. Además, se evaluó el efecto de 6-Bencilaminopurina (0,0; 0,44; 0,88; 1,33; 1,77 y 2,21  $\mu\text{M l}^{-1}$ ) sobre la brotación. Obteniendo en promedio un brote/explante.

Bacusoy y Macías (2019) estudiaron la “propagación *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King) especie forestal en estado de vulnerabilidad”, para la fase de establecimiento utilizaron el medio basal de Murashige y Skoog (MS), en la fase de multiplicación se emplearon como medios de cultivo MS, MS al 50% y Woody Plant Midium (WPM) adicionados con BAP 1 mg + GA<sub>3</sub> 0,2 mg. Para el enraizamiento se utilizó WPM con diferentes niveles de AIB (1,5 mg, 2 mg y 2,5 mg). En la fase de multiplicación la mejor respuesta se

obtuvo en el medio WPM obteniendo 3,33 brotes, con un diámetro del tallo de 0,27 cm y 1,52 cm de altura, para enraizamiento la mejor respuesta se obtuvo con Woody Plant Medium (WPM) + 2mg de AIB sin carbón activado.

Haygert-Lencina et al. (2017) en el estudio de propagación *in vitro* de *Apuleia leiocarpa*, obtuvieron explantes asépticas a partir de la germinación por semillas, estableciendo en medio WPM por 15 por días; para la multiplicación, se seccionaron los segmentos nodales y se cultivaron en medio WPM añadido con 8,8 uM de BAP por 30 días, mostrando como resultado el protocolo para establecimiento y multiplicación *in vitro*.

Delgado y Hoyos (2016) desarrollaron la “multiplicación clonal *in vivo* e *in vitro* de la especie forestal nativa *Aniba perutilis* Hemsl”. Para la germinación aséptica de las semillas se sometieron a NaOCl, HgCl<sub>2</sub> y AgNO<sub>3</sub>. Para incitar brotes se utilizó el medio WPM suplementado con (BAP, KIN, AIA, ANA y AG<sub>3</sub>). Para obtener el sistema radicular utilizaron ANA, AIB, y los medios MS 50% y WPM 50% adicionados con AIA y ANA. La aplicación de NaOCl por 15 minutos fue óptimo logrando el 60% libre de contaminantes. El medio WPM añadido con BAP 3 mg/l y 1,5 mg/l de AG<sub>3</sub> logró producir en promedio de 0,6 brotes por explante y una longitud media de 0,82 cm; en tanto, su baja facilidad de enraizamiento permite calificar como recalcitrante.

Lincango (2015) realizaron la “evaluación de 2 hormonas y 2 medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Jacarandá (*Jacaranda mimosifolia* D. Don.) Quito, Pichincha”. Las semillas se desinfectaron a base de NaOCl al 25% por 10 minutos, para su germinación se colocaron en medios de cultivo MS ½ y WPM. Para la brotación se cultivaron en MS½ y WPM adicionados con 6-bencilaminopurina (BAP). Para generar raíz, se sub cultivaron en medio MS ½ y WPM complementado con ácido indol butírico (IBA). El medio de cultivo WPM generó brotes de Jacarandá (*Jacaranda mimosifolia* D. Don.) en el menor tiempo, además aumentó el número de brotes, la longitud de brotes y raíces.

Hine, Rojas y Daquinta (2014) desarrollaron el “establecimiento *in vitro* de dos especies nativas de Costa Rica: *Terminalia amazonia* (Amarillón) y *Vochysia*

*allenii* (Botarrama Blanco)". Lograron establecer segmentos nodales empleando  $\text{HgCl}_2$  al 0,1% por 5 minutos. Los explantes de *Terminalia amazonia* se cultivaron en el medio de cultivo MS y WPM, para *Vochysia allenii* en medio de cultivo WPM (100 y 50%) y MS 50%; se adicionaron 3% de sacarosa y 2,7 g/l de Phytigel. El mejor medio de cultivo para el desarrollo de *T. amazonia* fue el WPM 100% y para *V. allenii* fue el WPM 50%. Logrando obtener 42% de nudos establecidos para *T. amazonia* y 10% para *V. allenii*.

Vilchez et al. (2014) determinaron el efecto del "medio de cultivo y reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* *Psidium guajava* L.". El objetivo fue determinar los medios (MS y WPM), BAP (0,5, 1,0, 1,5 mg l<sup>-1</sup>), Kinetina (0,5, 1,0, 1,5 mg l<sup>-1</sup>) y DI-31 (0,01 y 0,02 mg l<sup>-1</sup>). Se evaluaron número de brotes, número de nudos, longitud del brote y coeficiente de multiplicación. El tipo de medio de cultivo influyó en la multiplicación de brotes. Las variables evaluadas estuvieron determinadas por el tipo y concentración de citoquinina. Se obtuvo mayores valores de las variables evaluadas en el medio de WPM añadido con 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 3% de sacarosa.

Delgado (2013) desarrolló la "multiplicación clonal *in vitro* e *in vivo* de la especie forestal nativa *Aniba perutilis* Hemsley", se utilizaron semillas y son sometidas a NaOCl,  $\text{HgCl}_2$  y  $\text{AgNO}_3$ . Para lograr un medio de proliferación y generar brotes, se usó WPM adicionados con BAP, KIN, AIA, ANA y GA3 en diferentes dosis. Para inducir raíz, se utilizaron ANA y AIB, además los medios MS $\frac{1}{2}$  y WPM $\frac{1}{2}$  y diferentes dosis de AIA y ANA. La desinfección con NaOCl por 15 minutos, resultó óptimo, obteniendo una tasa de supervivencia mayor al 50%. El medio WPM adicionado con BAP 3 mg/l y 1,5 mg/l de GA3 favoreció en la obtención de 0,6 brotes/explante con longitud promedio de 0,82 cm. Permite catalogarla como recalcitrante al cultivo *in vitro* debido a su baja capacidad de enraizamiento.

Chávez et al. (2010) evaluaron las "características morfológicas de plantas *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *caribaea* influenciadas por el empleo de la sacarosa en la fase de multiplicación". En la fase de multiplicación, el objetivo fue de terminar la influencia de sacarosa (30, 40, 50 y 60 gr l<sup>-1</sup>). Para la fase de enraizamiento se evaluó la acción de AIB y nutrientes inorgánicos (50 y

100%). Se determinó que la sacarosa repercutió en las características morfológicas de las plantas logradas. Al añadir 50 y 60 gr l<sup>-1</sup> de sacarosa se consiguió una menor formación de nuevos brotes y mayores porcentajes de materia seca. Con 60 gr l<sup>-1</sup> de sacarosa presentaron un mayor crecimiento en longitud y acículas más diferenciadas. Para enraizamiento, al aumentar la dosis de AIB, se incrementó la longitud. Las plantas logradas con 30 gr l<sup>-1</sup> de sacarosa, al aumentar la dosis de AIB aminoró el porcentaje de materia seca, en tanto con 60 gr l<sup>-1</sup> ocurrió al revés. A las plantas desarrolladas con 60 gr l<sup>-1</sup> de sacarosa, y sub cultivados en medio de enraizamiento al 50% de los nutrientes inorgánicos, se determinó el 47,95% de residuos de la pared celular.

Millan (2006) estudió la “micropropagación de cuatro especies maderables tropicales de interés para Colombia, mediante técnicas de cultivo *in vitro*”; para *Cedrela odorata* se trabajaron con semilla madura, yemas terminales y axilares provenientes de invernadero, durante el establecimiento se empleó el medio MS añadido con 1 mg l<sup>-1</sup> de BA + 1 mg l<sup>-1</sup> de kinetina. Obteniéndose el 47,91% de sobrevivencia para semilla, 64,58%, 62,50% y 18,75 para yemas de cuatro, doce y catorce meses. En la etapa de proliferación de *C. odorata*, se realizaron otras evaluaciones al añadir tres dosis de sacarosa (3%, 4% y 5%). Reafirmando que la mejor dosis de sacarosa fue 3%. Cuando se agregó 5% de sacarosa, generó la aparición de callos y posterior deformación. En *C. montana* se empleó yemas provenientes de plántones de nueve y doce meses. El medio de cultivo fue igual a los empleados en *C. odorata*. El porcentaje de sobrevivencia obtenida fue 83,33%. En *Chlorophora tinctoria* el material vegetal empleado fue yemas de cuatro, seis y siete meses provenientes de invernadero. En el establecimiento y multiplicación se empleó el medio MS añadido con 1,0 mg l<sup>-1</sup> de BA. La sobrevivencia obtenida en el tercer mes de subcultivo fue 79,16% en semilla; 47,91%, 71,05% y 68,75% en las yemas de cuatro, seis y siete meses. En *Q. humboldtii* se empleó yemas de dos y seis meses de edad. El porcentaje de sobrevivencia fue 79,16% y 66,66% en las yemas de dos y seis meses de edad. La fuente carbonada fue sacarosa al 3% para las cuatro especies.

Perez et al. (2001) desarrollaron el “método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedreia odorata* fases de desarrollo y enraizamiento”. Para la proliferación, evaluaron los medios MS y WPM al (100, 75, 50 y 25%) suplementados con sacarosa (10, 20, 30, 40 gr/l). Para inducir raíz, se empleó el medio MS 50%, adicionado con ANA (0,5 y 1,0 mg/l) combinado con AIB (1,0 y 1,5 mg/l). Además, se determinó el efecto de carbón activado (0, 1,5, 2,0 y 3 gr/l) añadido con sacarosa (15, 30, 45 gr/l). El eficiente medio para proliferación de brotes fue WPM al 50% adicionado con 30 gr/l de sacarosa. Esta interacción ayudó claramente el enraizamiento. Además, se contempló el efecto de ANA; el carbón activado actuó negativamente el enraizamiento, en contraste que las altas dosis de sacarosa lo favorecieron.

### **2.1.2. Antecedentes nacionales**

Campos et al. (2020) estudiaron el “establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae)”. Se desinfectó con  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  y  $\text{NaClO}$  a 3% por 10, 15 y 20 minutos. Para su desarrollo se transfirieron a medio base MS, WPM e hidropónico LM. Luego son expuestos a BAP (0,1; 0,5 y 1 mg/l) y ANA (0,1 y 0,5 mg/l) para su proliferación. Para generar raíz, se empleó WPM suplementado con BAP (0,5 y 1 mg/l) y ANA (1 y 2 mg/l). Desinfectados con  $\text{NaClO}$  al 3% por 15 minutos presentaron el 87% de explantes vivos. En la etapa de proliferación el mejor medio de cultivo fue WPM, la dosis de 1 mg/l de BAP incitó brotes 8 mm de longitud y para el enraizamiento la auxina ANA a razón de 1 mg/l generó mayor número de raíces.

Navarro (2001) estudios realizados sobre la "micropropagación de *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) tornillo a partir de yemas". Se ensayaron las siguientes combinaciones T1: Sacarosa 3% + ANA (0,05 gr) + BAP (0,05 gr) + Agar 0,6 %; T2: Sacarosa 3% + inositol (0,1 gr) + BAP (0,05 gr) + Agar 0,8% y T3: Sacarosa 3% + inositol (0,05 gr) + Agua de coco (100 ml) + Agar 0,5%; consiguiendo diferencias significativas. El tratamiento T1 resultó ser el mejor medio de cultivo que ostenta clara ventaja respecto a la proliferación de masa celular indiferenciada. No se demuestran el desarrollo de brotes, no se

percibió el enraizamiento, debido a que la dosis de AIA no resultó ser la más apropiado.

### 2.1.3. Antecedentes locales

No existe investigación en técnicas de cultivo *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa*. Bonpl.)

## 2.2. Modelo teórico (si corresponde)

El modelo lineal aditivo del diseño experimental es el siguiente:

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

$Y_{ijk}$  = Una observación cualquiera

$\mu$  = Media poblacional

$\alpha_i$  = Efecto de la i-ésima sales WPM

$\beta_j$  = Efecto de la j-ésima niveles de sacarosa

$\alpha\beta_{ij}$  = Efecto de la interacción entre sales WPM x niveles de sacarosa

$e_{ijk}$  = Error experimental

## 2.3. Marco teórico

### 2.3.1. Descripción taxonómica de la especie

Mori y Prance (1990) la castaña (*Bertholletia excelsa* Bonlp.) es un árbol nativo de la amazonia, emergente, que suele alcanzar alturas entre los 40-50 m y 3 m o más de diámetro, y se distribuye en los bosques de tierra firme en la cuenca del Amazonas y las Guianas.

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.....*Bertholletia excelsa* Bonpl.

### 2.3.2. Descripción botánica

Corvera et al. (2010) presentan hojas deciduas, forma de cóncava, verde pálido en el envés y verde brillante en el haz, peciolo de 5 a 6 cm, 8 a 12 cm de ancho y 25 a 35 cm de longitud, base aguda, ápice obtuso-redondeado y ligeramente acuminado, nervadura central prominente de ángulo de 60°, nervaduras laterales abundante, márgenes ondulados.

Mori y Prance (1990) las flores son en panícula cortas de 3 cm de diámetro, 12 - 16 cm de longitud. Flores grandes, carnosas en forma de capucha doblada.

Corvera et al. (2010) el fruto es una cápsula de tipo pixidio incompleto, esférico o ligeramente achatado, diámetro de 10 a 25 cm, cáscara dura y leñosa. El peso del fruto oscila entre 200 y 1,500 g.

### 2.3.3. Micropropagación

Roca y Mroginski (1991) definen como una técnica aséptica, que concibe el manejo de plantas, órganos, tejidos o células que originen nuevas plántulas fenotípica y genéticamente igual a la planta madre.

Roca y Ramírez (2000) uno de las mayores virtudes que propone la propagación vegetativa a través del cultivo de tejidos vegetales es la probabilidad de conseguir la masificación de plantas en espacio y tiempo pequeño, el lucro es bastante relevante cuando se contrasta con las técnicas tradicionales de propagación asexual.

### 2.3.4. Etapas de la micropropagación

Murashige (1974) menciona las siguientes etapas de micropropagación:

- Etapa 0: Banco de plantas. Contempla asegurar a través de un tratamiento fitosanitario, plantas libres de patógenos para un desarrollo activo y vigoroso para adquirir explantes libres de síntomas de enfermedades.

- Etapa 1: Es el inicio, contempla la elección y la empleabilidad de un protocolo de desinfección y la introducción de explantes a un medio de establecimiento a fin de obtener una alta tasa de supervivencia.
- Etapa 2: Se promueve y estimula la generación de mayor número de brotes en un corto tiempo y con alta fidelidad genética.
- Etapa 3: Etapa de enraizamiento y elongación, que tiene como objeto el alargamiento de brotes, e inducir al desarrollo de raíz.
- Etapa 4: Etapa de aclimatación de condiciones "*in vitro*" a ex vitro. Consiste en la climatización de vitro plantas bajo condiciones controladas para garantizar la supervivencia.

### **2.3.5. Cultivo de tejidos vegetales**

Roca y Mroginski (1991) es una técnica que se utiliza en el aislamiento de órganos, tejidos o células vegetales en condiciones asépticas, en un medio de cultivo determinado e incubados en condiciones manejadas. Se fundamenta en proliferar numerosas muestras a partir de una porción de tejido de una planta donadora, logrando grandes proporciones, plantas similares, libres de microorganismos y en cualquier estación del año.

Roca y Ramírez (2000) indican que la totipotencia de las células vegetales sembradas *in vitro* fue fijada por Steward y colaboradores en 1958. Un explante se cultiva asépticamente en un medio cultivo determinado y en condiciones adecuadas.

### **2.3.6. Propagación *in vitro***

Consiste en tomar una porción de una planta y colocarla en un medio nutritivo estéril donde se desarrollará la planta. Rojo, Rodríguez y Ramírez (2010) indican que la propagación de especies tropicales en condiciones *in vitro* permite mantener y micropropagar material vegetal determinado y brinda nuevos mecanismos que se añaden al tradicional practica silvicultural, para realizar dos propósitos básicos de la gestión forestal: Sosteniendo la heterogeneidad de los bosques nativos para la preservación y el uso de los recursos para mejoramiento genético.

### **2.3.7. Medios de cultivo**

Son las combinaciones de macro y micronutrientes en cantidades apropiadas y en condiciones físicas impecables, proporcionan el desarrollo de los explantes vegetales. Villalobos, Leung y Thorpe (1984) generalmente se emplean macro y micro elementos, fuente carbonada, vitaminas, nitrógeno y reguladores del crecimiento. Se clasifican de acuerdo a su estado físico: Medio de cultivo sólido (agar al 1,5% – 2%) y medio líquido (no contiene agar).

### **2.3.8. Reguladores de crecimiento**

#### **a) Auxinas**

Roca y Mroginski (1991) tienen la gran idoneidad de realizar engrandecimiento y prolongamiento celular. Auxinas naturales: (AIA, indol-3-acetonitrilo, ácido indol-3-propiónico, etilindo-3-acetato) y auxinas artificiales: 2,4-D, ANA y AIB.

Alcántara et al. (2019) son fitohormonas especializadas en diferentes procesos a nivel vegetal. Tienen la idoneidad de conducir y mediar en la diferenciación celular, elongación y procesos de división. Las auxinas más conocidas se encuentran el AIA producida de manera natural, y otro de manera sintética como él IBA, 2,4-D y NAA.

#### **b) Citoquininas**

Roca y Mroginski (1991) provoca el acrecentamiento de los tallos laterales y cohiben la dominancia apical

Alcántara et al. (2019) poseen la capacidad de provocar e incitar un alto desarrollo y división celular, impulsan el inicio y elongación de las raíces; además, excitan la senescencia de las hojas, proporcionan la estimulación de foto morfogénico vegetal.

#### **c) Vitaminas**

Roca y Mroginski (1991) es imprescindible adicionar las vitaminas, hasta que los cultivos hayan desarrollado o se han convertido en verdes. Generalmente se agregan la tiamina, pirodoxina y el ácido nicotínico. Otras vitaminas que se

emplean como el ácido pantoténico, biotina, riboflavina y colina, pero no plenamente imprescindible.

#### **d) Ácido giberélico**

Alcántara et al. (2019) incita la elongación celular en respuesta a las condiciones de luz y juega un rol primordial en la prolongación de los segmentos nodales.

### **2.3.9. Fuentes de carbono**

La sacarosa es un carbohidrato más empleado en diferentes medios de cultivo a concentraciones de 2 a 6%. El reemplazo de la sacarosa por otro carbohidrato resultó fútil en la multiplicación de brotes en *D. asper* (Guadua bamboo) y *D. hamiltonii* (bambú de Hamilton), pero aminoró el coste de la productividad. En contraste, Singh et al. (2012) al utilizar la glucosa presentó resultados nocivos sobre la multiplicación de brotes.

Roca y Mroginski (1991) los cultivos *in vitro* son autótrofos, por ende, es necesario adicionar un carbohidrato, la dosis de 2 a 5%.

Leifert, Murphy y Lumsden (1995) mencionan que la sacarosa se agrega al medio de cultivo para proporcionar un ligero desarrollo heterotrófico, la productividad de la energía y carbohidratos por la fotosíntesis *in vitro* es muy limitada debido a la baja iluminación en las habitaciones destinadas a su desarrollo y no aseguran que se fructifique.

### **2.3.10. Asepsia**

Perla (2007) alude que, las condiciones físicas del área de incubación y la asociación explante-medio, constituyen un lugar favorable para el aumento de microorganismos, tales pueden destruir los cultivos. Evitar la polución con microorganismos es un aspecto esencial que se debe tener en consideración para el éxito.

### **2.3.11. Agua**

Pierik (1990) la naturaleza del agua es sustancial ya que compone el 95% del medio vigorizante, se sugiere usar purificada. Rosell y Villalobos (1990) el

agua de caño no es lo convenientemente limpio para el cultivo *in vitro*, es recomendable usar agua destilada.

### 2.3.12. Factores externos del cultivo

#### a) La temperatura

La temperatura adecuada para desarrollo de cultivo *in vitro* puede ser un procedimiento muy perseverante. Para la mayoría de las condiciones, se pueden lograr rendimientos sobresalientes con T° de incubación que fluctúan de 20 y 28°C.

#### b) El fotoperiodo

Algunos prodigios propios del crecimiento de las plantas pueden ser estimulados por la cantidad horas luces que percibe la planta. De forma similar, la cantidad de luces que percibe el explante cultivado *in vitro* puede perjudicar a su proliferación. Pierik (1990) “el mejor fotoperíodo in vivo será también el mejor fotoperíodo *in vitro*”.

#### c) La intensidad de luz

Miller (1967) puede utilizarse para extender el fotoperiodo natural, se ha verificado que el efecto estimulador no necesita de la intensidad de luz, si no de la luz como tal.

## 2.4. Definición de términos

De bartolini y Lallana (1995) mencionan los términos comúnmente utilizados en los cultivos *in vitro*.

- **Asepsia:** Sin infección o contaminación de microorganismos.
- **Callo:** Como contestación a una herida, a partir de células vegetales diferenciadas se produce un desarrollo de una aglomeración de células indiferenciadas.
- **Termoterapia:** Consta en doblegar a la planta virosada a temperaturas anormalmente insignes durante un lapso de tiempo, de forma que el calor inactive al virus sin inactivar completamente a la planta.

- **Explante:** es una parte de una planta y transferido a un medio sintético para proliferación o conservación.
- **Inducción:** es el inicio de una estructura, órgano o sucesión "in vitro".
- **Subcultivo:** Es el trasplante de células, de un frasco de cultivo a otro. En el momento de la transferencia de los explante de un frasco a otro pierden un porcentaje deliberadamente o no.
- **Regeneración:** En cultivo de vegetales, una contestación morfogénica a impulso, que deriva en la productividad de órganos, embriones o plantas enteras.
- **Totipotente:** Una característica celular, en la cual se mantiene la potencialidad de formar todo tipo de células del organismo medrado.

## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

### 3.1. Lugar de desarrollo de la investigación

La investigación se realizó en el módulo de laboratorio de micropropagación vegetal en la sede del CITE productivo Madre de Dios, ubicado en km 16,5 carretera Puerto Maldonado – Cusco, distrito y provincia de Tambopata, departamento de Madre de Dios.

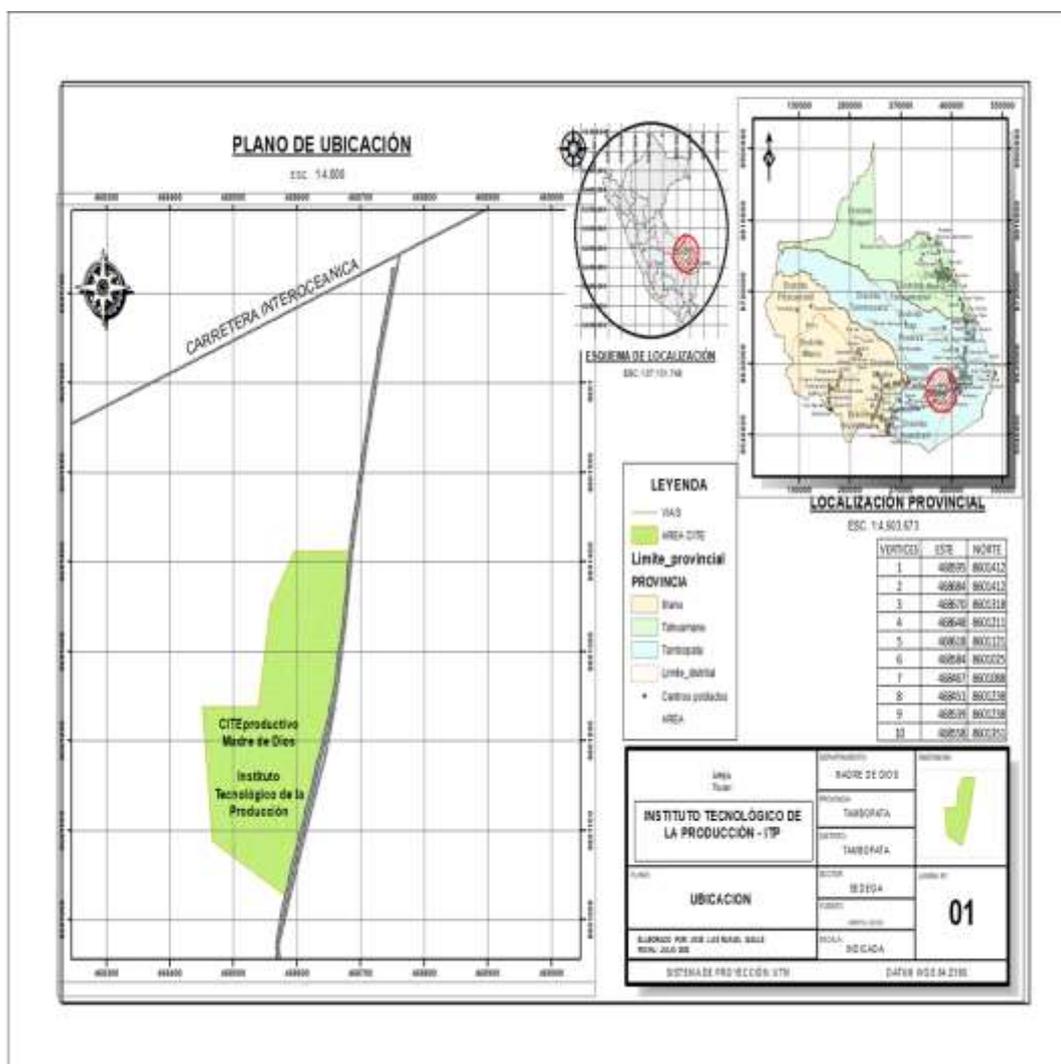


Figura 1. Mapa de ubicación del laboratorio de micropropagación CITE productivo MDD.

Tabla 2. Ubicación política.

<b>Ubicación política</b>	
Ciudad	Puerto Maldonado
Distrito	Tambopata
Provincia	Tambopata
Departamento	Madre de Dios
Nombre de edificación	CITE productivo Madre de Dios
Coordenadas UTM	19 L Este 0478905, Norte 8607585
Altitud	"214 m s.n.m."

### 3.2. Materiales, equipos e insumos

#### a) Materiales

- Magneto
- Platos de pesaje
- Pipeta
- Vaso precipitado
- Probeta
- Micropipeta
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Mechero
- Encendedor
- Placas Petri
- Espátula
- Bisturí
- Pinza
- Frascos de vidrio
- Papel toalla
- Bolsas autoclavables
- Saran wrap

- Plumón indeleble
- Pizeta

**b) Equipos**

- Destilador de agua
- PH metro
- Balanza analítica
- Horno microondas
- Refrigeradora
- Autoclave
- Agitador magnético
- Estufa
- Cabina de flujo laminar
- Aire acondicionado
- Cámara fotográfica

**c) Insumos**

- Sales de Woody plant medium
- Reguladores de crecimiento (citoquininas, giberelinas, auxinas)
- Fuente de carbono (Sacarosa)
- Agente gelificante (agar)
- Vitaminas (tiamina, myo inositol)
- Antioxidantes (ácido cítrico, ácido ascórbico).

### **3.3. Tipo de estudio**

Es de carácter experimental, por qué se determinó el efecto de los niveles de sacarosa y concentraciones de sales Woody Plant Medium en la multiplicación *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.).

### **3.4. Diseño del estudio**

El diseño estadístico que se empleó fue un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2 x 3 (factor 1: concentraciones de sales Woody Plant Medium y factor 2: niveles de sacarosa) distribuidos en 10 repeticiones cada combinación con tres individuos por repetición. Los factores estudiados son los siguientes:

### Factor 1: Concentraciones de sales (Woody Plant Medium)

**a<sub>1</sub>**: Sales de Woody Plant Medium (50% de concentración)

**a<sub>2</sub>**: Sales de Woody Plant Medium (100% de concentración)

### Factor 2: Niveles de sacarosa

**b<sub>1</sub>**: Sacarosa 30 gr/l

**b<sub>2</sub>**: Sacarosa 40 gr/l

**b<sub>3</sub>**: Sacarosa 50 gr/l

En la tabla 3, se muestra la combinación de estos factores dando como resultado 7 tratamientos, con 10 repeticiones, haciendo un total de 70 unidades experimentales. Cada unidad experimental estuvo conformada por tres individuos, sumando un total de 210 individuos (explantes).

Tabla 3. Las diferentes combinaciones de los factores de estudio.

<b>Factor 1 (concentración de WPM)</b>	<b>Factor 2 (Niveles de sacarosa)</b>	<b>Combinación</b>	<b>Tratamientos</b>
a <sub>1</sub>	b <sub>1</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	1
	b <sub>2</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	2
	b <sub>3</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>3</sub>	3
a <sub>2</sub>	b <sub>1</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	4
	b <sub>2</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>	5
	b <sub>3</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>3</sub>	6
Testigo	-	-	7

## 3.5. Población y muestra

### 3.5.1. Población

Para la presente investigación se contó con una población total de 1000 plantones de castaña los cuales estuvieron en el invernadero del CITE

Productivo – Madre de Dios, con la finalidad de extraer yemas apicales para el experimento.

### **3.5.2. Muestra**

De acuerdo al experimento y al diseño de estudio, se utilizaron 210 plántulas de castaña, los mismos que presentaban buenas características de desarrollo vegetativo y que estaban en estado saludable para extraer las 210 yemas apicales necesarias para el experimento. Esta cantidad de muestra se priorizó en función a la capacidad de espacio, insumos y la disponibilidad de plántulas de castaña disponibles en el invernadero del CITE Productivo - MDD, teniendo en cuenta que el experimento se desarrolló en condiciones de asepsia para la multiplicación *in vitro*.

## **3.6. Métodos y técnicas**

### **3.6.1. Fase de invernadero**

#### **a) Selección de plántulas de castaña**

Las plántulas son seleccionadas del invernadero CITE productivo - MDD, con aspectos favorables para la propagación, esencialmente tuvieron una altura de 15 – 30 cm aproximadamente y una edad de 4 a 6 meses. Estas plantas fueron donantes de yemas apicales.

#### **b) Tratamiento en invernadero**

Una vez seleccionadas las plantas madre o donadoras se mantuvieron en invernadero, bajo un tratamiento especial a base de fungicida benomil 2 gr/l y abono foliar, el cual se aplicó una vez por semana durante un mes, con la finalidad de disminuir la carga microbiana.

#### **c) Colecta de explantes**

La colecta de explantes (yemas apicales) se realizó a primeras horas del día de las plantas donadoras seleccionadas en el invernadero CITE productivo – MDD. Para la colecta de estos explantes se tomaron en cuenta lo siguiente: Los materiales de corte previamente desinfectados con alcohol 70% después de cada corte y la indumentaria apropiada (guantes, guardapolvo y barbijo)

esto para evitar la mínima contaminación del explante. Para el corte de los explantes se emplearon una tijera y pinza teniendo un ángulo de inclinación de 45° con respecto al eje horizontal.

#### **d) Transporte de explantes**

Los explantes colectados son depositados en frascos debidamente rotulada, y son trasladados al laboratorio en el menor tiempo posible a fin de no perder su estado óptimo.

### **3.6.2. Fase de laboratorio**

#### **a) Preparación de medio de cultivo**

INIA (2019) para el cultivo *in vitro* es fundamental definir la composición del medio de cultivo adecuado, ya que son la base para el desarrollo de las plantas. Bajo esta premisa, el procedimiento para la preparación del medio de cultivo se menciona a continuación:

En una probeta se midió 1000 ml de agua destilada y se transfirió aproximadamente 700 ml en un beacker, el cual se colocó en un agitador magnético para poder disolver, se añadió los componentes del medio de cultivo planteado (Anexo 5) previo pesaje en una balanza analítica, se continuó agitando hasta mezclar completamente todos los componentes.

Luego se aforó a la cantidad requerida (1000 ml), se ajustó el pH a 5,7 con NaOH y HCL, se agregó 5,5 gr de agar como agente gelificante y se llevó a una microondas para disolver completamente el agente gelificante por un lapso de 11 minutos; posteriormente con la ayuda de una pipeta se dispensó 4 ml de solución en tubos de ensayo N° 20 (20 x 125 mm) cerrándolo con tapadera plástica. Los medios de cultivo son esterilizados en autoclave a una temperatura de 121°C durante 15 minutos con presión de 1 atm, finalmente se dejó enfriar a T° ambiente y almacenados en una refrigeradora para su posterior utilización.

#### **b) Desinfección de explantes de castaña**

Para este efecto se han considerado dos procesos o fases de desinfección, el cual se mencionan a continuación:

- La primera se realizó fuera de la campana de flujo laminar, donde los explantes son sometidos a una solución de agua jabonosa y se mantuvieron en agitación constante por 10 minutos, se enjuagaron tres veces con agua de caño y finalmente con agua estéril.
- La segunda fase se desarrolló dentro de la campana de flujo laminar, donde los explantes se sometieron a una solución NaClO al 2,5% y se mantuvieron en agitación constante por un espacio de 10 minutos, se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril por un lapso de 4, 3, 2 y 1 minuto.

### **c) Introducción o establecimiento de explantes de castaña**

INIA (2019) indica que la fase de introducción o establecimiento tiene como objetivo establecer cultivos viables y asépticos.

Para lograr el éxito de la introducción, se tomó en cuenta los procedimientos adicionales (desinfección de cámara de flujo laminar y herramientas para el cultivo in vitro) mencionados por INIA (2019) y la indumentaria apropiada (guardapolvo y barbijo).

Después de la desinfección, los explantes se extrajeron sobre papel bond a fin de retirar las partes oxidadas de cada explante, luego son sembrados en los tubos de ensayo N° 20 (20 x 125 mm) que contenían 4 ml de medio de cultivo, finalmente se sellaron con cinta saran wrap y rotulados con el nombre específico (N° de explante y fecha). Los tubos con material vegetal son transferidos a una cámara de crecimiento bajo fotoperiodo de 16 horas/luz y 8 horas/oscuridad a una temperatura de 28°C y una intensidad lumínica de 2000 lux. Los explantes permanecieron por un periodo de 30 días para su posterior evaluación.

### **d) Multiplicación de explantes de castaña**

INIA (2019) menciona que esta etapa tiene como objetivo mantener e incrementar el número de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación. Para el desarrollo de esta fase de multiplicación, se tomaron los explantes establecidos (luego de pasar exitosamente la fase de introducción) y las que

originaron brotes foliares con el desarrollo de múltiples hojas. En la cabina de flujo laminar, los explantes son extraídos y colocados sobre papel bond para retirar las partes oxidadas de cada explante (en caso lo amerite), luego son sembrados en los tubos de ensayo (25 x 150 mm) que contenían 10 ml de medio de cultivo.

Finalmente se sellaron con cinta saran wrap y rotulados con el nombre específico (N° de explante y fecha). Los tubos con material vegetal son transferidos a una cámara de crecimiento bajo fotoperiodo de 16 horas/luz y 8 horas/oscuridad a una temperatura de 28°C y una intensidad lumínica de 2000 lux. Los explantes permanecieron por un periodo de 2 meses para su posterior evaluación.

En referencia al proceso metodológico de la micropropagación, en la figura 2, se muestra el flujograma empleado en la investigación.

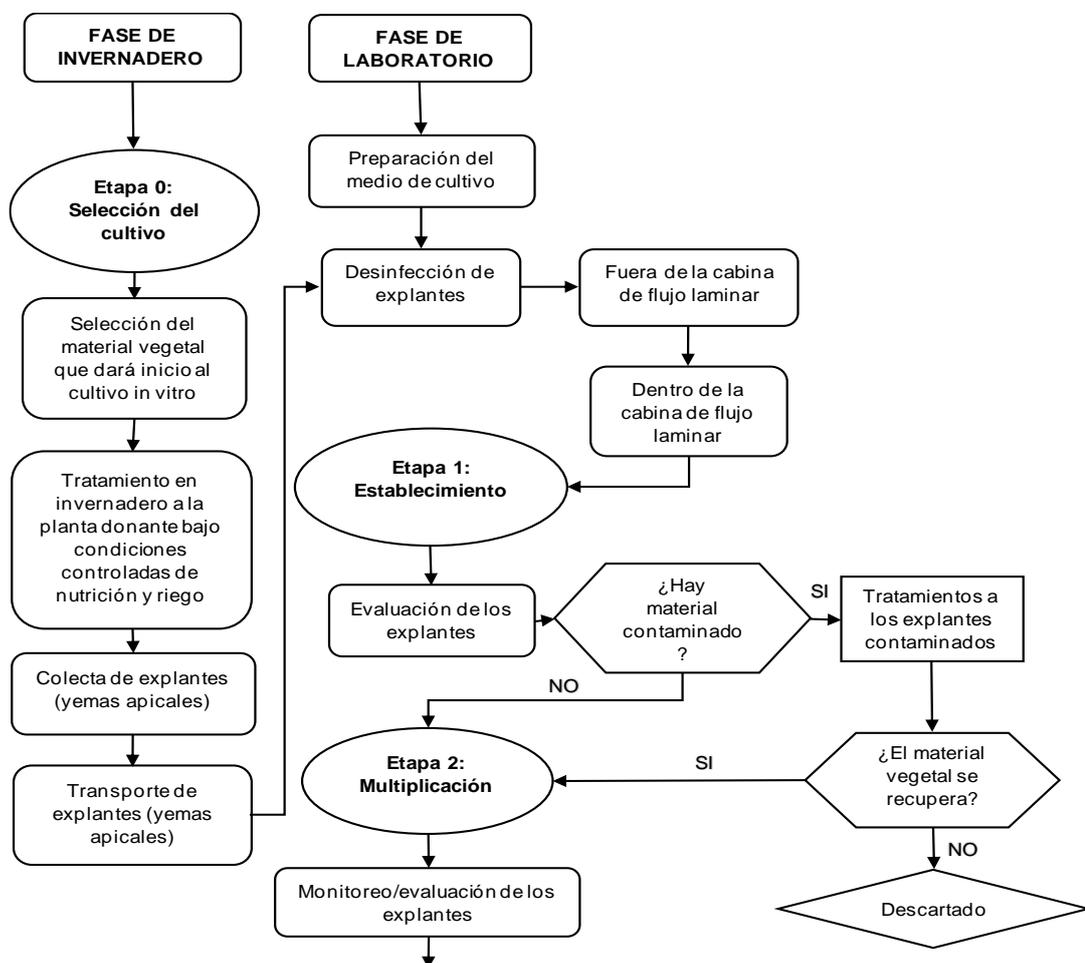


Figura 2. Flujograma del proceso de micropropagación.

### 3.7. Tratamiento de los datos

Los principales parámetros evaluados se mencionan a continuación:

- **Porcentaje de contaminación:** Se evaluó en porcentaje durante y al final de la investigación, contándose el número de explantes contaminadas en relación del total de explantes introducidas.
- **Porcentaje de supervivencia:** Se evaluó en porcentaje durante y al final de la investigación, contándose el número de explantes vivos en relación del total de explantes introducidos.
- **Altura del explante:** La altura se determinó en centímetros, los datos se tomaron desde inicio del vástago hasta la parte apical del explante, las evaluaciones se realizaron durante y al final de la investigación.
- **Número de hojas/explante:** Se evaluó durante y al final de la investigación, la proliferación de la parte aérea (producción y elongación de hojas y tallos).
- **Nº de nudos:** Se evaluó al inicio y al final de la investigación, contando el total de nudos por explante.
- **Viabilidad:** Se evaluó durante al final de la investigación, en forma visual por lote (número total de tubos por accesión) bajo los criterios mencionados por INIA,2019.

### 3.8. Análisis de datos

Para el tratamiento de los datos del diseño experimental usado, el mismo que fue un diseño completamente al azar con arreglo factorial (2 concentraciones de sales WPM x 3 niveles de sacarosa), se realizó el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de confiabilidad del 95%. Para los factores que resultaron estadísticamente significativos se realizó la prueba de “t” de Student. Los datos fueron procesados con el software estadístico libre R y R Studio para el análisis de varianza, RStudioTeam (2015); y utilizándose el paquete estadístico Agricolae para la comparación de promedios en la prueba de “t” de Student, Mendiburu (2021).

## CAPITULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

### 4.1. Establecimiento *in vitro* de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

#### 4.1.1. Porcentaje de asepsia de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

De acuerdo a los resultados (figura 3), la tasa máxima de explantes no contaminados fue en el medio de cultivo WPM al 50% con el 86,4% de asepsia y 13,6% de contaminación, esto al aplicar hipoclorito de sodio al 2,5% por 10 minutos.

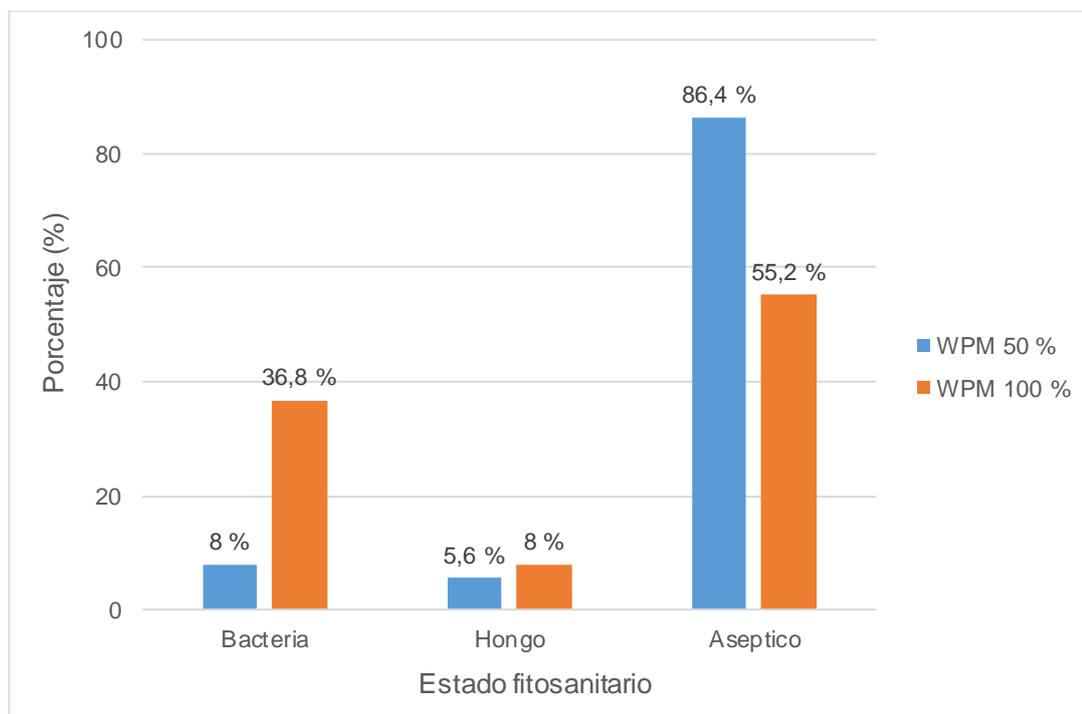


Figura 3. Porcentaje de asepsia de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

Similares resultados obtenidos por Campos et al. (2020) y Collado et al. (2004) al trabajar con explantes de *Swietenia macrophylla* King sumergidos en NaClO al 3% durante 15 minutos y NaClO al 3% por 20 minutos. A su vez, Suárez, Jarma y Avila (2006) lograron alcanzar el mayor porcentaje de

explantes libres de contaminación de Roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC) al aplicar 3% de NaClO por 10 minutos. En tanto, Olivas (2014) ha encontrado la dosis óptima para evitar la contaminación de las yemas axilares de capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth), al aplicar NaClO 2% + 15'.

Verçosa de Medeiros (2012) logró una contaminación por hongos y bacterias alcanzando una media del 38,54% y 45,83% en la regeneración *in vitro* de la castaña de Brasil (*Bertholletia excelsa* HBK). Los resultados logrados, son consecuentemente al pretratamiento que se dio a los explante antes y después de la siembra y a las condiciones estériles que se presentaron en el laboratorio.

#### 4.1.2. Porcentaje de supervivencia de explantes *in vitro* de castaña.

De acuerdo a los resultados (figura 4) se observó un alto porcentaje de supervivencia de los explantes introducidas en los medios de cultivo WPM 50% y WPM 100% con el 87,2% y 84% de explantes viables, evaluados a los 30 días después de la siembra.

El porcentaje de supervivencia de explantes de castaña se muestran en la figura 4.

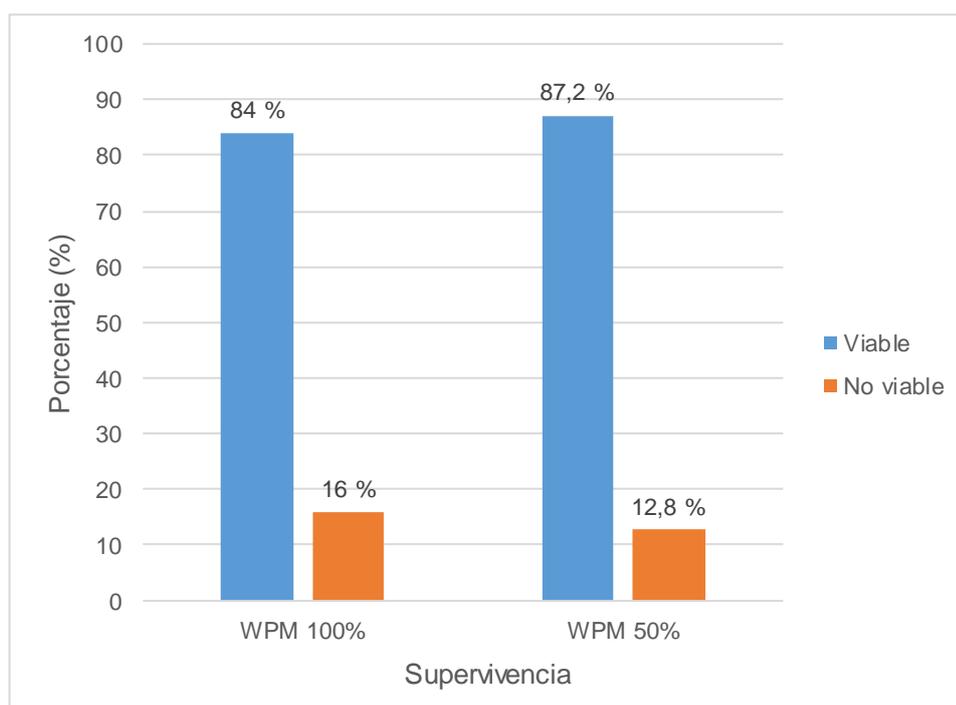


Figura 4. Porcentaje de supervivencia de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

Estos resultados son ligeramente mejores a los obtenidos por Verçosa de Medeiros (2012) logrando una tasa de supervivencia del 31,25% y Ancasi et al. (2016) en su investigación realizada en castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) obteniendo explantes con oxidación y sin contaminación, y no llegaron a la fase final del establecimiento. Lo cual mostró que la desinfección superficial efectuada al material vegetal (explantes) resultó efectivo para controlar los microorganismos.



Figura 5. Supervivencia de explantes de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

## 4.2. Multiplicación *in vitro* de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

### 4.2.1. Número de hojas de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

En la tabla 4, se muestran el valor promedio de número de hojas de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl) por cada uno de los tratamientos evaluados.

Tabla 4. Promedio de número de hojas por tratamiento de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

Tratamiento	Combinación	N° de explantes	Promedio
T1	WPM 50 % + 30 gr sacarosa	30	1,87
T2	WPM 50 % + 40 gr sacarosa	30	1,38
T3	WPM 50 % + 50 gr sacarosa	30	1,25
T4	WPM 100 % + 30 gr sacarosa	30	1,98
T5	WPM 100 % + 40 gr sacarosa	30	1,93
T6	WPM 100 % + 50 gr sacarosa	30	2,07

De acuerdo al análisis de varianza (tabla 5), se encontró que existen diferencias significativas en las concentraciones de sales de Woody Plant Medium utilizados.

Por otra parte, se registraron para el factor niveles de sacarosa e interacción de las mismas con las sales de Woody Plant Medium no mostraron diferencias estadísticas significativas.

Tabla 5. Análisis de varianza para número de hojas de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	P-valor	Significancia
Sales WPM	1	3,9168	3,9168	6,7621	0,01199	*
Sacarosa	2	0,8679	0,434	0,7492	0,4776	ns
Sales WPM x Sacarosa	2	1,2879	0,644	1,1117	0,3364	ns
Error	54	31,2785	0,5792			

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

En la comparación de promedios de número de hojas (tabla 6 y figura 6), se observó que las sales de Woody Plant Medium al 100% de su concentración

mostró un mejor efecto en el desarrollo de hojas con un promedio de 2,01 hojas, mientras las sales de Woody Plant Medium al 50% de su concentración solo obtuvo un promedio de 1,5 hojas.

Tabla 6. Prueba de comparación de promedios (t de Student) para sales Woody Plant Medium.

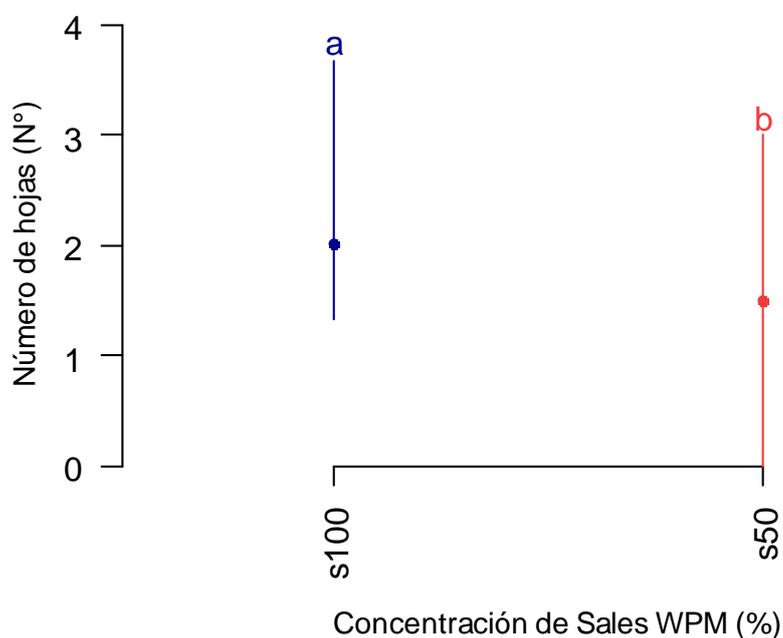
Sales WPM (%)	Hojas (N°)	Grupos
s100	2,011	a
s50	1,500	b

Valor critico de t: 2,004879

LSD: 0,3939747

Sin embargo, Campos et al. (2020) en su estudio sobre la micropropagación *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King logró obtener hojas grandes y un promedio de cuatro hojas por explante al emplear el medio WPM adicionado con 1 mg/l de BAP. Mientras, Martínez et al. (2015) obtuvo hojas más grandes de color verde intenso y más contenido de clorofila en el crecimiento *in vitro* de *Euphorbia leucocephala* Lotsy.

Figura 6. Promedio de número de hojas en las sales Woody Plant Medium.



#### 4.2.2. Altura de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

En la tabla 7, se muestran el valor promedio de altura de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) por cada uno de los tratamientos evaluados.

Tabla 7. Promedio de altura por tratamiento de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

Tratamiento	Combinación	N° de explantes	Promedio
T1	WPM 50 % + 30 gr sacarosa	30	2,25
T2	WPM 50 % + 40 gr sacarosa	30	2,01
T3	WPM 50 % + 50 gr sacarosa	30	1,66
T4	WPM 100 % + 30 gr sacarosa	30	2,09
T5	WPM 100 % + 40 gr sacarosa	30	2,24
T6	WPM 100 % + 50 gr sacarosa	30	2,43

De acuerdo al análisis de varianza (tabla 8), se encontró que existen diferencias altamente significativas con un 95% de certeza en las concentraciones de sales de Woody Plant Medium y la interacción de las mismas con los niveles de sacarosa. En tanto, en el factor "B" (niveles de sacarosa) no mostraron diferencias estadísticas significativas.

Tabla 8. Análisis de varianza para altura de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	P-valor	Significancia
Sales WPM	1	1,1371	1,13713	9,2543	0,003622	**
Sacarosa	2	0,1633	0,08166	0,6646	0,518641	ns
Sales WPM x Sacarosa	2	2,2179	1,10893	9,0249	0,000416	***
Error	54	6,6353	0,12288			

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

En la comparación de promedios de altura (tabla 9 y figura 7), se observó que un suministro de sales de Woody Plant Medium al 100% de su concentración

indujo un mejor efecto en el crecimiento en altura con un promedio de 2,25 cm; mientras, las sales de Woody Plant Medium al 50% de su concentración solo obtuvo un promedio de 1,97 cm.

Tabla 9. Prueba de comparación de promedios (t de Student) para sales Woody Plant Medium.

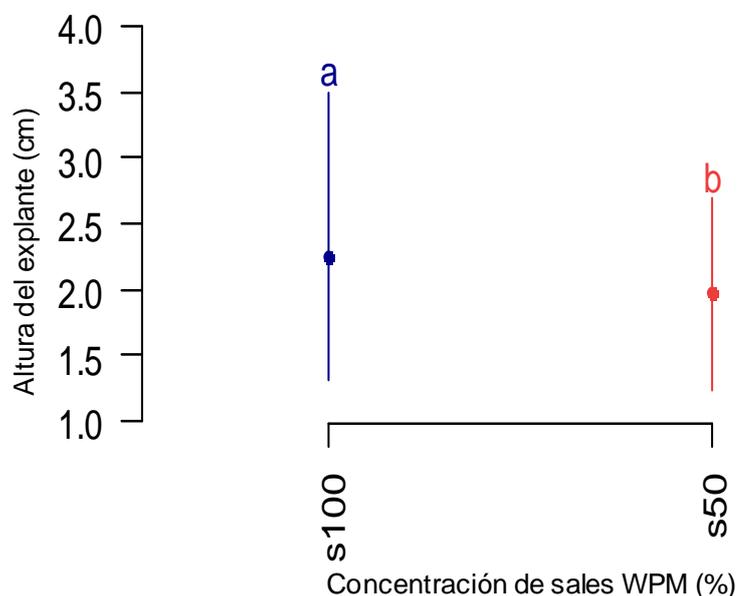
Sales WPM (%)	Altura (cm)	Grupos
s100	2,250	a
s50	1,975	b

Valor critico de t: 2,004879

LSD: 0,1814574

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa claramente un efecto positivo en el crecimiento de los explantes de *Bertholletia excelsa* Bonpl. al emplear WPM al 100% de su concentración. Estos resultados son superiores a los obtenidos por Campos et al. (2020) y Bacusoy y Macias (2019) en el crecimiento *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King. Asi mismo, Serrano, Cano y Casas (2012) manifiestan que las sales WPM fue más adecuado en el crecimiento *in vitro* de *Helianthemum marminorense*.

Figura 7. Promedio de altura en las sales Woody Plant Medium.



En la comparación de promedios de altura (tabla 10 y figura 8), se observó mayor crecimiento en el T6 (WPM 100% + 50 gr/l sacarosa) con promedio de 2,4 cm seguido del T1 (WPM 50% + 30 gr/l sacarosa) con 2,25 cm y T5 (WPM 100% + 40 gr/l sacarosa) con 2,23 cm, siendo éstas combinaciones las más eficientes para el crecimiento *in vitro*. Por otro lado, en la interacción de sales WPM al 50% con 50 gr/l de sacarosa los explantes resultaron más pequeñas que con el arresto de los tratamientos.

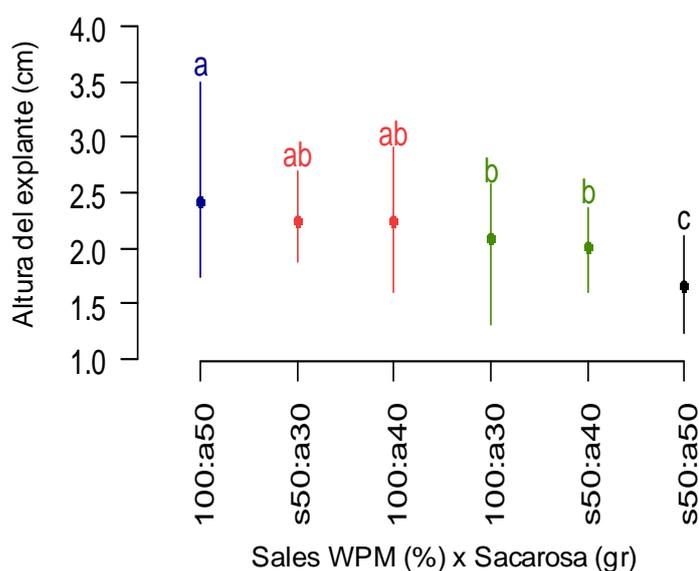
Tabla 10. Prueba de comparación de promedios (t de Student) para la interacción de sales WPM y niveles de sacarosa.

Sales WPM (%) x Sacarosa (gr)	Altura (cm)	Grupos
s100:a50	2,428	a
s50:a30	2,254	ab
s100:a40	2,238	ab
s100:a30	2,085	b
s50:a40	2,012	b
s50:a50	1,659	c

Valor crítico de t: 2,004879

LSD: 0,3142934

Figura 8. Promedio de altura en la interacción de sales WPM y niveles de sacarosa.



Los nutrimentos del medio de cultivo WPM y niveles de sacarosa empleados (WPM 100% + 50 gr/l y WPM 50% + 30 gr/l) influyeron positivamente en el crecimiento en altura, este último coincide con los resultados obtenidos por Perez et al. (2001) en el crecimiento *in vitro* de *Cedrela odorata* y Shibata et al. (1996) con *Crotón sublyratus*. Sin embargo, García, González y Manzanera (2001) manifiesta que esto atribuye a que las bajas concentraciones de sacarosa pueden inducir un metabolismo autotrófico. Además, las plantas leñosas requieren el medio WPM a bajas concentraciones.

Por otra parte, para el factor niveles de sacarosa no mostraron diferencias estadísticas significativas (tabla 8). Sin embargo, se observó visualmente que la concentración 30 gr/l de sacarosa fue óptima en el crecimiento de castaña. Lo cual coincide con lo manifestado por Millan (2006) en la micropropagación de *Cedrela odorata*. En contraste, Chávez et al. (2010) obtuvo plantas de *Pinus caribaea* var. con mayor desarrollo en longitud al emplear sacarosa 60 gr/l.

#### 4.2.3. Número de nudos de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

En la tabla 11, se muestran el valor promedio de número de nudos de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) por cada uno de los tratamientos evaluados.

Tabla 11. Promedio de número de nudos por tratamiento de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

Tratamiento	Combinación	N° de explantes	Promedio
T1	WPM 50 % + 30 gr sacarosa	30	2,73
T2	WPM 50 % + 40 gr sacarosa	30	2,52
T3	WPM 50 % + 50 gr sacarosa	30	1,88
T4	WPM 100 % + 30 gr sacarosa	30	2,77
T5	WPM 100 % + 40 gr sacarosa	30	2,58
T6	WPM 100 % + 50 gr sacarosa	30	2,72

De acuerdo al análisis de varianza (tabla 12), se encontró que existen diferencias significativas, en las concentraciones de sales de Woody Plant Medium, niveles de sacarosa y la interacción de las mismas.

Tabla 12. Análisis de varianza para número de nudos de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	P-valor	Significancia
Sales WPM	1	1,4353	1,43531	5,6954	0,02054	*
Sacarosa	2	2,029	1,0145	4,0256	0,02346	*
Sales WPM x Sacarosa	2	2,0437	1,02187	4,0548	0,02287	*
Error	54	13,6087	0,25201			

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

En la comparación de promedios de número de nudos (tabla 13 y figura 9), se observó que las sales de Woody Plant Medium al 100% de su concentración mostró un mejor efecto en la generación de nudos con un promedio de 2,68 nudos, mientras las sales de Woody Plant Medium al 50% de su concentración solo obtuvo un promedio de 2,37 nudos.

Tabla 13. Prueba de comparación de promedios (t de Student) para sales Woody Plant Medium.

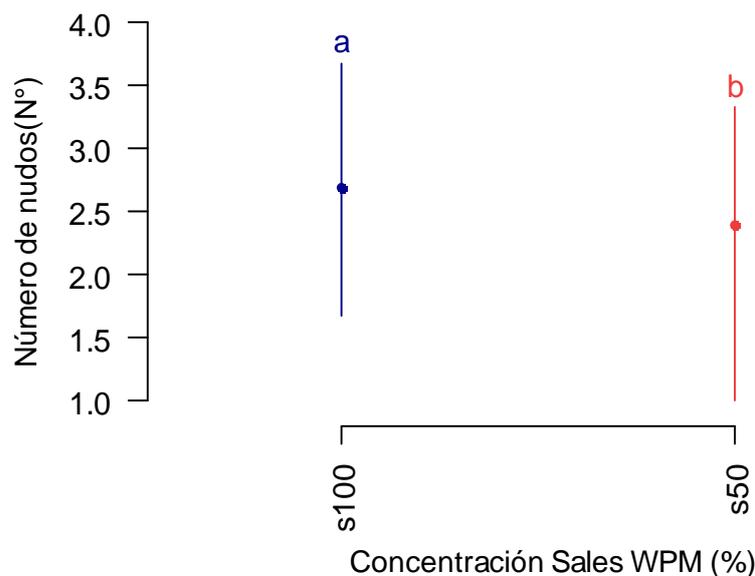
Sales WPM (%)	Nudos (N°)	Grupos
s100	2,688	a
s50	2,379	b

Valor crítico de t: 2,004879

LSD: 0,2598691

Ocampo y Núñez (2007) logró una mejor respuesta en la producción de nudos por brote al emplear WPM en la propagación *in vitro* de *Psidium guajaba*, y Hine, Rojas y Daquinta (2014) en el establecimiento *in vitro* de *Terminalia amazonia* (Amarillón). De esta manera se consolida que las sales de WPM es adecuado para cultivos *in vitro* de especies leñosas. Sin embargo, estos resultados contrastan en los estudios realizados por Biroščíková et al. (2004) en la propagación *in vitro* de *Ulmus glabra*.

Figura 9. Promedio de número de nudos en las sales Woody Plant Medium.



En la comparación de promedios de número de nudos (tabla 14 y figura 10), se observó que la sacarosa a 30 gr/l tiene el promedio más alto (2,7 nudos) y la más eficiente para generar nudos. Por otro lado, los niveles de sacarosa 40 y 50 gr/l solo generaron un promedio de 2,5 y 2,3 nudos respectivamente).

Tabla 14. Prueba de comparación de promedios (t de Student) para niveles de sacarosa.

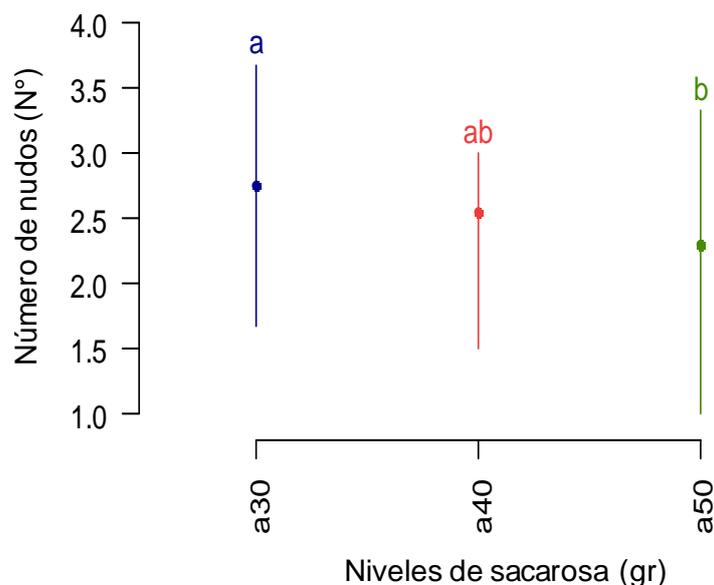
Sacarosa (gr)	Nudos (Nº)	Grupos
a30	2,750	a
a40	2,550	ab
a50	2,300	b

Valor crítico de t: 2,004879

LSD: 0,3182734

(López 2019) menciona que los explantes en un medio con bajo contenido de carbono, aseguran su crecimiento *in vitro* ante dicha carencia con una alta actividad fisiológica. Tal como se observa en los resultados, el uso de 30 gr/l de sacarosa influyó positivamente en la generación de nudos. Remache (2011) logró un desarrollo y crecimiento rápido en la micropropagación *in vitro* de cedro (*Cedrela montana*) con una media de 1 nudo de 4,9 mm.

Figura 10. Promedio de número de nudos en los niveles de sacarosa.



En la comparación de promedios de número de nudos (tabla 15 y figura 11), se observó que los tratamientos T4 (WPM 100% + 30 gr/l), T1 (WPM 50% + 30 gr/l), T6 (WPM 100% + 50 gr/l), T5 (WPM 100% + 40 gr/l) y T2 (WPM 50% + 40 gr/l) tienen los promedios más altos (T4= 2,76; T1= 2,73; T6= 2,71; T5 = 2,58 y T2 = 2,51), siendo estas combinaciones las más sobresalientes para la generación de nudos. Por otro lado, en la interacción de sales WPM al 50% y 50 gr/l de sacarosa, solo generaron un promedio de 1,88 nudos.

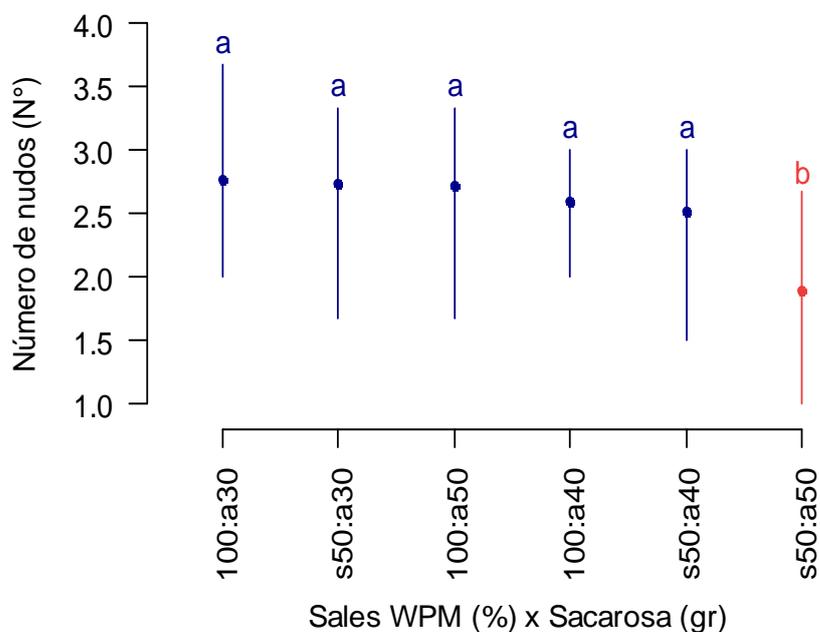
Tabla 15. Prueba de comparación de promedios (t de Student) para la interacción de sales WPM y niveles de sacarosa.

Sales WPM (%) x Sacarosa (gr)	Nudos (Nº)	Grupos
s100:a30	2,766	a
s50:a30	2,734	a
s100:a50	2,716	a
s100:a40	2,583	a
s50:a40	2,518	a
s50:a50	1,885	b

Valor crítico de t: 2,004879

LSD: 0,4501065

Figura 11. Promedio de número de nudos en la interacción de sales WPM y niveles de sacarosa.



Tal como se observa en los resultados, los tratamientos T4 (WPM 100% + 30 gr/l), T1 (WPM 50% + 30 gr/l) coinciden con lo citado por Hine, Rojas y Daquinta (2014) quienes obtuvieron como mejor medio de cultivo para desarrollo de *Terminalia amazonia* (Amarillón) al emplear WPM 100% y WPM 50% para *Vochysia allenii* (Botarrama Blanco) suplementados con 30 gr de sacarosa. Sin embargo, Serrano, Cano y Casas (2012) obtuvo el aumento de número de nudos al emplear WPM suplementado de 20 gr de sacarosa en la micropropagación *in vitro* de *Helianthemum marminorense*.

## CONCLUSIONES

- Se concluye que al realizar la desinfección con agua jabonosa y NaClO al 2,5% durante 10 minutos, obtuvo el 86,4 % de asepsia y 13,6 % de contaminación.
- En la etapa de multiplicación, la concentración de sales WPM 100% permitió obtener los mejores resultados en el desarrollo de *Bertholletia excelsa* Bonpl. y la interacción con 30 gr de sacarosa mostró un desarrollo eficiente en la generación de nudos.
- Se optimizó que la sacarosa 30 g/l fue más eficaz en el desarrollo de los parámetros morfológicos de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

## SUGERENCIAS

- Para una eficiente desinfección de las yemas apicales de *Bertholletia excelsa* Bonpl., es indispensable realizar un pretratamiento en invernadero.
- Realizar nuevos estudios con combinaciones de auxinas y citoquininas para obtener mayor proliferación de *Bertholletia excelsa* Bonpl.
- Estandarizar una metodología para desarrollar las etapas de establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación de plántulas de *Bertholletia excelsa* Bonpl. para nuevas investigaciones de esta especie forestal.
- Realizar nuevas investigaciones utilizando envases de frascos para su mejor desarrollo *in vitro* de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, G., PIERRE, J. y LEIGUE, L., 2016. Aplicacion del Cultivo de Tejidos en la Multiplicacion y Conservacion de los Recursos Fitogeneticos.
- ALCÁNTARA, J., GODOY, A., ALCÁNTARA, J. y SÁNCHEZ, R., 2019. Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, vol. 17, no. 32, pp. 109-129.
- ÁLVAREZ, L., 2006. Estudio de evaluación económica de la extracción de castaña *Bertholletia Excelsa* H.B.K – Madre de Dios. Memoria institucional. pp. 78.
- ANCASI, G., MONTERO, J., MAYGUA, R., MUÑOZ, I. y USNAYO, F., 2016. Protocolo para la propagacion in vitro de la castaña (*Bertholletia excelsa*). *Revista de Agricultura*, no. 56, pp. 37-42.
- ARIAS, E. y RONDÓN, J., 2010. Manejo Forestal de *Bertholletia excelsa* HBK (castaña o nuez de Brasil). *Revista Forestal Latinoamericana*, vol. 25, no. 1, pp. 93-113.
- BACUSOY, J. y MACÍAS, G., 2019. Propagación in vitro de caoba (*Swietenia macrophylla* King meliaceae) especie forestal en estado de vulnerabilidad. Universidad Técnica de Manabí - Ecuador. Disponible en: <http://repositorio.utm.edu.ec/bitstream/123456789/1310/1/pdf>.
- BIROŠČÍKOVÁ, M., SPIŠÁKOVÁ, K., LIPTÁK, Š., PICHLER, V. y ĎURKOVIČ, J., 2004. Micropropagation of mature wych elm (*Ulmus glabra* Huds.). *Plant Cell Rep*, vol. 22, pp. 640-644.
- CAMPOS, J., ARTEAGA, M., CAMPOS, S., CHICO, J. y CERNA, L., 2020. Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro de “ caoba ” *Swietenia macrophylla* King ( Meliaceae ). *Arnaldoa*, vol. 27, no. 1, pp. 141-156.
- CHÁVEZ, M., FERIA, M., BARBON, R., JIMÉNEZ, T., LA O, M., PÉREZ, P., QUIALA, E. y AGRAMONTE, D., 2010. Características morfológicas de

plantas in vitro de *Pinus caribaea* var. *Caribaea* influenciadas por el empleo de la sacarosa en la fase de multiplicación. *Biotecnología vegetal*, vol. 10, no. 1, pp. 31-40.

COLLADO, R., BARBÓN, R., AGRAMONTE, D., JIMÉNEZ, F., PÉREZ, M., GUTIÉRREZ, O. y RAMÍREZ, D., 2004. Establecimiento in vitro de ápices y segmento nodales de *Swietenia macrophylla* King. *Biotecnología vegetal*, vol. 4, no. 3, pp. 143-146.

CORVERA, R., DEL CASTILLO, D., SURI, W., CUSI, E. y CANAL, A., 2010. La castaña amazónica (*Bertholletia excelsa*) Manual de Cultivo [en línea]. Disponible en: <http://repositorio.iiap.org.pe/handle/IIAP/139>.

CUSI, E., 2013. Influencia de 12 sustratos en el crecimiento de *Bertholletia excelsa* H.B.K. en vivero, el castañal, Tambopata Madre de Dios.

DE BARTOLINI, B. y LALLANA, V., 1995. Catedra de fisiología vegetal : Terminos comunmente usados en cultivo de tejidos.

DELFÍN, Y., 2021. Exportaciones de castaña desde Perú hacia Estados Unidos y los factores que influyen en su variación. *Compendium*, vol. 24, no. 47, pp. 12.

DELGADO, L., 2013. Multiplicación clonal in vitro e in vivo de la especie forestal nativa *Aniba perutilis* Hemsley. Universidad Nacional de Colombia.

DELGADO, L. y HOYOS, R., 2016. Multiplicación clonal in vivo e in vitro de la especie forestal nativa *Aniba perutilis* Hemsl. *Acta Agronomica*, vol. 65, no. 2, pp. 190-196.

DELGADO, M.F., CUBA, M., HECHENLEITNER, P., THIERS, O. y DE, A., 2008. Propagación vegetativa de taique (*Desfontainia spinosa*) y tepa (*Laureliopsis philippiana*) con fines ornamentales Vegetative. *Bosque*, vol. 29, no. 2, pp. 120-126.

FIGUEIREDO, F. y CARVALHO, C., 2002. Aspectos Fisiológicos de Sementes de Castanha-do-brasil Submetidas a Condições de Estresse :

emergência e respiração. Belém: Embrapa Amazonia Oriental, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 05.

GARCÍA, G., GONZÁLEZ, M. y MANZANERA, J., 2001. *Quercus Suber* L. Somatic Embryo Germination and Plant Conversion: Pretreatments and Germination Conditions. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, no. 37, pp. 190-198.

GUARIGUATA, M., CRONKLETON, P., DUCHELLE, A. y ZUIDEMA, P., 2017. Revisiting the 'cornerstone of Amazonian conservation': a socioecological assessment of Brazil nut exploitation. *Biodivers Conserv*, vol. 26, pp. 2007-2027.

HAYGERT-LENCINA, K., ANTÔNIO-BISOGNIN, D., KIELSE, P. y PIMENTEL, N., 2017. Rooting and acclimatization of *Apuleia leiocarpa* plantlets. *Agrociencia*, vol. 51, no. 8, pp. 909-920.

HINE, A., ROJAS, A. y DAQUINTA, M., 2014. Establecimiento in vitro de dos especies nativas de Costa Rica: *Terminalia amazonia* (Amarillón) y *Vochysia allenii* (Botarrama Blanco). *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 16, no. 2, pp. 180-186.

INIA, 2019. Manual de Conservación in vitro en el Banco de Germoplasma del INIA.

LEIFERT, C., MURPHY, K. y LUMSDEN, P., 1995. Mineral and Carbohydrate Nutrition of Plant Cell and Tissue Cultures. *Critical reviews in plant science*, vol. 14, no. 2, pp. 83-109.

LINCANGO, R., 2015. Evaluación de 2 hormonas y dos medios de cultivo para la micropropagación in vitro de Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia* D. Don.) Quito, Pichincha. Universidad Central del Ecuador.

LÓPEZ, G., 2019. Establecimiento in vitro de papa (*Solanum tuberosum* L) variedad Purén- a partir de meristemos [en línea]. 2019. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6699/1/CPA-2019-T043.pdf>.

- LUQUE, L., 2021. Análisis de la deforestación de la Amazonia peruana: Madre de Dios. *Revista Innova Educación*, vol. 3, no. 3, pp. 198-112.
- MARTÍNEZ, Y., ANDRADE, M., COLINAS, M., VILLEGAS, O., CASTILLO, A. y ALIA, I., 2015. Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 38, no. 4, pp. 369-374.
- MENDIBURU, F., 2021. *Statistical Procedures for Agricultural Research*. Version 1.3-5. Package «agricolae» [en línea]. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/agricolae.pdf>.
- MILLAN, L., 2006. Micropropagación de cuatro especies maderables de interés para Colombia, mediante técnicas de cultivo in vitro. Universidad de Santiago de Compostela.
- MILLER, V., 1967. *Fisiología vegetal* [en línea]. Editorial. Mexico: Disponible en: [https://www.worldcat.org/title/fisiologia-vegetal/oclc/641720933? referer=di&ht=edition](https://www.worldcat.org/title/fisiologia-vegetal/oclc/641720933?referer=di&ht=edition).
- MINAM, 2014. La castaña Amazonica regalo de la biodiversidad. Sistematización de experiencias de investigación y manejo de castaña (*Bertholletia excelsa*) en ecosistemas de terrazas altas en el departamento de Madre de Dios.
- MINAM, 2016. Región Madre de Dios prioriza castaña como recurso estratégico. [en línea]. Disponible en: <http://www.minam.gob.pe/notas-de-prensa/madre-de-dios-castana-recurso-estrategico/>.
- MORI, S. y PRANCE, G., 1990. Taxonomy, Ecology, and Economic Botany of the Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). *Advances in Economic Botany*, vol. 8, pp. 130-150.
- MURASHIGE, T., 1974. Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, vol. 25, no. 1, pp. 135-166.
- NAVARRO, R., 2001. « Micropropagación de *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke “tornillo” a partir de yemas». Universidad Nacional Agraria la Selva.

- OCAMPO, F. y NÚÑEZ, V., 2007. Propagación in vitro de *Psidium guajaba* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, vol. 8, no. 1, pp. 22-27.
- OLIVAS, O., 2014. Desinfección ed yemas axilares para su establecimiento in vitro de capirona (*Calycophyllum spruceanum* Benth). Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- PEREZ, J., MESEN, F., HILJE, L. y AGUILAR, M., 2001. Método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata* fases de desarrollo y enraizamiento. *Recursos Naturales y Ambiente*, vol. 46, no. 47, pp. 146-151.
- PERLA, H., 2007. Evaluación de métodos de desinfección y tipos de explante de la especie vegetal *Piper oradendron* Trel . & Standl ., para el establecimiento de su cultivo in vitro. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- PIERIK, R., 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. España.
- PIETER, Z., 2003. Ecología y manejo del árbol de Castaña (*bertholletia excelsa*).
- RAMOS, L., 2018. Influencia del regimen de perturbacion de los bosques de castaña en la calidad de semilla y el vigor de las plantulas de castaña (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) en Madre de Dios, 2018.
- REAÑO, W., 2018. Madre de Dios: Castañas para todo el mundo.
- REMACHE, L., 2011. Desarrollo de una Técnica de Micropropagación in vitro de Cedro (*Cedrela montana*) a partir de Ápices, Hojas y Entrenudos [en línea]. Disponible en: <http://www.inia.uy/digital/bitstream/item/7130/1/LUZARDO-BUIATRIA-2017.pdf>.
- ROCA, W. y MROGINSKI, L., 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. fundamentos y aplicaciones.
- ROCA, W. y RAMÍREZ, H., 2000. Introducción a la Biotecnología Vegetal. Vicente Za. Colombia: s.n. ISBN 84-7738-101-1.

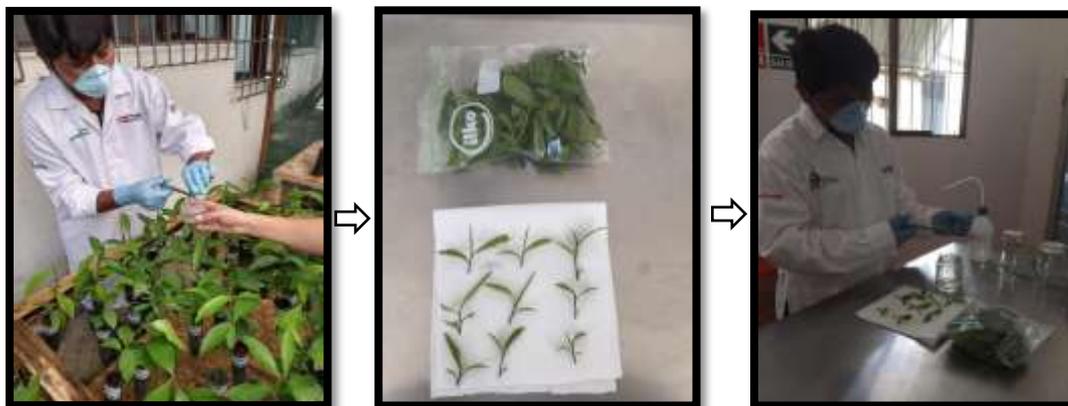
- ROCKWELL, C., GUARIGUATA, M., MENTON, M., ARROYO, E., QUAEVLI, J., WARREN, E., FERNANDEZ, H., JURADO, E., KOHAGURA, J., MEZA, L., REVILLA, O., QUENTA, R., VALERA, J., VILLARROEL, B. y YUCRA, J., 2015. Nut production in *Bertholletia excelsa* across a logged forest mosaic: Implications for multiple forest use. *Plos One*, vol. 10, no. 8, pp. 1-22.
- ROJAS, A. y HINE, A., 2019. Micropropagación de clones superiores de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de segmentos nodales. *Tropical Journal of Environmental Sciences*, vol. 53, no. 2, pp. 47-59.
- ROJO, G., RODRÍGUEZ, J. y RAMÍREZ, B., 2010. Biotecnología Aplicada a los Recursos Forestales. Libros Tecnicos. Serie Forestal. Mexico: s.n. ISBN 875-935-543-2.
- ROSELL, C. y VILLALOBOS, V., 1990. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales [en línea]. Roma: FAO. Disponible en: <https://www.worldcat.org/title/fundamentos-teorico-practicos-del-cultivo-de-tejidos-vegetales/oclc/807481341>.
- RSTUDIOTEAM, 2015. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA. [en línea]. 2015. Disponible en: <http://www.rstudio.com/>.
- SERRANO, F., CANO, M. y CASAS, J., 2012. In vitro propagation of *Helianthemum marminorense*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, vol. 21, no. 2, pp. 300-304.
- SHIBATA, W., MURAI, F., AKIYAMA, T., SIRIPHOL, M., MATSUNAGA, E., MORIMOTO, H. y I, 1996. Micropropagation of *Croton sublyratus* Kurz- a tropical tree of medicinal importance. *Plant Cell Reports*, vol. 16, no. 3, pp. 147-152.
- SINGH, S., DALAL, S., SINGH, R., DHAWAN, A. y KALIA, R., 2012. Seasonal influences on in vitro bud break in *Dendrocalamus hamiltonii* Arn. ex Munro nodal explants and effect of culture microenvironment on large scale shoot multiplication and plantlet regeneration. *Indian Journal of Plant Physiology*, vol. 17, no. 1, pp. 9-21.

- SUÁREZ, I., JARMA, A. y AVILA, M., 2006. Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de roble (*Tabebuia rosea* Bertol DC). *Temas Agrarios*, vol. 11, no. 2, pp. 52-62.
- SUAREZ, I., PÉREZ, P. y LOPEZ, C., 2020. Evaluación de sacarosa y GA3 en un cultivo in vitro de brotes de *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, vol. 21, no. 2, pp. 1-13.
- VERÇOSA DE MEDEIROS, N., 2012. Influencia del Cloranfenicol y Polivinilpirrolidona (PVP) en la regeneración in vitro de la castaña de Brasil (*Bertholletia Excelsa* HBK). *Revista Científica Interdisciplinaria Investigación Y Saberes*, vol. 1, no. 2, pp. 15-19. Disponible en: [http://revistasdigitales.utelvt.edu.ec/revista/index.php/investigacion\\_y\\_saberes/article/view/21](http://revistasdigitales.utelvt.edu.ec/revista/index.php/investigacion_y_saberes/article/view/21).
- VILCHEZ, J., MARTÍNEZ, L., ALVAREZ, C., ALBORNOZ, A., ALBANY, N., MOLINA, M. y LEYANIS, A., 2014. Medio de cultivo y reguladores de crecimiento en la multiplicación in vitro *Psidium guajava* L. *Biotecnología Vegetal*, vol. 14, no. 1, pp. 15-20.
- VILLALOBOS, V., LEUNG, D. y THORPE, T., 1984. Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. *Physiologia Plantarum*, vol. 61, pp. 497-504.

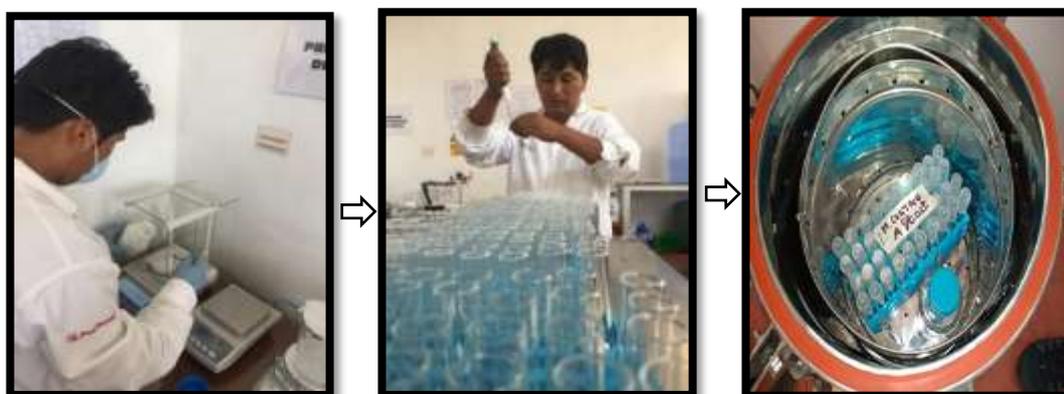
## ANEXOS

### ANEXO 1. Esquema metodológico de la investigación.

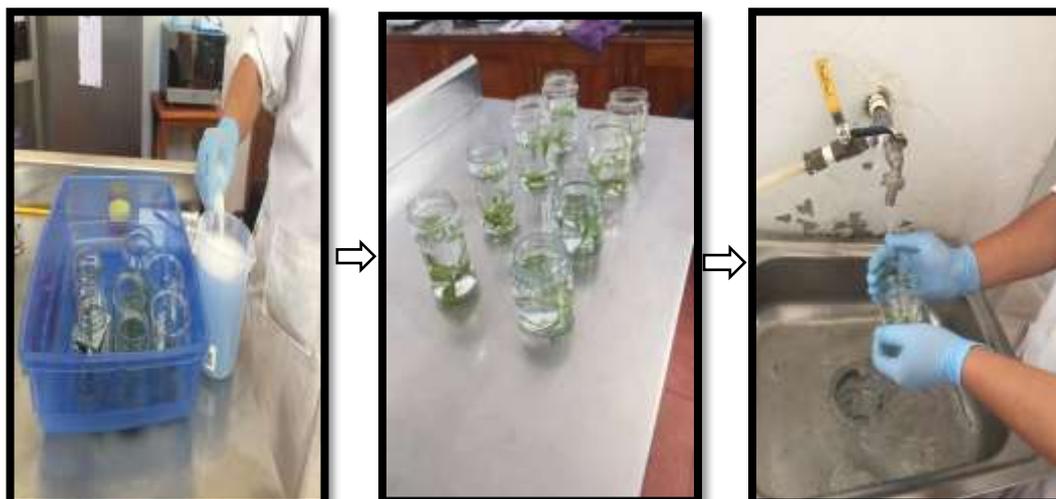
- a. Selección y colecta de material vegetal de *Bertholletia excelsa* Bonpl.



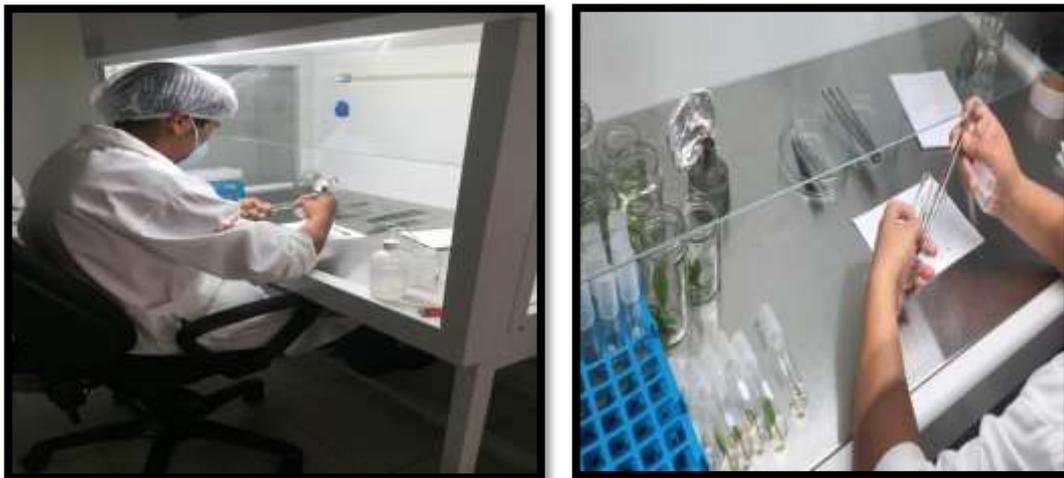
- b. Proceso de preparación de medio de cultivo.



- c. Proceso de desinfección del material vegetal.



d. Proceso de siembra de explantes de *Bertholletia excelsa* Bonp.



e. Material vegetal *Bertholletia excelsa* Bonp. en cámara de incubación.



f. Monitoreo y evaluación de explantes de *Bertholletia excelsa* Bonp.



**ANEXO 2. Resultados obtenidos por tratamiento.**

- Tratamiento I: Sales de WPM 50% + 30 g/L sacarosa



- Tratamiento II: Sales de WPM 50% + 40 g/L sacarosa



- Tratamiento III: Sales de WPM 50% + 50 g/L sacarosa



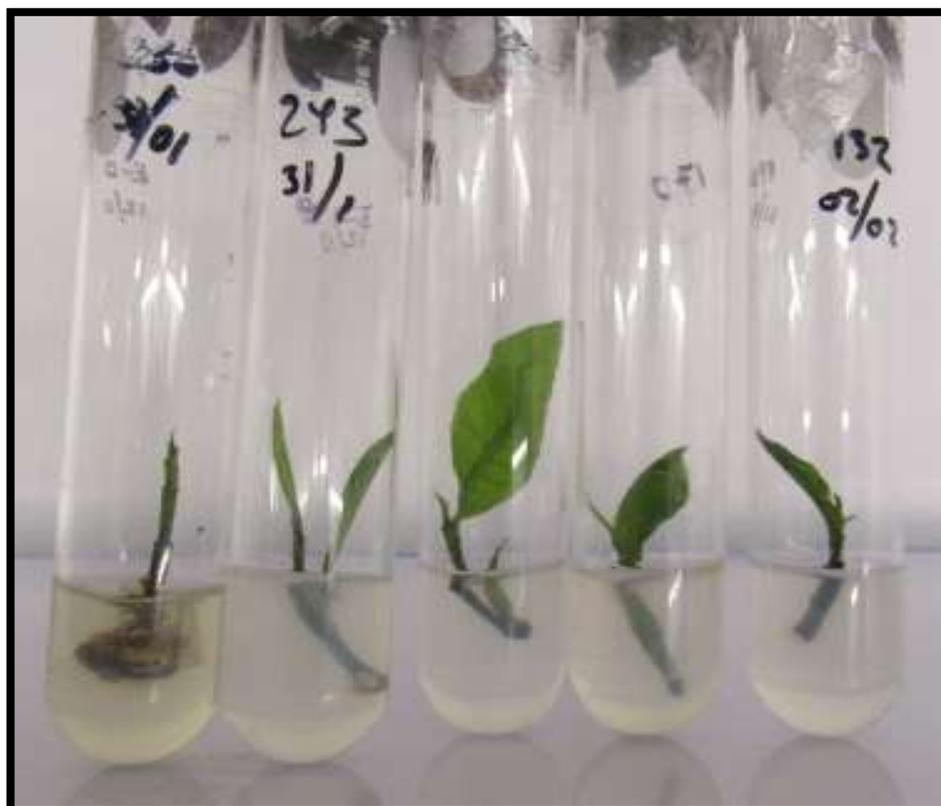
- Tratamiento IV: Sales de WPM 100% + 30 g/L sacarosa



- Tratamiento V: Sales de WPM 100% + 40 g/L sacarosa



- Tratamiento VI: Sales de WPM 100% + 50 g/L sacarosa



### Anexo 3: Constancia de identificación botánica de la especie estudiada.



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. **Jose Luis Rafael Quille**. Titulado "EFECTO DE LOS NIVELES DE SACAROSA Y SALES EN LA MULTIPLICACION IN VITRO DE CATAÑA (*Bestholletia excelsa Bonpl*) – PUERTO MALDONADO – MADRE DE DIOS – 2020", 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.

Nº	Código de Colecta	Nombre científico	Familia Según APG IV (2016)	Coordenada UTM 19L
1	J. L. Rafael - 001	<i>Bestholletia excelsa Bonpl</i>	Lecythidaceae	E-485085 N-8621296

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. Sifer Baez Quispe  
 DIRECTOR DEL HERBARIO

Cc:  
 Archivo

## 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/brccr, 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 **"Micropropagacion 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/brcc, 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	Co-investigador	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

*[Firma]*  
 Ing. Tania Margaret Yabar Villarreal  
 DIRECTORA REGIONAL



## Anexo 6: Matriz de Consistencia.

PROYECTO: "Efecto de los niveles de sacarosa y sales en la multiplicación *in vitro* de castaña (*Bertholletia excelsa* Bonpl.)

- Puerto Maldonado - Madre de Dios - 2020"

PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA	INDICADORES
<b>Problema general</b>	<b>Objetivo general</b>	<b>Hipótesis alterna</b>	<b>Variables dependientes</b>	<b>Nivel de investigación:</b> Experimental.	<b>Porcentaje de contaminación:</b> Se realizó, contando el número de plántulas contaminadas por bacterias y hongos.
¿Cuál es el efecto de los niveles de sacarosa y sales en la multiplicación <i>in vitro</i> de castaña ( <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl.)?	<ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar el efecto de tres niveles de sacarosa y dos concentraciones de sales en la multiplicación <i>in vitro</i> de castaña (<i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl.).</li> </ul>	<p><b>Ha:</b> Existen diferencias significativas en el efecto de los niveles de sacarosa y sales en la multiplicación <i>in vitro</i> de castaña (<i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl.).</p>	<p>Niveles de sacarosa</p> <p>Concentraciones de sales (Woody Plant Medium)</p>	<p><b>Diseño de investigación:</b> DCA con arreglo factorial AXB con 10 repeticiones.</p> <p><b>Población:</b> 1000 plantones presentes en invernadero CITE-Madre de Dios.</p> <p><b>Muestra:</b> 3 explantes por unidad experimental, total 210.</p> <p><b>Muestreo:</b> Al azar por unidad experimental.</p> <p><b>Recolección de datos:</b> Observación y medición de variables.</p> <p><b>Procesamiento de datos:</b> Análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confiabilidad del 95%, y para la comparación de medias se empleó "t" de Student. Los softwares estadísticos libre R y R studio y paquete estadístico Agricolae.</p>	<p><b>Porcentaje de supervivencia:</b> Se determinaron en unidades de explantes vivos en relación del total de explantes que se introdujeron inicialmente.</p> <p><b>Altura del explante:</b> 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><b>Número de hojas/explante:</b> Se evaluó durante y al final de la investigación, la proliferación de la parte aérea (producción y elongación de hojas y tallos).</p> <p><b>N° de nudos:</b> Se evaluó al inicio y al final del experimento, contando el total de nudos por explante.</p> <p><b>Viabilidad:</b> 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>
	<b>Objetivo específico</b>	<b>Hipótesis nula</b>	<b>Variables independientes</b>		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar los parámetros de asepsia favorables morfológicamente en la multiplicación <i>in vitro</i> de castaña (<i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl.).</li> <li>Evaluar el efecto respuesta de los niveles de sacarosa y sales en la multiplicación <i>in vitro</i> de castaña (<i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl.).</li> <li>Determinar la concentración óptima de sacarosa en la multiplicación <i>in vitro</i> de castaña (<i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl.).</li> </ul>	<p><b>Ho:</b> No existen diferencias significativas en el efecto de los niveles de sacarosa y sales en la multiplicación <i>in vitro</i> de castaña (<i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl.).</p>	<p>Características cuantitativas</p> <p>Características cualitativas</p>		



 UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZONICA DE MADRE DE DIOS	<b>REGLAMENTO GENERAL DE GRADOS Y TITULOS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS</b>	CÓDIGO: RGT - 13
		VERSIÓN: 3.0
		FECHA: Mayo-2022

**UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE DE DIOS**  
**FACULTAD DE INGENIERIA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA FORESTAL Y MEDIO AMBIENTE**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN**

Acta de sustentación oral y pública de Tesis para la obtención del Título Profesional de Ingeniero Forestal y Medio Ambiente.

Modalidad de titulación: Sustentación y Aprobación de Tesis

Título de la Tesis: titulado: "EFECTO DE LOS NIVELES DE SACAROSA Y SALES EN LA MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE CASTAÑA (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) PUERTO MALDONADO – MADRE DE DIOS- 2020", presentado por la Bachiller: José Luis, RAFAEL QUILLE.

En la ciudad de Puerto Maldonado, siendo las 11:00 horas del día 30 de setiembre del dos mil veintidós, en el Salón de Grados y Títulos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, y en mérito a la Resolución N° 304-2022-UNAMAD-DFI se realiza el acto académico de exposición y sustentación de la tesis, siendo el Jurado Revisor los Docentes:

Dr. Ing. Emer R. Rosales Solórzano Presidente  
 M.Sc. Ing. Saúl J. Manrique León Secretario  
 M.Sc. Ing. Jorge S. Garate Quispe Vocal

Como Asesor del Trabajo de Investigación: Dr. Joel Peña Valdeiglesias  
 Como Co –asesor del trabajo de investigación: MSc. Henry Robles Cueva.

El acto académico se inicia con la lectura de la resolución respectiva y el Reglamento en lo que concierne a la sustentación de tesis, luego se procede con la sustentación de tesis, finalizando con la etapa de preguntas, aclaraciones y observaciones respectivas. El Jurado Revisor califica la tesis y sustentación, obteniéndose el resultado de: **Aprobado con el calificativo de Bueno, por unanimidad, con la nota 17.** El jurado alcanza las observaciones respectivas las cuales debe ser absueltas en el tiempo más breve. El Presidente del Jurado Revisor da por concluida el Acto Académico de exposición y sustentación de la tesis, siendo las 12:00 horas del año en curso, firman los presentes.



Dr. Emer Rosales Solórzano  
PRESIDENTE



M.Sc. Saúl J. Manrique León  
SECRETARIO



M.Sc. Jorge S. Garate Quispe  
VOCAL



**Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios**  
 "MADRE DE DIOS, CAPITAL DE LA BIODIVERSIDAD DEL PERU"

**INFORME DICTAMEN 18-2022-UNAMAD-DFI/ERRS-MVD-VPA**

**PARA** : **Dr. Rosel Quispe Herrera**  
 Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios

**DE** : **Dr. Emer Ronald Rosales Solórzano**  
 Presidente Jurado Revisor del Proyecto de Tesis  
**Ing. Saúl Juan Manrique León**  
 Secretario Jurado Revisor del Proyecto de Tesis  
**Ing. Jorge Garate Quispe**  
 Vocal Jurado Revisor del Proyecto de Tesis

**ASUNTO** : Conformidad de levantamiento de observaciones de la tesis sustentada.

**REFERENCIA:** Acta de sustentación  
 RESOLUCIÓN DECANATURA N° 304-2022-UNAMAD-DFI

**FECHA** : Puerto Maldonado, 7 de noviembre del 2022

La presente es con la finalidad de hacer llegar a Ud. el dictamen de levantamiento de observaciones de la tesis titulado "EFECTO DE LOS NIVELES DE SACAROSA Y SALES EN LA MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE CASTAÑA (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) - PUERTO MALDONADO - MADRE DE DIOS - 2020" sustentado por el Bachiller Sr. José Luis Rafael Quille, el día 30 de setiembre del 2022 a las 11 horas en el salón de grados de la Facultad de Ingeniería de la UNAMAD.

Visto y verificado el levantamiento de las observaciones hechas a la tesis, dictaminamos **FAVORABLEMENTE**, por lo que se recomienda proceder con el empastado y su trámite correspondiente para su titulación.

Sin otro particular, quedo de Ud.

Atentamente,

Dr. Emer Ronald Rosales Solórzano  
**Presidente Jurado Revisor Proyecto de Tesis**

M.Sc. Saúl Juan Manrique León  
**Secretario Jurado Revisor de Proyecto de Tesis**

M.Sc. Jorge Santiago Garate Quispe  
**Vocal Jurado Revisor de Proyecto de Tesis**

C.c.  
 Archivo.