



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



Efecto de cuatro fuentes de citoquininas en la multiplicación *In Vitro* de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal en la Región San Martín

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero agrónomo

AUTOR:

Katerin Paola Amasifuén Alvarado

ASESOR:

Dr. Winston Franz Ríos Ruíz

CO - ASESOR:

Ing. Henri Delgado Haya

Ing. Mar Asunción Gárate Navarro

Tarapoto – Perú

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

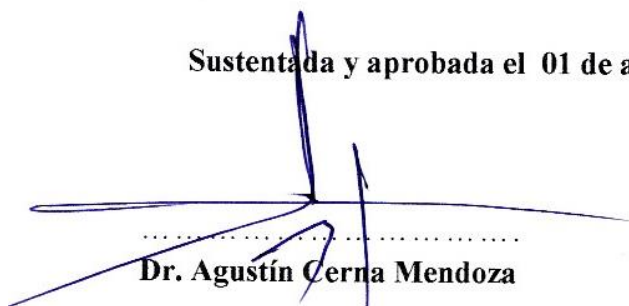


Efecto de cuatro fuentes de citoquininas en la multiplicación *In Vitro* de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal en la Región San Martín

AUTOR:


Katerin Paola Amasifuén Alvarado

Sustentada y aprobada el 01 de agosto del 2019, por los siguientes jurados:


.....
Dr. Agustín Cerna Mendoza
Presidente


.....
Ing. M.Sc. Patricia Elena García Gonzáles
Secretaria


.....
Ing. María Emilia Ruíz Sánchez
Miembro


.....
Dr. Winston Franz Ríos Ruíz
Asesor

Declaratoria de autenticidad

Katerin Paola Amasifuén Alvarado, con DNI N° 70229074, egresada de la Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Agronomía, autor de la tesis que lleva como título: **Efecto de cuatro fuentes de citoquininas en la multiplicación *In Vitro* de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal en la Región San Martín.**

Declaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. La redacción fue realizada respetando las citas y referencias de las fuentes bibliográficas consultadas.
3. Toda la información que contiene la tesis no ha sido auto plagiada;
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido alterados ni copiados, por tanto, la información de esta investigación debe considerarse como aporte a la realidad investigada.

Por lo antes mencionado, asumo bajo responsabilidad las consecuencias que deriven de mi accionar, sometiéndome a las leyes de nuestro país y normas vigentes de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.

Tarapoto, 01 de agosto del 2019.



Bach. Katerin Paola Amasifuén Alvarado

DNI N° 70229074

Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis.

1. Datos del autor:

Apellidos y nombres:	Amasifuén Alvarado Katerin Paola		
Código de alumno :	121103	Teléfono:	945130382
Correo electrónico :	paio.2495@gmail.com	DNI:	70229074

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Datos Académicos

Facultad de:	Ciencias Agrarias
Escuela Profesional de:	Agronomía

3. Tipo de trabajo de investigación

Tesis	(X)	Trabajo de investigación	()
Trabajo de suficiencia profesional	()		

4. Datos del Trabajo de investigación

Título:	«Efecto de cuatro fuentes de citoquininas en la multiplicación in vitro de Sacha Inchi (<i>Plukenetia volubilis</i> L.) bajo un sistema de Bioreactores de inmersión temporal en la Región San Martín»
Año de publicación:	2019

5. Tipo de Acceso al documento

Acceso público *	(X)	Embargo	()
Acceso restringido **	()		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:

6. Originalidad del archivo digital.

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.

7. Otorgamiento de una licencia **CREATIVE COMMONS**

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12° del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI **“Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA”**.

.....
Firma del Autor

8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM – T.

Fecha de recepción del documento:

22 / 10 / 2019



.....
Firma del Responsable de Repositorio
Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso
Abierto de la UNSM – T.

***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

** **Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

Dedicatoria

A Dios, quien se merece toda gloria y honra, por darme la vida para cumplir este sueño
anhelado.

A mi esposo Yoel Guerrero Chuquilin y mi hija Cattleya Consuelo Cristina quienes son mi
apoyo y la fuerza que me motiva a luchar por mis sueños.

A mis queridos padres Unías Amasifuén Tuanama y Consuelo Alvarado Pinedo y a mis
hermanos Luis David y Jhan Franco porque siempre me brindan su apoyo incondicional,
más aún en las situaciones difíciles que me tocó vivir.

Katerin Paola Amasifuén Alvarado

Agradecimiento

Agradezco a Dios por haber hecho posible concluir con este gran sueño de mi vida.

A la Universidad Nacional de San Martín y a los docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias que contribuyeron en la formación de mi carrera profesional.

Al Dr. Winston Franz Ríos Ruíz asesor del presente trabajo de investigación.

A mis Co – Asesores el Ing. Henri Delgado Haya y la Ing. Mar Asunción Gárate Navarro por la confianza, el apoyo técnico y el tiempo que ocuparon en impartirme parte de su conocimiento en la realización del presente trabajo.

A la Dirección Regional de Agricultura, por financiar el presente trabajo de investigación cuyos resultados llegarán a formar parte del desarrollo agrario.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación en su prestigiosa institución y por todo el apoyo brindado.

A mi esposo, mi hija, mis padres, hermanos, amigos, técnicos del Laboratorio de Biotecnología vegetal del INIA – EEA “El Porvenir San Martín” y a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en mi formación profesional.

A todos ellos, muchas gracias.

Índice general

	Pág.
Dedicatoria.....	vi
Agradecimiento	vii
Índice general	viii
Índice de tablas	ix
Resumen	xv
Abstract.....	xvi
 Introducción.....	 1
 CAPÍTULO I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	 3
1.1. Generalidades de cultivo	3
1.2. Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	7
 CAPÍTULO II MATERIAL Y MÉTODOS	 18
2.1. Materiales	18
2.2. Equipos	18
2.3. Reactivos	19
2.4. Métodos	19
2.4.1. Ubicación del experimento.....	19
2.4.2. Descripción del Experimento	19
2.4.3. Población y Muestra	21
2.4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	21
2.4.5. Variables evaluadas	29
 CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 31
 CONCLUSIONES.....	 56
 RECOMENDACIONES	 57
 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 58
 ANEXOS	 60

Índice de tablas

	Pag.
Tabla 1. Componentes de estudio	20
Tabla 2. Plan de experimentación	20
Tabla 3. Porcentaje de contaminación de BIT's con explantes de sachá inchi evaluados a los 42 días de la instalación evaluados en condiciones de laboratorio.	31
Tabla 4. Análisis de varianza del número brotes obtenidos a los 42 días de establecidos por cada unidad experimental	33
Tabla 5. Resumen del modelo para número de brotes obtenidos a los 42 días de establecidos por cada unidad experimental	34
Tabla 6. Análisis de varianza de la altura de plantas obtenidos a los 42 días de establecimiento	43
Tabla 7. Resumen del modelo para número de brotes obtenidos a los 42 días de establecidos por cada unidad experimental	43
Tabla 8. Programación del tiempo de inmersión y frecuencia de inmersión	61
Tabla 9. Proceso de preparación de hormonas	62
Tabla 10. Cantidad de citoquinina aplicar en ml	63
Tabla 11. Formulación de las sales para germinación de embriones cigóticos	65
Tabla 12. Formulación de las sales para multiplicación de sachá inchi en biorreactores bajo el sistema de inmersión temporal	65

Índice de figuras

	Pag.
<i>Figura 1.</i> Estadíos del desarrollo de fruto: a) Estadío 1, b) Estadío 2, c) Estadío 3 y d) Estadío 4 (Cachique, 2006).....	4
<i>Figura 2.</i> Semillas de seis agrupaciones del género <i>Plukenetia</i> encontradas en la Amazonía peruana: A = <i>P. brachybotrya</i> ; B = <i>P. lorentensis</i> ; C = <i>P. volubilis</i> (procedencia San Martín); D = <i>P. volubilis</i> (procedencia Cusco); E = <i>P. huayllabambana</i> ; F= <i>P. polyadenia</i> (Rodríguez et al., 2010).....	5
<i>Figura 3.</i> Brotes obtenidos a partir de segmentos nodales (Barrera, 2007)	9
<i>Figura 4.</i> Comparación entre las rutas de señalización del sistema bacteriano de dos componentes y de las citoquininas(Taiz & Zeiger, 2006a).....	13
<i>Figura 5.</i> Modelo de señalización de citoquininas(Taiz & Zeiger, 2006b)	14
<i>Figura 6.</i> Estructura química de la citoquinina 2Ip.....	16
<i>Figura 7.</i> Estructura química de la citoquinina Trans zeatina.....	16
<i>Figura 8.</i> Estructura química del BAP	17
<i>Figura 9.</i> Diagrama de proceso experimental	22
<i>Figura 10.</i> Planta madre, selección de la planta madre y colecta de material vegetal	23
<i>Figura 11.</i> Proceso de lavado y desinfección del material vegetal. a) y b) Decapsulado de la semilla, c) y d) extracción del endospermo de la semilla e) Lavado de las semillas en solución de detergente, f) Desinfección de las semillas con Kasugamicina, g) Desinfección de las semillas con NaOCl al 0,5 % en cámara de flujo laminar.	24
<i>Figura 12.</i> a) Embriones cigóticos sembrados b) Germinación de embriones cigóticos c) y d) Plántulas de sachá inchi germinadas in vitro.....	25
<i>Figura 13.</i> Esquema del modelo del Sistema de Inmersión temporal de frascos gemelos modificado de Alvera,(2015).....	26
<i>Figura 14.</i> a) Lavado de galones tipo cristal con solución detergente , b)y c) Lavado de mangueras, d) Desinfección de galones tipo cristal en NaOCl al 0,5% por 5 min, e) Secado de los BITS dentro de la cámara de flujo laminar, f) Esterilización de las unidades BITS con luz UV.	28
<i>Figura 15.</i> BITS limpios y contaminados.....	29
<i>Figura 16.</i> Evaluación de número de brotes.....	30

<i>Figura 17.</i> Evaluación de altura de brotes en cada explante de las unidades experimentales	30
<i>Figura 18.</i> Porcentaje de contaminación del cultivo de sachá inchi en Biorreactores de inmersión temporal en los tratamientos	32
<i>Figura 19.</i> Porcentaje de contaminación del cultivo de sachá inchi en Biorreactores de inmersión temporal en los tratamientos	32
<i>Figura 20.</i> Efectos simples o interacciones para número de brotes: Fuentes de citoquininas y tipo de explante(A x B), Fuentes de citoquininas y concentración de citoquininas (Ax C) y la interacción Tipo de explante y Concentración de citoquininas (B x C) Obtenida del software estadístico Minitab.....	35
<i>Figura 21.</i> Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el número de brotes , $\alpha = 0,05$. Obtenida del software estadístico Minitab.	36
<i>Figura 22.</i> Prueba de Tukey ($p < 0,05$) del número de brotes para el efecto principal Fuente de citoquinina (A), evaluados a los 42 días.	36
<i>Figura 23.</i> Prueba de Tukey ($p < 0,05$) del número de brotes para el efecto principal Tipo de explante (B), evaluados a los 42 días.	37
<i>Figura 24.</i> Prueba de Tukey ($p < 0,05$) del número de brotes para el efecto principal concentración de citoquinina (C), evaluados a los 42 días.	38
<i>Figura 25.</i> Prueba de Tukey ($p < 0,05$) del número de brotes para la interacción Fuente de citoquinina (A) x Tipo de explante(B), evaluados a los 42 días.....	39
<i>Figura 26.</i> Prueba de Tukey ($p < 0,05$) del número de brotes para la interacción Fuente de citoquinina (A) x concentración de citoquinina (C), evaluados a los 42 días. .	40
<i>Figura 27.</i> Prueba de Tukey ($p < 0,05$) del número de brotes para la interacción tipo de explante (A) x tipo de explante (B)x concentraciones de citoquininas (C), evaluados a los 42 días.	41
<i>Figura 28.</i> Efectos simples o interacciones para altura de brotes: Fuentes de citoquininas y tipo de explante(A x B), Fuentes de citoquininas y concentración de citoquininas (Ax C) y la interacción Tipo de explante y Concentración de citoquininas (B x C) Obtenida del software estadístico Minitab.....	44
<i>Figura 29.</i> Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el altura de brotes de brotes , $\alpha = 0,05$. Obtenida del software estadístico Minitab.....	45

<i>Figura 30.</i> Prueba de Tukey ($p < 0,05$) de la altura de brotes para el efecto principal Fuente de citoquinina (A), evaluados a los 42 días.	45
<i>Figura 31.</i> Prueba de Tukey ($p < 0,05$) de la altura de brotes para el efecto principal tipo de explante (B), evaluados a los 42 días.	46
<i>Figura 32.</i> Prueba de Tukey ($p < 0,05$) de la altura de brotes para el efecto principal concentración de citoquinina (C), evaluados a los 42 días.	47
<i>Figura 33.</i> Prueba de Tukey ($p < 0,05$) de la altura de brotes para la interacción Fuente de citoquinina (A) x Tipo de explante (B), evaluados a los 42 días.	47
<i>Figura 34.</i> Prueba de Tukey ($p < 0,05$) de la altura de brotes para la interacción Fuente de citoquinina (A) x concentración de citoquinina (C), evaluados a los 42 días. .	48
<i>Figura 35.</i> Prueba de Tukey ($p < 0,05$) de la altura de brotes para la interacción Tipo de explante (B) x concentración de citoquinina (C), evaluados a los 42 días.	49
<i>Figura 36.</i> Prueba de Tukey ($p < 0,05$) para la interacción Fuente de citoquinina (A) x tipo de explante (B) x concentración de citoquininas (C), evaluados a los 42 días.	50
<i>Figura 37.</i> Plántulas de sachá inchi obtenidas en el sistema de inmersión temporal adicionando Kinetina a) Plántula del T1= Segmento apical +Kinetina (0,045 μM) b) T2= Segmento apical +Kinetina (0,45 μM) c) T3= Segmento apical +Kinetina (2,32 μM), d) T4=Segmento apical +Kinetina (23,23 μM) , e) T5= Segmento nodal +Kinetina (0,045 μM) f) T6= Segmento nodal +Kinetina (0,45 μM) g) T7= Segmento nodal +Kinetina (2,32 μM), h) T8=Segmento nodal +Kinetina (23,23 μM)	52
<i>Figura 38.</i> Plántulas de sachá inchi obtenidas en el sistema de inmersión temporal adicionando Trans zeatina, a) Plántula del T9= Segmento apical + Trans zeatina (0,045 μM) b) T10= Segmento apical + Trans zeatina (0,45 μM) c) T11= Segmento apical + Trans zeatina (2,32 μM), d) T12=Segmento apical + Trans zeatina (23,23 μM) y los tratamientos e) T13= Segmento nodal + Trans zeatina (0,045 μM) f) T14= Segmento nodal + Trans zeatina (0,45 μM) g) T15= Segmento nodal + Trans zeatina (2,32 μM), h) T16=Segmento nodal + Trans zeatina (23,23 μM)	53
<i>Figura 39.</i> Plántulas de sachá inchi obtenidas en el sistema de inmersión temporal adicionando BAP a) Plántula del T17= Segmento apical +BAP (0,045 μM) b) T18= Segmento apical + BAP (0,45 μM) c) T19= Segmento apical + BAP	

(2,32 **uM**), d) T20=Segmento apical + BAP (23,23 **uM**), e) T21= Segmento nodal +BAP (0,045 **uM**) f) T22= Segmento nodal + BAP (0,45 **uM**) g) T23= Segmento nodal + BAP (2,32 **uM**), h) T24=Segmento nodal + BAP (23,23 **uM**)..... 54

Figura 40. Plántulas de sachá inchi obtenidas en el sistema de inmersión temporal adicionando 2ip a) Plántula del T25= Segmento apical +2 ip (0,045 **uM**) b) T26= Segmento apical + 2 ip (0,45 **uM**) c) T27= Segmento apical + 2 ip (2,32 **uM**), d) T28=Segmento apical + 2 ip (23,23 **uM**), e) T29= Segmento nodal +2 ip (0,045 **uM**) f) T30= Segmento nodal + 2 ip (0,45 **uM**) g) T31= Segmento nodal + 2 ip (2,32 **uM**), h) T32=Segmento nodal + 2 ip (23,23 **uM**) 55

Figura 41. Tablero de control ON/OFF, donde se programó el experimento..... 61

Figura 42. Plántulas obtenidas a los 35 días de establecimiento con el tratamiento 16 67

Figura 43. Plantulas T16 con presencia de raíces 67

Listado de siglas o abreviaturas

AG3	: Ácido giberélico
AIA	: Ácido Indol Acético
AIB	: Ácido Indol butírico
ANA	: Ácido naftalenacetico
BAP	: Bencilademinpurina
BIT	: Biorreactores de inmersión temporal
DCA	: Diseño completamente aleatorizado
DRASAM	: Dirección Regional de Agricultura San Martín
DKW	: Medio Driver y Kuniyuki
ELC	: Endospermo líquido de coco
HCL	: Ácido clorhídrico
INIA	: Instituto Nacional de Innovación Agraria
KIN	: Kinetina
MS	: Medio Murashige y Skoog
NaOCl	: Hipoclorito de sodio
SIT	: Sistema de inmersión temporal
UV	: Ultra violeta
<i>u</i>M	:Micromolar
ZEA	: Zeatina
2i p	: 2-Isopentenil-adenina
2,4-D	: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la tasa de multiplicación del cultivo de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) mediante un sistema de inmersión temporal, utilizando cuatro fuentes y cuatro concentraciones de citoquininas. Para ello se utilizó segmentos nodales y segmentos apicales de plántulas germinadas *in vitro* de sachá inchi, en medio de cultivo con M&S suplementado con Kinetina, trans zeatina, Bap y 2ip según tratamiento a concentraciones de 0,045 uM , 0,45 uM , 2,32 uM , 23,32 uM. En un sistema de biorreactores de inmersión temporal. Los cuales fueron distribuidos en un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial 4x2x4. Se evaluó variables que influyen en la propagación *in vitro* bajo el sistema de inmersión temporal como: porcentaje de contaminación, número y altura de brotes. Se determinó que utilizando segmento nodal como tipo de explante ,BAP como fuente de citoquinina a 0,45 uM nos permite lograr mayor tasa de multiplicación *in vitro* bajo el sistema de biorreactores de inmersión temporal, pues el T22 logró obtener 5,22 brotes a 42 días de establecimiento. Sin embargo en la longitud de brotes el T16 (Trans zeatina, segmento nodal y 23,23 uM) presentó un mejor comportamiento logrando un longitud 6,13 cm. Finalmente se identificó que los tratamientos con Bap obtuvieron mejores características morfológicas adecuadas para la aclimatación, tratamientos con trans zeatina lograron multiplicarse pero sufrieron hiperhidratación. Los tratamientos con 2 ip llegaron a causar quemado de explantes reduciendo su multiplicación. Asimismo se identificó que al utilizar segmentos nodales y Bap en bajas concentraciones favorecen la formación de raíces. De modo contrario al utilizar segmentos apicales y altas concentraciones de citoquininas inducen a la formación de callos.

Palabras clave: Biorreactores, citoquininas , *Plukenetia volubilis*, sistema de inmersión temporal, tasa de multiplicación.

Abstract

The objective of the following work was to evaluate the multiplication rate of the sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L) culture by means of a temporary immersion system, using four sources and concentrations of cytokinins. To this end, nodal segments and apical segment of *in vitro* germinated seedlings of sachá inchi were used in culture medium with MS supplemented with Kinetin, trans zeatin, Bap and 2ip according to treatment at concentrations of 0,045 uM, 0,45 uM, 2,32 uM, 23,32 uM. In a system of temporary immersion bioreactors. Which were distributed in a Completely Random Design with factorial arrangement 4x2x4. Variables that influence *in vitro* propagation under the temporary immersion system were evaluated as: percentage of contamination, number of shoots and height of shoots. It was determined that using nodal segment as explant type, BAP as a source of cytokinin at 0.45 uM allows us to achieve higher *in vitro* multiplication rate under the temporary immersion bioreactor system, as the T22 managed to obtain 5,22 shoots at 42 days of establishment. However, in the length of shoots, T16 (Trans zeatin, nodal segment and 23,23 uM) presented a better behavior, achieving a length of 6,13 cm. Finally, it was possible to evaluate the effect of cytokinin concentrations on the phenotypic characteristics of the explants, where it was identified that the trans-zeatin could multiply. However, they are explant with glassy appearance. The treatments with 2 ip were able to cause burns of explants reducing their multiplication. In addition, when using high concentrations BAP induces the formation of calluses of the explant, the apical segments used in this experiment did not manage to form roots, while the nodal segments achieved the formation of roots.

Keywords: Bioreactors, cytokinins, *Plukenetia volubilis*, temporary immersion system, multiplication rate.



Introducción

El cultivo de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en los últimos años ha venido tomando importancia económica e industrial en el mercado internacional por su alto contenido de ácidos grasos esenciales (ácido linolénico, linoleico y oleico, conocidos como omega 3, 6 y 9 respectivamente) y vitamina E en cantidades elevadas en comparación a otras oleaginosas (Manco, 2003; citado por Cachique, 2006), por lo que es necesario incrementar la producción de semilla de sachá inchi, no solo a través del sembrío de grandes extensiones de terreno, sino también mejorando el rendimiento del cultivo para abastecer dicho mercado, lo que trae como consecuencia el aumento de la demanda de grandes cantidades de plantas mejoradas por parte los productores de sachá inchi de la región San Martín.

Por otro lado, la plantación y uso a nivel industrial del sachá inchi siempre ha estado limitada por la ausencia de métodos confiables de propagación del cultivo (Ruiz-Solsol y Mesén, 2010; citado por Solis, 2016) ya que el sachá inchi es una especie alógama (Cachique, 2006), haciendo difícil su propagación sexual debido a la variabilidad genética que genera este método de propagación, donde se pierde las características agronómicas deseables de la planta madre. Como alternativa a esto nace la propagación vegetativa con el uso de cultivo de tejidos vegetales, que permite multiplicar genotipos superiores y asegurar la conservación de germoplasma valioso.

Sin embargo, este método de propagación de forma convencional también está restringido a producir pequeñas cantidades de plántulas, por lo que surge el uso del cultivo de tejidos vegetales mediante el sistema de inmersión temporal usando biorreactores, que es una metodología muy eficiente que permite la multiplicación masiva de plantas, brindándoles grandes beneficios como mejorar la absorción de nutrientes del medio de cultivo, evita la contaminación por gases tóxicos (ya que cuenta con una atmósfera gaseosa artificial) y evita también problemas de hiperhidricidad.

La Dirección Regional de Agricultura San Martín (DRASAM) en los últimos años ha venido investigando y promoviendo el cultivo de sachá inchi, considerando su importancia para el desarrollo económico de toda la región.

El presente trabajo de investigación está enmarcado dentro del proyecto “Mejoramiento del Servicio de Competitividad de la Cadena de Valor de Sachá Inchi a los Productores en cuatro Provincias de la Región San Martín” que es ejecutado por la DRASAM en convenio con la

Estación Experimental Agraria (EEA) “El Porvenir San Martín” del INIA, y tiene como objetivo principal evaluar la tasa de multiplicación del cultivo de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L) mediante un sistema de biorreactores inmersión temporal, utilizando cuatro fuentes y concentraciones de citoquininas, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- a) Determinar el tipo de explante de sachá inchi, la fuente y concentración de citoquinina que permite lograr mayor tasa de multiplicación *in vitro* bajo el sistema de biorreactores de inmersión temporal.
- b) Evaluar el efecto de las concentraciones de citoquininas en las características morfológicas de los explantes.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Generalidades de cultivo

1.1.1. Origen del cultivo

Según Manco (2006), en el Perú se encuentra al cultivo en forma silvestre en diversos lugares de San Martín, Ucayali, Huánuco, Cuzco, Amazonas, Loreto y Madre de Dios. En San Martín se encuentra en toda la cuenca del Huallaga, en la Provincia de Lamas, en el Valle de Sisa, Alto Mayo y Bajo Mayo.

1.1.2. Taxonomía del cultivo

La clasificación taxonómica del cultivo de sachá inchi, según (Macbride, 1951) es la siguiente:

Reino: Vegetal

División: Spermatophyta

Clase: Dicotyledonea

Orden: Euphorbiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Plukenetia*

Especie: *Plukenetia volubilis* Linneo

1.1.3. Morfología de la planta

(Dostert et al., 2009) menciona que el sachá inchi es una planta trepadora, monoica y posee las siguientes características:

1.1.3.1. Hojas

Las hojas son opuestas y simples; la lámina foliar es ovoido-triangular, 6 cm -13 cm de largo y 4 cm- 10 cm de ancho, con base truncada o cordada; el margen es crenado o finamente aserrado (Dostert et al., 2009).

1.1.3.2. Inflorescencia

La inflorescencia es racemosa, alargada, monoica (bisexual), de 5 cm a 18 cm de largo; las flores pistiladas se encuentran solitarias en los nudos basales, la columna estilar es parcial o totalmente connada, de 15 mm a 30 mm de largo, flores masculinas subglobosas, numerosas, agrupadas en los nudos distales; estambres de 16 mm a 30 mm, con filamentos conspicuos, cónicos de 0,5 mm de largo (Dostert et al., 2009).

1.1.3.3. Frutos

Las cápsulas son tetrámeras o pentámeras, glabras de 2,5 cm a 6 cm de diámetro (Dostert et al., 2009).

Cachique (2006) estableció escalas para determinar estadios de maduración del fruto de sachá inchi:

- ❖ **Estadio 1:** Ovario fecundado (posterior a la apertura del estigma)
- ❖ **Estadio 2:** Longitud del ovario fecundado (fruto) mayor que la longitud del pedúnculo.
- ❖ **Estadio 3:** Fruto maduro, adoptando una coloración grisácea
- ❖ **Estadio 4:** Fruto seco, de coloración marrón oscuro, observándose dehiscencia a lo largo de las soldaduras de las valvas del endocarpo.

Estos estadios de maduración del fruto de sachá inchi se pueden ver en la Figura 1.

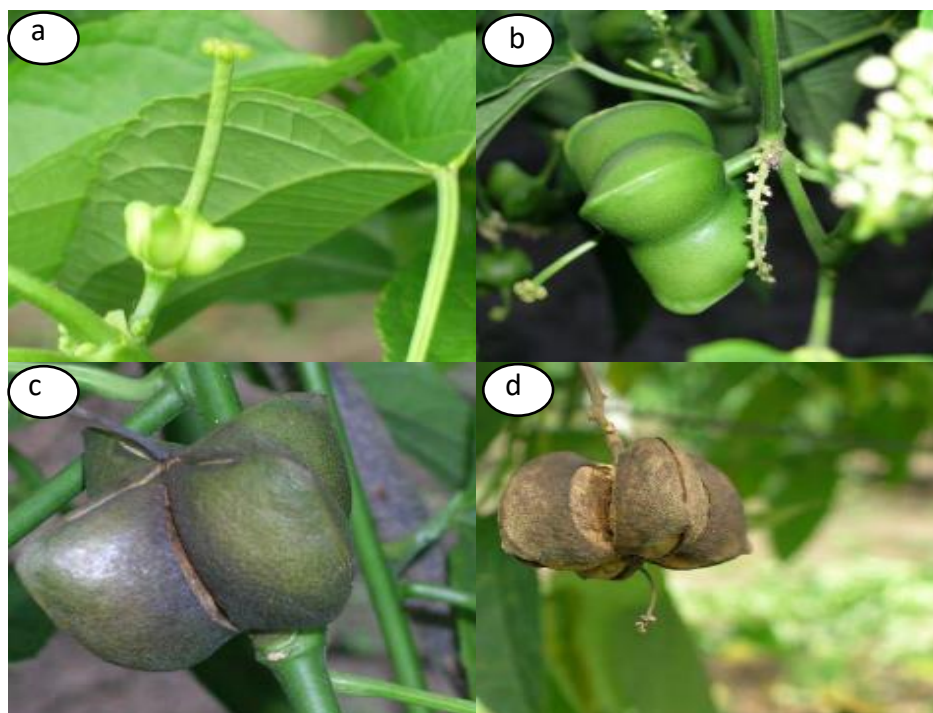


Figura 1. Estadios del desarrollo de fruto: a) Estadio 1, b) Estadio 2, c) Estadio 3 y d) Estadio 4 (Cachique, 2006).

1.1.3.4. Semillas

Las semillas son lenticulares, comprimidas lateralmente y de color marrón con manchas irregulares más oscuras de 1,5 cm a 2cm x 0,7 a 0,8 cm (Dostert et al., 2009).

Rodríguez et al. (2010) mencionan que el tamaño de la semilla es de 2,0 cm x 0,85 cm y tiene una forma aplanada, tal como se puede ver en la Figura 2.



Figura 2. Semillas de seis agrupaciones del género *Plukenetia* encontradas en la Amazonía peruana: A = *P. brachybotrya*; B = *P. lorentis*; C = *P. volubilis* (procedencia San Martín); D = *P. volubilis* (procedencia Cusco); E = *P. huayllabambana*; F= *P. polyadenia* (Rodríguez et al., 2010).

1.1.4. Ecología del cultivo

Manco (2006) describe los factores que intervienen en la ecología del cultivo de sacha inchi.

1.1.4.1. Temperatura

El sacha inchi crece y tiene buen comportamiento a diversas temperaturas que caracterizan a la Amazonía Peruana (mín. 10 °C y máx. 36 °C). Las temperaturas muy altas son desfavorables y ocasionan la caída de flores y frutos pequeños, principalmente los recién formados (Manco, 2006).

1.1.4.2. Altitud

Crece desde los 100 m.s.n.m. en la Selva Baja y 2 000 m.s.n.M. en la Selva Alta (Manco, 2006).

1.1.4.3. Luz

A bajas intensidades de luz, la planta de sachá inchi necesita de mayor número de días para completar su ciclo vegetativo; cuando la sombra es muy intensa, la floración disminuye y por lo tanto la producción es menor (Manco, 2006).

1.1.4.4. Agua

El sachá inchi es una planta que requiere de disponibilidad permanente de agua, para tener un crecimiento sostenido; siendo mejor si las lluvias se distribuyen en forma uniforme durante los 12 meses (850 mm a 1000 mm). El riego es indispensable en los meses secos. Períodos relativamente prolongados de sequía o de baja temperatura, causan un crecimiento lento y dificultoso. Por el contrario, el exceso de agua ocasiona daño a las plantas e incrementa los daños por enfermedades (Manco, 2006).

1.1.4.5. Suelo

El sachá inchi tiene amplia adaptación a diferentes tipos de suelo; crece en suelos ácidos y con alta concentración de aluminio. Se deben elegir los suelos que posibiliten su mejor desarrollo y productividad (Manco, 2006).

1.1.4.6. Drenaje

El sachá inchi necesita terrenos con drenaje adecuado, que eliminen el exceso de agua tanto a nivel superficial como profundo. Para un buen drenaje se debe considerar la textura del suelo, y ésta es importante para el desarrollo del cultivo.

1.1.5. Propagación

El cultivo de sachá inchi se propaga por semillas botánicas (Manco, 2006), sin embargo muestra variabilidad genética debido a que son plantas alógamas (Cachique, 2006).

Garcia (2008), realizó un trabajo de propagación vegetativa por injertos en *Plukenetia volubilis* L. empleando patrones interespecíficos e intergenéricos donde concluyó que no existe diferencias al realizar las técnicas de injertación empalme y pua central, ya que tuvieron 80% y 75,83% de prendimiento respectivamente, asimismo los patrones *Plukenetia* sp (Amazonas) , *Ricinus communis* y *Caryodendron orinocense* son los que alcanzaron los más altos porcentajes de prendimiento con 96,25%; 91,25% y 90% respectivamente

Cachique, Rodríguez, Ruiz-SolSol, Vallejos, & Solis (2011), mencionan que es posible la propagación vegetativa de sachá inchi a través del enraizamiento de estacas basales o intermedias de 8 cm de longitud con áreas foliares de 50 cm² y 100 cm² , en cámaras de subirrigación, empleando arena de textura media como sustrato y 0,2% de ácido indolbutírico como inductor hormonal.

1.2. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

1.2.1. Aspectos generales

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es el cultivo de plantas, semillas, embriones, órganos, tejidos y células de plantas superiores en un medio nutritivo, bajo condiciones estériles. En sentido estricto, *in vitro* quiere decir “dentro de vidrio”, es decir, el cultivo se realiza dentro de recipientes de vidrio en condiciones de ambiente controlado. Actualmente este concepto es flexible, ya que en muchos casos se ha sustituido el vidrio por otros materiales igualmente eficientes, como plástico, polipropileno y poliestireno, entre otros (Cruzat, 2009).

1.2.2. Etapas de micropropagación *in vitro*

(Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010) mencionan que la micropropagación *in vitro* tiene cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas. Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*.

1.2.2.1. Etapa 1: Preparación del material vegetal

La correcta elección y preparación del explante (parte de una planta que puede ser tejidos u órganos, células, células desprovistas de pared celular, protoplastos) incide directamente

sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante (Levitus et al., 2010).

1.2.2.2. Etapa 2: Establecimiento del cultivo

El establecimiento del cultivo es definido como un conjunto heterogéneo de técnicas que tienen en común el hecho de que un explante se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Levitus et al., 2010).

Para el establecimiento es necesario tener bien definido el concepto de explante. Se debe tener en cuenta varios factores para la elección del mismo como: Objetivo del cultivo, posibilidad de contaminación con microorganismos (para ello se usan plantas donantes que crecen en condiciones de invernadero), edad fisiológica, tamaño (cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño de explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos) y época del año (Levitus et al., 2010).

En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes. El éxito está determinado por la calidad del explante a utilizar (Levitus et al., 2010).

1.2.2.3. Etapa 3: Multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción ya sea enraizamiento, bulbificación, etc (Levitus et al., 2010).

1.2.2.4. Etapa 4: Enraizamiento y aclimatización

En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas, es relativamente fácil mientras que en muchas especies leñosas resulta más complicada por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*.

1.2.3. Antecedentes de cultivo *in vitro* en *Plukenetia volubilis* L.

Barrera (2007) inició con la investigación de propagación del sachá inchi bajo condiciones *in vitro*, logró establecer protocolos de propagación sexual donde utilizó medio de cultivo M&S total + 20 g sucrosa + Agente gelificante (Gelrite 2,5 g) con un pH de 5,8; como material vegetal colectó frutos que no alcanzaron su totalidad de su madurez fisiológica para facilitar su trabajo de escarificación e incisión de la semilla al momento de la siembra. Para la desinfección de su material vegetal utilizó una solución de detergente con agua (5 g/l de detergente comercial) durante 10 minutos. Retiró las semillas existentes en las cápsulas, y con la ayuda de una tijera podadora retiró la testa, luego procedió a lavarlos nuevamente.

La desinfección lo hizo sumergiendo las semillas en Hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos, enjuagó 2 veces por 2 minutos con agua destilada estéril. Su porcentaje máximo de contaminación fue de 30 %.

Asimismo logró realizar la propagación clonal de sachá inchi bajo condiciones *in vitro*, sometiendo a segmentos nodales de vitroplantulas establecidas a concentraciones hormonales de auxina y citoquinina, donde concluyó que la concentración hormonal de 0,10 ppm de BAP y 0,05 ppm de ANA, muestran mayor inducción hormonal de la yema axilar del segmento nodal, desarrollo de brotes y hojas; pues obtuvo 2 brotes por explante y 3,8 hojas por brotes, como se observa en la figura 3.



Figura 3. Brotes obtenidos a partir de segmentos nodales (Barrera, 2007)

Guerrero (2007) logró inducir a embriogénesis somática a hojas inmaduras de sachá inchi, estableció un protocolo de introducción y establecimiento *in vitro* de explantes, determinó

la concentración más adecuada de thidiazurón para el proceso de inducción embriogénica y evaluó formas de callos adquiridos durante los procesos de embriogénesis somática.

Gárate (2009) determinó el efecto de cuatro dosis de ácido- 3- indol butírico en el enraizamiento de ápices y segmentos nodales de sachá inchi, donde obtuvo mayor número de raíces por explantes empleando segmentos nodales y 200 ppm de AIB, además la mayor longitud de raíces en ápices se obtuvo empleando una concentración de 50 ppm de AIB y en segmentos nodales empleando una concentración de 100 ppm, observándose no solo desarrollo de raíces a partir de los explantes sino también a partir de los callos generados sobre los explantes.

Bordignon, Bovi, & Viegas (2012) realizaron una evaluación de la relación auxina-citoquinina en diferentes segmentos del epicótilo e hipocótilo de semillas de sachá inchi germinadas *in vitro* . Los segmentos apical, medio y basal se introdujeron a condiciones *in vitro* en medio de cultivo MS, semisólido (2,0 g/l Phytigel), suplementado con vitaminas de MS, sacarosa (30,0g/L) , con tres dosis de auxina ácido indolbutírico - IBA (0; 0,1; 0,5mg/L), asociadas a cuatro dosis de citoquinina benzilaminopurina - BAP (0; 0,1; 0,5; 1,0mg/L), y después de nueve semanas, el segmento apical presentó la formación de brotes mediante organogénesis directa en medios de cultivo que contenían 0,5 y 1mg/L de BAP combinados con 0 y 0,1mg/L de AIB.

Solis Leyva (2016) determinó la mejor desinfección para las yemas apicales de sachá inchi utilizando alcohol (70%) durante 60 segundos y NaOCl 1% durante 10 minutos y para los embriones cigóticos se obtuvo con alcohol (70 %) durante 60 segundos y NaOCl 1,5% durante 10 minutos. Asimismo, determinó que la combinación de 0,1 mg/L de BAP y 0,05 mg/L de ANA permite la mejor diferenciación de los ápices meristemáticos en la fase de establecimiento . El medio de cultivo MS suplementado con 0,1 mg/L de BAP y 0,25 mg/L ANA permitió obtener explantes con mayor altura (18mm), mayor número de brotes (2,25) y mayor número de nudos (2,35) por brote en la fase de multiplicación. El mayor porcentaje de enraizamiento (73,33%) se obtuvo con la interacción de 0,5 mg/L de ANA y 2 mg/L de AIB. En los estudios sobre embriogénesis somática, determinó que la combinación del 2,4-D (2 y 4 mg/L) y TDZ (0,5y1mg/L) presentan un efecto positivo en la inducción callogénica a partir de embriones cigóticos.

1.2.4. Sistema de inmersión temporal

En el año 1997 surgió el sistema de inmersión temporal, que se logró a partir de la aplicación de un flujo de aire a uno de sus frascos, el cual hacía subir el medio de cultivo que, luego de bañar los explantes, descendía por gravedad. En consecuencia, la técnica SIT se inserta como un complemento o herramienta de apoyo, y no como una alternativa a la micropropagación.

Una unidad de inmersión temporal utilizada normalmente consiste en dos recipientes interconectados por tubos de silicona. Uno se usa para la mantención del medio y el otro para el cultivo de los explantes. Para la ventilación se ajusta un filtro esterilizable en cada recipiente. El número de veces (frecuencia) y el tiempo que las plantas son inmersas en el medio se regulan mediante un programador conectado a válvulas solenoides. Al abrir una de las válvulas el medio es inyectado desde el recipiente de mantención al del cultivo; al abrirla otra vez, el medio vuelve al recipiente de mantención. Con este sistema los explantes son inmersos en el medio de cultivo sólo por un tiempo definido, permitiendo la absorción de nutrientes por toda su superficie. El intercambio gaseoso se restaura cuando el medio de cultivo es trasladado a recipiente de mantención (Cruzat, 2009).

1.2.4.1. Importancia del sistema de inmersión temporal

Cruzat (2009), menciona la importancia del sistema de inmersión temporal:

- Un mayor contacto entre la biomasa vegetal y el medio, la inexistencia de restricciones en el intercambio gaseoso y la posibilidad de controlar la composición del medio, así como la de la atmósfera dentro del biorreactor
- Al trabajar en medios líquidos temporales se puede mantener una gran cantidad de plántulas en un mismo volumen.
- El contacto intermitente del medio con los explantes reduce el nivel de toxinas presentes, ya que se mantienen limpias de sus propios exudados que pueden ser perjudiciales para su crecimiento.
- El mecanismo permite renovar y/o modificar la atmósfera interna de los contenedores y eventualmente, controlar ciertos aspectos de su desarrollo (pre aclimatación).

1.2.5. Sistema de biorreactores de inmersión temporal en plantas alógamas.

Basail et al., (2003) con el utilizaron biorreactores con el objetivo de incrementar el coeficiente de multiplicación en la propagación masiva de la yuca bajo este sistema. Usando

el clon 'CMC-40', estudiaron diferentes volúmenes de medio de cultivo por explante y densidad de material vegetal por unidad a una misma frecuencia de inmersión. Obtuvieron los resultados más elevados en el coeficiente de multiplicación al utilizar 20 ml de volumen de medio de cultivo al emplear una densidad de 40 explantes/frasco. Estos resultados utilizando los Sistemas de Inmersión Temporal permitieron establecer una metodología más eficiente para la micropropagación siendo una especie alógama.

1.2.6. Hormonas vegetales o reguladores de crecimiento

Azcón-Bieto & Talón (2013), mencionan que las hormonas vegetales o fitohormonas pueden ser definidas como un grupo de sustancias orgánicas, sintetizadas por las plantas, que tienen la capacidad de afectar a los procesos fisiológicos en concentraciones mucho más bajas que los nutrientes o las vitaminas ($< 1\text{mM}$, frecuentemente $< 1\ \mu\text{M}$). El control de la respuesta hormonal se lleva a cabo a través de cambios en la concentración y la sensibilidad de los tejidos a las hormonas.

Hasta fechas recientes ha existido un acuerdo general en clasificar como hormonas vegetales a auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico, que constituyen los cinco grupos hormonales clásicos. En los últimos años, sin embargo, se ha ido aislando una serie de sustancias que también pueden clasificarse como hormonas basándose en sus efectos sobre el desarrollo o el fenotipo de mutantes con defectos en su síntesis o percepción. En este nuevo grupo de hormonas se incluyen brasinosteroides, oxilipinas (los representantes más conocidos son los jasmonatos), poliaminas, salicilatos, oligopéptidos y óxido nítrico (Azcón-Bieto & Talón, 2013).

1.2.7. Citoquininas

Azcón-Bieto & Talón (2013) mencionan que el término citoquinina se acuñó como nombre genérico de una serie de sustancias, naturales o sintéticas, capaces de estimular la división celular en presencia de auxinas. También (Prieto, Jordan, Barrieto, Cordeiro, & Durzan, 2005) menciona que las citoquininas es normalmente usado en el cultivo de tejidos para promover el desarrollo de yemas adventicias a partir de callos o embriogénesis somática. Las citoquininas también son usadas en pequeñas cantidades (μM), son solubles en HCl 0,1 N y mantenidas como solución madre congeladas.

1.2.7.1. Descubrimiento de las citoquininas

Azcón-Bieto & Talón (2013), mencionan que el descubrimiento de las citoquininas tuvo lugar en 1956, cuando el grupo de Skoog aisló la quinetina (6-furfurilaminopurina) a partir del DNA de arenque sometido al autoclave. El nombre asignado a esa sustancia se basó, obviamente, en su capacidad para promover la división celular (citocinesis) en los tejidos vegetales. A pesar de que la quinetina tiene una gran actividad biológica, no es sintetizada por las plantas.

La primera citoquinina natural fue aislada por los grupos de Miller y Letham, en 1963, en semillas inmaduras de maíz. La sustancia se identificó químicamente como 6-(4-hidroxi-3-metilbut-trans-2--enilamino) purina y recibió el nombre común de zeatina. Desde entonces se han descubierto más de un centenar de productos, naturales y sintéticos, que ejercen efectos fisiológicos análogos a los de la quinetina (Azcón-Bieto & Talón, 2013)

1.2.7.2. Mecanismos celulares y moleculares de la acción de las citoquininas

Taiz & Zeiger (2006b) menciona que la secuenciación del genoma *Arabidopsis thaliana* ha sido un factor decisivo para el aislamiento y la caracterización de los componentes de la ruta de señalización de las citoquininas. Dicha ruta, similar a la que opera en la transducción de señales a través del sistema de dos componentes de bacterias y levaduras, está integrada por receptores histidina quinasa, fosfotransferasas y reguladores de respuesta.

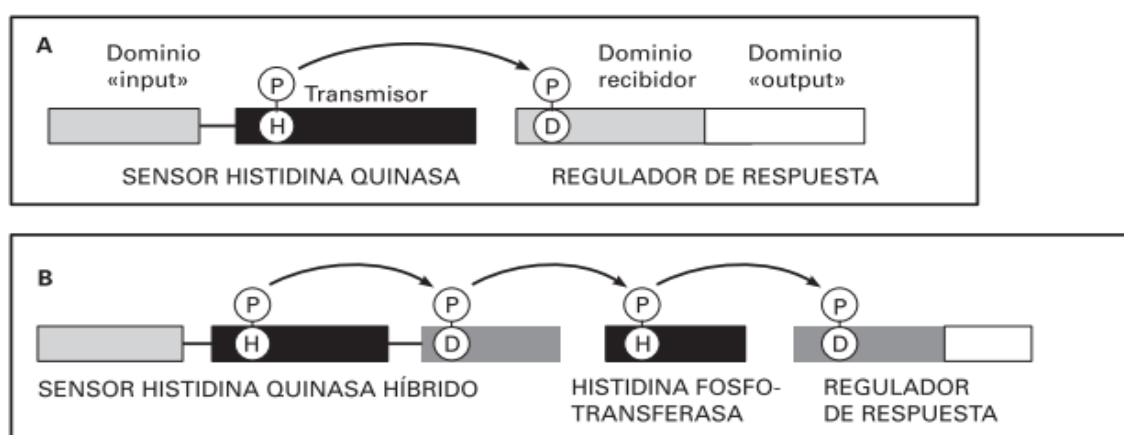


Figura 4 . Comparación entre las rutas de señalización del sistema bacteriano de dos componentes y de las citoquininas (Taiz & Zeiger, 2006a)

Las fosfotransferasas actúan como lanzaderas que conectan la señal entre los receptores y los reguladores de respuesta, algunos de los cuales son factores de transcripción que activan

la expresión de genes de respuesta primaria a las citoquininas. Aunque la ruta fue dilucidada inicialmente en Arabidopsis, numerosos datos experimentales sugieren que este modelo de señalización es válido para todas las plantas(Taiz & Zeiger, 2006a).

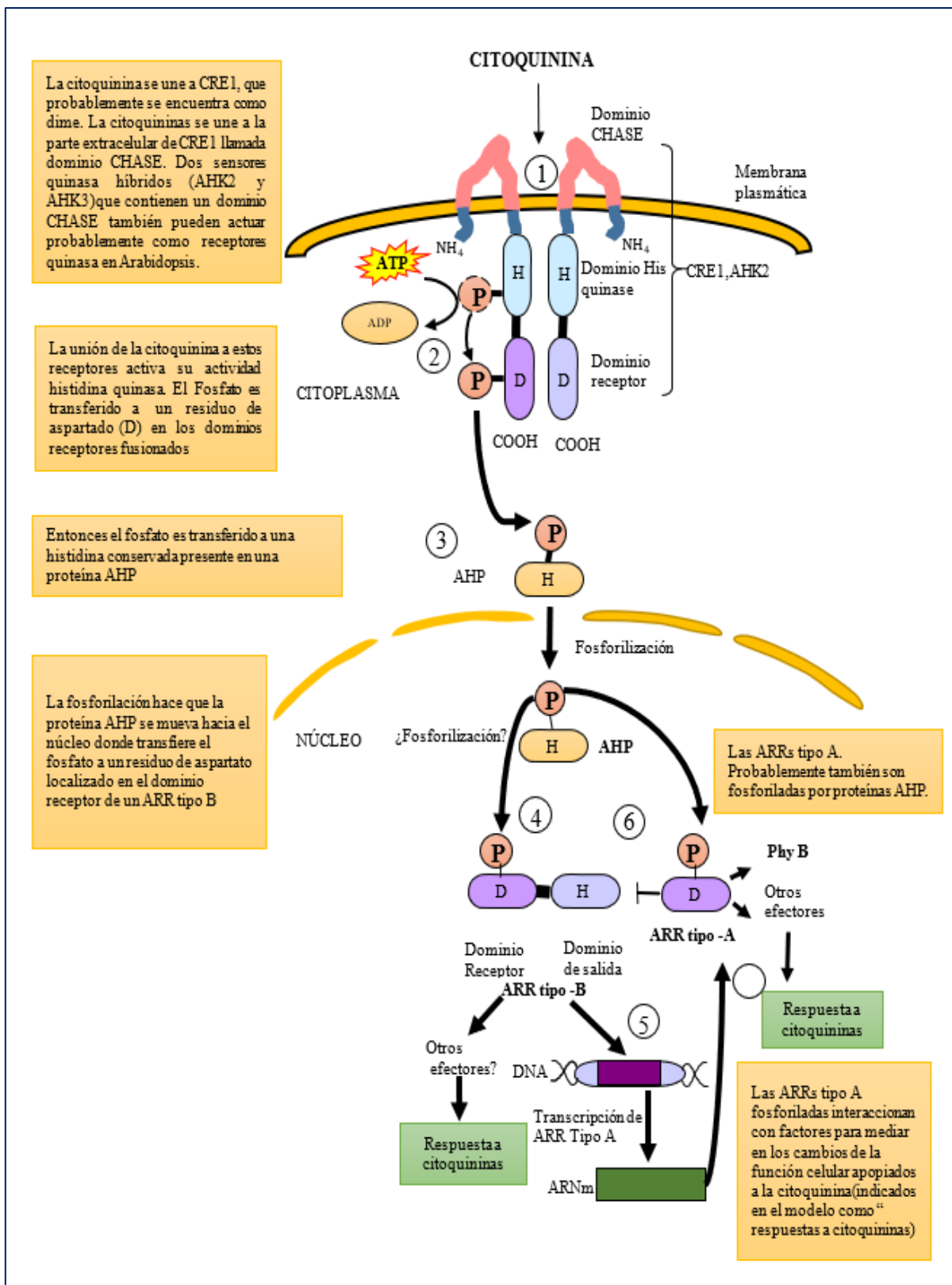


Figura 5. Modelo de señalización de citoquininas(Taiz & Zeiger, 2006b)

1.2.7.3. Estructura de las citoquininas

1.2.7.3.1. Citoquininas naturales

Son derivados de la base púrica adenina (6-aminopurina). Todas ellas poseen un sustituyente, de naturaleza isoprenoide o aromática, en el nitrógeno amínico de la posición 6 del anillo de purina. Las citoquininas pueden encontrarse en las plantas como bases libres o formando conjugados con diversos compuestos químicos que se unen al anillo de purina o a la cadena lateral (Azcón-Bieto & Talón, 2013).

Las principales formas conjugadas de las citoquininas son:

1. *Nucleósidos (ribósidos)*: se forman por conjugación con la ribosa en la posición 9 del anillo de purina.
2. *Nucleótidos (ribótidos)*: el ácido ortofosfórico se esterifica, en posición 5', con el correspondiente ribósido.
3. *Glicósidos*: se forman por conjugación con un resto de glucosa, que se une al anillo (N-glicósidos) o al grupo hidroxilo de la cadena lateral (O-glicósidos). Los N glicósidos pueden ser 3-, 7- y 9-glicosilderivados, dependiendo de que la glucosa se conjugue con los grupos amino en posición 3 ó 7 del anillo o con el grupo imino en posición 9, respectivamente.
4. *Alanilderivados*: presentan un residuo de alanina unido al grupo imino en posición 9 del anillo de purina. 5. *Metiltioderivados*: presentan un grupo (CH₃ S-) unido al carbono en posición 2 del anillo de purina.

1.2.7.3.2. Clasificación de la citoquininas naturales

Azcón-Bieto & Talón (2013) mencionan que las citoquininas naturales se clasifican atendiendo su naturaleza química (isoprenoide o aromática) del sustituyente en N⁶ de la adenina en dos grandes clases, citoquininas isoprenicas y citoquininas aromáticas.

Citoquininas isoprenoídicas: Comprende las familias de la isopenteniladenina (iP) (Figura 6), la zeatina (Z) y la dihidrozeatina (DZ). El rasgo estructural que diferencia la isopenteniladenina de la zeatina es la presencia, en la segunda, de un grupo hidroxilo unido al carbono 4 de la cadena lateral isoprenoide. Ambas poseen un doble enlace entre los átomos de carbono 2 y 3 de dicha cadena, lo que las distingue de la familia de la dihidrozeatina, cuya cadena lateral está saturada. La zeatina ha sido identificada en forma tanto cis (cZ) como trans (tZ), aunque la más activa es la segunda.

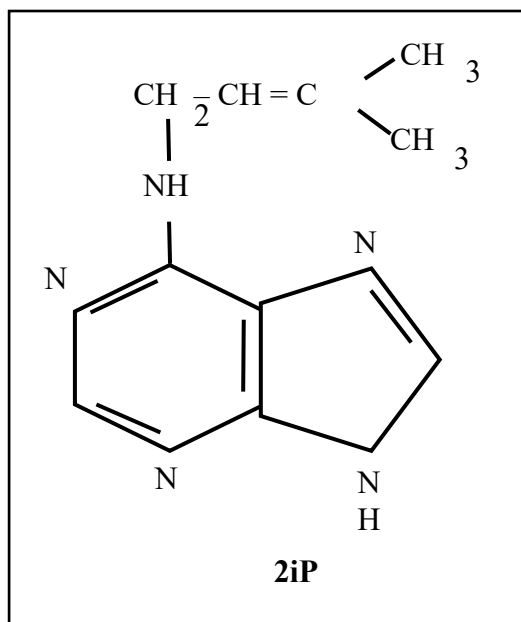


Figura 6. Estructura química de la citoquinina 2Ip

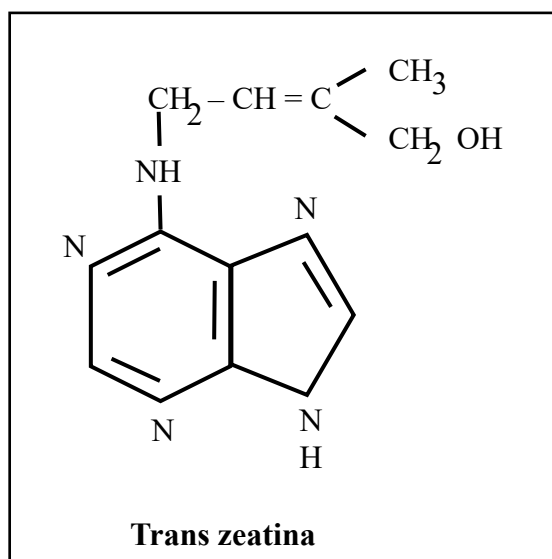


Figura 7. Estructura química de la citoquinina Trans zeatina

Citoquininas aromáticas: Incluye las familias de la benciladenina (BA), la orto-hidroxibenciladenina y la meta-hidroxibenciladenina. La cadena lateral de estas citoquininas consta de 7 carbonos estructurados en forma de grupo metilbenceno. En la orto- y meta-hidroxibenciladenina, el anillo de benceno presenta un radical hidroxilo en posición 2 (orto) o 3 (meta), respectivamente, mostrado en la Figura 8.

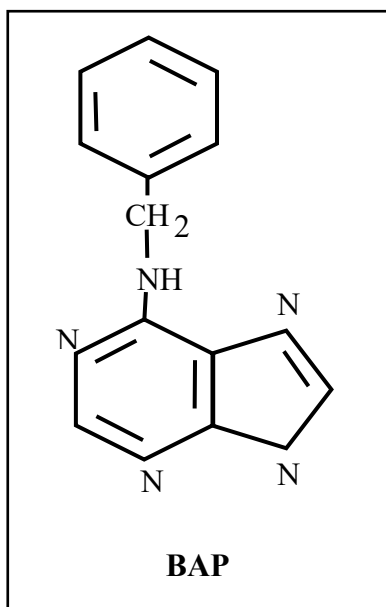


Figura 8. Estructura química del BAP

1.2.7.4.Efectos fisiológicos de las citoquininas

Azcón-Bieto & Talón (2013) mencionan que entre los procesos en los que las citoquininas están implicadas cabe señalar la división celular, la proliferación de yemas axilares (ruptura de la dominancia apical), la neoformación de órganos *in vitro*, la senescencia foliar, el desarrollo de los cloroplastos y la floración. En la mayor parte de estos procesos, las citoquininas actúan en concierto con otros estímulos, especialmente hormonales y ambientales. De particular importancia a este respecto son las interacciones de las citoquininas con las auxinas y con la luz.

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Instrumentos de Laboratorio

- Beaker de 1000 ml
- Espátulas pequeñas
- Frascos Boecco con tapa de 1000 ml
- Frascos Boecco con tapa de 100 ml
- Pinzas de 25 cm
- Mango de bisturí N°7
- Bisturí N° 10
- Placas pettri grandes
- Mechero
- Papel aluminio
- Micropipetas de 10 ml, 1ml, 100 ul y 10 ul
- Algodón

2.2 Equipos

- Cámaras de flujo laminar
- Balanza analítica
- Horno microondas
- Acondicionador de aire
- Cámara fotográfica
- Estufa
- Ollas Autoclaves
- Potenciómetro
- Refrigerador

2.3 Reactivos

- Alcohol de 96°
- Kinetina

- Trans zeatina
- BAP(bencil aminopurina)
- 2 Ip
- Ácido Ascórbico
- Sales Murashige & Skoog
- Vitaminas
- Solución de NaOH 0,1 N.
- Agua destilada
- Azúcar
- Carbón activado

2.4 Métodos

2.4.1 Ubicación del experimento

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la EEA “El Porvenir” – San Martín del INIA.

2.4.2 Descripción del Experimento

El desarrollo del presente trabajo de investigación comprendió una prueba de multiplicación, para esta prueba se usó un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial 4x2 x4 ; con 32 tratamientos cada tratamiento con 2 repeticiones, evaluándose las respuestas de 2 tipos de explantes (ápices y segmentos nodales), obtenidos de condiciones *in vitro* , las cuatro fuentes de citoquininas y concentraciones Kinetina, Zeatina, Bencilademinpurina y 2iP a (0,045 μM ; 0,45 μM ; 2,32 μM ; 23,23 μM).

(Pierik, 1990) menciona que los fisiólogos piensan que las unidades de peso no son aceptables, pues resulta imposible comparar la actividad fisiológica de 1 mgL^{-1} de AIA y 1 mgL^{-1} IBA. La comparación correcta sería 1 μM de AIA y 1 μM de IBA. Esto se debe a que el peso molecular de AIA no es el mismo al del IBA, por lo que los reguladores de crecimiento se debería emplear la concentración molar. Debido a esta premisa es que se utilizó estas concentraciones, que se muestran en la Tabla 1 y Tabla 2.

Tabla 1
Componentes de estudio

Factores	Tipo de factor	Niveles de factores	Descripción de los factores
A	Fuente de citoquinina	A ₁	Kinetina
		A ₂	Zeatina
		A ₃	BAP
		A ₄	2ip
B	Tipo de explante	B ₁	Segmento apical
		B ₂	Segmento nodal
C	Concentración de citoquininas	C ₁	0,045uM
		C ₂	0,45 uM
		C ₃	2,32 uM
		C ₄	23,23 uM

Tabla 2
Plan de experimentación

TRATAMIENTOS	Factores		
	A	B	C
T1	KINETINA	Segmento apical	0,045 <i>uM</i>
T2			0,45 <i>uM</i>
T3			2,32 <i>uM</i>
T4			23,23 <i>uM</i>
T5		Segmento nodal	0,045 <i>uM</i>
T6			0,45 <i>uM</i>
T7			2,32 <i>uM</i>
T8			23,23 <i>uM</i>
T9	ZEATINA	Segmento apical	0,045 <i>uM</i>
T10			0,45 <i>uM</i>
T11			2,32 <i>uM</i>
T12			23,23 <i>uM</i>
T13		Segmento nodal	0,045 <i>uM</i>
T14			0,45 <i>uM</i>
T15			2,32 <i>uM</i>
T16			23,23 <i>uM</i>
T17	BAP	Segmento apical	0,045 <i>uM</i>
T18			0,45 <i>uM</i>
T19			2,32 <i>uM</i>
T20		23,23 <i>uM</i>	
T21		Segmento nodal	0,045 <i>uM</i>
T22			0,45 <i>uM</i>
T23			2,32 <i>uM</i>

T24			23,23 μM
T25		Segmento apical	0,045 μM
T26			0,45 μM
T27			2,32 μM
T28			23,23 μM
T29	2 ip	Segmento nodal	0,045 μM
T30			0,45 μM
T31			2,32 μM
T32			23,23 μM

Los explantes fueron cultivados en un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura aproximada de 24°C y una humedad relativa de 46%.

2.4.3 Población y Muestra

2.4.3.1 Población

La población vegetal en estudio fueron las semillas de plantas identificadas anteriormente como Tratamiento 04, plantas que se encontraron en su cuarto ciclo de mejoramiento perteneciente a la Accesoión 07-PER000409 procedente de Loreto/Maynas/Putmayo.

La planta donante fue resultado de la investigación de la Subdirección de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología de la EEA “El Porvenir”- INIA; en el marco del desarrollo del Sub-Proyecto “Generación de líneas élites de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.), de alta productividad, con alto contenido de aceites omega y tolerantes a nemátodos (*Meloidogyne* spp.) para su cultivo en la región amazónica”

2.4.3.2 Muestra

Los dos tipos de explantes (segmento apical y segmento nodal), fueron extraídos de las plantas germinadas *in vitro* a través de embriones cigóticos en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del INIA - EEA “El Porvenir”

2.4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

El proceso experimental que se siguió para la determinar el efecto de cuatro fuentes de citoquininas en la multiplicación *in vitro* de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal en la Región San Martín, se encuentra en la Figura 9.

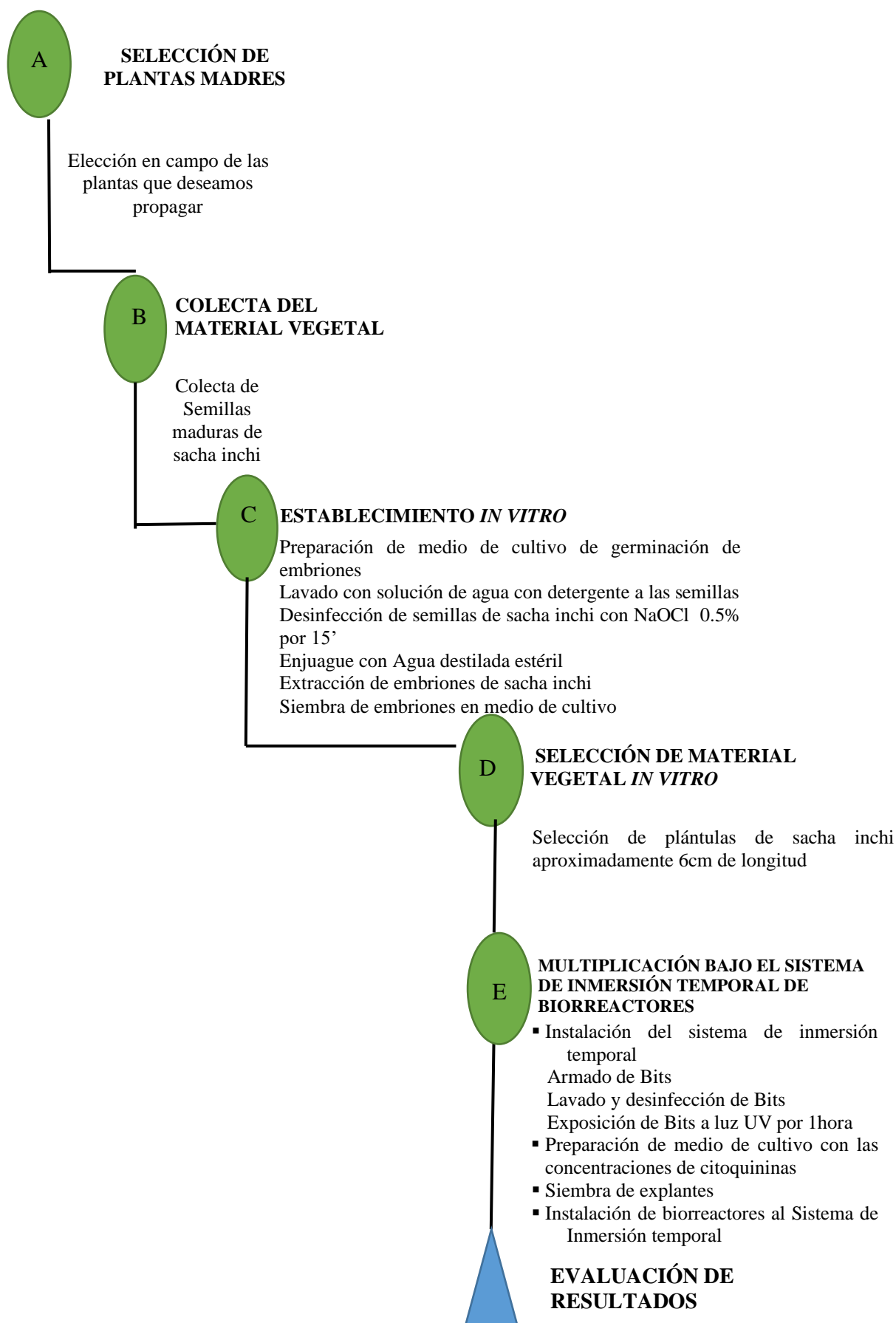


Figura 9. Diagrama de proceso experimental

A. Selección y preparación de las plantas madres

La planta seleccionada fue resultado de la investigación de la Subdirección de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología de la EEA “El Porvenir”- INIA. En este trabajo de investigación se utilizó plantas del Tratamiento 04, plantas con cuarto ciclo de mejoramiento perteneciente a la Accesoión 07-PER000409 procedente de Loreto/Maynas/Putumayo.

B. Colecta del material vegetal

Los frutos maduros de sacha inchi se colectaron en horas de la mañana. Para colectar se utilizó una tijera podadora y papel craf, posteriormente los frutos fueron llevados al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la EEA “El Porvenir” del INIA, para su desinfección como muestra la figura 10.



Figura 10. Planta madre, selección de la planta madre y colecta de material vegetal

C. Establecimiento *In Vitro*

➤ Preparación del medio de cultivo de germinación de embriones

El medio de cultivo fue preparado a base de sales minerales Murashige & Skoog 1962, a mitad de su concentración + tiamina $0,4 \text{ mgL}^{-1}$, ácido nicotínico $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, sacarosa 2%, endospermo líquido de coco 10%, carbón activado 2 gL^{-1} y agar 10gL^{-1} . El pH del medio fue ajustado a $5,4 \pm 0,1$ antes de la adición de agar y del autoclavaje por 15 min a 121°C .

➤ Lavado y Desinfección del material vegetal

En el laboratorio se extrajeron las semillas que se encuentran dentro de las cápsulas de sacha inchi, se sumergieron en una solución con detergente durante 10 minutos manteniendo en constante agitación, luego se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril, seguidamente se

retiró la testa de las semillas, las cuales fueron sumergidas en solución fungicida- bactericida (kasugamicina 10 ml/ L) por 10 minutos y finalmente se enjuagó con agua destilada estéril de 3 veces.

En cámara de flujo laminar, las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0,5% por 15 minutos y enjuagadas con agua destilada estéril. Este procedimiento se muestra en la figura 11.

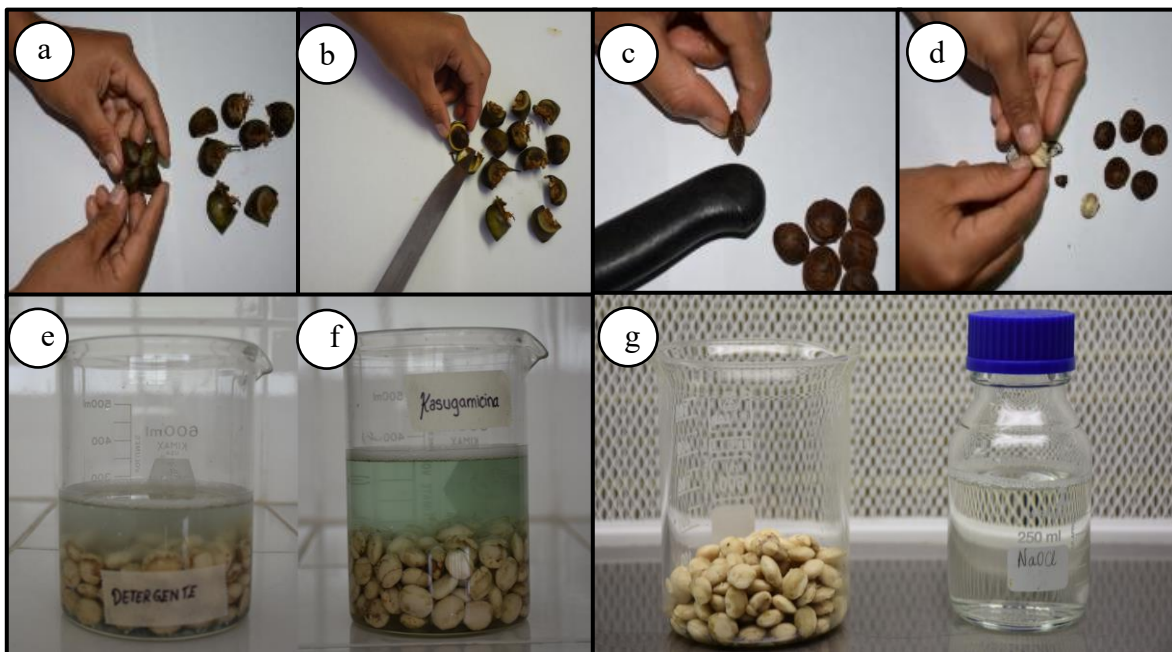


Figura 11. Proceso de lavado y desinfección del material vegetal. a) y b) Decapsulado de la semilla, c) y d) extracción de la semilla e) Lavado de las semillas en solución de detergente, f) Desinfección de las semillas con Kasugamicina, g) Desinfección de las semillas con NaOCl al 0,5 % en cámara de flujo laminar.

Siembra de embriones cigóticos

En una placa Petri, dentro de la cámara de flujo laminar los embriones fueron retirados con bisturí N° 10, con cortes en los extremos de la semilla y levantando suavemente un cotiledón del otro, con la hoja de bisturí se retiró el embrión y fue sembrado la base en forma vertical dentro del medio de cultivo, este proceso se muestra en la figura 12.

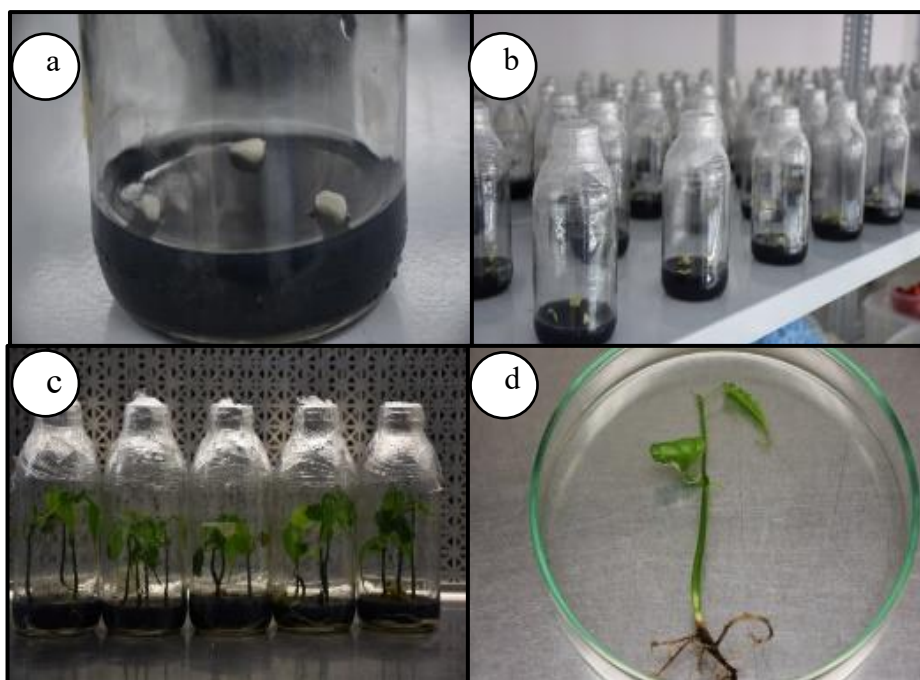


Figura 12. a) Embriones cigóticos sembrados b) Germinación de embriones cigóticos c) y d) Plántulas de sachá inchi germinadas *in vitro*

D. Selección de material vegetal *In Vitro*

A los 25 días del establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos, se seleccionaron plántulas de sachá inchi de aproximadamente 6 cm de longitud, de donde se extrajo el segmento nodal y apical.

E. Multiplicación bajo el sistema de inmersión temporal de biorreactores

a) Descripción del sistema de Inmersión temporal

Se utilizó el modelo de SIT de frascos gemelos (Alverca, 2015) modificado, donde el sistema estuvo constituido por un frasco contenedor de los explantes (N°01) y un frasco contenedor de medio (02), se utilizó galones tipo cristal de 4 litros. Los dos galones, tuvieron una tapa de plástico con 2 conductos de 3 cm al interior y exterior, donde se conectaron por mangueras de plástico flexible como se muestra en la Figura 13. Esto constituyó 1 unidad BIT. En cada caso, el flujo de aire estuvo esterilizado por el paso a través de filtros hidrofóbicos de 0,2 μm . La presión de aire generada por un compresor, empujó el medio de un frasco a otro para sumergir las plantas completamente por 3 minutos. Finalmente el flujo de aire se revirtió para retirar el medio del frasco contenedor de plantas. Este modelo de sistema de inmersión se encuentra esquematizado en la figura 13.

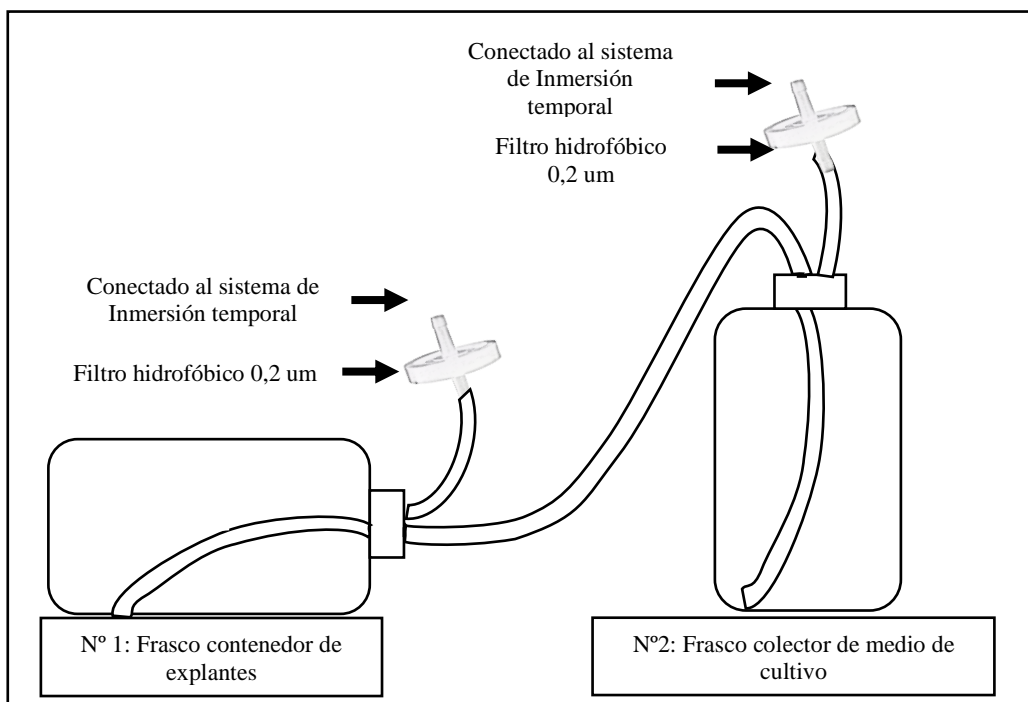


Figura 13. Esquema del modelo del Sistema de Inmersión temporal de frascos gemelos modificado de Alvera,(2015).

Los temporizadores digitales controlaron la frecuencia (cada 4 horas) y duración del periodo de inmersión (3 minutos); válvulas de solenoide de tres vías proporcionaron el funcionamiento encendido/ apagado (on/off).

b) Preparación de biorreactores de inmersión temporal (BITs)

➤ **Materiales**

Los materiales utilizados son de fácil acceso y de menos costo:

- 128 galoneras rectangulares tipo cristal de polietileno con tapa rosca.
- 128 tapas de plástico para biorreactores
- 2 rollos de manguera automotriz de $\frac{1}{4}$ de diámetro
- 128 filtros hidrofóbicos de 0,2 um

➤ **Metodología**

Armado de BITs

- Los frascos contenedores de explantes (N° 1) y los frascos colectores de medio (N° 2) tuvieron tapas de plástico adaptados para este sistema.
- Seguidamente se colocó una manguera de plástico con aproximadamente 35 cm en un extremo de la tapa dentro del frasco N° 02, de la misma manera se colocó una manguera del extremo del tubo de plástico del frasco N° 1.

- Posteriormente se tomó otra manguera de plástico con aproximadamente 12 cm y la conectamos a la tapa N° 2 del frasco colector, quedando este hacia el exterior ya que es ahí donde se conectó un filtro hidrofóbico; se realizó este mismo procedimiento para el frasco contenedor de explantes.
- Finalmente se conectó los frascos N° 1 y 2, con una manguera de plástico de 25 cm, conformando la denominada unidad de birreactor de inmersión temporal (BIT).

Protocolo de lavado, desinfección y esterilización de BITs

❖ Lavado

Se lavaron los galones tipo cristal, las tapas de plástico y mangueras con solución detergente, para quitar impurezas de los materiales. Se dejó secar.

❖ Desinfección

- Se preparó 15 litros de solución de hipoclorito de sodio al 0,5%, se colocó en un recipiente de plástico de capacidad de 30 L, dicho recipiente fue colocado dentro de cámara de flujo laminar.
- Los galones tipo cristal fueron sumergidos en la solución durante 5 minutos, girando constantemente.
- Se dejó escurrir los galones y se dejó secar en el otro extremo de la cámara de flujo laminar
- Se sumergió las mangueras y las tapas conectadas, en la solución de hipoclorito de sodio por 10 minutos, sin haber dejado que se formen burbujas de agua en el interior de las mangueras.
- Se dejó escurrir las mangueras y se colocó en cada frasco, armando así las unidades BITs.

❖ Esterilización de BITs mediante irradiación (Luz UV)

Después de haber dejado secar las unidades BITs, se encendió la luz UV de las cámaras de flujo laminar y se esterilizó durante 60 minutos para eliminar microorganismos, como muestra la figura 14.

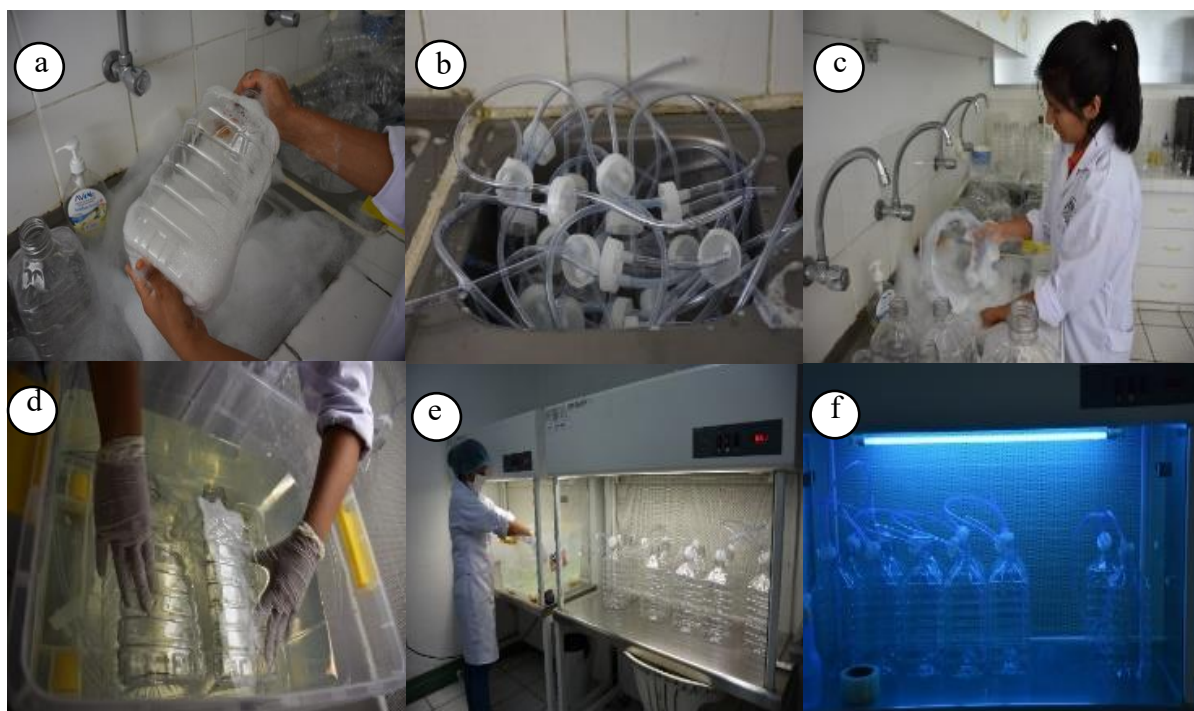


Figura 14. a) Lavado de galones tipo cristal con solución detergente , b)y c) Lavado de mangueras, d) Desinfección de galones tipo cristal en NaOCl al 0,5% por 5 min, e) Secado de los BITs dentro de la cámara de flujo laminar, f) Esterilización de las unidades BITs con luz UV.

c) Procedimiento de inoculación o siembra de explantes en los biorreactores.

❖ Preparación de medio de cultivo para multiplicación por biorreactores.

Para realizar la multiplicación en biorreactores se utilizó el medio de cultivo Murashige Skoog – MS +0,4 mg/L de tiamina+ 0,5 mg/L de ácido nicotínico+20g/L sacarosa + 10 mg/L de ácido ascórbico adicionando una fuente de citoquinina según distribución de tratamientos (Cada tratamiento constó de 800 ml de medio). El pH del medio fue ajustado a $5,8 \pm 0,1$ antes del autoclavado por 25 min a 121°C .

❖ Siembra en el sistema de inmersión temporal

Previamente a la siembra se realizó el pesado del esterilizante químico para cada unidad BIT (Vitrofuril 0,116 g/L de medio de cultivo). Una vez realizada la desinfección y esterilización de los BITs, en cámara de flujo laminar se procedió a la siembra de explantes al BIT esto se realizó de la siguiente manera:

Se seleccionó el material vegetal, embriones germinados de aproximadamente 6 cm de altura, se abrieron los frascos y se colocaron en placas Petri para disectar las plantas y extraer los explantes.

Se cortaron los explantes, el segmento apical consistió en la yema apical más un nudo, el segmento nodal consistió en el nudo de las hojas embrionarias más 3 cm de longitud del hipocótilo.

Se sembró 4 explantes en el frasco contenedor de explantes

Se tapó y selló con film para evitar fuga de aire y contaminación , seguidamente, se disolvió el esterilizante químico Vitrofurul en el frasco de medio de cultivo y se dispensó el medio de cultivo líquido en el frasco estéril N° 02 o frasco contenedor de medio del BIT, se selló la tapa con la ayuda de la cinta film.

Se conectaron los filtros esterilizados a las mangueras ubicadas en las tapas.

Finalmente se llevaron los Bits al área de incubación, para la conexión con las mangueras transportadoras de aire comprimido y darle las condiciones de cultivo.

2.4.5 Variables evaluadas

2.4.5.1 Porcentaje de contaminación

A los 42 días se contó las unidades experimentales contaminadas y sin contaminar (como muestra la figura 15), se determinó su porcentaje respecto al total de unidades experimentales.

$$\% \text{ Contaminación} = \text{contaminados} * 100 / \text{total}$$



Figura 15. BITS limpios y contaminados

2.4.5.2 Número de brotes por explante

Se contó el total de brotes presentes en cada unidad experimental (figura 16).



Figura 16. Evaluación de número de brotes

2.4.5.3 Altura de brotes

Se determinó mediante la medición de los brotes, sobre un papel milimetrado (Figura 17).



Figura 17. Evaluación de altura de brotes en cada explante de las unidades experimentales.

2.4.6. Análisis estadístico

Hurtado & Merino (1994) indicaron que en investigaciones donde se emplea la técnica de cultivo de tejidos, generalmente se emplea el diseño completamente al azar (DCA) puesto que el material experimental es homogéneo. Por ejemplo, se puede determinar cuál es el mejor medio de cultivo para meristemos, callos, anteras, hojas, embriones, óvulos, etc.

Los datos fueron transformados por la raíz cuadrada del dato inicial \sqrt{x} , asimismo estos fueron procesados empleando los softwares estadístico INFOSTAT 2016 y Minitab 18. Este software nos permitió realizar la prueba de análisis de varianza y la prueba de comparación de medias Tukey ($p < 0,05$).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Porcentaje de contaminación

La tabla 3 muestra la evaluación de la contaminación en los tratamientos .La figura 18 y 19 muestran el porcentaje de contaminación por tratamientos y del experimento en general.

Tabla 3

Porcentaje de contaminación de BIT's con explantes de sachá inchi evaluados a los 42 días de la instalación, en condiciones de laboratorio.

T	REPETICIONES		% Contaminación	% Sin contaminación	% Prom. contaminados	% Sin contaminar
	I	II				
1	a	b	50	50	17	83
2	b	b	0	100		
3	b	a	50	50		
4	b	b	0	100		
5	a	b	50	50		
6	a	b	50	50		
7	a	a	50	50		
8	b	b	0	100		
9	b	b	0	100		
10	b	b	0	100		
11	b	a	50	50		
12	a	a	50	50		
13	b	b	0	100		
14	b	b	0	100		
15	b	a	50	50		
16	b	b	0	100		
17	b	b	0	100		
18	b	b	0	100		
19	b	b	0	100		
20	b	b	0	100		
21	b	b	0	100		
22	b	b	0	100		
23	a	b	50	50		
24	b	b	0	100		
25	b	b	0	100		
26	b	b	0	100		
27	b	a	50	50		
28	a	b	50	50		
29	b	b	0	100		
30	b	b	0	100		
31	b	b	0	100		
32	b	b	0	100		

a: Contaminado

b: No contaminado

T: N° de tratamientos

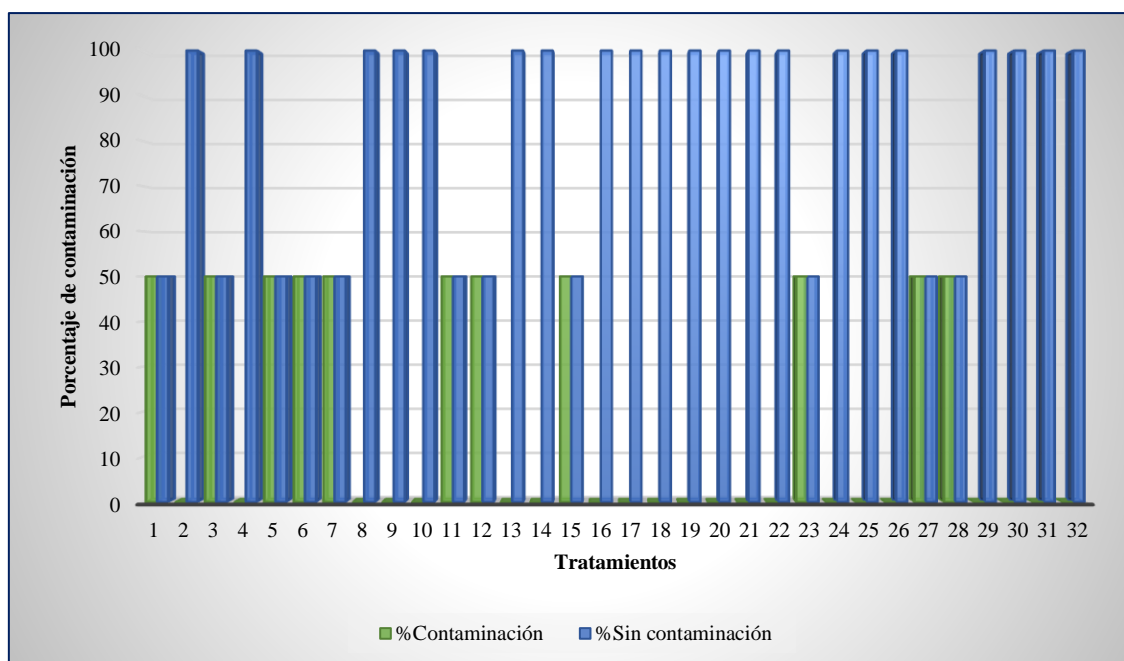


Figura 18. Porcentaje de contaminación del cultivo de sachu inchi en Biorreactores de inmersión temporal en los tratamientos

En la figura 18 se observa que los tratamientos T1, T3, T5, T6, T7, T11, T12, T15, T23, T27 y T28 se contaminaron el 50% quedando para evaluar la mitad de las unidades experimentales. Estos contaminantes fueron bacterias y hongos puede atribuirse debido a contaminantes intrínsecos del explante o al manipuleo durante la inoculación. En los tratamientos restantes si se logró controlar la contaminación en un 100%. Lo que indica que los resultados de multiplicación son confiables.

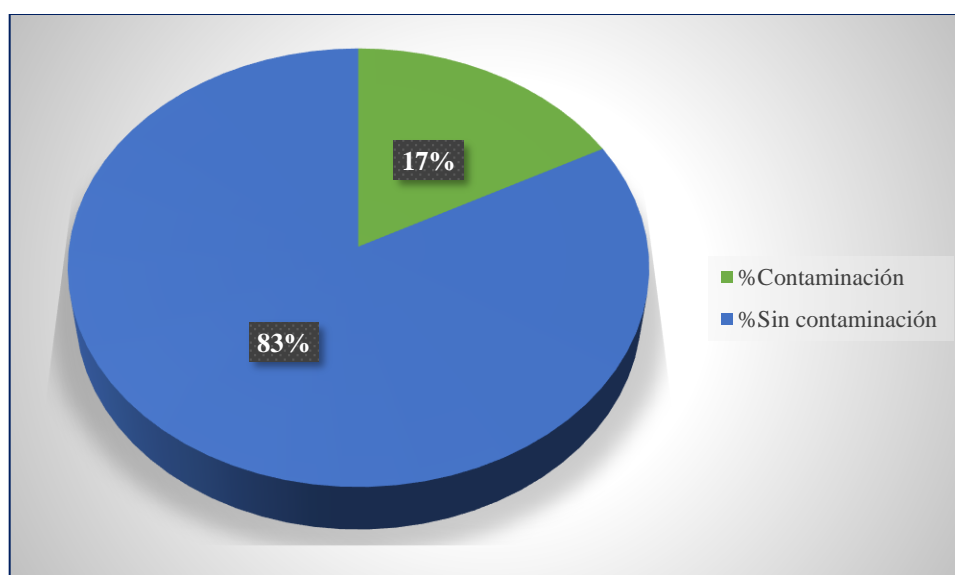


Figura 19. Porcentaje de contaminación del cultivo de sachu inchi en Biorreactores de inmersión temporal en los tratamientos

El porcentaje de contaminación del experimento fue 17% y el porcentaje sin contaminar fue 83% lo que aseguró posteriores evaluaciones, evitando el riesgo de no lograr determinar la tasa de multiplicación de brotes con la pérdida de unidades experimentales.

Estos resultados pueden atribuirse al esterilizante químico denominado G-1 o Vitrofur, pues en trabajos anteriores de sistemas de inmersión con el cultivo de piña se logró controlar la contaminación en un 100% utilizando 0,114 g/l. Todo ello sumado al proceso de desinfección de biorreactores y a la inoculación bajo condiciones inocuas. (Alverca, 2015)

Con los resultados obtenidos se logró cumplir con los requerimientos para considerar al método de desinfección utilizado eficiente. Esto fue posible debido a que los explantes utilizados fueron tomados de plántulas germinadas *in vitro*.

3.2 Número de brotes por explante

La tabla 4 muestra el análisis de varianza del número brotes por explante de sachá inchi obtenidos a los 42 días de haber sido establecidos en el sistema de inmersión temporal por cada unidad experimental

Tabla 4

Análisis de varianza del número brotes por explante de sachá inchi obtenidos a los 42 días de establecidos por cada unidad experimental

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	31	218,083	7,0349	35,42	0,0000
Lineal	7	123,645	17,6636	88,94	0,0000
A	3	105,628	35,2094	177,3	0,0000
B	1	4,295	4,2953	21,63	0,0000
C	3	13,722	4,5739	23,03	0,0000
Interacciones de 2 términos	15	85,816	5,7211	28,81	0,0000
A*B	3	4,237	1,4125	7,11	0,0000
A*C	9	80,247	8,9164	44,9	0,0000
B*C	3	1,332	0,4439	2,24	0,0850
Interacciones de 3 términos	9	8,622	0,9579	4,82	0,0000
A*B*C	9	8,622	0,9579	4,82	0,0000
Error	224	44,485	0,1986		
Total	255	262,567			

F: Estadístico de prueba usado para determinar si el término está asociado con la respuesta

GL: Grados de libertad total

MC: Cuadrados medios

P: Probabilidad

SC: Sumas de los cuadrados

Tabla obtenida del software estadístico Minitab 18

El análisis de varianza (Tabla 4), para el número de brotes por explantes de sachá inchi obtenidos en los 32 tratamientos, indica que estadísticamente existen diferencias altamente significativas, para la fuente de citoquininas (A), tipo de explante (B) y la concentración de citoquininas (C) en los efectos principales, así como en las interacciones de Fuentes de citoquininas y tipo de explante (AxB), Fuentes de citoquininas y concentración de citoquininas (A*C) .De modo contrario para la interacción tipo explante y concentración de citoquininas (Bx C) es no significativa.

La tabla 5 muestra el resumen del modelo para número de brotes por explante obtenidos a los 42 días de establecidos por cada unidad experimental.

Tabla 5

Resumen del modelo para número de brotes por explante obtenidos a los 42 días de establecidos por cada unidad experimental

S	R ²	R ² _{aj}	CV
0,445	83,06%	80,71%	13,98%

R²: Coeficiente de determinación.

S: desviación estándar de la separación entre los valores de datos y los valores ajustados.

Tabla obtenida del software estadístico Minitab 18.

El valor de R² obtenido en este estudio es de 83,06%, por lo tanto, se puede decir que el 83,06% de la variación observada en el número de brotes es explicada por el modelo, ya que la relación entre los factores de fuente de citoquinina, tipo de explante y concentración de citoquininas es descrita adecuadamente en los niveles estudiados para la variable respuesta de número de brotes. Además, según la Tabla 5, el coeficiente de determinación ajustado resultó ser de 80,71 %, indicando que el modelo si es adecuado para predecir el número de brotes.

La figura 20 muestra los efectos simples para el número de brotes por explantes de sachá inchi obtenidos con el sistema de inmersión temporal.

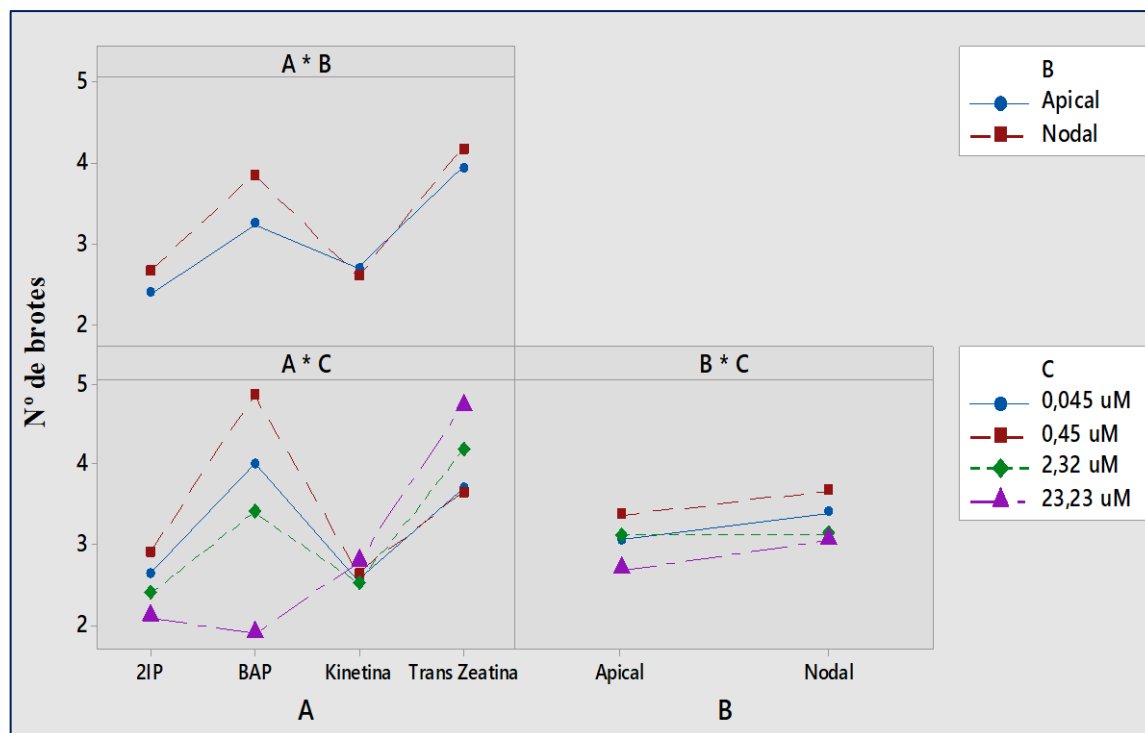


Figura 20. Efectos simples o interacciones para número de brotes por explante: Fuentes de citoquininas y tipo de explante (A x B), Fuentes de citoquininas y concentración de citoquininas (AxC) y la interacción Tipo de explante y Concentración de citoquininas (B x C) Obtenida del software estadístico Minitab.

Del gráfico podemos evidenciar los resultados obtenidos en el análisis de varianza, donde los efectos simples o interacciones: Fuentes de citoquininas y tipo de explante (A x B), Fuentes de citoquininas y concentración de citoquininas (A x C) son significativos, es decir los niveles de estos factores no siguen la misma tendencia y los datos se cruzan, mientras que en la interacción tipo explante y concentración de citoquininas (B x C) es no significativa, es decir los datos siguen la misma tendencia y no existe punto en el que los niveles de los factores se crucen, lo que nos quiere decir que el factor tipo de explante no depende del factor concentración de citoquinina donde se debe recomendar por separado a dichos factores.

La figura 21 muestra el diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el número de brotes de sachá inchi obtenidos mediante el sistema de inmersión temporal. Para determinar el factor que tuvo mayor efecto sobre otro.

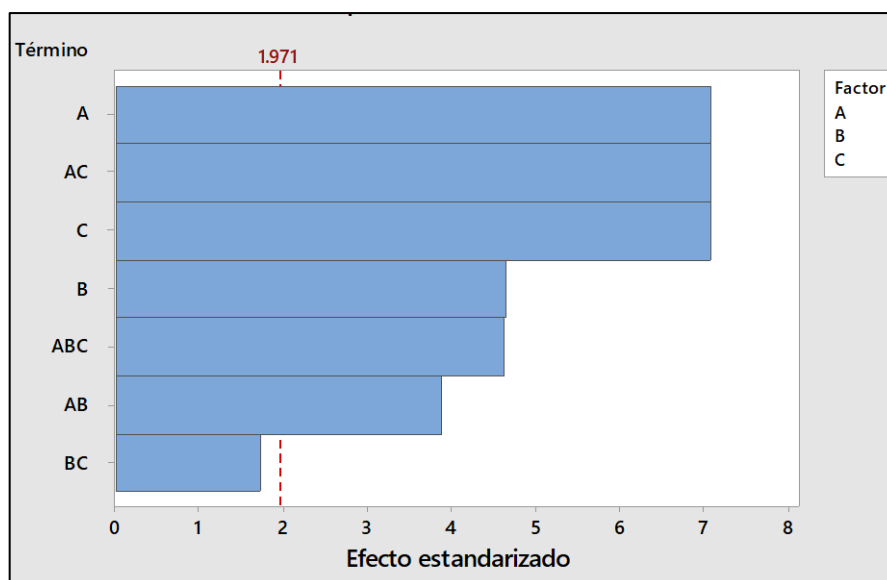


Figura 21. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el número de brotes, $\alpha = 0,05$. Obtenida del software estadístico Minitab.

En este diagrama de Pareto, las barras que representan los factores A, AC y C, B, ABC, AB cruzan la línea de referencia que está en 1,971 . Estos factores son estadísticamente significativos en el nivel de 0,05 con los términos del modelo actuales. La combinación de los factores BC es no significativa ya que esta por de bajo de la línea de referencia. También nos muestra que el factor A (Fuente de citoquinina) y el factor C (concentración de citoquinina) son los que tuvieron mayor efecto en esta variable evaluada.

La figura 22 muestra la Prueba de Tukey del número de brotes por explante del cultivo de sachá inchi para el efecto principal Fuente de citoquinina (A).

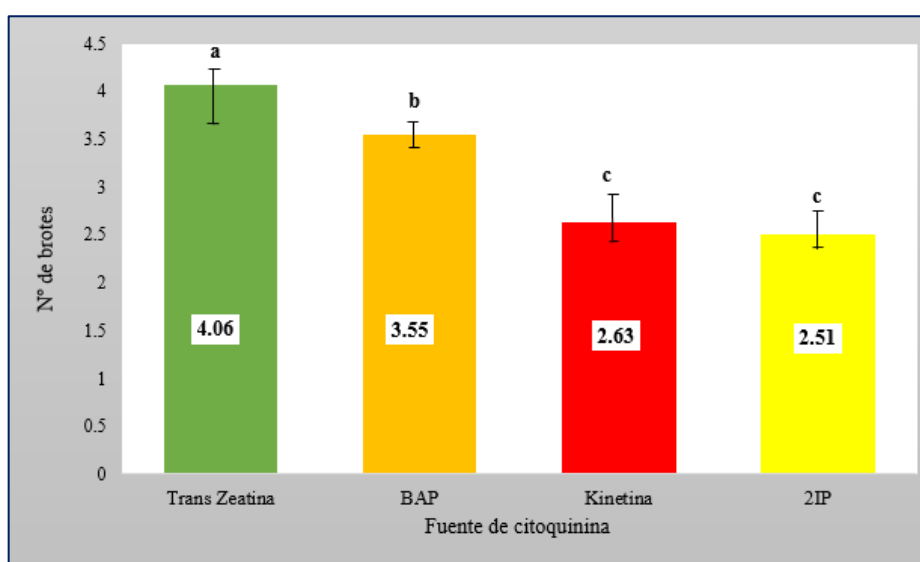


Figura 22. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) del número de brotes por explante para el efecto principal Fuente de citoquinina (A), evaluados a los 42 días.

La prueba de Tukey ($p < 0,05$), para el efecto principal fuente de citoquinina (A), muestran que existe diferencias estadísticas significativas entre las cuatro fuentes de citoquininas (Kinetina, BAP, Trans zeatina y 2ip), siendo Trans zeatina (4,06 brotes) superiores BAP (3,55 brotes), Kinetina (2,63 brotes) y 2IP (2,51 brotes). Este resultado muestra que independientemente de los demás factores al actuar por separado la trans zeatina tiene un mejor efecto, la trans zeatina es el prototipo de las adenilcitoquininas que ocurren naturalmente, es unas 10 veces más potente que la Kinetina (Roca & Mroginski, 1993).

La figura 23 muestra el Prueba de Tukey del número de brotes por explante del cultivo de sachá inchi para el efecto principal Fuente de citoquinina (A).

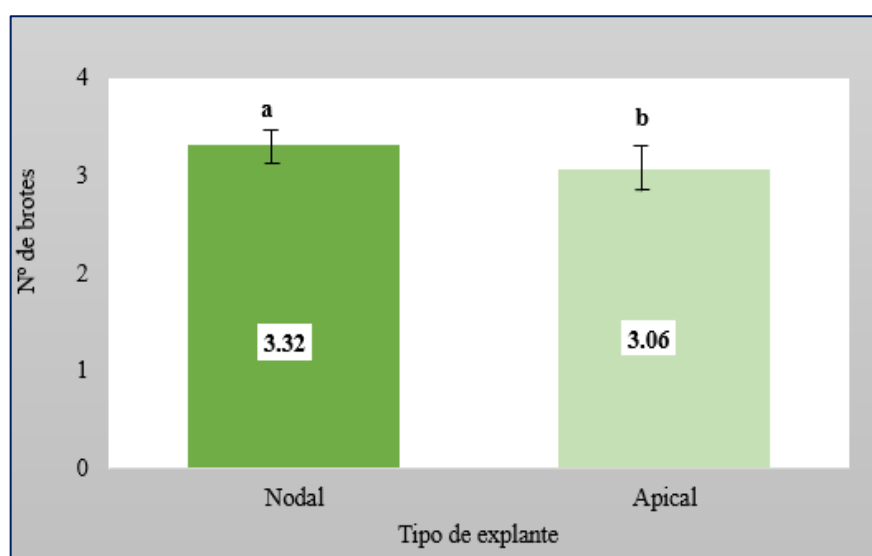


Figura 23. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) del número de brotes por explante del efecto principal Tipo de explante (B), evaluados a los 42 días.

La prueba de Tukey ($p < 0,05$), para el efecto principal tipo de explante (B), muestran que existe diferencias estadísticas significativas entre los dos tipos de explantes (Segmento apical y segmento Nodal), siendo Segmento nodal (3,32 brotes) superiores al segmento apical (3,06 brotes). Resultados similares obtuvo Bordignon et al., (2012) al utilizar tres segmentos de plántulas de sachá inchi en la multiplicación *in vitro* convencional, donde el segmento C (formado por un segmento nodal más la región basal cercana a la raíz) obtuvo mayor número de brotes, debido a la acumulación natural de auxinas en esta parte de la planta. Pues la combinación de auxinas y citoquininas incrementa la división celular logrando una mayor multiplicación de brotes (Pierik, 1990).

La Figura 24 muestra la prueba de Tukey del número de brotes por explante del efecto principal concentración de citoquinina (C).

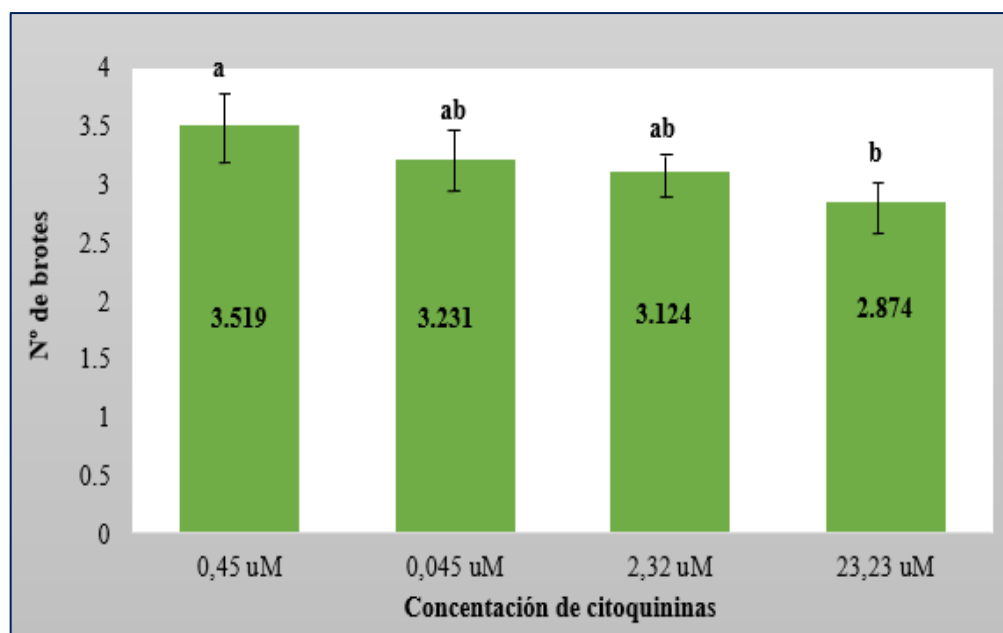


Figura 24. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) del número de brotes por explante para el efecto principal concentración de citoquinina (C), evaluados a los 42 días.

La prueba de Tukey ($p < 0,05$), para el efecto principal concentración de citoquinina (C), muestran que existe diferencias estadísticas significativas entre las cuatro concentraciones de citoquinina (0,045 uM, 0,45 uM; 2,32 uM y 23,23 uM), siendo la concentración 0,45 uM (3,52 brotes) superior; las concentraciones 0,045 uM y 2,32 uM se comportan de la misma manera pero son inferiores a 0,45 uM. La concentración 23,23 uM produce menor número de brotes (2,87).

Estos resultados confirman lo mencionado por Azcón-Bieto & Talón (2013) la hormonas vegetales pueden ser sintetizadas por las plantas, que tienen la capacidad de afectar a los procesos fisiológicos en concentraciones mucho más bajas que los nutrientes o las vitaminas ($< 1 \text{ mM}$, frecuentemente $< 1 \text{ } \mu\text{M}$). El control de la respuesta hormonal se lleva a cabo a través de cambios en la concentración y la sensibilidad de los tejidos a las hormonas.

La figura 25 muestra la prueba de Tukey del número de brotes por explante de la interacción fuente de citoquinina (A) y tipo de explante (B), evaluados a los 42 días.

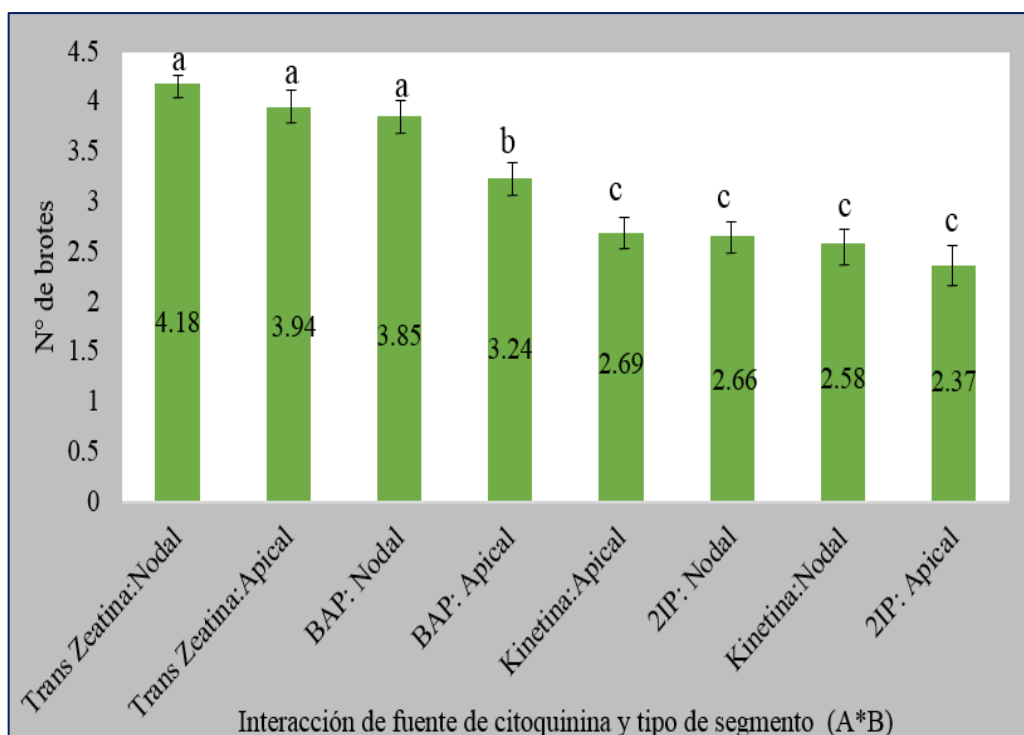


Figura 25. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) del número de brotes de la interacción Fuente de citoquinina (A) x Tipo de explante(B), evaluados a los 42 días.

La interacción fuente de citoquinina (A) y tipo de explante (B) (figura 25) muestra que la combinación de trans zeatina : Nodal presentó un mejor comportamiento en el número de brotes (4,18 brotes por explante), seguido de la combinación Trans zeatina: Apical (3,94 brotes), Bap : nodal (3,85 brotes), Bap: Apical (3,24 brotes), Kinetina : Apical (2,69 brotes), 2ip : Nodal (2,66 brotes), Kinetina :segmento nodal (2,58 brotes) y 2ip :Apical (2,37 brotes).

La figura 26 muestra la prueba de Tukey ($p < 0,05$) del número de brotes por explante de la interacción Fuente de citoquinina (A) x concentración de citoquinina (C), evaluados a los 42 días.

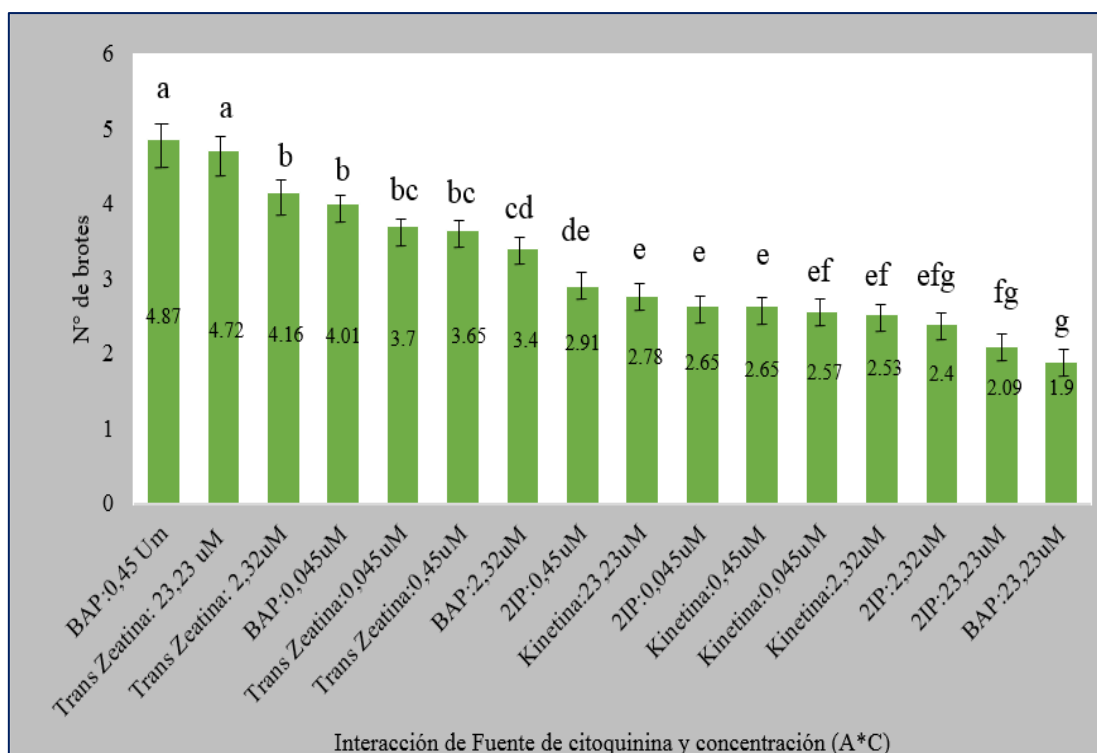


Figura 26. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) del número de brotes por explante de la interacción Fuente de citoquinina (A) x concentración de citoquinina (C), evaluados a los 42 días.

La interacción fuente de citoquinina (A) y concentración de citoquinina (C) (figura 26) muestra que la combinación de BAP: 0,45 uM presentó un mejor comportamiento en el número de brotes (4,87 brotes), seguido de la combinación Trans zeatina:23,23 uM(4,72 brotes), Trans zeatina:2,32 uM(4,16 brotes), BAP : 0,045 uM (4,01 brotes); Trans zeatina:0,045 uM(3,70 brotes) ; Trans zeatina:0,45 uM(3,65 brotes), BAP: 2,32 uM (3.4 brotes), 2ip : 0.45uM (2,91 brotes) kinetina:23,23 uM(2,78 brotes) 2ip : 0,045Um (2,65 brotes) Kinetina :0,45 uM (2,65 brotes), Kinetina :0,045 uM(2,57 brotes) Kinetina :2,32uM(2,53 brotes), 2ip : 2,32 uM (2,40 brotes), 2ip : 23,23Um(2,09 brotes) y BAP: 23,23 uM(1,09 brotes)

La figura 25 muestra la Prueba de Tukey ($p < 0,05$) del número de brotes por explante para la interacción tipo de explante (A) x tipo de explante (B)x concentraciones de citoquininas (C), evaluados a los 42 días.

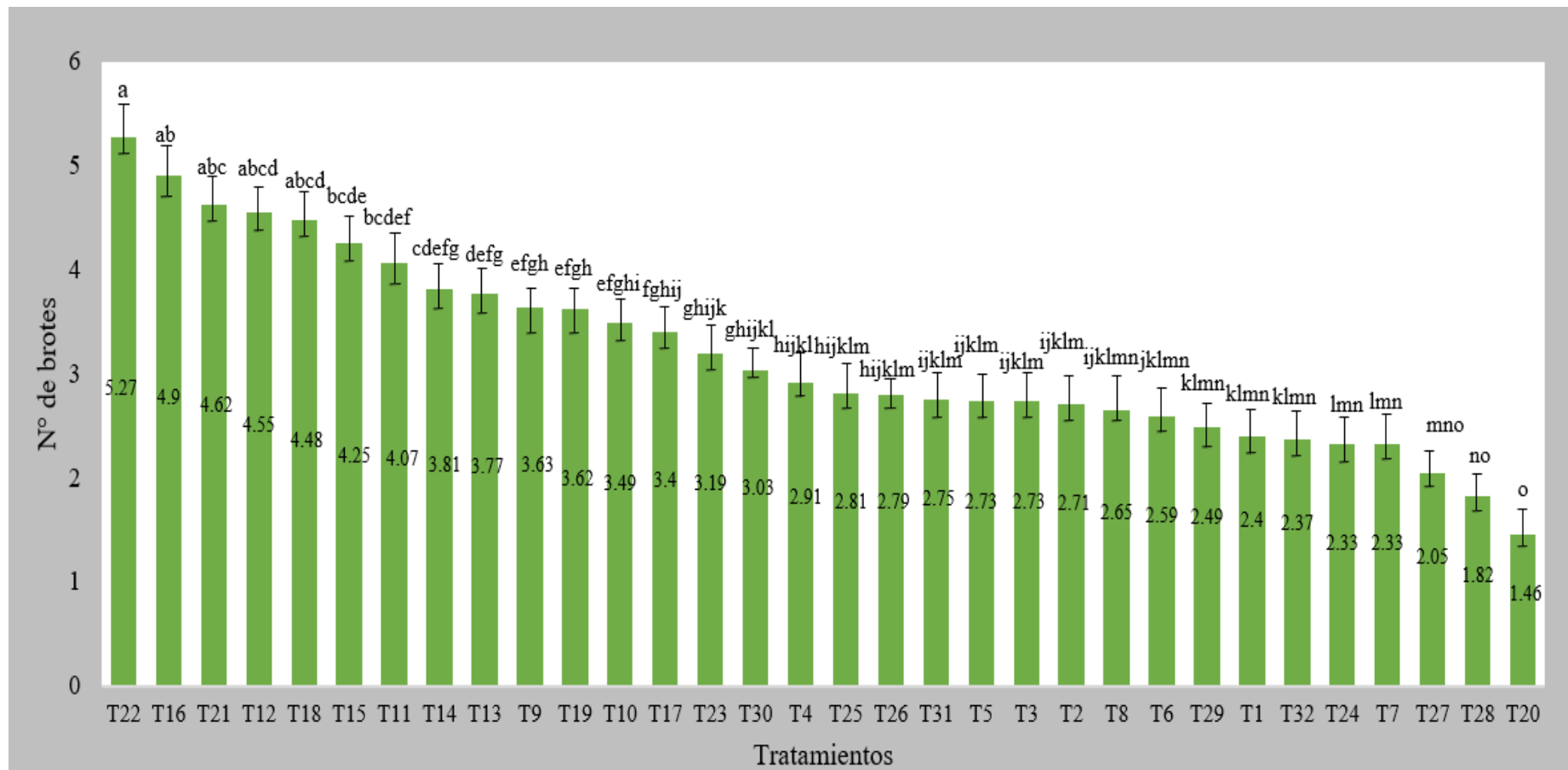


Figura 27. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) del número de brotes por explante de la interacción tipo de explante (A) x tipo de explante (B) x concentraciones de citoquininas (C), evaluados a los 42 días.

La interacción fuente de citoquinina (A), tipo de explante (B) y concentración de citoquinina (C) (figura 27) muestra que T22 (BAP segmento nodal a 0,45 uM) presentó un mejor comportamiento en el número de brotes (5,27 brotes), seguido por el tratamiento T21 (BAP a 0,045 uM + segmento nodal) con 4,62 brotes, T12 (Trans Zeatina a 23,23 uM + segmento apical) 4,55 brotes, T18 (BAP a 0,45 uM + segmento apical) 4,48 brotes, T15 (Trans Zeatina a 2,32 uM + segmento nodal) 4,25 brotes, T11 (Trans Zeatina a 2,32 uM + segmento apical) 4,07 brotes, T14 (Trans Zeatina a 0,45 uM + segmento nodal) 3,81 brotes, T13 (Trans Zeatina a 0,045 uM + segmento nodal) 3,77 brotes, T9 (Trans Zeatina a 0,045 uM + segmento Apical) 3,63 brotes, T19 (BAP a 2,32 uM + segmento apical) 3,62 brotes, T10 (Trans Zeatina a 0,45 uM + segmento apical) 3,49 brotes, T17 (BAP a 0,045 uM segmento apical) 3,40 brotes, T23 (BAP a 2,32 uM + segmento nodal) 3,19 brotes, T30 (2IP a 0,45 uM + segmento nodal) 3,03 brotes, T4 (Kinetina a 23,23 uM + segmento apical) 2,91 brotes, T25 (2IP a 0,045 uM + segmento apical) 2,81 brotes, T26 (2IP a 0,45 uM + segmento apical) 2,79 brotes, T31 (2IP a 2,32 uM + segmento nodal) 2,75 brotes, T5 (Kinetina a 0,045 uM segmento nodal) 2,73 brotes, T3 (Kinetina a 2,32 uM + segmento apical) 2,73 brotes, T2 (Kinetina a 0,45 uM + segmento apical) 2,71 brotes, T8 (Kinetina a 23,23 uM + segmento nodal) 2,65 brotes, T6 (Kinetina a 0,45 uM + segmento nodal) 2,59 brotes, T29 (2IP a 0,045 uM + segmento nodal) 2,49 brotes, T1 (Kinetina a 0,045 uM + segmento apical) 2,40 brotes, T32 (2IP a 23,23 uM + segmento nodal) 2,37 brotes, T24 (BAP a 23,23 uM + segmento nodal) 2,33 brotes, T7 (Kinetina a 2,32 uM + segmento nodal) 2,33 brotes, T27 (2IP a 2,32 uM + segmento apical) 2,05 brotes.

El resultado más bajo con respecto a esta variable se obtuvo con los tratamientos T28 (2IP a 23,23 uM + segmento apical) y T4 (BAP a 23,23 uM + segmento apical) con 1,82 y 1,46 brotes respectivamente. De esto se deduce que la citoquinina más importante para la multiplicación de sachá inchi es la citoquinina BAP, resultados similares obtuvieron (Solís Leyva, 2016) quien reportó que BAP le permitió obtener mejores resultados frente a la kinetina en el cultivo de sachá inchi bajo el sistema convencional del cultivo *in vitro*.

De acuerdo a Hu & Wang (1983) la citoquinina más efectiva en la inducción de yemas axilares en los medios de proliferación es el BAP (74,6%), seguida en orden decreciente por la kinetina (19,4%), el 2-ip (3%) y la zeatina (3%).

La diferencia de los resultados de diversas hormonas a la misma concentración, es debido al peso molecular que cada fuente de citoquinina posee (Pierik, 1990).

3.3. Altura de Brotes

La tabla 6 muestra el análisis de varianza de la altura de brotes obtenidos a los 42 días de establecimiento en el sistema de inmersión temporal. La tabla 6 muestra el resumen del modelo para número de brotes.

Tabla 7

Análisis de varianza de la altura de plantas obtenidos a los 42 días de establecimiento

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	31	485,95	15,6758	31,25	0,000
Lineal	7	251,48	35,9263	71,62	0,000
A	3	176,17	58,7237	117,07	0,000
B	1	40,16	40,1639	80,07	0,000
C	3	35,15	11,7165	23,36	0,000
Interacciones de 2 términos	15	177,3	11,8202	23,56	0,000
A*B	3	48,34	16,1149	32,13	0,000
A*C	9	110,71	12,3016	24,52	0,000
B*C	3	18,24	6,0813	12,12	0,000
Interacciones de 3 términos	9	57,16	6,3513	12,66	0,000
A*B*C	9	57,16	6,3513	12,66	0,000
Error	224	112,36	0,5016		
Total	255	598,31			

F: Estadístico de prueba usado para determinar si el término está asociado con la respuesta

GL: Grados de libertad total

MC: Cuadrados medios

P: Probabilidad

SC: Sumas de los cuadrados

Tabla obtenida del software estadístico Minitab 18

Indica que estadísticamente existen diferencias altamente significativas, para la fuente de citoquininas (A), tipo de explante (B) y la concentración de citoquininas (C) en los efectos principales, así como en las interacciones de dos y tres términos. Es decir los niveles de los factores empleados son dependientes.

Tabla 8

Resumen del modelo para número de brotes obtenidos a los 42 días de establecidos por cada unidad experimental

S	R ²	R ² _{aj}	CV
0,4456	81%	80%	37,7%

R²: Coeficiente de determinación.

S: desviación estándar de la separación entre los valores de datos y los valores ajustados.

Tabla obtenida del software estadístico Minitab 18.

El valor de R^2 obtenido en este estudio es de 81%, por lo tanto, se puede decir que el 81% de la variación observada la altura de brotes es explicada por el modelo, ya que la relación entre los factores de fuente de citoquinina, tipo de explante y concentración de citoquininas es descrita adecuadamente en los niveles estudiados para la variable respuesta de número de brotes. Además, según la Tabla 7, el coeficiente de determinación ajustado resultó ser de 80%, indicando que el modelo si es adecuado para predecir altura de brotes.

Los efectos simples o interacciones para altura de brotes: Fuentes de citoquininas y tipo de explante(A x B), Fuentes de citoquininas y concentración de citoquininas (AxC) y la interacción Tipo de explante y Concentración de citoquininas (B x C) se muestran en la figura 28.

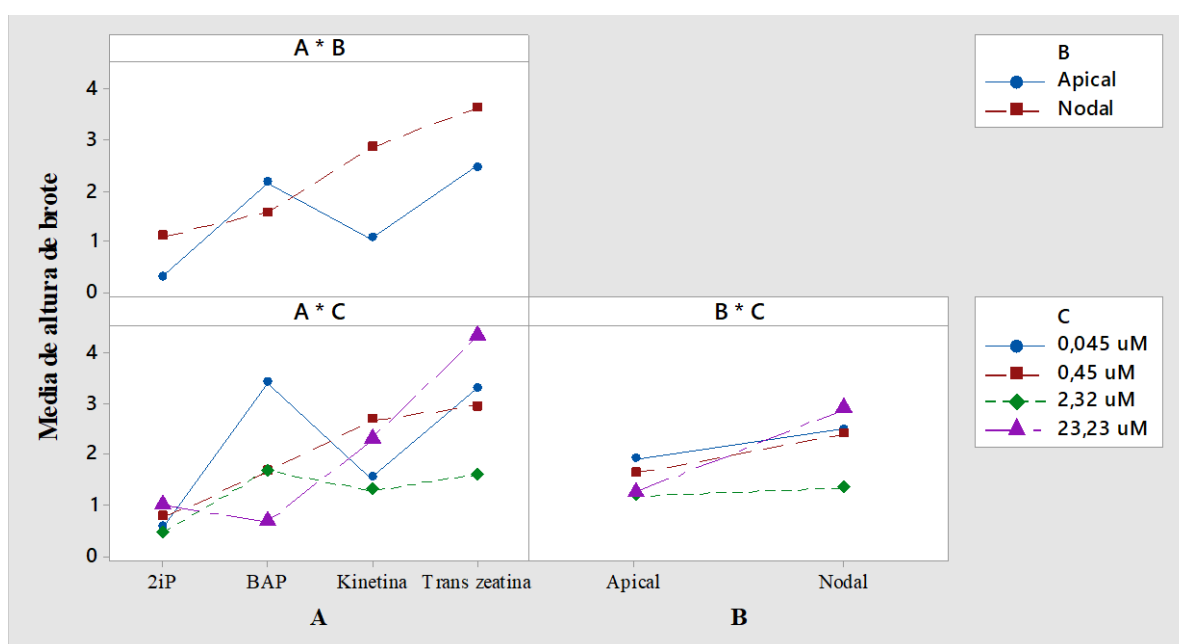


Figura 28. Efectos simples o interacciones para altura de brotes: Fuentes de citoquininas y tipo de explante(A x B), Fuentes de citoquininas y concentración de citoquininas (AxC) y la interacción Tipo de explante y Concentración de citoquininas (B x C) Obtenida del software estadístico Minitab.

De la figura 28 podemos evidenciar los resultados obtenidos en el análisis de varianza, donde los efectos simples o interacciones: Fuentes de citoquininas y tipo de explante (A x B), Fuentes de citoquininas y concentración de citoquininas (A x C) y (BxC) son significativos, es decir los niveles de estos factores no siguen la misma tendencia y los datos se cruzan, es decir los niveles de los factores son dependientes unos de otros.

Los efectos de los factores se observan en el diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el altura de brotes de brotes de la figura 29.

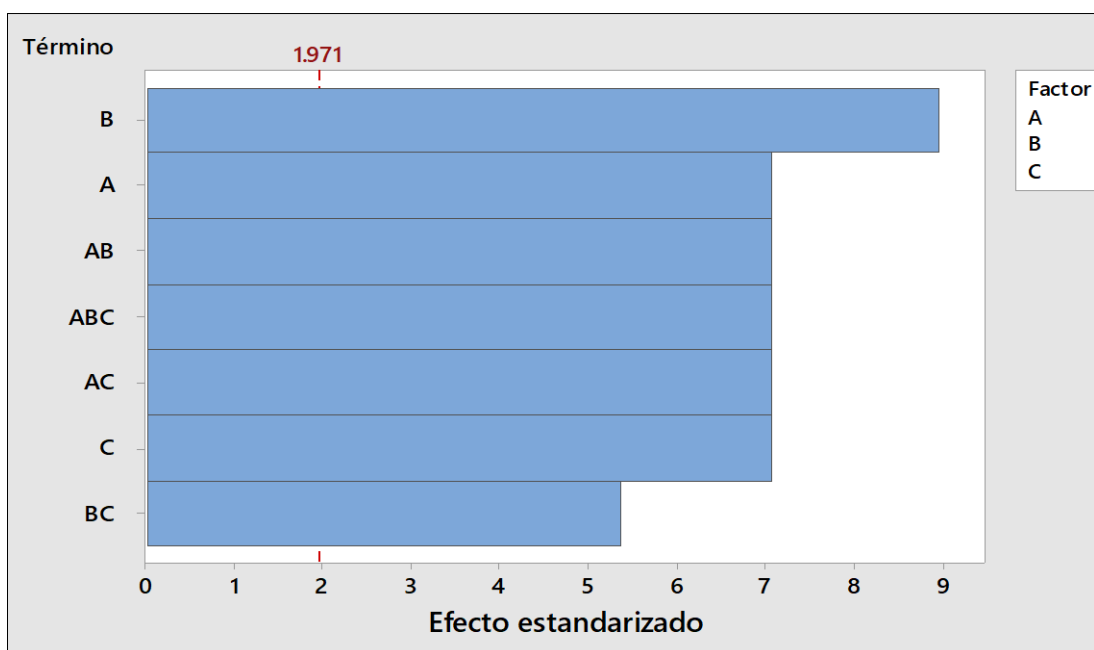


Figura 29. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el altura de brotes de brotes , $\alpha = 0,05$. Obtenida del software estadístico Minitab.

En este diagrama de Pareto, las barras que representan todos los factores y sus interacciones cruzan la línea de referencia que está en 1,971 . Estos son estadísticamente significativos en el nivel de 0,05 con los términos del modelo..También nos muestra que el factor B (tipo de explante) tuvo mayor efecto en esta variable evaluada.

La prueba Tuckey de la altura de brotes de sachá inchi del efecto principal fuente de citoquinina (A) se observa en la figura 30 .

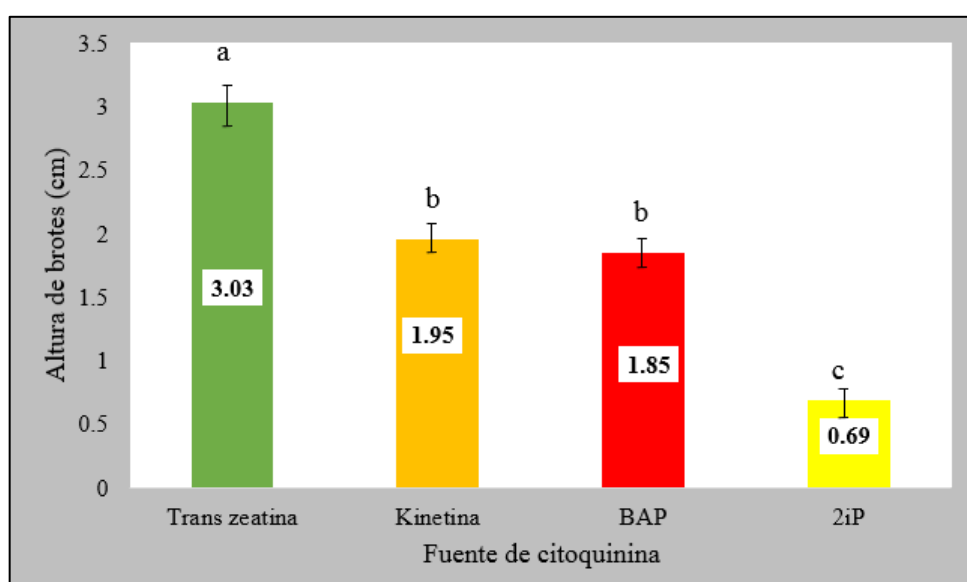


Figura 30. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) de la altura de brotes para el efecto principal fuente de citoquinina (A), evaluados a los 42 días.

La prueba de Tukey ($p < 0,05$), para el efecto principal fuente de citoquinina (A), muestran que existe diferencias estadísticas significativas entre las cuatro fuentes de citoquininas (Kinetina, BAP, Trans zeatina y 2ip) respecto a la altura de brotes, siendo Trans zeatina (3,03 cm/brote) superior a Kinetina (1,95 cm /brote), BAP (1,85cm/ brote) y 2IP (0,69 cm/brote).

Al igual que para el parámetro número de brotes, la fuente de citoquinina que produce mayor altura de brotes es la trans zeatina. Este resultado muestra que independientemente de los demás factores al actuar por separado la trans zeatina tiene un mejor efecto, la trans zeatina es una citoquinina 10 veces más potente que la Kinetina (Roca & Mroginski, 1993) y fue extraída de la molécula de maíz (*Zea mays*) (Taiz & Zeiger, 2006b).

La prueba de Tukey de la altura de brotes para el efecto principal tipo de explante (B) se observa en la figura 31.

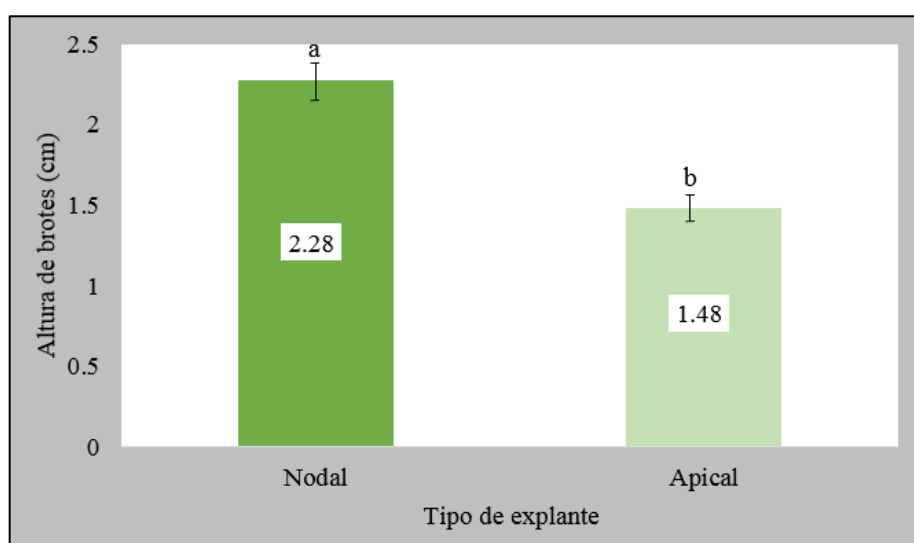


Figura 31. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) de la altura de brotes para el efecto principal tipo de explante (B), evaluados a los 42 días.

La prueba de Tukey ($p < 0,05$), para el efecto principal tipo de explante (B), muestran que existe diferencias estadísticas significativas entre los dos tipos de explantes (segmento apical y segmento nodal), siendo el segmento nodal (altura de 2,28 cm) superior al segmento apical (altura de 1,48 cm). En este experimento no se mostó dominancia apical (Desarrollo longitudinal, limitando del crecimiento de yemas y brotes laterales impuesta por la yema apical del tallo principal) (Azcón-Bieto & Talón, 2013), razón por la cual el segmento apical se desarrolló longitudinalmente llegando a producir menor número de brotes con menor altura.

La altura de brotes del efecto principal concentración de citoquinina (C) se determinó mediante la prueba de tuckey como se muestra en la figura 32.

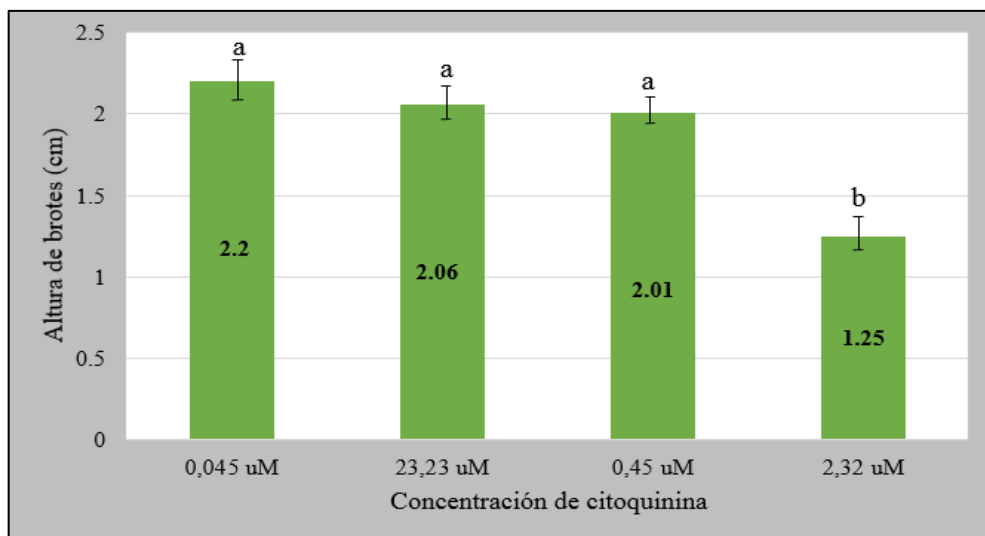


Figura 32. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) de la altura de brotes para el efecto principal concentración de citoquinina (C), evaluados a los 42 días.

La prueba de Tukey ($p < 0,05$), para el efecto principal concentración de citoquinina (C), muestran que existe diferencias estadísticas significativas entre las cuatro concentraciones de citoquinina (0,045uM ,0,45 uM; 2,32uM y 23,23 uM), siendo la concentración 0,045 uM, 23,23 uM y 0,45 uM iguales estadísticamente con 2,20 cm , 2,06 cm y 2,01 cm respectivamente; pero superiores a 2,32 uM 1,25 cm/brote.

Bajas y altas citoquininas logran obtener mayor altura de brotes de sachu inchi bajo el sistema de inmersión temporal.

La altura de brotes para la interacción fuente de citoquinina (A) y tipo de explante (B), se determinó mediante la prueba de Tukey como muestra la figura 33.

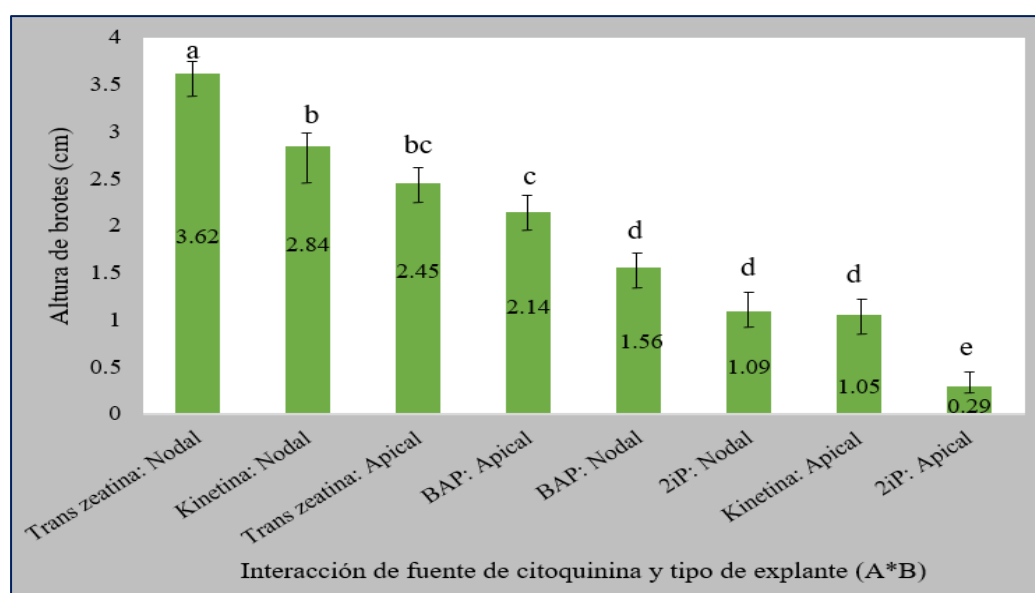


Figura 33. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) de la altura de brotes para la interacción Fuente de citoquinina (A) x Tipo de explante (B), evaluados a los 42 días.

La interacción fuente de citoquinina (A) y tipo de explante (B) (figura 33) muestra que la combinación de trans zeatina : Nodal presentó un mejor comportamiento en la altura de brotes (3,62 cm), seguido de la combinación Kinetina :segmento nodal (2,84 cm); Trans zeatina: Apical (2,45 cm) ; Bap: Apical (2,14cm), Bap : nodal (1,56 cm), 2ip : Nodal (1,09cm) y Kinetina : Apical (1,05 cm)

La altura de brotes de la interacción fuente de citoquinina (A) x concentración de citoquinina (C), se determinó mediante la prueba de Tuckey como e muestra en la figura 34.

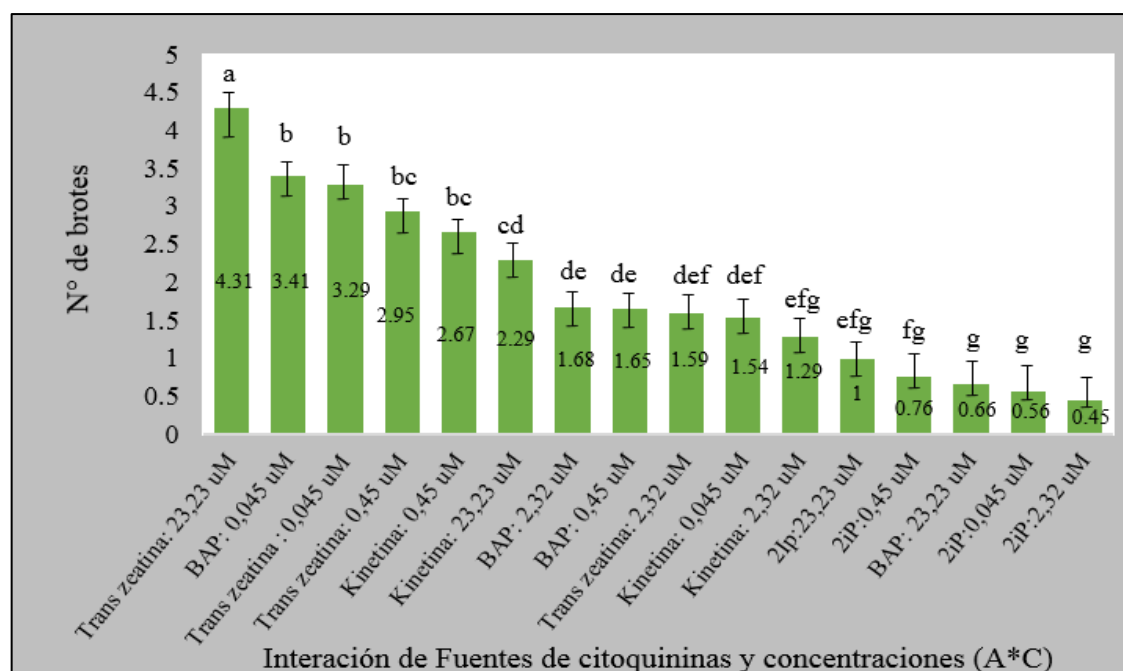


Figura 34. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) de la altura de brotes para la interacción Fuente de citoquinina (A) x concentración de citoquinina (C), evaluados a los 42 días.

La interacción fuente de citoquinina (A) y concentración de citoquinina (C) (figura 34) muestra que la combinación de trans zeatina :23,23 uM presentó un mejor comportamiento en la altura brotes (4,31 cm), seguido de la combinación BAP : 0,045 uM (3,41 cm); Trans zeatina:0,045 uM(3,29 cm) ; Trans zeatina:0,45 uM(2,95 cm), Kinetina :0,45 uM (2,67 cm) kinetina:23,23 uM(2,29cm), BAP: 2,32 uM (1,68 cm), BAP: 0,45 uM (1,65 cm) Trans zeatina:2,32 uM(1,59 cm) Kinetina :0,45 uM(1,54 cm) Kinetina :2,32uM(1,29 cm), 2ip : 23,23(1cm) 2ip : 0,45uM (0,76 cm) BAP: 23,23 uM(0,66 cm) 2ip : 0,045 uM (0,56 cm) y 2ip : 2,32 uM (0,45 cm)

La altura de brotes de la interacción Tipo de explante (B) x concentración de citoquinina (C), se determinó mediante la prueba de Tuckey como se muestra en la figura 35.

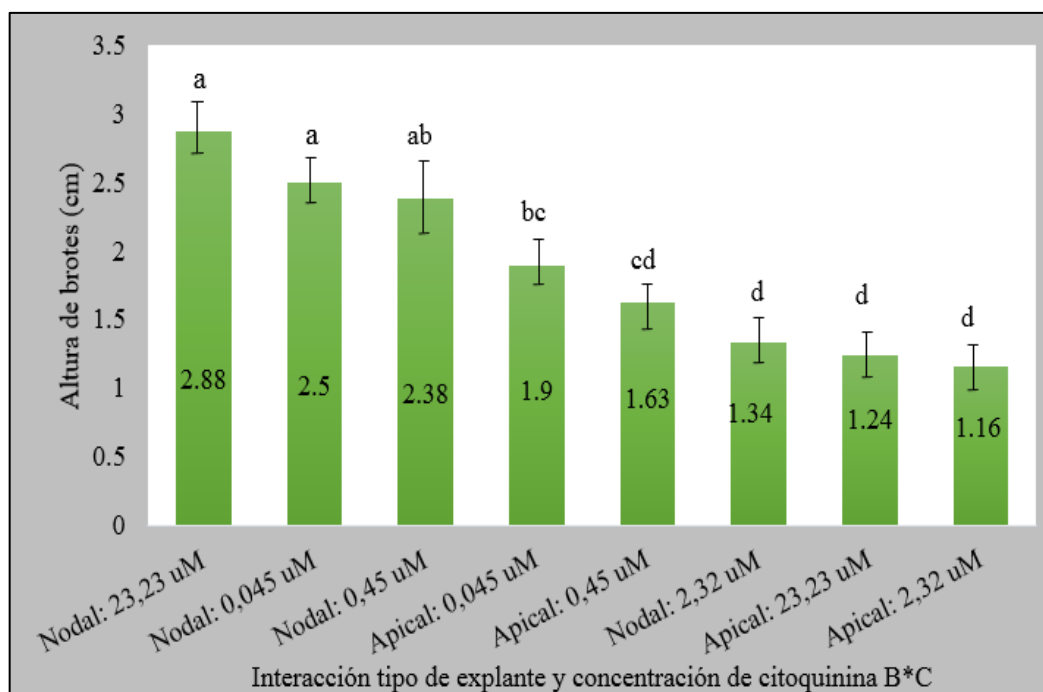


Figura 35. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) de la altura de brotes para la interacción Tipo de explante (B) x concentración de citoquinina (C), evaluados a los 42 días.

La interacción Tipo explante (B) y concentración de citoquinina (C) (figura 35) muestra que la combinación de Nodal :23,23 uM presentó un mejor comportamiento en la altura de brotes (3,67 cm), seguido de la combinación nodal : 0,045 uM (3,4 cm); Nodal:0,045 uM(3,37 cm) ; Apical:0,45 uM(3,12 cm), Nodal:2,32 uM (3,06 cm) apical:23,23 uM (3,06 cm)y Apical : 2,32 uM (2,69 cm) .

La altura de brotes de sachá inchi según la interacción fuente de citoquinina (A) x tipo de explante (B) x concentración de citoquininas (C), se determinó con la prueba de Tuckey como se muestra en la figura 36.

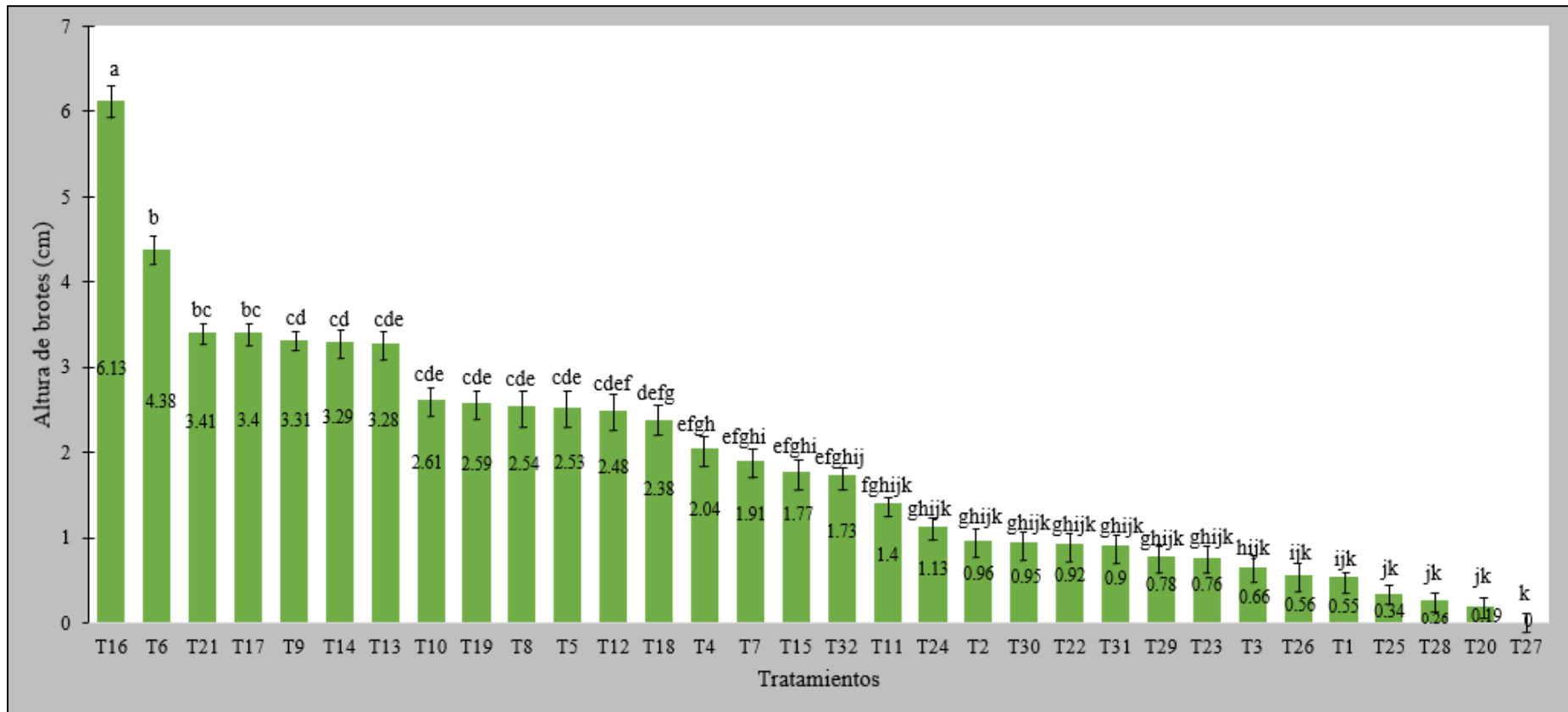


Figura 36. Prueba de Tukey ($p < 0,05$) de la altura de brotes de sachu inchi para la interacción Fuente de citoquinina (A) x tipo de explante (B) x concentración de citoquininas (C), evaluados a los 42 días.

La interacción fuente de citoquinina (A), tipo de explante(B) y concentración de citoquinina (C) (figura 36) muestra que T16 (Trans zeatina, segmento nodal y 23,23 uM) presentó un mejor comportamiento en la altura de brotes (6,3 cm), seguido por el tratamiento T6 (Kinetina Nodal 0,45 uM) 4,38 cm, T21 (BAP, segmento nodal y 0,045 uM) con 3,41 cm, T17 (BAP, segmento apical y 0,045 uM) 3,40 cm, T9 (Trans zeatina, segmento apical y 0,045 uM) 3,31 cm, T14 (Trans zeatina, segmento nodal y 0,45 uM) 3,29 cm, T13 (Trans zeatina, segmento nodal y 0,045 uM) 3,28 cm, T10 (Trans zeatina, segmento apical 0,45 uM) 2,61 cm, T19 (BAP, segmento apical y 2,32 uM) 2,59 cm, T8 (Kinetina, segmento nodal y 23,23 uM) 2,54 cm, T5 (Kinetina segmento nodal y 0,045 uM) 2,53 cm, T12 (Trans zeatina, segmento apical y 23,23 uM) 2,48 cm, T18 (BAP, segmento apical y 0,45 uM) 2,38 cm, T4 (Kinetina, segmento apical y 23,23 uM) 2,04 cm, T7 (Kinetina nodal y 2,32 uM) 1,91 cm, T15 (Trans zeatina nodal y 2,32 uM) 1,77 cm, T32 (2iP, segmento nodal 23,23 uM) 1,73 cm, T11 (Trans zeatina, segmento apical y 2,32 uM) 1,40 cm, T24 (BAP, segmento Nodal y 23,23 uM) 1,13 cm.

El resultado más bajo con respecto a esta variable se obtuvo con los tratamientos T2 (Kinetina, segmento apical y 0,45 uM), T30 (2iP, segmento nodal y 0,45 uM), T22 (BAP, segmento nodal y 0,45 uM), T31 (2iP, segmento nodal y 2,32 uM), T29 (2iP, segmento nodal y 0,045 uM), T23 (BAP, segmento nodal y 2,32 uM), T3 (Kinetina, segmento apical y 2,32 uM), T26 (2iP, segmento apical y 0,45 uM), T1 (Kinetina, segmento apical y 0,045 uM), T25 (2iP, segmento apical y 0,045 uM), T28 (2iP, segmento apical y 23,23 uM), T20 (BAP, segmento apical y 23,23 uM) y T27 (2iP, segmento apical y 2,32 uM) obtuvieron un promedio de 0,96; 0,95; 0,92; 0,90; 0,78; 0,76; 0,66; 0,56; 0,55; 0,34; 0,26; 0,19 y 0 cm de longitud de brote respectivamente.

3.4. Caracterización de la multiplicación en biorreactores de los tratamientos puestos en estudio.

Las características morfológicas de las plántulas obtenidas en el sistema de inmersión temporal utilizando Kinetina se observa en la figura 37.

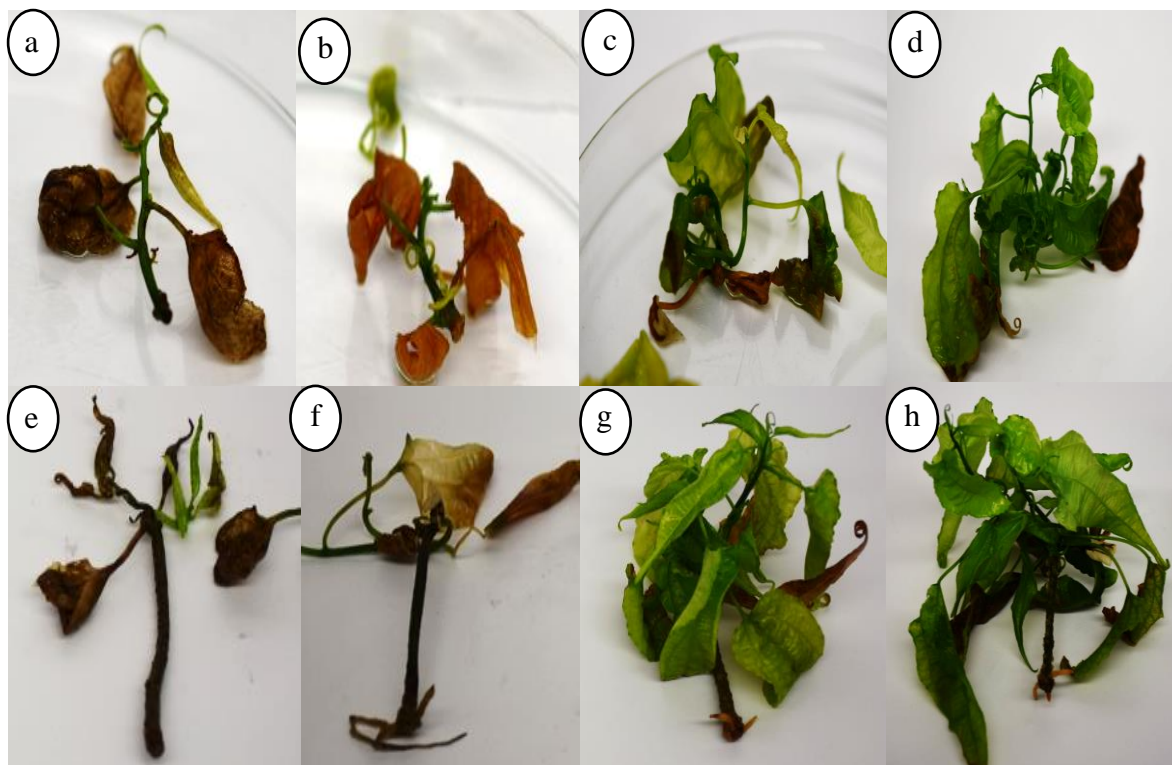


Figura 37. Plántulas de sachá inchi obtenidas en el sistema de inmersión temporal adicionando Kinetina a) Plántula del T1= Segmento apical +Kinetina (0,045 μ M) b) T2= Segmento apical +Kinetina (0,45 μ M) c) T3= Segmento apical +Kinetina (2,32 μ M), d) T4=Segmento apical +Kinetina (23,23 μ M) , e)T5= Segmento nodal +Kinetina (0,045 μ M) f) T6= Segmento nodal +Kinetina (0,45 μ M) g) T7= Segmento nodal +Kinetina (2,32 μ M), h) T8=Segmento nodal +Kinetina (23,23 μ M).

Una observación analítica para los tratamientos en el que se empleó Kinetina como fuente de citoquinina nos muestra que, el tratamiento T4 (fig. N° 37, imagen d) y el tratamiento T8 (Fig. N° 37, imagen h), con 42 días de haber sido establecido en el sistema de inmersión temporal con biorreactores se observó mayor tejido vegetal de color verde, es decir a mayor concentración de Kinetina se incrementa el follaje. Además los tratamientos con segmento apicales (T1,T2,T3y T4) mostraron presencia de callo en la base del explante, mientras que los tratamientos que tuvieron segmento nodal (T5,T6,T7 y T8) mostraron presencia de raíces a medida que se incrementó la concentración de Kinetina, esto se relaciona con lo mencionado por Bordignon et al., (2012), pues dice que los explantes nodales que tienen un segmento de tallo cercano a la región de la raíz poseen la acumulación de auxinas naturales,

por lo que en este experimento generó raíces a medida en que se agregó Kinetina. Según la cantidad de brotes emitidos, a deferencia de Solis Leyva, (2016) utilizando kinetina obtuvo plántulas de menor tamaño, menor número de brotes y nudos por brote que los explantes sometidos a BAP como fuente de citoquinina.

Las características morfológicas de las plántulas obtenidas en el sistema de inmersión temporal utilizando trans zeatina se observa en la figura 38.



Figura 38 . Plántulas de sacha inchi obtenidas en el sistema de inmersión temporal adicionando Trans zeatina, a) Plántula del T9= Segmento apical + Trans zeatina (0,045 μM) b) T10= Segmento apical + Trans zeatina (0,45 μM) c) T11= Segmento apical + Trans zeatina (2,32 μM), d) T12=Segmento apical + Trans zeatina (23,23 μM) y los tratamientos e) T13= Segmento nodal + Trans zeatina (0,045 μM) f) T14= Segmento nodal + Trans zeatina (0,45 μM) g) T15= Segmento nodal + Trans zeatina (2,32 μM), h) T16=Segmento nodal + Trans zeatina (23,23 μM)

La observación analítica para los tratamientos en el que se empleó Trans zeatina como fuente de citoquinina nos muestra que a los 42 días de haber establecido en el sistema de inmersión temporal con biorreactores se observó mayor tejido vegetal en el tratamiento T12 (fig. N° 38, imagen d) utilizando segmento apical como explante inicial y el tratamiento T10 (Fig. N° 38, imagen h) utilizando segmento nodal como explante inicial, es decir a mayor concentración de Trans zeatina se incrementa el tejido vegetal. Sin embargo, muestra vitrificación de explantes y clorosis de las hojas tal como menciona Prieto et al., (2005) las citoquininas a pesar de ser fundamentales, el exceso de humedad relativa dentro del frasco y altos niveles de amonio causan la hiperhidricidad, donde el explante toma un aspecto

vitrificado, caracterizado por hojas rígidas y quebradizas, anormalidad estomática y deficiente formación de la cutícula.

Todos los tratamientos muestran ausencia de raíces y presencia de callo en la base del explante.

Las características morfológicas de las plántulas obtenidas en el sistema de inmersión temporal utilizando Bap se observa en la figura 39.

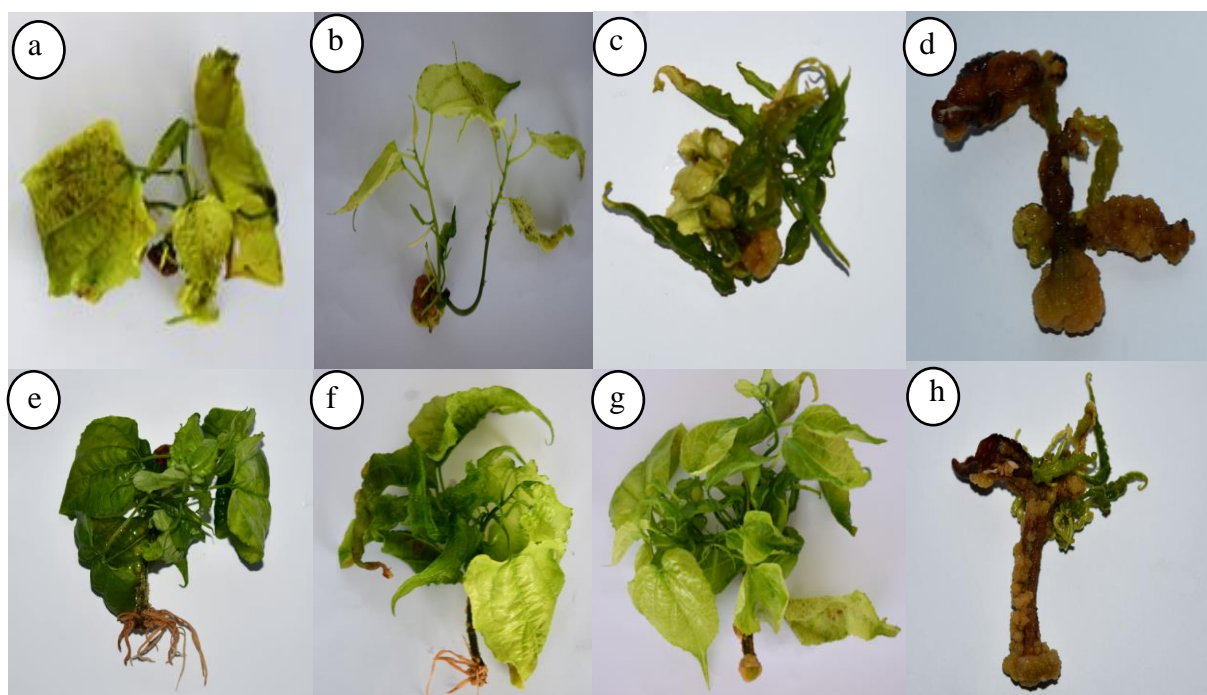


Figura 39. Plántulas de sachá inchi obtenidas en el sistema de inmersión temporal adicionando BAP a) Plántula del T17= Segmento apical +BAP (0,045 μ M) b) T18= Segmento apical + BAP (0,45 μ M) c) T19= Segmento apical + BAP (2,32 μ M), d) T20=Segmento apical + BAP (23,23 μ M), e) T21= Segmento nodal +BAP (0,045 μ M) f) T22= Segmento nodal + BAP (0,45 μ M) g) T23= Segmento nodal + BAP (2,32 μ M), h) T24=Segmento nodal + BAP (23,23 μ M)

Para los tratamientos en el que se empleó BAP como fuente de citoquinina, el tratamiento T17 (fig. N° 39, imagen a) de segmento apical y el tratamiento T21 (Fig. N° 39, imagen e) de segmento nodal, con 42 días de haberse establecido en el sistema de inmersión temporal de biorreactores, se observó que los explantes produjeron mayor follaje en concentraciones de 0,045 μ M de BAP

Además se observó la aparición de raíces para el caso de segmento nodal, y a medida que se incrementó la concentración de la hormona redujo la producción de tejido vegetal y de raíces tal como fue el caso de , presentó clorosis T17y T 18 (segmento apical) como también de T22 y T23 (segmento nodal). Alta concentración de BAP (23,23 μ M) en segmentos apicales

y nodales T20 Y T24, causó deformación de los explantes, producción de brotes vitrificados y cloróticos al igual .

Las características morfológicas de las plántulas obtenidas en el sistema de inmersión temporal utilizando 2iP se observa en la figura 40.



Figura 40. Plántulas de sachá inchi obtenidas en el sistema de inmersión temporal adicionando 2ip a) Plántula del T25= Segmento apical +2 ip (0,045 μM) b) T26= Segmento apical + 2 ip (0,45 μM) c) T27= Segmento apical + 2 ip (2,32 μM), d) T28=Segmento apical + 2 ip (23,23 μM), e) T29= Segmento nodal +2 ip (0,045 μM) f) T30= Segmento nodal + 2 ip (0,45 μM) g) T31= Segmento nodal + 2 ip (2,32 μM), h) T32=Segmento nodal + 2 ip (23,23 μM)

La observación analítica para los tratamientos en el que se empleó 2ip como fuente de citoquinina nos muestra que a los 42 días de haber establecido en el sistema de inmersión temporal con biorreactores, se observó la aparición de raíces en los tratamientos en el que se utilizó menor concentración de esta fuente de citoquinina, además que generó clorosis y necrosis en el tejido vegetal, pues Azcón-Bieto & Talón (2013) menciona que estos síntomas predominantes en hojas jóvenes y ápices ocurre por deficiencia de elementos minerales como Fe, Ca, B, Cu. Es decir menores concentraciones de 2ip no logran un equilibrio nutricional para actuar en la multiplicación celular.

CONCLUSIONES

La mayor tasa de multiplicación *in vitro* de sachu inchi bajo el sistema de biorreactores de inmersión temporal se logra con explantes de segmento nodal , utilizando como fuente de citoquinina BAP a una concentración de 0,45 uM donde se obtuvo 5,27 brotes por explante en 42 días.

En la multiplicación *in vitro* bajo el sistema de biorreactores de inmersión temporal se ha identificado que al utilizar Bap a bajas concentraciones se obtiene características morfológicas adecuadas para el proceso de aclimatación, sin embargo altas concentraciones inducen a la formación de callos en la base del explante, además los segmentos nodales lograron la formación de raíces. Asimismo, altas concentraciones de Trans zeatina incrementó el tejido vegetal , pero mostraron vitrificación de explantes y clorosis en las hojas. También al utilizar Kinetina se obtuvo buenas características morfológicas , pero la multiplicación de brotes fue menor al BAP. Finalmente al utilizar 2 IP como fuente de citoquinina se observó la aparición de raíces en los tratamientos de menor concentración donde generó clorosis y quemado en el tejido vegetal, haciendo difícil su aclimatación con esta citoquinina.

RECOMENDACIONES

- Utilizar los tratamientos que dieron lugar a los mejores resultados y emplearlos para realizar nuevos estudios planteando las combinaciones con auxinas.

- Determinar la DL50 del efecto de las concentraciones de citoquininas sobre los explantes.

- Continuar con los estudios de investigación de modo tal que se pueda lograr un protocolo eficiente para la propagación de sachá inchi bajo esta metodología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alverca, W. (2015). *Micropropagación de Ananas comosus (L.) Merr. Cultivar MD-2 “Golden”, mediante un sistema de inmersión temporal*. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú.
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2013). *Fundamentos de fisiología Vegetal* (Segunda ed). Madrid: McGraw-Hill - Interamericana de España, S. L.
- Barrera, O. (2007). Propagación sexual y clonal de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) bajo condiciones in vitro. Tarapoto, Perú.
- Basail, M., Kosky, R. G., Medero, V., Otero, E., Torres, M., Cabrera, M., ... Garcia, J. (2003). Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo en la propagación in vitro del cultivar híbrido ‘ FHIA-21 ’ (AAAB) en Sistemas de Inmersión Temporal. *Bioteología Vegetal Vol.*, 3(1), 93–96.
- Bordignon, S. R., Bovi, G. M., & Viegas, P. H. (2012). Propagação in vitro de Sachá inchi. *Ciência Rural*, 42(7), 1168–1172. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000700005&lng=pt&tlng=pt
- Cachique, D. (2006). *Biología floral y reproductiva de Plukenetia volúbilis L.(Euphorbiaceae)- (Sachá inchi)*. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú.
- Cachique, D., Rodríguez, Á., Ruiz-SolSol, H., Vallejos, G., & Solis, R. (2011). Propagación vegetativa del Sachá Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) mediante enraizamiento de estacas juveniles en cámaras de subirrigación en la amazonia peruana. *Folia Amazónica*, 20(1–2), 95–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.24841/fa.v20i1-2.348>
- Cruzat, R. (2009). *Resultados y Lecciones en Sistema de Inmersión Temporal en Especies Anuales, Frutales y Vides*. Chile.
- Dostert, N., Roque, J., Brokamp, G., Cano, A., La Torre, M., & Weigend, M. (2009). *Factsheet : Datos botánicos de Sachá Inchi*. Lima, Perú.
- Gárate, M. (2009). *Efecto de cuatro dosis de ácido- 3- indol butírico en el enraizamiento de ápices y segmentos nodales de sachá inchi (Plukenetia volubilis L.)*. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú.

- García, M. (2008). *Propagación vegetativa por injertos en Plukenetia volubilis L. empleando patrones interespecífico e intergenericos (Euphorbiaceae) en la provincia de San Martín*. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú.
- Guerrero, J. (2007). *Inducción de la embriogénesis somática en hojas inmaduras de sacha inchi (Plukenetia volubilis L.)*. Universidad Nacional de San Martín.
- Hurtado, D., & Merino, M. (1994). *Cultivo de tejidos vegetales* (Editorial). Mexico.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (Segunda ed). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Macbride, J. (1951). Flora del Perú: Euphorbiaceae. Botanical Series, 13(III A), 115–118.
- Manco, E. (INIA/). (2006). *Cultivo de sacha inchi*. Tarapoto, Perú.
- Noriega, V., Reátegui, J., Gonzales, R., Gárate, M., Delgado, H., Altamirano, A., & Amasifuén, K. (2017). *Manual práctico de propagación in vitro de sacha inchi (Plukenetia volubilis L.) utilizando biorreactores de inmersión temporal*. Tarapoto.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. (L. Ayerbe, Ed.) (Madrid Mun).
- Prieto, H., Jordan, M., Barrueto, L., Cordeiro, M., & Durzan, D. (2005). Biotecnología Vegetal. In 15 (pp. 1–218). Santiago.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). *Cultivo de tejidos en Argicultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Cali: CIAT.
- Rodríguez, Á., Corazon-Guivin, M., Cachique, D., Mejía, K., Del Castillo, D., & García-Dávila, C. (2010). Diferenciación morfológica y por ISSR (Inter simple sequence repeats) de especies del género *Plukenetia* (Euphorbiaceae) de la Amazonía peruana: propuesta de una nueva especie. *Rev. Peru. Biol*, 17(3), 325–330.
- Solis Leyva, R. (2016). *Morfogénesis invitro de Sacha inchi (Plukenetia volubilis L.)*. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006a). *Fisiología vegetal- Volumen 1*. (Artmed, Ed.) (Tercera ed). Los Ángeles.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006b). *Fisiología vegetal-Volumen 2* (Tercera ed). Los Ángeles.

ANEXOS

A. Programación del timer para el experimento

Tabla 9

Programación del tiempo de inmersión y frecuencia de inmersión

Programación	Inmersión		Retorno del medio de cultivo	
	ON	OF	ON	OF
1	7:00	7:04	7:05	7:06
2	11:00	11:04	11:05	11:06
3	15:00	15:04	15:05	15:06
4	19:00	19:04	19:05	19:06
5	23:00	23:04	23:05	23:06
6	3:00	3:04	3:05	3:06

ON: Encendido

OF: Apagado



Figura 41. Tablero de control ON/OF, donde se programó el experimento

B. Proceso de preparación de Hormonas vegetales

Tabla 10

Proceso de preparación de hormonas

	Nombre	Abreviatura	Peso Molecular	Conc. de Stock	Unid	Vol final Stock	Unid	Pesar	Unid	Solvente	Diluyente	PREPARACIÓN
1	Bencil amino purina	BAP	225,3	100	mg/L	100	mL	0,0100	g	1N NaOH	Agua	Se agregó NaOH 1N hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada esteril hasta enrazar a 100 mL. Se guardó en refrigeración.
2	Kinetina	KIN	215,2	100	mg/L	100	mL	0,0100	g	1N NaOH	Agua	Se agregó NaOH 1N hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada esteril hasta enrazar a 100 mL. Se guardó en refrigeración.
3	2 isopentil adenina	2IP	203,2	100	mg/L	100	mL	0,0100	g	1N NaOH	Agua	Se agregó NaOH 1N hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada esteril hasta enrazar a 100 mL. Se guardó en refrigeración.
4	Ácido Naftalen-Acético	ANA	186,2	100	mg/L	100	mL	0,0100	g	1N NaOH	Agua	Se agregó NaOH 1N hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada esteril hasta enrazar a 100 mL. Se guardó en refrigeración.
5	Trans-zeatina	Tran-zea	219,25	100	mg/L	100	mL	0,0100	g	1N NaOH	Agua	Se agregó NaOH 1N hasta disolver completamente, luego agregar agua destilada esteril hasta enrazar a 100 mL. Se guardó en refrigeración.

C. Cantidad de hormona aplicar

Tabla 11

Cantidad de citoquinina aplicar en ml

Fuente de citoquinina	Tratamiento	Concentración (uM)	Concentración en ppm	Voumen de hormona (ml)
Kinetina	1	0,045	0,00968	0,077472
	2	0,45	0,09684	0,77472
	3	2,32	0,49926	3,994112
	4	23,23	4,99910	39,992768
	5	0,045	0,00968	0,077472
	6	0,45	0,09684	0,77472
	7	2,32	0,49926	3,994112
	8	23,23	4,99910	39,992768
Tranz Zeatina	9	0,045	0,00987	0,07893
	10	0,45	0,09866	0,7893
	11	2,32	0,50866	4,06928
	12	23,23	5,09318	40,74542
	13	0,045	0,00987	0,07893
	14	0,45	0,09866	0,7893
	15	2,32	0,50866	4,06928
	16	23,23	5,09318	40,74542
BAP	17	0,045	0,01014	0,081108
	18	0,45	0,10139	0,81108
	19	2,32	0,52270	4,181568
	20	23,23	5,23372	41,869752
	21	0,045	0,01014	0,081108
	22	0,45	0,10139	0,81108
	23	2,32	0,52270	4,181568
	24	23,23	5,23372	41,869752
2 Ip	25	0,045	0,00914	0,073152
	26	0,45	0,09144	0,73152
	27	2,32	0,47142	3,771392
	28	23,23	4,72034	37,762688
	29	0,045	0,00914	0,073152
	30	0,45	0,09144	0,73152
	31	2,32	0,47142	3,771392
	32	23,23	4,72034	37,762688

Para convertir de μM a ppm se utilizó la siguiente fórmula

De ppm a μM :

$$\mu\text{M} = [\text{ppm}] \times 1000 / \text{Peso molecular}$$

De μM a ppm:

$$\text{ppm} = \text{Peso molecular} \times [\mu\text{M}] / 1000$$

Posteriormente para determinar el volumen final a aplicar en 800 ml de medio de cultivo se utilizó la fórmula de concentraciones:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Ejemplo en el caso del tratamiento 1

Se utilizó Kinetina cuyo peso molecular es 215,2 ; se convirtió a ppm de la siguiente manera:

$$X \text{ ppm} = \text{Peso molecular} \times [\mu\text{M}] / 1000$$

$$X \text{ ppm} = 215,2 \times 0,045 \mu\text{M} / 1000$$

$$X \text{ ppm} = 0,00968 \text{ ppm}$$

Seguidamente se calculó el volumen final aplicar de la solución stock de la hormona.

$C_1 = 100 \text{ ppm}$ (la concentración en la que fueron preparadas las hormonas)

$V_1 =$ Por determinar

$C_2 =$ concentración en ppm transformadas para cada tratamiento

$V_2 = 800 \text{ ml}$ cantidad de medio a utilizar en todos los tratamientos.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times X = 0,00968 \text{ ppm} \times 800 \text{ ml}$$

$$X = 0,00968 \text{ ppm} \times 800 \text{ ml} / 100 \text{ ppm}$$

$$X = 0,077472 \text{ ml}$$

D. Formulación de medio de cultivo para germinación de embriones y multiplicación en biorreactores del sistema de inmersión temporal.

Tabla 12

Formulación de las sales para germinación de embriones cigóticos

Reactivos	Cantidades (litros)
1,000 ml	
Murashige & Skoog, 1962	
A, B, G	10 ml
C, D, E, F	2,5 ml
Thiamina	0,4ml
Ácido Nicotínico	0,5 ml
Sacarosa	20 g
ELC – Endospermo líquido de coco	100 ml
Carbón activado	2 g
pH 5,4 (KOH – 1M)	
Agar	10 g
Esterilizar en Autoclave	15 min.
Fuente (Noriega et al., 2017)	

Tabla 13

Formulación de las sales para multiplicación de sachá inchi en biorreactores bajo el sistema de inmersión temporal

COMPOSICIÓN DEL STOCK	CANTIDAD POR LITRO
A	20 ml
B	20 ml
G	20 ml
C	5 ml
D	5 ml
E	5 ml
F	5 ml
Thiamina Hcl 1000 ppm	0,4
Ácido Nicotínico	0,5
Ácido Ascórbico	10
Azúcar	20 g
Dividido cada 800 ml para agregar hormona según tratamiento	

Fuente : (Noriega et al., 2017) modificado por el autor

E. Flujo de la multiplicación de sachá inchi en biorreactores de inmersión temporal



F. Panel fotográfico

Figura 42. Plántulas obtenidas a los 35 días de establecimiento con el tratamiento 16



Figura 43. Plantulas del Tratamiento 16 con presencia de raíces