

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FCA
Facultad de
Ciencias Agropecuarias

TRABAJO DE DIPLOMA

Departamento: Agronomía

Título: Establecimiento y multiplicación *in vitro* de Sacha inchi
(*Plukenetia volubilis* L.)

Autor: Juan Pablo Gómez Posada

Tutor: Dr. C. Rafael Gómez Kosky

Santa Clara Noviembre 2023
Copyright©UCLV

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FCA
Facultad de
Ciencias Agropecuarias

DIPLOMA THESIS

Department: Agronomy

Title: *In vitro* establishment and multiplication of Sacha inchi
(*Plukenetia volubilis* L.)

Author: Juan Pablo Gómez Posada

Tutor: Dr. C. Rafael Gómez Kosky

Santa Clara Noviembre 2023
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria "Chiqui Gómez Lubian" subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419



ACTA DE CONFORMIDAD PARA ESTUDIANTES DE PREGRADO

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas

Por una parte: Juan Pablo Gómez Posada
estudiante de la carrera de: Agronomía en la facultad de: Ciencias Agropecuarias, en lo adelante EL ESTUDIANTE. Con número de identidad permanente: 00030570506 o pasaporte: _____ . Y por otra parte Dr. C. Ubaldo Alvarez Hernández Jefe del Departamento Docente de: Agronomía en la ya mencionada facultad, en lo adelante EL JEFE DE DEPARTAMENTO, Dr. C. Rafael Gómez Losky (es) encargado(s) de tutorar el Trabajo de Diploma DEL ESTUDIANTE, en lo adelante EL TUTOR.

Reconocen que:

- I. A EL ESTUDIANTE se le ha aprobado como tema de investigación para su Trabajo de Diploma el titulado Establecimiento y multiplicación in vitro de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*)
- II. EL ESTUDIANTE no divulgará información concerniente a la investigación, tanto durante el desarrollo como tras la culminación de esta sin la debida autorización DEL TUTOR o EL JEFE DE DEPARTAMENTO.
- III. Que el Trabajo de Diploma fruto de la labor investigativa de EL ESTUDIANTE y la asesoría de EL TUTOR, resulta de TITULARIDAD EXCLUSIVA de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas.
- IV. EL ESTUDIANTE una vez aprobada su tesis para la defensa, depositará una copia electrónica de la misma en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- V. A partir de la defensa y aprobación del Trabajo de Diploma, la publicación total, parcial o la elaboración de cualquier obra que se derive de esta investigación por parte de EL ESTUDIANTE, contará con la coautoría de EL TUTOR y viceversa, resultando de referencia obligada esta obra en cualquier otra que se elabore. El incumplimiento de esta cláusula, puede llevar consigo el inicio de procesos de plagio. Todo lo anterior de acuerdo a la normativa de Derecho de Autor vigente en Cuba.

Y para que así conste se firma la presente en la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, a los 4 días del mes de diciembre del año 2023

Juan Pablo Gómez Posada

EL ESTUDIANTE

Ubaldo Alvarez Hernández

JEFE DE DEPARTAMENTO

Rafael Gómez Losky

TUTOR

TUTOR

Pensamiento

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: **La voluntad**”

Albert Einstein

Dedicatoria

A lo mejor de mi vida:

Mi familia, especialmente a mis padres.

Agradecimientos

En estos momentos deseo dar infinitas gracias a todos los que me han ayudado para alcanzar esta meta:

- En primer lugar a mis padres. Ustedes son mi ejemplo a seguir, gracias por ser mis primeros profesores, agradecido estoy de todo lo que han aportado para mi formación y sobre todo gracias por siempre estar alentándome y dándome fuerzas para seguir.
- A mis compañeros de aula, los cuales comenzamos como desconocidos y salimos como una familia. Ustedes han hecho que este viaje haya sido menos pesado para mí. Un agradecimiento especial a una compañera, que aunque su vida siguió otro rumbo, siempre ha sido una gran amiga, muchos éxitos para ti, Sivle.
- A todos los profesores que han aportado su grano de arena para mi formación como profesional.
- A mi familia, en especial a mi abuela. Gracias por todas tus bendiciones y estar alentándome para que me supere cada día más, eres uno de mis más grandes pilares.
- A la princesa de mis ojos, mi hermanita. Aunque estemos separados por 90 millas siempre estás pendiente de mí y dándome fuerzas para seguir hacia adelante.
- A mi amor, esa personita que aunque haya llegado en la parte final de este camino, ha sido una luz para mí, gracias por aparecer en mi vida, apoyarme y alentarme sobre todo cuando ni ganas tenía.

A todos, muchas gracias!!!!

Resumen

RESUMEN

Sacha inchi es una planta oleaginosa, perenne y trepadora. Su aceite está considerado el mejor del mundo por cualidades de color, sabor, olor y beneficios nutricionales para la salud humana. Una de las principales limitaciones es la falta de continuidad en el abastecimiento de la semilla, ante esta situación la propagación *in vitro* es una de las alternativas para empezar a desarrollar el potencial agroindustrial de la especie. El presente trabajo tuvo como objetivo lograr el establecimiento y la multiplicación de brotes *in vitro* en esta especie. Se evaluaron tres diferentes tipos de explante inicial para el establecimiento de brotes o plantas *in vitro* (semillas maduras, inmaduras y segmentos nodales), así como diferentes concentraciones y tiempos de exposición de los explantes en hipoclorito de sodio, además de las NPs-Ag en el medio de cultivo. También, se evaluó el efecto de la sacarosa, agua de coco y floriglucinol en los medios de cultivo durante las fases de establecimiento y multiplicación *in vitro*. Fue posible alcanzar la germinación *in vitro* de las semillas inmaduras sin testa de Sacha inchi en un medio de cultivo con agua de coco. Así como, un alto porcentaje de segmentos nodales libres de contaminantes con la presencia de las NPs-Ag en el medio de cultivo. La combinación de los reguladores del crecimiento 6-BAP y ANA junto con el floriglucinol a 30,0 mg L⁻¹ permitió la multiplicación *in vitro* de los brotes apicales obtenidos de plantas de semillas inmaduras, sin formación de callo basal.

Palabras clave: propagación *in vitro*, floriglucinol, Sacha inchi, reguladores del crecimiento, plantas *in vitro*

Abstract

ABSTRACT

Sacha inchi is an oily, perennial, climbing plant. Its oil is considered the best in the world for qualities of color, flavor, smell, and nutritional benefits for human health. One of the main limitations is the lack of continuity in the supply of the seed. Given this situation, *in vitro* propagation is one of the alternatives to start developing the agro-industrial potential of the species. The objective of this work was to achieve the *in vitro* establishment and multiplication of shoots in this species. Three different types of initial explant were evaluated for the establishment of *in vitro* shoots or plants (mature and immature seeds and nodal segments), as well as different concentrations and exposure times of the explants in sodium hypochloride. In addition to evaluating the effect of sucrose, coconut water and phloroglucinol in the culture medium during the establishment and multiplication phases *in vitro*. It was possible to achieve *in vitro* germination of immature seeds without coat of Sacha inchi in a culture medium with 100 mL L⁻¹ of coconut water. The combination of the growth regulators 6-BAP and ANA together with phloroglucinol at 30,0 mg L⁻¹ allowed the *in vitro* multiplication of the apical shoots obtained from immature seed plants, without basal callus formation.

Key words: *in vitro* propagation, phloroglucinol, sacha inchi, growth regulators, *in vitro* plants

Índice

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Sacha inchi. Generalidades del cultivo	4
2.1.1 Taxonomía	4
2.1.2 Morfología	5
2.1.3 Distribución geográfica	5
2.2. Características del cultivo	6
2.3 Siembra	6
2.3.1 Sistema de siembra	7
2.4 Podas	9
2.5 Ciclo fenológico	9
2.6 Cosecha y postcosecha	11
2.7 Usos y propiedades del cultivo de Sacha inchi	12
2.8 Propagación <i>in vitro</i>	13
2.9 Cultivo <i>in vitro</i> en Sacha inchi	14
2.9.1 Floroglucinol	17
2.10 Nanobiotecnología	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Efecto del tipo de explante y medio de cultivo en el establecimiento <i>in vitro</i> del Sacha inchi	20
3.1.1 Semillas maduras	21
3.1.2 Semillas inmaduras	22
3.1.3 Segmentos nodales	23
3.2 Multiplicación <i>in vitro</i> de Sacha inchi	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1 Efecto del tipo de explante y medio de cultivo en el establecimiento <i>in vitro</i> del Sacha inchi	31
4.1.1 Semillas maduras	31
4.1.2 Semillas inmaduras	32
4.1.3 Segmentos nodales	34
4.2 Multiplicación <i>in vitro</i> de Sacha inchi	38

5. CONCLUSIONES	41
6. RECOMENDACIONES	42
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

Índice de tablas

Tabla 1. Efecto de la sacarosa en el medio de cultivo sobre la germinación <i>in vitro</i> de semillas maduras de Sacha inchi (<i>P. volubilis</i> L.) a los 15 y 60 días de cultivo.	31
Tabla 2. Efecto del agua de coco en el medio de cultivo sobre la germinación <i>in vitro</i> de semillas inmaduras sin cubierta de Sacha inchi (<i>P. volubilis</i> L.) a los 15 y 60 días de cultivo.	32
Tabla 3. Efecto de las concentraciones de Hipoclorito de Sodio en la desinfección de segmentos nodales de Sacha inchi (<i>P. volubilis</i> L.) a los 15 días de cultivo.	35
Tabla 4. Efecto de la exposición de los segmentos nodales de Sacha inchi (<i>P. volubilis</i> L.) al Hipoclorito de Sodio a los 15 días de cultivo.	36
Tabla 5. Efecto de la exposición de los segmentos nodales de Sacha inchi (<i>P. volubilis</i> L.) a la mezcla de hipoclorito de sodio y NPs-Ag a los 15 días de cultivo.	37
Tabla 6. Efecto del floroglucinol en el medio de cultivo para la multiplicación <i>in vitro</i> de brotes apicales de plantas <i>in vitro</i> de Sacha inchi (<i>P. volubilis</i> L.) obtenidas de semillas inmaduras a los 30 días de cultivo.	38

Índice de figuras.

Figura 1. Material vegetal utilizado para la obtención de plantas <i>in vitro</i> de Sacha inchi (<i>P. volubilis</i> L.). (A) Frutos inmaduros. (B) Endospermo de semillas inmaduras <i>in vitro</i> sin la testa.	22
Figura 2. Plantas madres de Sacha inchi (<i>P. volubilis</i> L.) a los seis meses de edad, en el Banco de Donantes semicontrolado utilizadas para la toma de los segmentos nodales para el establecimiento <i>in vitro</i>.	25
Figura 3. Germinación <i>in vitro</i> de semillas inmaduras sin testa de Sacha inchi (<i>P. volubilis</i> L.) (A). Inicio de la emisión de la radícula a los 10 días de cultivo. (B) Crecimiento de las raíces y el hipocótilo a los 15 días de cultivo. (C) Planta completa <i>in vitro</i> obtenida a los 60 días de cultivo.	33
Figura 4. Multiplicación <i>in vitro</i> de los ápices obtenidos de la zona apical de plantas <i>in vitro</i> de semillas inmaduras de Sacha inchi (<i>P. volubilis</i> L.) a los 30 días de cultivo.	39

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Los aceites vegetales constituyen una alternativa para atender a las demandas energéticas, alimentarias y agroindustriales de países tropicales en desarrollo y países desarrollados. Según informes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en los últimos decenios, 20 de cada 100 kilocalorías consumidas por las poblaciones de estos países, provienen de cultivos oleaginosos (FAO, 2022). Estos cultivos están entre los más dinámicos, pero hasta el momento solo se han usado pocas especies como la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.), soya (*Glycine max* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.) y colza (*Brassica napus* L.) (MADR, 2009). El manejo de los aceites vegetales en la nutrición humana ha adquirido especial relevancia, y los alimentos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados tipo omega son un tema actual de investigación (Kodahl, 2020).

Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) es una planta oleaginosa, perenne y trepadora que crece en países como Perú, Bolivia, Venezuela, Colombia y Brasil. Es autóctona de la Amazonía peruana, conocida en el mundo como el “maní del inca”, por su enorme importancia durante el esplendor del imperio indoamericano. Entre los múltiples beneficios, este prodigio natural es una de las fuentes vegetales más grandes de ácidos grasos poliinsaturados Omega (3, 6 y 9), un ácido graso esencial para la vida del ser humano, además de proteínas (33%) y antioxidantes (50%). El aceite de Sacha inchi está considerado el mejor del mundo por cualidades de color, sabor, olor y beneficios nutricionales para la salud humana. Su consumo le da energía al cerebro, limpia el torrente sanguíneo, y lleva los nutrientes a las células (Follegatti-Romero *et al.*, 2009; Gutiérrez, 2011).

Los alimentos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados tipo omega, pueden desempeñar un papel importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades coronarias, hipertensión, diabetes tipo II, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedades renales, enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Además, otras enfermedades inflamatorias, autoinmunes y cáncer (Adkins y

Kelley, 2010; Hull, 2011). Estos aceites vegetales insaturados son el componente básico empleado para muchas formulaciones cosméticas por sus innumerables propiedades hidratantes y antioxidantes (Follegatti-Romero *et al.*, 2009).

Por otro lado, el análisis de calidad de los aceites para fines agroindustriales, concluye que los altos índices de yodo en correspondencia con el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, le confieren al aceite de *P. volubilis* propiedades secantes, condición de gran utilidad en la industria oleoquímica para la fabricación de barnices y revestimientos (Pascual, 2000; Kodahl, 2020).

Debido a las cualidades de los aceites de Sacha inchi, el fruto se ha ido consolidando en un mercado promisorio para la comercialización de productos elaborados, a partir de éstos aceites (Follegatti-Romero *et al.*, 2009). Sin embargo, la producción de materias primas es insuficiente, lo cual a la hora de exportar y de competir en los mercados, resulta un obstáculo (Dewick, 2001). Una de las principales limitaciones es la falta de continuidad en el abastecimiento de la semilla de *P. volubilis*, y ante esta situación la propagación *in vitro* es una de las mejores alternativas para empezar a desarrollar el potencial agroindustrial de la especie.

Actualmente la propagación de esta planta se hace solo por semilla, lo que implica alta variabilidad en el material vegetal y por lo tanto pueden perderse las características deseadas por los cultivadores. Además, de reducir la disponibilidad de material vegetal para la obtención de aceites. También, las semillas tienen una pobre viabilidad, un bajo porcentaje de germinación, baja resistencia a enfermedades y un enraizamiento lento de los brotes al germinar (Solis *et al.*, 2016; Kodahl, 2020).

Sin embargo, hasta la fecha las investigaciones en el cultivo *in vitro* son escasas a nivel internacional y en todas se informa como un problema la formación de un callo en la base del brote que impide la toma de nutrientes en la fase de multiplicación y la conexión de las raíces con el tallo durante el enraizamiento (Barrera, 2007; Solis, 2016, Solis *et al.*, 2018; Henao *et al.*, 2021). Por otra parte

no han sido informados hasta la fecha trabajos de propagación *in vitro* para *P. volubilis* en Cuba.

Tomando en consideración lo anteriormente expuesto se propone el siguiente

problema científico:

Es conocido que la propagación de esta planta se hace solo por semilla, lo que implica reducción de la disponibilidad de material vegetal para la obtención de aceites. Las semillas tienen pobre viabilidad, bajo porcentaje de germinación y lento enraizamiento de las posturas ¿Cómo lograr obtener brotes *in vitro* de *P. volubilis*, que permita contar con un material vegetal para realizar la propagación *in vitro* de este cultivo?

La presente investigación partió de la siguiente **hipótesis:**

Es posible al determinar el explante inicial, los componentes de los medios de cultivo alcanzar el establecimiento y la multiplicación de brotes *in vitro* vía organogénesis, en la especie Sacha inchi.

Para validar dicha hipótesis de trabajo se trazaron los siguientes objetivos:

Objetivo general

Lograr el establecimiento y la multiplicación de brotes *in vitro* en Sacha inchi (*P. volubilis*).

Objetivos específicos

- 1.-Determinar el tipo de explante inicial para el establecimiento de brotes *in vitro* de Sacha inchi.
- 2.-Establecer los requerimientos nutricionales de los medios de cultivo durante las fases de establecimiento y multiplicación de brotes *in vitro* de Sacha inchi.

Revisión Bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sacha inchi. Generalidades del cultivo

Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo) es una planta que pertenece a la familia de la Euphorbiaceae, originaria de la Amazonía, conocida como, sachá inchik, amui, sachá yuchi, sachá yuchiqui, sampannankii, suwaa, maní del monte, sachá maní, maní del inca, maní jibaro o inca peanuts (Álvarez y Ríos, 2007; Perúbiodiverso, 2009).

Características del género y la familia

Este género pertenece a la familia Euphorbiaceae, se caracteriza porque presenta plantas con una importancia económica ya que se obtienen productos tales como el caucho, la tapioca, ceras y aceites. Este género comprende 17 especies, 12 en América, 3 en África, una en Madagascar y una en Asia (Jiménez *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2002).

2.1.1 Taxonomía

Según el sistema de clasificación sugerido por Mc-Bride (1951) la taxonomía del Sacha inchi es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Angiospermae

Clase: Dicotyledonea

Orden: Geraniales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Plukenetia*

Especie: *volubilis*

Nombre científico: *Plukenetia volubilis* L.

2.1.2 Morfología

Es una planta trepadora, voluble, semileñosa con hábito de crecimiento indeterminado; en cuanto a sus hojas, son alternas de forma acorazonada de 10 a 12 cm de largo y de 8 a 10 cm de ancho, elípticos, aserrados y con pecíolos de 2 a 6 cm de largo. Las nervaduras nacen en la base de la nervadura central orientándose al ápice (Tasso *et al.*, 2013).

En cuanto al fruto, tiene forma de estrella, con número variable de lóbulos que pueden ir desde cuatro hasta ocho, predominando aquellos que tienen cuatro o cinco lóbulos. Estos frutos se dividen cuando maduran y se diferencia, endureciendo sus paredes. Dentro del fruto se hallan las semillas que son de color marrón oscuro, corrugadas y venadas, de forma lenticular y con 1,5 a 2,0 cm de diámetro (Gómez, 2004).

Es una planta hermafrodita, las flores presentan una polinización cruzada, lo cual implica que se trata de una especie alógama. El conocimiento del tipo de reproducción es de suma importancia para futuros trabajos de mejoramiento genético de la especie. En Sacha inchi se observan dos tipos de flores, las flores masculinas las cuales son pequeñas, blanquecinas, dispuestas en racimos y las femeninas que se encuentran en la base del racimo y ubicadas lateralmente de una a dos flores (Cachique *et al.*, 2014).

2.1.3 Distribución geográfica

La planta de Sacha inchi se ha encontrado desde América Central hasta Bolivia. En América del Sur se ha registrado en la Amazonía peruana, colombiana y boliviana. En el Perú están distribuidas principalmente en las zonas selváticas de los departamentos de San Martín, Ucayali y Loreto (Chirinos *et al.*, 2016). En Colombia se encuentra en estado silvestre en diversos lugares de la Orino-Amazonia y en el Pacífico y como cultivo establecido se ha informado en el departamento del Chocó, en el Putumayo, Caquetá y en el Amazonas; se han registrado cultivos de Sacha inchi en Fresno Tolima y Tibacu y Cundinamarca (Karisma, 2015).

2.2. Condiciones edafoclimáticas para el cultivo

Altitud: Sacha inchi se adapta desde los 100 a 2000 m.s.n.m; registrándose así mismo las mejores semillas (> 12mm) en plantaciones establecidas desde los 600 m.s.n.m. El rango óptimo para que obtenga buenos rendimientos es de los 100 m.s.n.m. hasta 1500 m.s.n.m. (Nima, 2007).

Temperatura: Presenta un buen crecimiento y desarrollo en diversas temperaturas, pero la temperatura óptima para su crecimiento, oscila con un mínimo 10°C y un máximo de 36°C. Si las temperaturas son superiores por una fracción de tiempo prolongado puede generar caída de flores y frutos pequeños, principalmente aquellos recién formados (Calram, 2007).

Luz: La luz es otro factor ecológico importante en esta especie; mientras más luz reciba la planta, mayor es la población de brotes, flores y frutos. Si la intensidad de luz es baja, la planta va a requerir mayor número de días para completar sus fases de crecimiento y desarrollo. Por lo tanto si la sombra se prolonga y la luz disminuye, la floración va a disminuir y por lo tanto la producción va a ser menor (Tasso *et al.*, 2013).

Suelos: Tiene amplia adaptación a diferentes tipos de suelo, pero se deben elegir los suelos que posibiliten su mejor desarrollo y productividad. Para que la planta no se vea afectada por el suelo, es ideal que este suelo tenga una textura franco-arcillosa a franco y con un pH que oscile en un rango de 5,5 a 7,5. La ventaja de esta planta en cuanto al pH de los suelos que tolera suelos ácidos y su crecimiento y desarrollo se ve reflejado en suelos de 5,5 a 6,5. Si los pH son muy alcalinos puede presentar susceptibilidad a este tipo de suelos. Además, el contenido de materia orgánica debe ser de medio a alto, la pedregosidad de media a baja y lo ideal es que en cuanto a fertilidad del suelo sea de media a alta (Andrade y Calderón, 2009).

2.3 Siembra

Distancia de siembra: para llevar a cabo la distancia de siembra se debe tener en cuenta la topografía y la fertilidad de los suelos. Dependiendo de estos dos factores, se implementan dos tipos de distanciamiento que son: 3,0 metros entre

plantas y 3,0 metros entre calles o también se puede implementar 3,0 metros entre plantas y 2,5 metros entre calles equivalente entre 1111 a 1333 plantas por hectáreas (Perúbiodiverso, 2009).

2.3.1 Sistema de siembra

Siembra directa: este sistema de siembra consiste en implementar semillas sin realizar tratamientos pre-germinativos, es decir sembrar directamente al suelo. Aquellas semillas que presenten mayor a 60 días de cosechado y se quiere implementar para siembra directa, se debe realizar una escarificación manual para así favorecer a la germinación de la semilla, además se deben sembrar 2 semillas por hoyo realizado y colocar la semilla a una profundidad de 3,0 cm (Perúbiodiverso, 2009).

Siembra indirecta: Consiste en realizar una pre-germinación de la semilla a través de almácigos y trasplantar a bolsas negras para así obtener material vegetal para llevar a campo. Una de las ventajas de este sistema es que se puede seleccionar la mejor calidad para así llevarlas a campo y así reducir la pérdida de plantas por condiciones adversas que no permitan su crecimiento (Perúbiodiverso, 2009).

Siembra en campo

Hoyado: para llevar a cabo el trasplante en el caso de siembra indirecta se recomienda según las condiciones que presente el suelo hoyos de hasta 40 centímetros de profundidad por 30 centímetros de ancho y 30 centímetros de largo 30 cm x 30 cm x 40 cm para garantizar un buen desarrollo radicular.

En el caso de siembra directa, se recomienda implementar hoyos con una dimensión de 20 centímetros de profundidad por 20 centímetros de ancho y 20 centímetros de largo en suelos sueltos. Pero en el caso que se presenten suelos compactados o arcillosos se recomienda realizar hoyos de las mismas dimensiones que en siembra por trasplante (Perúbiodiverso, 2009).

Sistema de tutoraje

Tutores vivos: si se implementa este sistema de siembra se reducen los costos de producción. Las especies que se recomiendan para implementar este sistema son

Eritrina (*Erythrina sandwicensis* L.) y el matarratón o Gliricidia (*Gliricidia sepium* L.) (Perúbiodiverso, 2009).

Los tutores vivos se recomiendan instalar dos meses antes de trasplantar para el caso siembra indirecta. Cuando presentan un sistema de siembra directo se debe realizar simultáneamente con la siembra de semillas.

El sistema de tutores vivos con espalderas se utiliza con un distanciamiento entre filas de 3,0 m y entre tutores de 3,0 a 2,5 m. Este sistema de espalderas se puede implementar alambre galvanizado de un calibre grueso para favorecer la estabilidad de la planta durante su crecimiento y desarrollo. Este sistema se puede combinar con tutores muertos rollizos, intercalando un tutor vivo y uno muerto en la línea del cultivo. Esto tutores vivos deben presentar 2 metros de largo y de 10 a 15 centímetros de diámetro, lo cual garantizará la estabilidad de la planta de Sacha inchi (Perúbiodiverso, 2009).

Tutores muertos: Se requieren postes de madera rolliza dura y alambre galvanizado. Se recomienda implementar postes de madera de 2,5 metros de largo por 15,0 centímetros de diámetro.

Deben ser instalados a una profundidad de 50 centímetros para asegurar que estén sólidos a un distanciamiento de 6 metros entre postes o se puede realizar un distanciamiento de 3 metros o 4 metros, esto va a depender de la resistencia del alambre.

Para dar un buen soporte a los postes, es necesario colocar templadores o pie amigos, que son postes que se instalan inclinados en ambos extremos sujetos al suelo. Como recomendación se debe templar dos filas de alambre: la primera, a 1,2 metros del suelo, y la segunda, a 2 metros. Se recomienda utilizar madera proveniente de fincas o bosques, extraída según los criterios de manejo forestal sostenible.

Este sistema de tutores al implementarlo al cultivo favorece a un manejo agronómico más adecuado debido a que permite que se distribuya la planta a través del alambrado, facilitando las podas, permitiendo la aeración, facilitando la distribución de la luz en toda la planta y facilitar las cosechas, viendo como

resultado final el incremento en la producción en comparación con los sistemas tradicionales sin tutoraje o con tutores vivos (Perúbiodiverso, 2009).

2.4 Podas

Las podas se realizan para llevar a cabo una buena distribución en el cultivo y así poder darle forma a la planta. Este proceso busca distribuir la luz, facilitar la aireación e incrementar la producción y facilitar la cosecha y el manejo del cultivo. Existen dos tipos de podas que se usa en este cultivo y son:

Podas de formación: este proceso de formación se lleva acabo a los 60 días cuanto se realiza en siembra directa y si se realiza en siembra indirecta realizar esta poda a los 30 días. El proceso de estas podas es de eliminar aquellas ramas que crezcan a una altura inferior entre 40 y 50 centímetros del suelo, además eliminar aquellas ramas delgadas y mal formadas. La idea de llevar este proceso de formación es de dejar dos ramas para así guiarlas sobre el tutoraje. La idea es de formar una “Y”, es decir que se deben dejar dos ramas para guiarlas sobre la espaldera o tutor vivo. Cuando se realiza por siembra directa esta poda se realiza a los 60 días de haber germinado. Es importante mencionar que se debe formar una horqueta con solo dos ramas que se guían sobre la espaldera o tutor vivo.

Podas de producción: esta poda se realiza después de haber realizado las dos primeras cosechas. El proceso consiste en eliminar aquellas ramas que se encuentran secas, enfermas e improductivas favoreciendo el rebrote de aquellas ramas sanas y con buena producción. Esta poda se realiza cada 30 a 60 días luego de cada cosecha. Hay que evitar que las ramas lleguen al suelo, por lo tanto entre el suelo y las ramas se debe dejar una altura mínima de 20 centímetros. Además evitar el crecimiento de ramas que se enlacen entre filas (Perúbiodiverso, 2009).

2.5 Ciclo fenológico

El tiempo que transcurre desde el momento de la siembra de las semillas hasta la obtención de frutos maduros es de 220 a 230 días según el Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIA, 2017). Este ciclo fenológico se divide en dos fases:

Fase vegetativa: durante esta fase los fenómenos que transcurren son la germinación y se extiende hasta la etapa de prefloración, incluyendo la formación de raíz, tallo y hojas; esta etapa dura aproximadamente de 90 días.

Una semana después de la germinación, aparece la segunda hoja verdadera y el tallo guía. Cuando se siembra en semillero una semana después de germinación es el momento más apropiado para el traslado a sitio definitivo.

Es una planta de rápido crecimiento, pero para que se desarrolle de manera rápida requiere de tutores para enredarse y extenderse. Si se encuentran estas condiciones se desarrolla una gran cantidad de ramas y hojas.

El Sacha inchi (*P. volubilis*) tiene crecimiento vegetativo, floración y fructificación continua durante todo el año, aunque en las épocas de máxima precipitación su productividad biológica es menor (Gómez, 2004).

Fase reproductiva: esta fase comprende desde el inicio de la formación de las estructuras florales, hasta el desarrollo y obtención de los frutos maduros. Esta fase tiene una duración aproximadamente de 120 días que se encuentra distribuida entre brote inicial de inflorescencia, diferenciación de flores masculinas y femeninas, formación de frutos y maduración de frutos. El periodo que va desde el inicio de formación de los racimos florales hasta la diferenciación completa de las flores masculinas y femeninas es de 20 a 25 días. Generalmente es abundante la oferta de las flores en la planta pero sin embargo, suele presentarse una pérdida bastante alta de flores femeninas, por lo que la fructificación está muy por debajo del potencial floral.

El desarrollo de los frutos es aproximadamente de 30 días al final de los cuales se inicia la fase de maduración. Ocasionalmente se presenta caída temprana de frutos pequeños. Este periodo de maduración de los frutos tiene una duración media de 25 a 30 días. El fruto maduro adquiere un color marrón, y se puede diferenciar perfectamente cada una de las capsulas en las que se localizan las semillas de manera individual. En resumen, a partir del séptimo mes se empieza a obtener frutos maduros (Gómez, 2004).

2.6 Cosecha y postcosecha

Cosecha: se realiza entre los 3 a 4 meses después de iniciado la fructificación, es decir a los 5 o 6 meses establecido la plantación en campo. Esta especie fructifica durante todo el año por lo tanto la cosecha debe realizarse de manera habitual. Se debe observar de manera constante el cultivo para así realizar la cosecha, aproximadamente se debe estar realizando cada 15 días, si no es así se puede presentar inconveniente ya que pueden suceder caídas de frutos al suelo generando como resultado pérdidas.

Durante cada jornada de cosecha para evitar estas pérdidas, es recomendable revisar la superficie del suelo bajo la planta y así recolectar algunos frutos maduros que hayan podido caer. Se recomienda cosechar aquellos frutos más próximos a alcanzar su madurez completa, pues si se dejan para la siguiente jornada, podrían perderse (Gómez, 2004; Paitan, 2006).

Una de las desventajas en cuanto al comportamiento de la cosecha de este cultivo, es que no hay una época definida de cosecha que permita programar esta labor de manera convencional. El momento ideal para realizar la cosecha es el momento soleado o que no haya niveles de precipitación para así cosechar la semilla con la menor humedad posible.

Postcosecha: durante esta etapa, se realizan cuatro actividades que son, el secado, el descascarado, almacenamiento y obtención de la almendra.

Los frutos se cosechan con un alto nivel de humedad, por lo tanto se requiere una actividad en la cual consiste principalmente en un periodo de secado, para evitar que las semillas se dañen por el exceso de humedad; además durante este proceso se facilita la extracción de la semilla. El almacenamiento de las semillas pueden realizarse dentro de la capsula durante un tiempo, que posteriormente se puede realizar el proceso de descascarada para la obtención de la semilla.

Hay dos actividades principalmente durante el periodo de pos cosecha que son la extracción de la semilla de la capsula y la extracción de la almendra. Estos dos procesos requieren del diseño y evaluación de prototipos mecánicos que vayan de acuerdo con los volúmenes de producción a manejar. Durante este proceso es

importante tener claro que la extracción se debe realizar solamente en los momentos antes de utilizarla o procesarla; este momento de extracción va a depender de la utilización de la almendra, si la almendra se usa para proteína, para aceite o para almendra entera (Perúbiodiverso, 2009).

2.7 Usos y propiedades del cultivo de Sacha inchi

Tiene muchos usos, como: reductor del colesterol, aceite de mesa, de cocina, en la industria para enriquecer con omega 3 los alimentos producidos industrialmente, en la producción de cosméticos, nutracéuticos y medicina (Wang *et al.*, 2018).

Los aceites omega 3 son muy escasos en la naturaleza y son indispensables para la vida y la salud, por lo que siempre deben estar presentes en la dieta. Sobre todos el omega 3 alfa linolénico, debido a que el organismo no puede sintetizarlo a partir de los alimentos que ingiere, se le denomina ácido graso esencial linolénico.

Es de suma importancia el consumo de aceite omega 3 en la salud y alimentación debido a que previene y mantiene la salud, controla y reduce el colesterol, fundamental en la formación del tejido ocular, esencial en la formación de la estructura de las membranas celulares, más de la mitad del cerebro contiene omega 3, favorecen el incremento y la agilización de las diferentes funciones cerebrales que se encuentran estrechamente ligadas a la memoria, la inteligencia y el razonamiento. Transporta los nutrientes en el torrente sanguíneo, favorece el mejor funcionamiento del sistema digestivo y fortifica los huesos y el sistema óseo en general, contribuye a mantener el equilibrio del metabolismo, potencia las funciones motoras del cuerpo y favorece los regímenes alimenticios para bajar de peso (Sihuayro, 2013).

Propiedades

Las características nutritivas de la semilla de Sacha inchi se caracteriza principalmente por su alto contenido de proteína ya que este nivel oscila entre 25 y 27%, siendo los aminoácidos esenciales más representativos la isoleucina (50 mg g⁻¹), leucina (79 mg g⁻¹), lisina (72 mg g⁻¹), tirosina (58 mg g⁻¹), treonina (57 mg g⁻¹), valina (62 mg g⁻¹), metionina más cisteína (57 mg g⁻¹) y finalanina mas tirosina (67 mg g⁻¹) (Gutiérrez *et al.*, 2011; Ramos, 2014). La calidad del aceite se debe a

su alto nivel ácidos grasos insaturados ya que puede llegar hasta el 93,6% entre los cuales el promedio de estos ácidos grasos se divide en alfa linoleico (omega 3) con un 48,60 %, el linoleico (omega 6) con un 36,80% y el oleico (omega 9), 8,28% (Watanabe y Tatsuno, 2017).

2.8 Propagación *in vitro*

Existen dos vías de regeneración o morfogénesis de plantas *in vitro*: la organogénesis y la embriogénesis somática.

Organogénesis

La tecnología de propagación *in vitro* se basa en la aplicación de las potencialidades de los tejidos meristemáticos para formar brotes, lo cual es conocido como organogénesis. Este proceso se caracteriza por el desarrollo unipolar del brote en condiciones apropiadas de luz, temperatura y balance de nutrientes (Pérez, 1998).

El banco de donantes es el área destinada a conservar la semilla de fundación en su más alto grado de pureza y durante todo su ciclo de desarrollo recibe atenciones culturales especiales. El objetivo de este es garantizar el material inicial del cual partirá la producción de semilla básica tradicional y para la propagación *in vitro* (Santana *et al.*, 2014).

La propagación vía organogénesis consta de cinco fases (Pérez, 1998) que a continuación se describen:

Fase 0: Preparativa. En esta fase se incluye la selección de la planta donadora y que tengas buenas condiciones sanitarias. Se aplican tratamientos con fungicidas y antibióticos para disminuir las concentraciones de patógenos y otros contaminantes. A partir de este momento, las tres fases siguientes se realizan en condiciones asépticas.

Fase I: Establecimiento o iniciación de los cultivos. El objetivo de esta fase es establecer cultivos de tejidos viables hasta regenerar brotes *in vitro* que se utilizarán en la fase siguiente. Esta fase constituye la etapa fundamental en la

propagación *in vitro*, pues de ella depende su eficiencia o el posible mantenimiento *in vitro* de las plantas, así como la eliminación de contaminaciones.

Fase II: Multiplicación. Es considerada la fase más importante del proceso donde se debe de garantizar la estabilidad genética de los brotes *in vitro* producidos.

Fase III: Enraizamiento. Su objetivo es la formación de las raíces de los brotes *in vitro* y prepararlos para pasar a condiciones de aclimatización *ex vitro*.

Fase IV: Aclimatización. Es la fase final del proceso y su meta es lograr plantas listas para su trasplante definitivo a campos comerciales de producción.

P. volubilis tiene un grado considerable de variación morfológica y alta diversidad genética entre diferentes poblaciones. Es una especie alógama que generalmente se propaga por semillas. Por tanto, su descendencia es heterogénea (Cachique *et al.*, 2018). Además, sus semillas tienen baja viabilidad de semilla, un menor tasa de germinación, menor resistencia a enfermedades y retraso enraizamiento de plántulas (Solís *et al.*, 2016). Propagación vegetativa permite mantener el 100 % de la identidad de los genotipos superiores, asegura la conservación del germoplasma y aumenta la ganancia genética en períodos cortos utilizando tanto aditivos como no aditivos componentes de la varianza genética (Solís *et al.*, 2019). El método de propagación asexual a través de esquejes ha limitado el establecimiento de plantaciones comerciales porque los genotipos con las características deseadas no se pueden propagar en masa.

Una estrategia para superar estas limitaciones es el cultivo *in vitro* de tejidos. La regeneración *in vitro* ofrece una importante oportunidad para la propagación masiva y la mejora genética de las plantas. Se puede realizar en espacios reducidos y lo hace posible mantener *in vitro* un grupo de plantas libres de enfermedades.

2.9 Cultivo *in vitro* en Sacha inchi

Fase 0 ó preparativa

La Fase 0 ó Preparativa, es la fase inicial del proceso. Esta fase es indispensable en el desarrollo de un esquema de propagación *in vitro* y en la posterior calidad de

las plantas obtenidas del proceso biotecnológico. La misma incluye la selección de plantas donantes y el establecimiento de un Banco de Donantes con reconocida integridad genética, fisiológica y sanitaria de los cultivares comerciales y los nuevos aprobados para su extensión e introducción en la producción (Thorpe, 2014).

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre varios meses hasta 2 años en un invernadero bajo condiciones semicontroladas. Esto permite que las mismas se desarrollen en condiciones sanitarias óptimas, con un control de la nutrición y riego adecuados que permita un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Noguera *et al.*, 2013).

Actualmente las técnicas del cultivo *in vitro*, permite obtener, en corto tiempo, gran número de individuos idénticos, por lo que resulta indispensable iniciar la propagación con plantas madre o donadoras de tejidos libres de microorganismos patógenos y altos rendimientos (Thorpe, 2014).

Se han desarrollado algunos estudios para la propagación *in vitro* de *P. volubilis*. Los tiempos de germinación de las semillas han sido más cortos en la germinación *in vitro* que en viveros. Sin embargo, algunos tiempos aún son largos (de la Rosa y Quijada, 2013; Cardoso *et al.*, 2018; Kodahl *et al.*, 2018). Algunos estudios utilizaron meristemas apicales obtenidos de plantas *in vitro*. Viegas-Rodrigues *et al.* (2014) lograron la formación de brotes pero, no informó la fase de enraizamiento y Solis *et al.* (2018) también pudieron obtener resultados en las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento pero, no llegó a la fase de aclimatización *ex vitro*.

Bordignon *et al.* (2012) y Restrepo-Osorio *et al.* (2020) utilizaron diferentes segmentos de hipocótilo y epicótilo de semillas germinadas *in vitro* para obtener plantas. También, Millones y Vásquez (2008) y Thuy y Nhung (2019) utilizaron segmentos de hipocótilo para la obtención de brotes y el enraizamiento de estos.

Dong *et al.* (2016) emplearon hojas del cotiledón para obtener la regeneración de brotes, pero carecían de raíces. Por su parte, Viegas-Rodrigues *et al.* (2014) realizaron evaluación en campo de plántulas regeneradas *in vitro*, lo que mostró un aumento de la productividad y ausencia de variabilidad genética en comparación a las plántulas propagadas por semillas.

Los resultados más altos de germinación de semillas botánicas se obtuvieron en medio de cultivo basal Murashige-Skoog (1962) completo, sin testa y temperatura de 28°C. Algunos estudios han planteado la hipótesis de que las concentraciones bajas de nutrientes facilitan la germinación de embriones cigóticos maduros (Hesami *et al.*, 2018). Sin embargo, esto no puede ser generalizado porque cada especie tiene características fisiológicas específicas. También, Cardoso *et al.* (2018) solo obtuvieron un 70 % de germinación de semillas en un medio de cultivo MS completo, pero no eliminaron las cubiertas de las semillas; la germinación tomó 20 - 25 días. Kodahl *et al.* (2018), quienes lograron 100 % de germinación cuando a la semilla le quitaron la testa y observaron la radícula emerger 7 días después del cultivo, mientras que Restrepo-Osorio *et al.* (2020) informaron 30 días.

P. volubilis crece en bosques tropicales secos, donde un aumento en temperatura puede desencadenar respuestas bioquímicas necesarias para germinación. Asimismo, según Azcón y Talón (2008), el tipo de tegumento puede ser responsable de controlar impermeabilidad y el movimiento o imbibición del agua. Además, la temperatura, la humedad del suelo y las condiciones de luz son los factores más importantes que determinan el final de latencia de semillas. La ausencia de una cubierta en la semilla en gran medida favorece la germinación, y la actividad metabólica es inmediatamente reactivada. Estas condiciones de cultivo (sales MS, sin testa, 28 °C), permitió obtener 91,6 % de germinación de las semillas (Henaó *et al.*, 2021).

Los resultados positivos obtenidos para el desarrollo de yemas axilares con el uso de la isopenteniladenina (2iP) 0,8 mg L⁻¹ y 6-furfurilaminopurina (Kinetina) 0,4 mg L⁻¹ mostraron que se deben agregar citoquininas a medios de cultivo para estimular el desarrollo de estas en *P. volubilis*. Se ha informado ampliamente que

la proliferación de yemas axilares en el cultivos *in vitro* se logró complementando los medios de cultivo con citoquinina para evitar la dominancia apical y estimular la brotación de yemas (Gupta *et al.*, 2020). Además, fue señalado que bajas concentraciones de citoquininas promueven la brotación y disminuyen la formación de callos. Esto puede atribuirse a interacciones entre los contenidos de reguladores del crecimiento exógenos y endógenos en el tejido vegetal de las plantas *in vitro* (Almeida *et al.*, 2012).

Varios investigadores informaron sobre el empleo de reguladores del crecimiento como la 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido indolbutírico (AIB) para brotes principales de los segmentos del tallo en *P. volubilis*. Al respecto, Bordignon *et al.* (2012) utilizaron segmentos de hipocótilo de explantes después de las nueve semanas de cultivo *in vitro* con 0,5 mg L⁻¹ 6-BAP o 1,0 mg L⁻¹ 6-BAP + 0,1 mg L⁻¹ de AIB, obtuvieron inducción de brotes. Además, Patthanajuck y Bunnag (2017) obtuvieron inducción de brotes con segmentos de hipocótilo usando 1,0 mg L⁻¹ de 6-BAP después de 4 semanas.

También, Thuy y Nhung (2019) regeneraron brotes *in vitro* con 1,0 mg L⁻¹ de 6-BAP + 0,1 mg L⁻¹ AIB después de 4 semanas utilizando segmentos nodales entre la primera y la segunda hoja, consideradas hojas maduras. Por otro lado, el desarrollo de las yemas axilares se obtuvo en el estudio sin ninguna concentración de 6-BAP, pero hubo formación de callos basal con este regulador del crecimiento en el medio de cultivo. También, la inducción de yemas a partir de segmentos nodales usando 2iP (0,8 mg L⁻¹) y Kinetina (0,4 mg L⁻¹) sin formación de callos fue informado por estos autores. En cambio, otros trabajos han utilizado el meristemo apical como explante para la formación de brotes *in vitro*. Al respecto Viegas-Rodrigues *et al.* (2014) utilizaron 1,0 mg L⁻¹ 6-BAP durante seis semanas de cultivo y Solis *et al.* (2018) 0,1 mg L⁻¹ 6-BAP y 0,05 mg L⁻¹ ácido naftalenacético (ANA) para la brotación de las yemas 15 días después de colocado el explante en el medio de cultivo.

2.9.1 Floroglucinol

En los últimos años se ha incrementado el empleo *in vitro* de otros reguladores del crecimiento menos conocidos y algunos de origen natural (Machakova *et al.*, 2008; Terrero, 2010; Suárez *et al.*, 2010). Varios de ellos mostraron su efecto positivo

sobre el crecimiento de callo, mayor efectividad en la formación de raíces adventicias y mejoras generales en la fase de enraizamiento de las plantas *in vitro* (Machakova *et al.*, 2008).

El Floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzeno o floroglucin), un producto de la degradación del floridcin, es un compuesto relativamente poco utilizado por sus propiedades como promotor del crecimiento vegetal (Teixeira da Silva *et al.*, 2013). Sin embargo, tiene diversas aplicaciones en las industrias médica y farmacéutica (Saddique *et al.*, 2010; Stein *et al.*, 2012).

Gur *et al.* (1988) demostraron la inducción de actividad morfogénica en manzana (*Malus domestica* Borkh) debido a la acción de los productos resultantes de la oxidación de compuestos como el Floroglucinol y el floridcin. A su vez, ellos detectaron que ambos inhibían la hiperhídricidad porque aparentemente funcionaron como precursores en la síntesis de lignina.

En las plantas *in vitro*, el Floroglucinol incrementó la formación de raíces (Bopana y Saxena, 2009; Agud *et al.*, 2010; Teixeira da Silva *et al.*, 2013) y estimuló la embriogénesis somática (Reis *et al.*, 2008; George *et al.*, 2010). También, se destaca en la recuperación de protocormos de *Dendrobium* criopreservados (Galdiano *et al.*, 2012).

La búsqueda de alternativas adecuadas a los protocolos actuales es uno de los principales impulsores de la investigación en cultivo de tejidos. Una forma de mejorar diferentes aspectos de la organogénesis sería incluir una nueva sustancia promotora del crecimiento, como por ejemplo el Floroglucinol para mejorar los niveles de establecimiento, multiplicación y eliminar la formación del callo en la base de los brotes *in vitro*.

2.10 Nanobiotecnología

Los avances en nanotecnología que se han integrado en la biología han llevado al surgimiento de una nueva y apasionante disciplina llamada nanobiotecnología, indicaron Razzaq *et al.* (2015). Las nanopartículas (NP: 1-100 nm de diámetro) son pequeñas formas de material de origen natural o manufacturado cuyas propiedades difieren notablemente de las de las respectivas formas a granel del "mismo" material. Ciertas NP tienen usos diagnósticos y terapéuticos; algunas NP

muestran una toxicidad de dosis baja, mientras que otras muestran capacidad para estimular respuestas adaptativas de dosis bajas según Wang *et al.* (2016).

La contaminación del tejido vegetal y del medio de cultivo es causada por microorganismos, en su mayoría hongos y bacterias, que crecen rápidamente en medios nutritivos. Los contaminantes microbianos en la base de la explantes y alrededor de ellos son un gran problema. Alternativamente, se ha sugerido una incorporación de antibióticos y antimicóticos en los medios de cultivo para eliminar contaminantes microbianos (Habiba *et al.*, 2002). Sin embargo, el uso prolongado de estos agentes puede provocar resistencia en los microorganismos. Actualmente, las nanopartículas de plata (NPs-Ag) han demostrado ser efectivas en la inhibición de agentes contaminantes (hongos, bacterias y virus) sin generar resistencia indicó Parzymies (2021).

Las NPsAg en el cultivo de tejidos vegetales son empleadas de la siguiente forma: desinfección de explantes, esterilización de medios de cultivo, inhibir efectos de etileno en algunas especies y eliminación de virus *in vitro*. Sin embargo, la información disponible sobre el tema es demasiado escasa para alcanzar algún consenso sobre la nanotoxicidad y su mecanismo. Los resultados demostraron que las NPsAg presentan efecto microbicida en brotes *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en fase de multiplicación Bello-Bello *et al.* (2017); stevia (*Stevia rebaudiana*), vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) Spinoso-Castillo *et al.* (2017) y *Psidium friedrichsthalianum* Andújar *et al.* (2020). Además, se emplearon en la esterilización del medio de cultivo, para inhibir efectos de etileno y recientemente. La utilización de estas tiene las siguientes ventajas: reducción de los gastos de operación, disminución de pérdidas por contaminación y saneamiento de las plantas *in vitro*.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en las áreas del Complejo Científico Productivo de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Villa Clara (UEB INICA Villa Clara). La misma está ubicada en el Municipio de Ranchuelo, provincia Villa Clara. Los experimentos se desarrollaron en el período comprendido entre enero 2022 hasta junio de 2023.

Procedimientos generales

Esterilización del medio y frascos de cultivo e instrumental

Los medios, tubos y frascos de cultivos utilizados fueron esterilizados en autoclave vertical a 121°C y 1,2 kg cm⁻² de presión. Los platos metálicos para el trabajo en la cabina de flujo laminar, fueron esterilizados en la estufa a 180°C durante 2 h. El instrumental (pinzas y bisturíes), se desinfectó en un esterilizador eléctrico modelo DENT-EQ (Alemania) que permaneció dentro de la cámara de flujo laminar horizontal, donde se realizó el manejo del material vegetal en condiciones de esterilidad.

Condiciones de cultivo *in vitro*

De manera general los tubos y frascos de cultivo con los explantes, de todos los experimentos se colocarán en cámara de crecimiento climatizada a una temperatura de 25±2 °C con luz solar, con un fotoperiodo de 12,5/11,5 h de luz/oscuridad con un rango de densidad de Flujo de Fotones Fotosintéticos (DFFF) entre 47,1 a 64,6 μmol m⁻² s⁻¹; medido con un luxómetro PCE-174 Instruments (España). En determinados epígrafes se especifican otras condiciones de cultivo que fueron empleadas.

3.1 Efecto del tipo de explante y medio de cultivo en el establecimiento *in vitro* del Sacha inchi

El objetivos de estos experimentos fue evaluar diferentes tipos de explantes y medios de cultivo para lograr obtener brotes o plantas *in vitro* de *P. volubilis*.

Material vegetal

Se emplearon frutos maduros e inmaduros de Sacha inchi que fueron donados por el Centro de Investigaciones en Plantas Proteicas y Bioproductos (CIPB) “Sierra Maestra”, perteneciente al Consejo de Ministro. Los mismos tuvieron entre 4-6 semillas por frutos.

3.1.1 Semillas maduras

Extracción y desinfección

Las semillas fueron extraídas de los frutos con ayuda de una tijera de podar y posteriormente se procedió a la desinfección de las mismas. En el laboratorio se realizaron los diferentes pasos del procedimiento de desinfección. Lavado con jabón líquido (detergente doméstico) adicionando de 3-5 mL por cada 250 mL de agua durante 15 min, con la ayuda de un cepillo plástico y enjuagues posteriores con agua para eliminar el mismo.

A continuación y en el laboratorio se realizó una primera desinfección en recipientes previamente esterilizados con etanol al 70% durante un minuto. En la cabina de flujo laminar con el auxilio de una pinza estéril se eliminó el etanol y se colocaron las semillas en una frasco con solución de hipoclorito de sodio al 3,0% (v/v) durante 30 min según Restrepo-Osorio *et al.* (2020). Después, tres enjuagues con agua desmineralizada estéril. Las semillas maduras fueron colocadas en un frasco de cultivo estéril con una solución de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico.

Medios de cultivo

El medio de cultivo basal estuvo compuesto por las sales Murashige-Skoog (1962) (MS) al 50% de su concentración y como gelificante agarE (BIOCEN, Cuba) a 5 g L⁻¹. Los tratamientos fueron un medio de cultivo sin sacarosa y otro con 20 g L⁻¹ del reactivo. El pH se ajustó a 5,4 con NaOH (1,0 N) y HCl (1,0 N) previo a la esterilización.

Se emplearon 25 tubos de cultivo de vidrio de un tamaño de 16 x 2 cm, con 10 mL de medio de cultivo por tratamiento. Los mismos con las semillas desinfectadas fueron colocados en cámara de cultivo en condiciones de oscuridad total y una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta que salió la radícula. Posteriormente fueron cultivadas en condiciones de luz, según lo descrito en procedimientos generales.

3.1.2 Semillas inmaduras

Una vez extraídas las semillas de los frutos inmaduros (verdes) (figura 1A), los pasos siguientes para la desinfección fueron los mismos que en el epígrafe 3.1.1. En la cabina de flujo laminar con el auxilio de una pinza estéril se eliminó la testa que cubre la semilla para extraer el endospermo con el embrión cigótico, los que fueron colocados en tubos de cultivo iguales a los anteriormente señalados (Figura 1B).



Figura 1. Material vegetal utilizado para la obtención de plantas *in vitro* de Sacha inchi (*P. volubilis* L.). (A) Frutos inmaduros. (B) Endospermo de semillas inmaduras *in vitro* sin la testa.

Medios de cultivo

El medio de cultivo basal estuvo compuesto por las sales Murashige-Skoog (1962) (MS), vitaminas Heinz y Mee (1969) al 100% de sus concentraciones, carbón

activado 2 g L⁻¹ y como gelificante agarE (BIOCEN, Cuba) a 5 g L⁻¹. Los tratamientos fueron un medio de cultivo con agua de coco 100 mL L⁻¹ y otro sin este endospermo líquido. El pH se ajustó a 5,4 con NaOH (1,0 N) y HCl (1,0 N) previo a la esterilización.

Se emplearon 25 tubos de cultivo de vidrio de un tamaño de 16 x 2 cm, con 10 mL de medio de cultivo por tratamiento. Estos con las semillas inmaduras desinfectadas fueron colocados en cámara de cultivo en condiciones de oscuridad total y una temperatura de 22±2,0 °C hasta que salió la radícula. Posteriormente fueron cultivadas en condiciones de luz, según lo descrito en procedimientos generales.

Evaluaciones

En ambos experimentos se evaluaron las siguientes variables:

A los 15 días de cultivo: número de semillas contaminadas con bacterias y hongos, así como oxidación fenólica o amarronamiento.

A los 60 días de cultivo: el número de semillas vivas, número de semillas muertas y número de semillas que germinaron (%).

3.1.3 Segmentos nodales

3.1.3.1 Plantas madres en condiciones semicontroladas de cultivo.

Las semillas maduras fueron sembradas en tubetes de plásticos de color negro (tamaño de 15,0 cm x 4,0 cm) con una mezcla de compost de cachaza y zeolita (3:1) para la obtención de las posturas. El riego fue por aspersión durante 3 veces al día con una duración de 10 min. Una vez germinadas las semillas y crecidas las plantas, a los 85-90 días de cultivo con una altura entre 25-30 cm, estas fueron llevadas al Banco de donante semicontrolado para su crecimiento y desarrollo con el objetivo de obtener plantas madres.

Banco de Donantes semicontrolado

El mismo está ubicado en las áreas de la propia UEB INICA Villa Clara. El mismo estuvo constituido por una estructura metálica de hierro galvanizado, cubierta con

material plástico (filme de polietileno) transparente (Rafia). La altura de la estructura 4,00 m en la parte alta y 2,20 m la baja. Por encima del mismo se encuentra una malla semisombra de 50% (Sarán) para reducir la intensidad lumínica y evitar quemaduras en las hojas por temperaturas muy altas dentro del banco de donante. Además, fueron cubiertos sus lados con una malla plástica antiáfidos. Todo el piso fue cubierto con zeolita.

Se utilizaron para plantación de las posturas (8 en total) tanques de plástico con una capa de grava en el fondo y rellenos con una mezcla de compost de cachaza y zeolita 3:1 (v/v) para un volumen de 20 m³. Además de protección fitosanitaria con badén para los pies y un lavamanos con formol o hipoclorito de sodio al 0,1%. El riego fue por microaspersores, con una frecuencia de dos veces por día, sobre todo en el horario del medio día y la tarde cuando las temperaturas son más altas.

Como el Sacha inchi es una planta de crecimiento indeterminado se le colocó a cada planta un tutor de caña energética (cultivar C90-176) previamente cortado, secado al sol durante 15 días y eliminadas las yemas axilares. Al alcanzar las plantas una altura mayor de 1,50 m, se procedió a colocar dos alambres de forma transversal a las mismas para orientar su crecimiento. Previamente se la había realizado una poda de la yema apical, lo cual provocó la brotación y crecimiento de las yemas laterales. Esto permitió que a las nuevas ramas con los brotes le fueran también orientados su crecimiento en los alambres colocados para tal fin (Figura 2).

A las plantas madres de Sacha inchi se les realizaron pretratamientos con diferentes productos. Estos fueron FitoMas-E[®], (ICIDCA, Cuba) 1,0 mL L⁻¹, fertilizante foliar Bayfolan forte[®], (Bayer Crop Science, Alemania) 2,0 mL L⁻¹ y fungicida sistémico Regnum[®] 0,65 mL L⁻¹ (BASF, Alemania) por mochila respectivamente. Una vez por semana, durante los primeros tres meses le fueron aplicados, con mochila de aspersión (Matabi, España) de 16 L de capacidad, con boquilla de inundación (*flood-jet*) Lurmark AN 2,5 con una presión de 1,5 a 2,0 bar, según los parámetros técnicos de la misma. A partir de los 4 meses se le realizaron aplicaciones foliares de urea (10 g L⁻¹) cada 15 días. Todo esto para

poder contar con un material vegetal con una mayor calidad sanitaria y fisiológica, para lograr una mejor respuesta en la fase de establecimiento *in vitro*.



Figura 2. Plantas madres de Sacha inchi (*P. volubilis* L.) a los seis meses de edad, en el Banco de Donantes semicontrolado utilizadas para la toma de los segmentos nodales para el establecimiento *in vitro*.

Condiciones de limpieza y prevención de enfermedades

Todas las herramientas y material de trabajo (tijeras de podar, cuchillos, rastrillo manual, regaderas, mochila de fumigación) fueron utilizados solo para esta área de trabajo para evitar contaminación con microorganismos patógenos. En el momento de la toma de los tallos para el establecimiento *in vitro* posterior en el laboratorio se empleó una tijera de podar previamente desinfectada y antes de usarlo en la próxima planta se volvió a desinfectar con etanol al 70%. Semanalmente las hojas secas y restos de ellas fueron eliminados para garantizar una mayor sanidad.

Condiciones de cultivo del Banco de donantes semicontrolado

Densidad de Flujo de Fotones Fotosintéticos (DFFF), en un rango de 209,4 a 1036 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, medido con el auxilio de un luxómetro digital (modelo Multimatrix LM 76, E.U.A). Los valores de Humedad Relativa (HR) fueron una mínima de 49,5% y

una máxima de 81,9%. La temperatura presentó valores de una mínima de 27,1°C y una máxima de 39°C, utilizando un termohigrómetro (modelo Ebro Electronic® TFH 620, EUA).

Selección de los explantes de partida

De las plantas madres fueron seleccionadas ramas jóvenes en pleno crecimiento con cuatro a seis meses de edad en Banco de Donantes. La toma de los explantes (segmentos nodales) fue realizada en horas tempranas de la mañana. Para el corte se tuvo en cuenta que los segmentos nodales utilizados fueran los comprendidos entre el primer y quinto par de hojas a partir de la yema apical, con un grosor no superior a 0,2 cm. Se les eliminaron las hojas y se dejó solo un pequeño fragmento del peciolo de 3-5 mm. Todo esto empleando una tijera de podar. Para el traslado al laboratorio los explantes una vez cortados fueron colocados en frascos de cultivo cerrados con agua destilada.

En el laboratorio se realizaron los diferentes pasos del procedimiento de desinfección. Lavado con agua bajo la llave durante una hora. Lavado con detergente doméstico líquido adicionando de 3-5 ml por cada 250 ml de agua. Se realizó el lavado durante 30 minutos en agitación, empleando un agitador magnético y enjuague posteriormente con agua para eliminar el detergente.

Posteriormente los segmentos nodales fueron individualizados con ayuda de una tijera de podar o bisturí. Después se realizó una primera desinfección de los segmentos nodales individuales en recipientes previamente esterilizados y con etanol al 70% durante 30 segundos con agitación manual. A continuación se eliminó el etanol dentro de la cabina de flujo laminar con el auxilio de una pinza estéril.

Experimento I

Para la etapa final del proceso de desinfección los segmentos nodales fueron colocados en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO). Se evaluaron ocho tratamientos 1,0; 1,5, 2,0 y 2,5% (v/v) de NaClO, durante dos tiempos de exposición al desinfectante de 15 y 20 min en agitación, según INIA (2017).

Después de la desinfección con hipoclorito de sodio, fueron realizados tres enjuagues en la cabina de flujo laminar, con agua destilada estéril. Los segmentos nodales después de desinfectados fueron colocados en una solución estéril de ácido ascórbico a una concentración de 100 mg L^{-1} , la cual fue autoclaveada con anterioridad.

Una vez realizada la desinfección de los segmentos nodales se siguieron los siguientes pasos para el establecimiento de los explantes, en la cabina de flujo laminar. Se redujo el tamaño del explante a 2,0-2,5 cm aproximadamente. Para este procedimiento, se eliminaron ambos extremos del segmento porque en esa zona hay un mayor daño del desinfectante. A continuación se introdujeron los segmentos nodales en los tubos de cultivo de vidrio de un tamaño de 16 x 2 cm, con 2 mL de una solución de 10 g L^{-1} de sacarosa con agua desmineralizadas para evaluar la contaminación microbiana. Los tubos fueron tapados con láminas de aluminio de $0,2 \text{ }\mu\text{M}$.

Experimento II

A partir de los resultados del primer experimento se realizó el presente experimento. Se evaluó el efecto de un mayor tiempo de exposición al NaClO. Se establecieron dos tratamientos, mayor tiempo de exposición de los segmentos nodales al NaClO (30 minutos) y un segundo tratamiento con una doble desinfección con hipoclorito de sodio (primero durante 20 minutos y después del etanol al 70% otra con igual concentración durante 30 minutos).

Experimento III

Tomando como base los resultados del experimento anterior se diseñó este. El mismo tuvo como objetivo de evaluar el efecto de las nanopartículas de plata en la etapa final del proceso de desinfección de los segmentos nodales.

Nanopartículas de Plata (NPs-Ag).

Fueron sintetizadas en el Centro de Estudios Avanzados (CEA) del Ministerio de Ciencia y Tecnología, La Habana, Cuba. Las nanopartículas eran de forma

esférica, disueltas en agua destilada, con un diámetro hidrodinámico promedio de 63,54 nm y con un potencial zeta (mV) -39,1.

Los pasos de la desinfección fueron los mismos de los experimentos anteriores hasta etanol al 70%. A partir de este paso se estudiaron dos tratamientos:

1.-Concentración de NaClO del experimento II + la adición de NPs-Ag (300 mg L⁻¹) al medio de cultivo.

2.- Doble desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO) primero durante 20 min y después del etanol al 70% otra con igual concentración durante 30 min (Control).

Todos los tubos de cultivo de vidrio con los segmentos nodales de los tres experimentos fueron colocados bajo condiciones de oscuridad total a una temperatura de 24 ± 2,0°C durante una semana. Posteriormente se colocaron en cámara de crecimiento en las condiciones de cultivos señaladas en procedimientos generales. Se utilizaron 25 tubos de cultivo como repeticiones por tratamiento con un segmento nodal en cada uno.

Las evaluaciones se realizaron a los 15 días de cultivo para las variables número de segmentos nodales contaminados y con oxidación fenólica o amarronamiento y a los 45 días de cultivo para las siguientes variables: número de segmentos nodales vivos, muertos y brotados. Los datos fueron convertidos a porcentaje.

3.2 Multiplicación *in vitro* de Sacha inchi

Las plantas *in vitro* obtenidas del mejor explante les fueron cortadas las raíces y la zona apical fue colocada en el medios de cultivo de multiplicación para el Sacha inchi según INIA (2017). Se conformaron dos tratamientos, con y sin la presencia del floroglucinol. Los medios de cultivos estudiados fueron los siguientes:

Medio de cultivo

a) Medio de cultivo basal compuesto por las sales (MS) al 100%, vitaminas Heinz y Mee (1969), 20 g L⁻¹ de sacarosa, 100 mL L⁻¹ de agua de coco, 1,0 mg L⁻¹ 6-bencilamino purina (6-BP), 0,5 mg L⁻¹ de ácido naftalen acético (ANA), 2 g L⁻¹ de carbón activado y gelificado con 6 g L⁻¹ de agarE (BIOCEN, Cuba), modificado

según INIA (2017). El pH se ajustó a 5,4 con NaOH (1,0 N) y HCl (1,0 N) previo a la esterilización.

b) Medio de cultivo basal compuesto por las sales (MS) al 100%, vitaminas Heinz y Mee (1969), 20 g L⁻¹ de sacarosa, 100 mL L⁻¹ de agua de coco, 0,5 mg L⁻¹ 6-bencilamino purina (6-BP), 0,1 mg L⁻¹ de ácido naftalen acético (ANA), 2 g L⁻¹ de carbón activado, 30 mg L⁻¹ de floroglucinol y gelificado con 6 g L⁻¹ de agarE (BIOCEN, Cuba. El pH se ajustó a 5,4 con NaOH (1,0 N) y HCl (1,0 N) previo a la esterilización.

Los explantes fueron colocados en frascos de cultivo de vidrio de 250 mL de volumen total con 30 mL de ambos medios de cultivo. Se colocaron 3 explantes por frasco, para un total de 30 por tratamientos. Los frascos fueron tapados con papel de aluminio doble.

En todos los tratamientos se evaluarán las siguientes variables:

A los 30 días de cultivo se evaluaron las siguientes variables:

- ✓ altura (cm),
- ✓ coeficiente de multiplicación (número de segmentos nodales por brote)
- ✓ numero de hojas
- ✓ formación de callo basal (%)

Análisis estadístico

El diseño experimental para todos los experimentos fue completamente aleatorizado. En el análisis de la normalidad de las variables se utilizó la prueba de *Shapiro Wilk* y la homogeneidad de varianza por Levene. Se utilizó el Paquete Estadístico SPSS versión 23,0 del 2015 para *Windows* (IBM, 2013) y STATISTICA versión 12.0 para la variable expresada en porcentaje, la diferencia entre los valores se determinó mediante la prueba de comparación de proporciones para dos muestras. Para la comparación entre las medias se aplicó un Análisis de varianza (ANOVA simple) y la diferencia entre las medias se determinó por la

prueba de Tukey. En todos los casos las diferencias significativas fueron establecidas para $p < 0,05$. Todos los experimentos fueron repetidos dos veces.

Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto del tipo de explante y medios de cultivo en el establecimiento *in vitro* del Sacha inchi

4.1.1 Semillas maduras

Los resultados alcanzados con el protocolo de desinfección para las semillas maduras fueron positivos. Se obtuvieron muy bajos porcentajes de contaminación por microorganismos, solo bacterias y con porcentajes bajos (15,6 a 12,8%). Sin embargo, el porcentaje de germinación fue nulo en el medio de cultivo sin sacarosa y muy bajo con la presencia de este carbohidrato. Solo en esta concentración a los 60 días de cultivo se logró la germinación de dos semillas, un 8,0% del total (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la sacarosa en el medio de cultivo sobre la germinación *in vitro* de semillas maduras de Sacha inchi (*P. volubilis* L.) a los 15 y 60 días de cultivo.

Sacarosa (g L ⁻¹)	Solución NaClO (v/v) (%)	Tiempo (min.)	Oxidación (%)	Contaminación (%)			Muertas (%)	Vivas (%)	Germina ción (%)
				Bacterias	Hongos	Total			
0,0	3,0	30	0	15,6 a	0	15,6 a	0,0	100 a	0,0 b
20,0	3,0	30	0	12,8 a	0	12,8 a	0,0	100 a	8,0 a

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para $p < 0,05$ según la Prueba de proporciones ($n=50$)

Estos resultados pudieron ser debido a que las semillas fueron colocadas *in vitro* completas, sin la eliminación de la testa, lo que hizo que el proceso de dormancia y germinación por la acción de factores externos (agua, humedad, oscuridad) no tuvieron un efecto en estos para las semillas de Sacha inchi. Al respecto, Obdulio (2007), Restrepo-Osorio *et al.* (2020) y Henao *et al.* (2021) señalaron la necesidad de eliminar la testa de las semillas en esta especie para garantizar adecuados porcentajes de germinación. Todos estos autores utilizaron en el protocolo de desinfección la combinación de etanol al 70% e hipoclorito de sodio entre 2,0 y 3,0%

con tiempos de 20 a 30 min. Los resultados alcanzados en el presenta trabajo apoyan lo informados por estos autores.

4.1.2 Semillas inmaduras

Al emplear semillas inmaduras a las cuales se les eliminó la cubierta (testa) se obtuvieron resultados superiores que al utilizar semillas maduras completas. Se alcanzó un 66,8 % de germinación a los 60 días de cultivo y un 88,0 % de semillas vivas cuando en el medio de cultivo se le adicionó el agua de coco (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del agua de coco en el medio de cultivo sobre la germinación *in vitro* de semillas inmaduras sin cubierta de Sacha inchi (*P. volubilis* L.) a los 15 y 60 días de cultivo.

Agua de coco (mL L ⁻¹)	Solución NaClO (v/v) (%)	Tiempo (min.)	Oxidación (%)	Contaminación (%)			Muertas (%)	Vivas (%)	Germinación (%)
				Bacterias	Hongos	Total			
0	3,0	30	0	19,6	0	19,6 a	8,0	92,0 a	18,4 b
100	3,0	30	0	16,5	0	16,6 a	12,0	88,0 a	66,8 a

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para $p < 0,05$ según la Prueba de proporciones ($n=50$)

La combinación de la eliminación de la testa a las semillas inmaduras y la presencia del agua de coco en el medio de cultivo permitió alcanzar altos porcentajes de germinación en las semillas de Sacha inchi (Figura 3). El empleo del agua de coco en los medios de cultivo constituye uno de los compuestos naturales que se le adicionan al mismo en la regeneración de plantas tanto vía organogénesis como embriogénesis somática (Gómez, 1998).

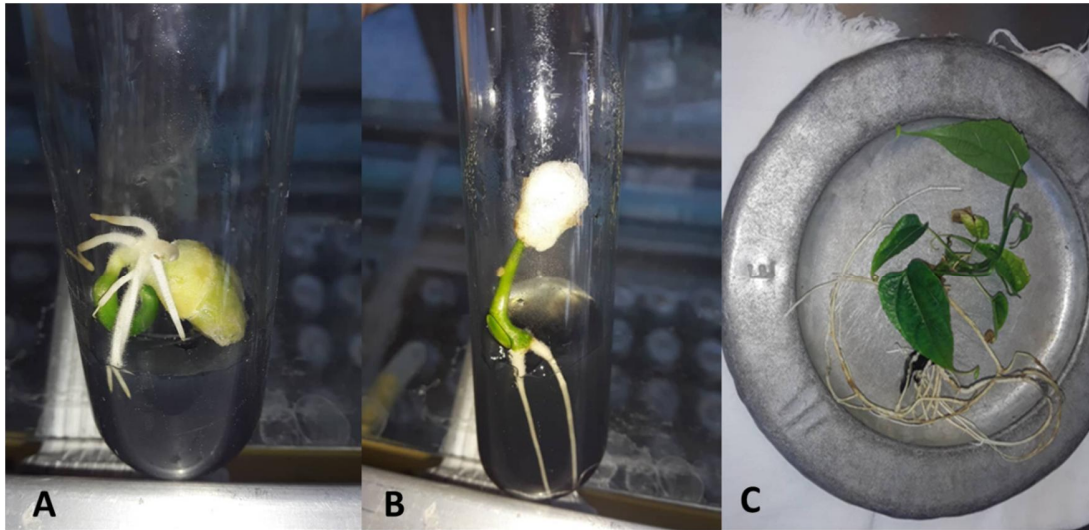


Figura 3. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras sin testa de Sacha inchi (*P. volubilis* L.) (A). Inicio de la emisión de la radícula a los 10 días de cultivo. (B) Crecimiento de las raíces y el hipocótilo a los 15 días de cultivo. (C) Planta completa *in vitro* obtenida a los 60 días de cultivo

El agua de coco contiene diversidad de hormonas con acción citoquinina, por ejemplo, del tipo isoprenoide, las cuales están implicadas en el proceso de división celular, y aromáticas, implicadas en procesos posgerminativos (Del Pozo *et al.*, 2005). El efecto de las citoquininas contenidas en el agua de coco, especialmente las de tipo isoprenoide, podría tener una implicación en la regulación del ciclo celular, por su efecto sobre la síntesis de DNA y a través de su efecto sobre la elongación de la célula, procesos claves durante la germinación. Igualmente, estas hormonas han sido implicadas en procesos de diferenciación, condición inherente al desarrollo de una plántula a partir del embrión, lo que apoya aún más, su efecto promotor en la germinación.

La adición de agua de coco podría bastar para suplir a la semilla con niveles y tipos adecuados de estas hormonas, que permitan romper la latencia observada en semillas bajo condiciones naturales. Al respecto, INIA (2017) propone en el protocolo para la germinación de embriones cigóticos de semillas inmaduras la adición de 100 mL de agua de coco en el medio de cultivo. Los resultados de la presente investigación apoyan lo informado.

También, Ovalles *et al.* (2002) señalaron que el agua de coco (*Cocos nucifera* L) es rica en nutrientes y su composición específica depende de la madurez del fruto, a menor madurez mayor concentración de nutrientes (Munro-Olmos *et al.*, 2005). El agua de coco contiene citoquinina, como se ha informado anteriormente, que entre otras funciones promueve la ruptura de la dormancia y la germinación de semillas al estimular la elongación de las células de los cotiledones en respuesta a la luz (Taiz y Zeiger, 1998, Del Pozo *et al.*, 2005). Otros autores, como Bertolini *et al.* (2013) informaron el uso del agua de coco para la germinación *in vitro* de semillas de la especie *Rhynchosstele bictoniensis* (Bateman). También, en esta especie Soto y Salazar (2013), alcanzaron porcentajes de germinación superiores al 70%.

Por otra parte, Quinto *et al.* (2009) en las especies forestales caoba (*Swietenia macrophylla* King), cedro (*Cedrela odorata* L.) y roble (*Tabebuia rosea* (Bertol) DC) y Patiño *et al.* (2011) en la especie hierba de la equis (*Dracontium grayumianum*) plantearon el uso de agua de coco como agente promotor de la germinación de semillas en condiciones *ex vitro* con alto nivel de latencia una alternativa adicional, altamente eficaz y de bajo costo, para ser utilizado en estrategias de propagación vegetal de especies con semillas de latencia profunda. Las semillas no sometidas a los tratamientos inductores fueron incapaces de germinar, pero la inmersión en agua de coco tuvo efectos notables, produciendo un porcentaje de germinación superior al 50%.

4.1.3 Segmentos nodales

Experimento I

Los resultados alcanzados en el primer experimento con segmentos nodales con el protocolo de desinfección empleado y distintas concentraciones de hipoclorito fueron nulos. En los tratamientos con las concentraciones más bajas de NaClO se observó la presencia de contaminación por hongos. Sin embargo, a partir de 1,5% y 20 min y en el resto de los tratamientos evaluados hubo solo contaminación por bacterias, lo cual demuestra la efectividad del pretratamiento a las plantas madres con el fungicida

sistémico (Regnum®), dos semanas previas a la toma de los segmentos nodales. No obstante, es necesario señalar que los valores de contaminación por estos microorganismos fueron altos para un protocolo de desinfección (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de las concentraciones de Hipoclorito de Sodio en la desinfección de segmentos nodales de Sacha inchi (*P. volubilis* L.) a los 15 días de cultivo.

Solución NaClO (v/v) (%)	Tiempo (min.)	Oxidación (%)	Contaminación (%)			Muertos (%)	Vivos (%)
			Bacterias	Hongos	Total		
1,0	15	0	95,8	5,2	100	0	100
1,0	20	0	97,7	2,3	100	0	100
1,5	15	0	97,8	2,2	100	0	100
1,5	20	0	100	0	100	0	100
2,0	15	0	100	0	100	3,4	96,6
2,0	20	0	100	0	100	4,1	95,9
2,5	15	0	100	0	100	4,4	95,6
2,5	20	0	100	0	100	4,7	95,3

Al respecto, Solis *et al.* (2018) informaron alcanzar éxitos en el establecimiento *in vitro* utilizando como explante yemas apicales de plantas cultivadas en invernadero. También, como parte del proceso de desinfección el uso del hipoclorito de sodio al 1,0% durante 10 min.

Los resultados informados en el presente trabajo difieren con los informados por estos autores. Sin embargo, es importante destacar que extrajeron meristemas a las yemas una vez desinfectadas, lo cual pudo reducir ampliamente los porcentajes de contaminación, al trabajar con tejido muy pequeño (menor a 1 mm).

Según Guevara *et al.* (2016) el establecimiento de plantas leñosas en cultivo *in vitro* es un paso difícil. La desinfección de los explantes es un paso esencial para el éxito del cultivo *in vitro*. La contaminación puede originarse por contaminantes que vienen adheridos a la superficie del explante o por fallas en los procedimientos de laboratorio. El mantenimiento de plantas donadoras bajo condiciones de invernadero

o vivero y pretratándolas con sustancias antimicrobianas disminuyen los procesos de infección (Cassells, 2012).

Experimento II

Se obtuvieron los mismos resultados del experimento anterior, a pesar de la doble desinfección con el hipoclorito de sodio en el tratamiento 2. De nuevo fue imposible eliminar las bacterias con el protocolo de desinfección empleado (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la exposición de los segmentos nodales de Sacha inchi (*P. volubilis* L.) al Hipoclorito de Sodio a los 15 días de cultivo.

Solución NaClO (v/v) (%)	Tiempo (min)	Solución NaClO (v/v) (%)	Tiempo (min)	Oxidación (%)	Contaminación (%)			Muertos (%)	Vivos (%)
					Bacterias	Hongos	Total		
2,5	30	-	-	0	100	0	100 a	0	100
2,5	20	2,5	30	0	100	0	100 a	10	90,0

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para $p < 0,05$ según la Prueba de proporciones ($n=50$)

El hipoclorito de sodio ha sido utilizado tradicionalmente solo o en combinación con otros desinfectantes en la desinfección de los materiales vegetales a establecer *in vitro*, por su alto potencial redox 1,36 eV (Clavo *et al.*, 2007). En cada protocolo para el establecimiento de especies vegetal es necesario ajustar la concentración y el tiempo de exposición al mismo. Por lo general se han usado concentraciones desde 1,0 a 6,0% en dependencia de las características morfológicas e higiénica del material vegetal a establecer (Janse, 2007).

Experimento III

Los mejores resultados se alcanzaron en el tratamiento con la presencia de las nanopartículas de plata (NPs-Ag) en el medio de cultivo, a pesar de la doble desinfección con el hipoclorito de sodio en el tratamiento 2. De nuevo fue imposible eliminar las bacterias por el protocolo empleado (Tabla 5). No se observaron efecto toxico de las NPs-Ag a la concentración empleada sobre los segmentos nodales cultivos *in vitro*.

Tabla 5. Efecto de la exposición de los segmentos nodales de Sacha inchi (*P. volubilis* L.) a la mezcla de hipoclorito de sodio y NPs-Ag a los 15 días de cultivo.

Solución NaClO (v/v) (%)	Tiempo (min)	Solución NaClO (v/v) (%)	Tiempo (min)	Oxidación (%)	Contaminación (%)			Muertos (%)	Vivos (%)
					Bacteria	Hongo	Total		
*2,5	20	-	-	0	35,0 a	4,5	39,5 a	0	100
2,5	20	2,5	30	0	91,0 b	9,0	100 b	20	80

*300 mg L⁻¹ de NPs-Ag en el medio de cultivo

Porcentajes con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para p<0,05 según la Prueba de proporciones (n=50)

Según informó Parzymies (2021) las NPs-Ag proporcionan un área de superficie extremadamente grande lo que permitió un mejor contacto con las bacterias. Estas NPs-Ag se adhieren a la membrana celular y penetran fácilmente dentro de las bacterias.

Actualmente, las nanopartículas de plata (NPs-Ag) han demostrado ser efectivas en la inhibición de agentes contaminantes (bacterias y hongos) sin generar resistencia (Arab *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2017; Parzymies, 2021). Estos resultados constituyen el primer informe, hasta el momento del uso de NPs-Ag como parte del protocolo de desinfección de segmentos nodales de Sacha inchi.

También, Pal *et al.* (2007) señalaron que la forma de la nanopartícula también influye en la toxicidad de las mismas. Se comprobó que las formas de triángulo truncado son más tóxicas que las formas esféricas y alargadas, ya que contienen más caras y por tanto son más reactivas. Siendo las esféricas las que presentan menor toxicidad.

Según señalaron Manh *et al.* (2021) la utilización de las NPs-Ag para controlar la contaminación por microorganismos, así como la estimulación del crecimiento. También, Kim *et al.* (2017) emplearon nanopartículas de plata (NPs-Ag), para controlar la contaminación bacteriana en *Valeriana officinalis*. Por otro lado Mahna *et al.* (2013) refirieron al efecto del tratamiento con NPs-Ag en la desinfección de la superficie de semillas de *Arabidopsis*, hojas de papa (*Solanum tuberosum* L.) y cotiledones de tomate (*Solanum lycopersicum*). También, se observó que la adición de NPs-Ag en el medio de cultivo para explantes de olivo (*Olea europaea*) controló

adecuadamente los contaminantes internos y no presento efectos negativos en los mismos como muerte o problemas en el crecimiento.

4.2 Multiplicación *in vitro* de Sacha inchi

La combinación de los reguladores del crecimiento a las concentraciones evaluadas con la presencia del floriglucinol (30,0 mg L⁻¹) en el medio de cultivo, permitió alcanzar valores aceptables para la fase de multiplicación *in vitro* de *P.volubilis* (Tabla 6). Importante destacar que la presencia de este fenol en el medio de cultivo evitó la formación del callo basal en los brotes de Sacha inchi. Uno de los problemas que se presentan en los protocolos de propagación *in vitro* de especies leñosas y en específico en *P.volubilis* (INIA, 2017).

Tabla 6. Efecto del floriglucinol en el medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de brotes apicales de plantas *in vitro* de Sacha inchi (*P. volubilis* L.) obtenidas de semillas inmaduras a los 30 días de cultivo.

6 BAP (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)	Floriglucinol (mg L ⁻¹)	Altura (cm)	Presencia de callo basal (%)	Numero de hojas	Coefficiente de Multiplicación
0,5	0,1	0,0	4,6 b	100 b	2,5 a	1,90 b
0,5	0,1	30,0	6,4 a	0,0 a	3,0 a	2,25 a

Medias con letras no comunes dentro de la misma columna difieren estadísticamente según prueba de Tukey y de proporciones para el caso del porcentaje para p<0,05 (n=60)

La mezcla de 0,5 mg L⁻¹ de 6-BAP y 0,1 mg L⁻¹ de ANA permitió lograr un mayor crecimiento de los brotes, lo cual tuvo un efecto positivo en la multiplicación a partir de las yemas laterales, con un coeficiente de 2,25 para un primer subcultivo en esta fase de la propagación *in vitro* (Figura 4). Al respecto, Solis *et al.* (2018) informaron iguales resultados con igual combinación y concentraciones de reguladores del crecimiento, pero utilizando como material inicial meristemas.



Figura 4. Multiplicación *in vitro* de los ápices obtenidos de la zona apical de plantas *in vitro* de semillas inmaduras de Sacha inchi (*P. volubilis* L.) a los 30 días de cultivo.

Bordignon *et al.* (2012) refirieron el efecto positivo del 6-BAP en la formación de brotes de Sacha inchi y otras especies de la familia Euphorbiaceae, tales como *Phyllanthus caroliniensis* Walter (Catapan *et al.*, 2000). Varios autores también señalaron la combinación de estos dos reguladores del crecimiento para la propagación *in vitro* del Sacha inchi vía organogénesis. Tanto a partir de semillas como segmentos nodales y yemas apicales (Obdulio, 2007; INIA, 2017; Solis *et al.*, 2018; Restrepo-Osorio *et al.*, 2020; Henao *et al.*, 2021).

También, en el cultivo *in vitro* ha sido demostrado su efecto positivo en la lignificación (Ross y Castillo, 2010), en la reducción de los procesos de hiperhidricidad (Ross y Grasso, 2010) y en la no formación de callos en la base de los brotes en especies leñosas (Teixeira da Silva *et al.*, 2013; Posada-Pérez *et al.*, 2016).

El presente trabajo constituye el primer informe hasta el momento, de la no formación del callo en la base de los brotes de *P. volubilis* al utilizar en el medio de cultivo el regulador del crecimiento floroglucinol. El mismo es un producto de la degradación del floridcin y precursor de la ruta de biosíntesis de la lignina.

Compuesto fenólico relativamente poco utilizado por sus propiedades como promotor del crecimiento vegetal (Teixeira da Silva *et al.*, 2013).

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. Fue posible alcanzar la germinación *in vitro* de las semillas inmaduras sin testa de Sacha inchi en un medio de cultivo con agua de coco. Así como, un alto porcentaje de segmentos nodales libres de contaminantes con la presencia de las NPs-Ag en el medio de cultivo.

2. La combinación de los reguladores del crecimiento 6-BAP y ANA junto con el floriglucinol permite la multiplicación *in vitro* y sin formación de callo basal en los brotes apicales obtenidos de plantas de semillas inmaduras.

Recomendaciones

6. RECOMENDACIONES

- 1.-Emplear semillas inmaduras sin la testa como una vía alternativa para el establecimiento *in vitro* de Sacha inchi.
- 2.-Evaluar la brotación y crecimiento de las yemas de los segmentos nodales en presencia de las NP-Ag en el medio de cultivo de establecimiento.
- 3.-Continuar estudiando el efecto del floroglucinol en siguientes subcultivos de multiplicación *in vitro*.

Referencias Bibliográficas

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta M, Sánchez J, Bañón M (2008) Auxinas. En: Azcón-Bieto J, Talón M (Eds) Fundamentos de Fisiología vegetal. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, pp 377-397
- Adkins Y, Kelley DS (2010) Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J.Nutr.Biochem.*, 21:781–792.
- Agud E, Zapartan M, Cap Z (2010) The *in vitro* tuberization at the potato Desirée variety in media with phloroglucinol. *Res J Agric Sci* 42: 191-196
- Agustini V, Rahayu I, Numberi L, Mah Z (2020) The role of chitosan as a growth driver for orchid culture *Dendrobium lasianthera*. *J.J.Sm. in vitro. Journal Biology Papua* 12(1): 43–49. <https://doi.org/10.31957/jbp.1096>
- Almeida M, Almeida CV, Graner E, Brondani GE, Abreu-Tarazi M F (2012) Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: A histological study. *Plant Cell Reports* 31(8):1495–1515. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1264-6>
- Andrade I, Calderón A (2009) Manual de producción de sacha inchi para el biocomercio y la agroforestería sostenible. Proyecto Perúbiodiverso – PB. pp. 5-51.
- Andújar I, González N, García JC, Bogdanchikova N, Pestryakov A (2010) Argovit™ silver nanoparticles reduce contamination levels and improve morphological growth in the *in vitro* culture of *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied. *SN Applied Sciences*. 2(2110): 1-9.
- Arab MM, Abbas Y, Hosseini-Mazinani M, Bagheri S (2014) Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on *in vitro* establishment of GN15 (hybrid of almond peach) rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 12:103–110.
- Azcón J, Talón M (2008) *Plant Physiology Fundamentals*. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 676 pp.
- Bairu MW, Jain N, Stirk WA, Doležal K, Van Staden, J (2009) Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *South African Journal of Botany*, 75 (1): 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.08.006>
- Barrera OR (2007) Propagación sexual y clonal de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) bajo condiciones *in vitro*. Tesis para optar por el Título de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú 62p.

- Bello-Bello, J.J., R.A. Chavez-Santoscoy, C.A. Lecona-Guzmán, N. Bogdanchikova, J. Salinas-Ruiz, F.C. Gómez-Merino, A. Pestryakov (2017) Hormetic Response by Silver Nanoparticles on In Vitro Multiplication of Sugarcane (*Saccharum* spp. cv. Mex 69-290) Using a Temporary Immersion System. *Dose Response* 15(4):1-9.
- Bertolini V, Damon A, Valle Mora J, Rojas VN (2013) Influencias de tres niveles de agua de coco en la germinación *in vitro* de *Rhynchosstele bictoniensis* (Bateman), en medio de cultivo Knudson C. Lankesteriana. *International Journal on Orchidology*, 13:1-2. <https://doi.org/10.15517/lank.v0i0.11623>
- Bopana N, Saxena S (2009) *In vitro* regeneration of clonally uniform plants of *Crataeva magna*: a high value medicinal tree by axillary branching method. *New Forest* 38: 53-65.
- Bordignon SR, Bovi-Ambrosano MG, Viegas RPH (2012) *In vitro* propagation of Sacha inchi. *Ciência Rural* 42(7): 1168–1172. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012005000049>
- Burns D T, Johnston E L, Walker MJ (2020) Authenticity and the potability of coconut water - a critical review. *Journal of AOAC International* 103(3): 1-7. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qs2008>
- Caboni E, Tonelli MG, Lauri P, Iacovacci P, Kevers C, Damiano C, Gaspar T (1997) Biochemical aspects of almond microcuttings related to *in vitro* rooting ability *Biology Plant* 39: 91-97.
- Cachique DH, Solsol HR, García SMA, Arévalo LLA, Kodahl N (2018) Vegetative propagation of the underutilized oilseed crop Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 65(7): 2027-2036. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0659-9>
- CALRAM SAC (2007) Análisis y Recomendaciones de la Cadena de Valor de Sacha Inchi en la Región San Martín. Perubiodiverso. Lima, Perú 12 pp.
- Cardoso AAS, Lopes MTG, Valente MSF, Quisen RC, Chaves FCM (2018) Seed morphometry, *in vitro* germination and vegetative propagation in sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 13(3): 1–7. <https://doi.org/10.5039/agraria.v13i3a5561>
- Cassells AC (2012) Pathogen and Biological Contamination Management in Plant Tissue Culture: phytopathogens, vitro pathogens, and vitro pests. En: Loyola-Vargas V, OchoaAlejo N (eds). *Plant Cell Culture Protocols Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 877, pp. 57-80. Humana Press, Totowa. doi: 10.1007/978-1-61779-818-4_6
- Catapan E, Otuki, MF, Viana AM (2000) *In vitro* culture of *Phyllanthus caroliniensis* (Euphorbiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 195-202. doi: 10.1023/A:1006406806839.
- Chirinos R, Necochea O, Pedreschi R, Campos D (2016) Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) shell: An alternative source of phenolic compounds and

- antioxidants. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(4): 986-993. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13049>.
- Clavo E, Barbón R, Jiménez E, De Fera M, Chávez Maite, Capote Alina y Pérez Naivy (2007) Biomass production of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 42:298–300.
- Crockett S, Wenzig E, Kunert O, Bauer R (2008) Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium*. *Phytochem Lett* 1: 37-43.
- Daud N, Faizal A, Greelen D (2013) Adventitious rooting of *Jatropha curcas* L. is stimulated by phloroglucinol and by red LED light. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 49: 183-190.
- De Klerk GJ, Guan HY, Huiman P, Marinova S (2011) Effects of phenolic compounds on adventitious root formation and oxidative decarboxylation of applied indoleacetic acid in *Malus Jork 9*. *Plant Growth Regul* 63: 175-185.
- de la Rosa R, Quijada J (2013) Germination of Sacha Inchi, *Plukenetia volubilis* L. (Malpighiales, Euphorbiaceae) under four different conditions. *The Biologist* 11(1): 9-14.
- De Souza R, Grasso R (2012) Evaluación de un sistema de enraizamiento *in vitro* fotoautotrófico para *Eucalyptus dunnii*. Tesis presentada para obtener el título de Ingeniero Agrónomo, Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay, 75 pp.
- Del Pozo JC, López-Matas MA, Ramírez-Parra E, Gutierrez C (2005) Hormonal control of the plant cell cycle. *Plant Physiol.* 123:173-183.
- Dewick PM (2001) *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. Second Edition. John Wiley & Song, LTD. England 256 p.
- Dobrąnszki J, Teixeira da Silva JA (2010) Micropropagation of apple-a review. *Biotechnol Adv.* 28: 301-322.
- Dong Y, Chen M, Wang X, Niu L, Fu Q, Xu Z (2016) Establishment of *in vitro* regeneration system of woody oil crop *Plukenetia volubilis*. *Molecular Plant Breed* 14(2): 462–470.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (2022). Oilseeds market summary FAO - Trade and Markets Division. [on line]. Mayo de 2021. [Citado mayo de 2022]. URL disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Oilcrops/Documents/Food_outlook_oilseeds/Food_Outlook_May_12.pdf
- Follegatti-Romero L, Piantino C, Grimaldi R, Cabral F (2009) Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *The Journal of Supercritical Fluids* 49: 323–329.

- Galdiano RF Jr, Lemos EGM, Faria RT, Vendrame WA (2012) Cryopreservation of *Dendrobium* hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and supercool X1000. *Sci Hort* 148: 154-160.
- George EF, Hall MA, De Klerk GJ (2010) The growth regulatory effects of phenols. En: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (Eds) *Plant propagation by tissue culture*, 3rd ed. Springer, The Netherlands, pp. 192-196.
- Gómez MEJ (2004) Monografía y cultivo de Sacha inchi, oleaginosas promisorias para la diversificación productiva en el trópico. Corporación Colombiana de Investigación agropecuaria CORPOICA. Primera edición. 45 p.
- Gómez R (1998) Cultivo de células y tejidos. En: J. Pérez Ponce (Ed). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Cap. 2. Vol. 1. IBP, Santa Clara. pp. 25-44.
- Guevara L, Arencibia Padilla JA, Sala S, Aguilar A, Tirado F, Gómez-Kosky R (2016) Establecimiento *in vitro* del portainjerto híbrido 'Garfi x Nemared' para durazno. *Biotecnología Vegetal* 16(2): 73 -82
- Gupta S, Kachhwaha S, Lal Kothari S, Jain R (2020) Synergistic effect of cytokinins and auxins enables mass clonal multiplication of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.): a wonder. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 56: 458-469. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10065-0>
- Gur A, Gad AE, Haas E (1988) Rooting of apple rootstock clones as related to phenols and their oxidation. *Acta Hort.* (ISHS) 227: 160-166
- Gutiérrez LFR (2011) Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. *Grasas y aceites* 62 (1): 76-83.
- Habida U, Reja S, Saha ML, Khan MR (2002) Endogenous bacterial contamination during *in vitro* culture of table banana: identification and prevention. *Plant Tissue and Organ Culture* 12(2):117-124.
- Henao AMR, Urrea AT, Atehortúa LG (2021) Germinación y propagación vegetativa *in vitro* a través del desarrollo de yemas de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) *Acta Biológica Colombiana* 27(1):70-78.
- Hesami M, Daneshvar MH, Yoosefzadeh-Najafabadi M (2018) Establishment of a protocol for *in vitro* seed germination and callus formation of *Ficus religiosa* L., an important medicinal plant. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 13(4):1–8. <https://doi.org/10.5812/jjnpp.62682>.
- Hull MA (2011) Omega-3 polyunsaturated fatty acids *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 25 (4–5): 547-554.
- Husain MK, Anis M, Shahzad A (2008) *In vitro* propagation of a multipurpose leguminous tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using nodal explants. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 353-359.

- INIA (2017) Manual práctico de propagación *in vitro* de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), utilizando biorreactores de inmersión temporal. Dirección Regional de Agricultura. Biblioteca Nacional del Perú. 22 p.
- Janse JD (2007) Phytobacteriology: Principles and Practice. Wallingford: CABI Publishing. 126 p.
- Jiménez Ramírez J, Martínez Gordillo M, Cruz DR (2000) Genero *Plukenetia* (Euphorbiaceae) en México. Anales del Instituto de Biología Nacional Autónoma de México; 71:11–8.
- Kao K, Michayluk M (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta 126(2): 105–110. <https://doi.org/10.1007/BF00380613>.
- Karisma L (2015) Una propuesta para cultivar y procesar Sacha inchi en la Zona Cafetera Colombiana. Disponible desde internet en: <https://karisma.org.co/2008-2014/?p=4451> [Con acceso el 10/03/2022]
- Kerdiles O, Layé S, Calon F (2017) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and brain health: Preclinical evidence for the prevention of neurodegenerative diseases. Trends in Food Science & Technology 69(Part B): 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.003>.
- Kim DH, Gopal J, Sivanesan I (2017) Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. Royal Society of Chemistry Advance 7:36492–36505.
- Kodahl N (2020) Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) from lost crop of the Incas to part of the solution to global challenges. Planta 251(4):1-22. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03377-3>.
- Kodahl N, García-Dávila CR, Cachique D, Sørensen M, Lütken H (2018) An *in vitro* seed germination protocol for *Plukenetia volubilis* L. ISHS Acta Horticulturae 1201: 549–554. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1201.73>.
- Machakova I, Zazimalova E, George EF (2008) Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. En: George EF, Hall MA, De Klerk G-J (Eds) Plant Propagation by Tissue Culture 5(1), 3rd Edition, The Background, Springer, The Netherlands, pp 175-204.
- MADR (2009) Observatorio de competitividad agrocadenas la cadena de oleaginosas aceites y grasas. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia.
- Mahna N, Vahed SZ, Khani S (2013) Plant *in vitro* culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of *ex vitro* explants. J Nanomed Nanotechol 4:161-172. doi:10.3389/fpls.2016.01330.
- MANCO CE (2005) Instituto Nacional de Investigación y Extensión agraria. Dirección de Investigación Agraria. Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología Estación Experimental Agraria “El Porvenir” – Tarapoto. 8pp.

- Manh Cuong D, Cong Du P, Tung HT et al. (2021) Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis*—a valuable medicinal plant. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 146(2):577-588. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02095-2>
- Martínez GM, Jiménez RJ, Cruz DR, Juárez AE, García R, Cervantes A, Mejía HR (2002) *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 73(2):155-281.
- Maurer NE, Hatta-Sakoda B, Pascual-Chagman G, Rodriguez-Saona LE (2012) Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega-3 fatty acids, Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Food Chemistry* 134(2):1173–1180.
- Mc-Bride F (1951) Euphorbiaceae. In *Flora of Peru. Botanical Series vol. 13, Part IIIA. Field Museum of Natural History.* pp. 115-118.
- Millones CE, Vásquez ER (2008) Micropropagación de plantas de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) provenientes de la provincia de Rodríguez de Mendoza, Región Amazonas. *Investigaciones Amazonenses* 2: 7–11.
- Millones CE, Vásquez ER (2008) Micropropagación de plantas de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) provenientes de la provincia de Rodríguez de Mendoza, Región Amazonas. *Investigaciones Amazonenses* 2:7-11.
- Modgil M, Sharma DR, Bhardwaj SV (1999) Micropropagation of apple cv. Tydeman Early Worcester. *Sci. Hortic.* 81:179-188.
- Moreno Martínez D, Menchaca GRA (2007) Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Foresta Veracruzana* 9(2): 27–32.
- Munro-Olmos D, Ramos-Serrano J, Romero-Cadena A, Figueroa-Viera J (2005) Paquete tecnológico para el cultivo del cocotero en el estado de Colima. Gobierno del estado de Colima, Secretaría de Desarrollo Rural. Estado de Colima. 50 pp.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Mustafa G, Khan MS (2015) Differential role of Indolebutyric acid in Sugarcane root development. *Sugar Tech.* 18(1):55-60.
- Nima JE (2007) Estudio sobre sistematización de avances de investigación y propuesta de un modelo productivo competitivo para la Producción de Sacha Inchi en la Región San Martín. Gobierno regional de San Martín DIRCETUR. Moyobamba, Perú. pp.1-51.
- Noguera AS, Paz N Del V, Díaz ME, Perera MF, Díaz CR, García MB, Filippone MP, Welin B, Cuenya MI, Digonzelli PA, Castagnaro AP (2013) Production of healthy seed cane in Tucumán, Argentina. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol* (28): 1-6.

- Obdulio BR (2007) Propagación sexual y clonal de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) bajo condiciones *in vitro*. Tesis de Ingeniería para optar el grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú. 62 pp.
- Ovalles JF, León LA, Vielma RA, Medina A (2002) Determinación del contenido de aminoácidos libres del agua de coco tierno por HPLC y revisión electrónica sobre la nueva tecnología para el envasado del agua de coco. Revista de la Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes. Mérida, R. B. de Venezuela 44: 70-78.
- Paitan MR (2006) Adaptabilidad del cultivo de sachá inchi en el Valle del Jequetepeque, La Libertad. Centro económico de promoción y acción social. CEDEPAS NORTE. 21 pp.
- Pal S, Tak YK, Song JM (2007) Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 27: 1712–1720. doi: 10.1128/AEM.02218-06
- Parzymies M (2021) Nano-Silver particles reduce contaminations in tissue culture but decrease regeneration rate and slows down growth and development of *Aldrovanda vesiculosa* explants. Applied Sciences 11: 36-53. <https://doi.org/10.3390/app11083653>
- Pascual G, Mejía J (2000) Extracción y caracterización de aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*). Anales Científicos Universidad Agraria la Molina, Perú, 25 p.
- Patiño TC, Mosquera GF, Tulio GR (2011) Efecto inductor del agua de coco sobre la germinación de semillas y brotamiento de los cormos de la hierba de la equis *Dracontium grayumianum*. Acta Biológica Colombiana 16 (1):133-142.
- Patthanajuck V, Bunnag S (2017) Effect of plant growth regulators on shoot induction of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) *in vitro* (pp. 494–500). NIGRC KCU-2017.
- Pérez J (1998) Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Jiménez E, Agramonte D, (Eds). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. pp. 179-191.
- Perúbiodiverso (2009) Manual de producción de sachá inchi con el marco conceptual operativo del Biocomercio y la agroforestería sostenible. Perúbiodiverso. Lima, Perú.
- Posada-Pérez L, Padrón YM, González JO, Barbón RR, Rodríguez RS, Norman OM, Rodríguez CRE, Daniels D, Gómez-Kosky R (2016) Effect of phloroglucinol on rooting and *in vitro* acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol Roja) In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant 52:196–203.
- Quinto PA, Martínez-Hernández L, Pimentel-Bribiesca D, Rodríguez-Trejo A (2009) Alternativas para mejorar la germinación de semillas de tres árboles

- tropicales. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 15(1):23-28.
- Rai IN, Sudana IM, Astawa ING, Dwiyani R, and Fitriani Y (2019) Direct organogenesis *in vitro* propagation of local balinese banana with thidiazuron. International Journal of Life Sciences 3(3):32–40. <https://doi.org/10.29332/ijls.v3n3.360>.
- Ramos EF (2014) Caracterización y trazabilidad del aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Programa de Ciencias y Tecnología, Departamento de Química Analítica. Universidad de Sevilla.
- Razzaq AR, Ammara HM, Jhanzab T. Mahmood A, Hafeez S, Hussain M (2015) A novel nanomaterial to enhance growth and yield of wheat. Journal Nanoscience Technology 2(1):55-58.
- Reis E, Batista MT, Canhoto JM (2008) Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. Protoplasma 232: 193-202.
- Restrepo-Osorio C, Gil-Correal A, Chamorro-Gutiérrez L, Ramírez-Ríos V, Álvarez JC, Villanueva-Mejía D (2020) Efficient direct shoot organogenesis and genetic stability in micropropagated sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). BMC Research Notes 13(1):1–7. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05257-1>
- Romais E, Teixeira C, Ribeiro E, Lopes S (2000) Efeito do Floroglucinol na reação morfogênica *in vitro* de segmentos internodais de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv Pera. Rev. Ceres. 47:113-120.
- Ross S, Castillo A (2010) Micropropagación de *Achyrocline flaccida* (Weinm) DC. en medios de cultivo líquido. Agrociencia XIV (1):1-7.
- Ross S, Grasso R (2010) *In vitro* propagation of Guayabo del país (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). Fruit Veg Cereal Sci Biotech 4 (special tissue 1): 83-87.
- Saddique Z, Naeem I, Maimoona A (2010) A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. J Ethnopharmacol 131:511–521.
- Santana I, Rodríguez J, Nodarse O, Bernal A, Monte de Oca JL, Jiménez M, Machado P, Rolo JM, Pérez A, Zayas C (2014). Biofábrica de 5ta generación. En: XXXVI Convención y EXPOATAM 2014 "Héctor M. Sáenz Couret", septiembre 2 al 5. Revista ATAM, México, ISSN: 2007610: 10 p.
- Sathe SK, Kshirsagar HH, Sharma GM (2012) Solubilization, Fractionation, and electrophoretic characterization of inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.) Proteins. Plant Foods for Human Nutrition, 67(3), 247–255. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0301-5>.
- Sembiring R, Hayati M, Kesumawati E (2020) Formation of potato micro tubers (*Solanum tuberosum* L.) by using BAP and coconut water in the *in vitro*

- culture. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 425(1): 012-072. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/425/1/012072>
- Sharma M, Modgil M, Sharma DR (2000) Successful propagation in vitro of apple rootstock MM106 and influence of phloroglucinol. *Indian J. Exp Biol* 38:1236-1240.
- Sihuayro LDB (2013) Evaluación del rendimiento en la extracción del aceite de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) del ecotipo predominante en el valle del río Apurímac (Ayacucho) y su caracterización físico-química y sensorial". Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann Tacna, Perú- 120 pp.
- Solis R, Cachique D, Guerrero-Abab J, Ruiz SME, Figueroa TL (2018) *In vitro* propagation of Sacha inchi through organogenesis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 53(3):1285–1288. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2018001100012>
- Solis R, Gonzales N, Pezo M, Arévalo L, Vallejos-Torres G (2019) Rooting of sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) juvenile cuttings in microtunnels. *Acta Agronómica* 68(11):35–40. <https://doi.org/10.15446/acag.v68n1.72101>
- Solis R, Pezo M, Diaz G, Arévalo L, Cachique D (2016) Vegetative propagation of *Plukenetia polyadenia* by cuttings: effects of leaf area and indole-3-butyric acid concentration. *Brazilian Journal of Biology* 77(1): 580–584.
- Soto A, Salazar D (2013) Influencias de tres niveles de agua de coco en la germinación *in vitro* de *Rhynchosstele bicktoniensis* (Bateman), en medio de cultivo Knudson C LANKESTERIANA 13:1–2. Universidad de Costa Rica,
- Spinoso-Castillo JL, Chavez-Santoscoy RA , Bogdanchikova NJA, Pérez -Sato V, Morales-Ramos J, Bello-Bello J (2017) Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 129:195–207.
- Stein AC, Viana AF, Muller LG, Nuñez JM, Stolz ED, do Rego J-C, Costentin J, von Poser GL, Ratesa SMK (2012) Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: A promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. *Behav Brain Res* 228:66–73.
- Suárez B, Álvarez ÁL, Diñeiro YG , del Barrio G, Picinelli A L, Parra F (2010) Phenolic profiles, antioxidant activity and *in vitro* antiviral properties of apple pomace *Food Chemistry* 120 (1): 339-342.
- Taiz I, Zeiger E (1998) *Plant physiology*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers. 792 p.
- Teixeira da Silva JA, J Dobránszki J, Ross S (2013) Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 49:1-16.
- Terrero JC (2010) Evaluación de 3 sustancias biostimulantes en el cultivo del pepino (*Cucumis sativus*, L.) en condiciones de organopónico. Disponible

en: <http://www.monografias.com/trabajos46/cultivo-pepino/cultivo-pepino.html>. [Consulta: 5 de diciembre de 2022].

- Thorpe T (2014) History of Plant Tissue Culture. Methods in Molecular Biology, En: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F (Eds) Plant Cell Culture Protocols, Second Edition, Totowa, 411 pp.
- Thuy L, Nhung N (2019) Study on the suitable mediums for in vitro culture the stem segment of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) plant. Naresuan University Journal: Science and Technology 207(14):121–128.
- Viegas-Rodrigues P, Bordignon SB, Ambrosano BG (2014) Horticultural performance of *in vitro* propagated plants of Sacha inchi. Ciência Rural, Santa Maria,44(6):1050–1053.doi.org/10.1590/S0103-84782014000600016.
- Wang P, Lombi E, Fang-Jie Z, Kopittke PM (2016) Nanotechnology: A new opportunity in plant sciences. Trends in Plant Science 21 (8):699-712.
- Wang S, Zhu F, Kakuda Y (2018) Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.): Nutritional composition, biological activity, and uses. Food Chemistry, 265:316–328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.055>
- Watanabe Y, Tatsuno I (2017) Omega-3 polyunsaturated fatty acids for cardiovascular diseases: present, past and future. Expert Review of Clinical Pharmacology 10(8):865–873.
- White PR (1964) The cultivation of animal and plant cells. Soil Science, 97(1): 74-78. <https://doi.org/10.1097/00010694-196401000-00013>