

# Propagación in vitro del árbol de castaña amazónica (Bertholletia excelsa Bonpl.)

# In vitro propagation of brazilian nut tree (Bonpl.)

Henry Robles Cueva <sup>1a</sup>, Francisco Román-Dañobeytia <sup>2b</sup>, Jose Luis Rafael Quille <sup>3c\*</sup>, Cesar Enrique Álvarez Sanchez <sup>3d</sup>, Nelson Leopoldo Meléndez Ascaño <sup>3e</sup>, Renzo André De la Peña Lavander <sup>3d</sup>, Olegario Robles Cueva <sup>3e</sup>

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Piura, Facultad de Ciencias, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas, Piura, Perú

<sup>2</sup> Centro de Innovación Científica Amazónica – CINCIA, Madre de Dios, Perú

<sup>2</sup> Centros de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica Productivo Madre de Dios, Instituto Tecnológico de la Producción, Iquitos, Perú

<sup>a</sup> hroblesc@unp.edu.pe, <sup>b</sup>fromn76@gmail.com, <sup>c</sup>rqjose93@gmail.com, <sup>d</sup>cesaralvarez26@gmail.com, <sup>e</sup> nleomelendez@yahoo.com, <sup>f</sup>rzdelander@gmail.com, <sup>e</sup> olegarobles@gmail.com

\* Autor de correspondencia

| Recibido: 28/06/22 |  
| Arbitrado por pares |  
| Aceptado: 15/12/22 |

## Resumen

*Bertholletia excelsa*, conocida como castaña, es una especie forestal de gran importancia económica y ecológica a nivel nacional e internacional, actualmente su presencia en los bosques de Madre de Dios se ve amenazada por actividades antropogénicas como la deforestación, la degradación de suelos y la disminución de las poblaciones naturales. Considerando dicha problemática, en el presente trabajo se realizó la micropropagación *in vitro* de esta especie como tecnología estratégica para su conservación y producción a gran escala. Para la micropropagación *in vitro* se probaron 6 tratamientos en base a factores como 2 concentraciones de Woody Plant Medium (WPM) al 50 y 100% y 3

concentraciones de sucrosa (30, 40 y 50 g/L) obteniendo como resultados que el mejor protocolo corresponde a WPM al 50% con 30 g/L de sucrosa, dando un crecimiento de 2.37 cm, 2.73 nudos y 1.60 hojas de promedio. Finalmente indicamos que el medio con WPM 50% y 30 g/L de sucrosa es eficiente para el cultivo de tejidos vegetales de esta valiosa especie forestal.

**Palabras claves:** castaña amazónica, cultivo *in vitro*, micropropagación, medio de plantas leñosas, establecimiento, multiplicación, sucrosa, explantes

### **Abstract**

*Bertholletia excelsa*, known as Brazil nut, is a forest species of great economic and ecological importance at the national and international level, currently its presence in the forests of Madre de Dios is threatened by anthropogenic activities such as deforestation, soil degradation and decline in natural populations. Considering this problem, the *in vitro* micropropagation of this species was carried out as a strategic technology for its conservation and large-scale production in the present work. For the micropropagation *in vitro*, 6 treatment were tested based in factors as 2 concentrations of Woody Plant Medium (WPM) at 50 and 100% and 3 concentrations of sucrose (30, 40 and 5, g/L), obtaining results that the best protocol corresponds to WPM at 50 % with 30 g/L of sucrose, giving a growth of 2.37 cm, 2.73 nodes and 1.60 leaves on average. Finally, we indicate that medium with WPM 50% and 30 g/L sucrose concentration is efficient for plant tissue culture to this valuable forest species.

**Keywords:** brazilian nuts, *in vitro* culture, micropropagation, woody plant medium, establishment, multiplication, sucrose, explants

### **Introducción**

*Bertholletia excelsa* Bonpl., también conocido como castaña amazónica, es una especie del bosque no maderable que se distribuye en Perú, Bolivia y Brasil y que posee una gran importancia económica por la producción de nueces (Rockwell et al., 2015). Se considera que actualmente, las actividades relacionadas a la explotación de castaña

amazónica brindan actividad económica directa e indirecta a 20,000 personas en Madre de Dios, que es la principal zona de explotación de esta especie.

Es importante mencionar que, de acuerdo a la categorización de especies amenazadas de flora silvestre, aprobada mediante Resolución Ministerial N° 00729-81-AG-DGFF, *Bertholletia excelsa* está catalogada como especie en peligro de extinción desde 1981 (OSINFOR 2018). Actualmente, diferentes actividades antropogénicas como la tala indiscriminada, la emigración de los colectores de castaña, la pérdida de polinizadores por quema de bosques y uso descontrolado de insecticidas, y las inundaciones en zonas de castaños por deforestación han generado cambios en la distribución y situación de la especie (Ramos, 2018).

En los últimos años, se han desarrollado diferentes iniciativas para la propagación de castaña amazónica utilizando técnicas tradicionales de propagación como el uso de semillas, injertos y esquejes, que desafortunadamente terminaron en resultados no satisfactorios para dichas pruebas (Arias y Rondón, 2010). Esto debido a las características fisiológicas de la especie como poseer una semilla recalcitrante, germinación lenta e irregular y la dificultad para el desarrollo del sistema radicular (Figueiredo y Carvalho, 2002).

Con estos resultados obtenidos por metodologías tradicionales, resulta necesario el uso de técnicas biotecnológicas que permitan una producción rápida y eficaz de la especie, para así disminuir los riesgos de pérdida de diversidad genética y lenta regeneración de los bosques de castaña amazónica ya identificados como posibles riesgos para la especie (MINAM, 2014). El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales presenta una gama amplia de aplicaciones prácticas, que incluyen la propagación clonal por yemas, organogénesis directa y embriogénesis somática de variedades elite por yemas apicales y axilares; para la conservación a largo plazo de plantas en peligro de extinción (Anis & Ahmad 2016). La micropropagación, a través del cultivo de tejidos es presentado como una alternativa que permite obtener una masificación de la propagación de plantas en un menor periodo de tiempo y haciendo uso de un espacio reducido (Roca y Ramirez, 2000).

Si bien existen numerosos estudios sobre cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, son muy pocos los relacionados con especies peruanas, especialmente en especies medicinales y forestales (Carrión & Tapia 2019). Por ello, el objetivo principal de esta investigación fue determinar el efecto de las citoquininas

## Material y métodos

### *Material biológico*

Se colectaron esquejes jóvenes (con un tamaño de 3 a 5 cm de altura) de castañas amazónicas del vivero ubicado en el fundo “El Bosque” de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, Km 18 – Carretera Interóceánica Puerto Maldonado – Iñapari. Estos esquejes fueron llevados al invernadero del CITE Productivo Madre de Dios donde se realizó un acondicionamiento para su establecimiento (Figura 1).

### **Figura 1**

*Esquejes de Bertholletia excelsa establecidas en el invernadero del CITE Productivo Madre de Dios*



### *Desinfección y establecimiento*

Se cortaron yemas axilares jóvenes de las plantas tratadas en el invernadero usando una tijera de podar que fue desinfectada entre cortes con alcohol 70%, el corte se realizó en un ángulo de 45° a la dirección del tallo y fueron colocados en frascos con agua destilada para evitar que se deshidraten durante el procedimiento.

En el laboratorio, cada uno de los esquejes cortados fue lavado cuidadosamente con un cepillo, haciendo uso de agua de caño y detergente durante 10 minutos para eliminar cualquier resto de tierra presente en los esquejes, posteriormente se enjuagó con agua de caño hasta eliminar cualquier resto de detergente.

El material biológico fue trasladado a una cabina de flujo laminar, los esquejes fueron colocados en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% bajo agitación constante durante 10 minutos, para que posteriormente se enjuague 4 veces con agua destilada

estéril durante un lapso de 3 minutos por cada enjuague. Los nudos axilares fueron sembrados a manera de 1 nudo en cada tubo de ensayo, evaluándose la contaminación y viabilidad durante 30 días en 2 tratamientos: WPM al 50% y WPM al 100%.

### *Multiplicación*

Los tratamientos a probar fueron generados a base del medio WPM (Lloyd y McCown, 1981) en 2 concentraciones (50 y 100%), suplementados con componentes orgánicos como Myo-inositol 100 mg/L, Ácido Nicotínico 1 mg/L, Piridoxina 1 mg/L, Tiamina 1 mg/L y Pantotenato de Calcio 2 mg/L, además de probar 3 concentraciones de sucrosa (30, 40 y 50 g/L).

El pH del medio fue ajustado a 5.6 y se gelificó con agar a 6.5 g/L, dispensándose 10 mL en tubos de 25 x 150 mm, posteriormente se esterilizaron los tubos conteniendo el medio con una autoclave a 121 ° C en 100 kPa durante 20 minutos. Las condiciones de la cámara de crecimiento fueron de un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, con una intensidad de luz de 2000 lux y una temperatura de 28°C.

De los explantes sobrevivientes y en buen estado del experimento anterior, se procedió a subcultivar un nudo axilar en cada uno de los tubos de ensayo con 10 mL de medio de cultivo (Figura 2), estos tubos fueron colocados de manera aleatoria en la cámara de crecimiento para la evaluación de su desarrollo a los 90 días.

### **Figura 2**

*Subcultivo de *Bertholletia excelsa* en cabina de flujo laminar (izquierda) y explantes de *Bertholletia excelsa* sembrados en medio de cultivo de tejidos vegetales (derecha)*



### Análisis Estadístico

El presente trabajo se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar (DCA), en la etapa de establecimiento se realizaron 125 réplicas para cada uno de los dos medios a evaluar que fueron WPM 50% y WPM 100%, mientras que para el experimento de multiplicación se trabajaron 30 repeticiones por cada uno de los 6 tratamientos dando un total de 180 muestras a evaluar durante 3 meses.

Con el experimento de establecimiento se realizó pruebas Chi-cuadrado para identificar dependencia entre contaminación y viabilidad versus la concentración de WPM, mientras que con respecto al análisis de multiplicación se realizaron Análisis de Varianza (ANOVA) para encontrar diferencias significativas entre los tratamientos probados en el experimento y en caso se identifique significancia se procedió a realizar una prueba de comparación de Tukey entre tratamientos. Previamente, los supuestos del ANOVA se cumplieron a través pruebas de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) (Fry, 1993).

### Resultados

Respecto a la viabilidad de los explantes, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos solo a los 15 días de desarrollo, mostrando un mejor desempeño el tratamiento WPM 50% (Tabla 1).

**Tabla 1**

*Viabilidad de explantes en medio WPM durante el establecimiento in vitro de castaña*

Tratamiento	Viabilidad		
	8 días	15 días	30 días
<b>WPM 50%</b>	96.8%	96%	87.2%
<b>WPM 100%</b>	93.6%	88.8%	80.0%
	p-value=0.23663	p-value=0.031716	p-value=0.12423

Con respecto a la etapa de multiplicación, se encontraron diferencias significativas entre algunos factores como la altura del explante y el número de nudos y hojas para las diferentes concentraciones de sucrosa de WPM al 50% (Tabla 2).

**Tabla 2**

*Análisis de Varianza para el factor concentración de WPM y el factor concentración de sucrosa*

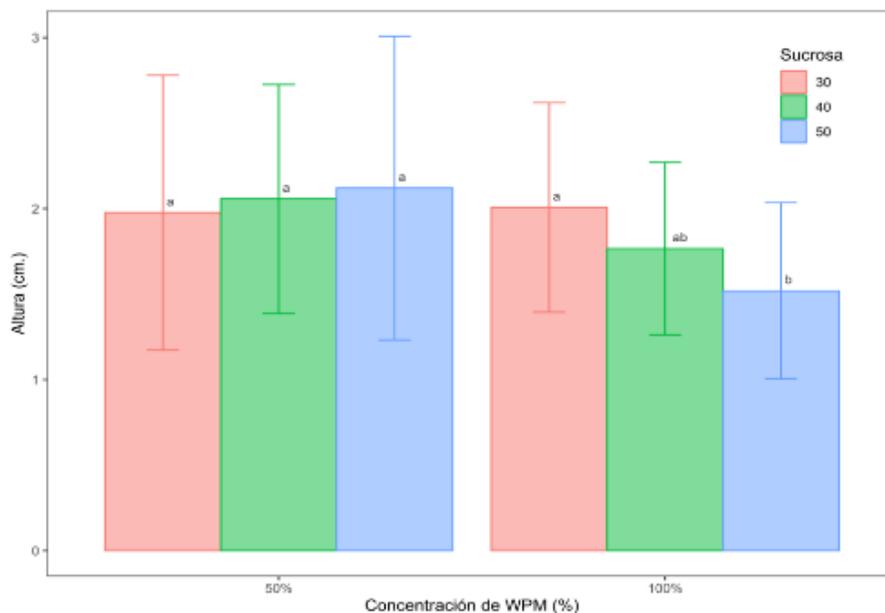
Factor	Altura de explante (cm.)	Número de nudos	Número de hojas
<b>Concentración de WPM</b>	0.0004816***	1.74e-06***	1.021e-10***
<b>Concentración de sucrosa en WPM 50%</b>	5.19e-05***	0.0005072***	0.7788
<b>Concentración de sucrosa en WPM 100%</b>	0.2702	0.4072	0.01839

*Nota:* \*\*\* Indica significancia estadística en el análisis normal de varianza para dicho factor

Para el caso de la altura de explante se encontraron diferencias significativas en el tratamiento de WPM 50% por efecto de las diferentes concentraciones de sucrosa (Figura 3).

**Figura 3**

*Diferencias en la altura de los explantes por efecto de las concentraciones de sucrosa en los tratamientos WPM 50% y WPM 100%*

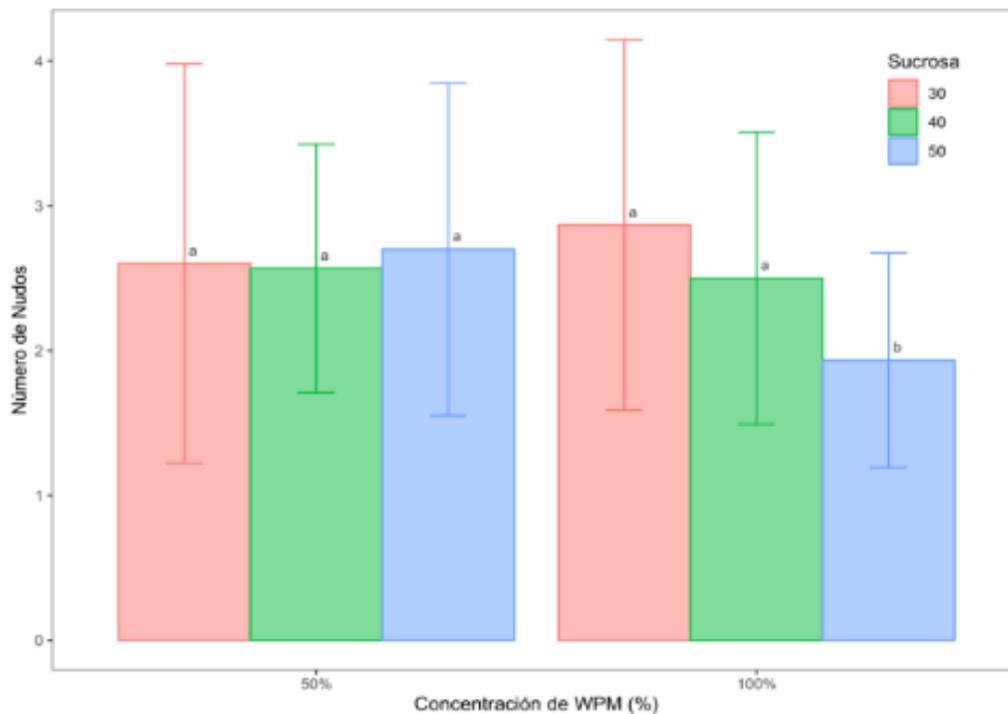


*Nota:* Letras por encima de las barras de error muestran diferencias significativas (P<0.05; Prueba de Tukey)

Con respecto a los resultados del número de nudos, encontramos diferencias significativas en el tratamiento WPM 50% a una concentración de 50 g/L de sucrosa, mientras que el resto de tratamientos no ha mostrado diferencias significativas entre ellos (Figura 4).

#### Figura 4

*Diferencias en el número de nudos de los explantes por efecto de las concentraciones de sucrosa en los tratamientos WPM 50% y WPM 100%*

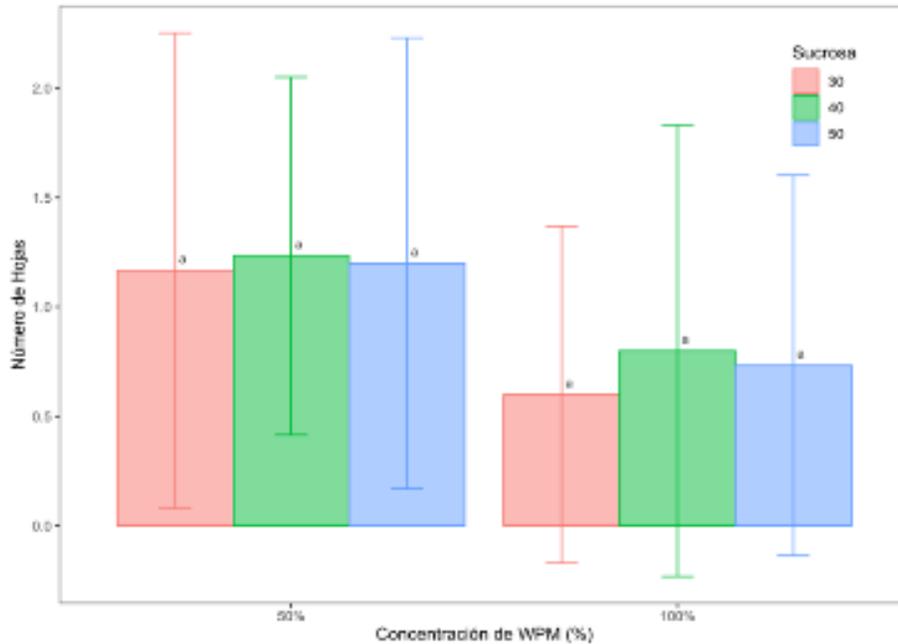


*Nota:* Letras por encima de las barras de error muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ; Prueba de Tukey)

Finalmente, con respecto al número de hojas no se han encontrado diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 5).

#### Figura 5

*Diferencias en el número de hojas de los explantes por efecto de las concentraciones de sucrosa en los tratamientos WPM 50% y WPM 100%*



*Nota:* Letras por encima de las barras de error muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ; Prueba de Tukey)

De igual forma, todos nuestros resultados se encuentran descritos en la tabla resumen donde se puede apreciar los promedios y la desviación estándar para cada variable (Tabla 3).

**Tabla 3**

*Efecto de concentración de WPM y sucrosa en la multiplicación de *Bertholletia excelsia**

WPM	Sucrosa	Altura (cm.)	Número de Nudos	Número de Hojas
50 %	30 g/L	2.0067±0.6119 <sup>a</sup>	2.7333±1.2576 <sup>a</sup>	1.6000±0.8944 <sup>a</sup>
	40 g/L	1.7667±0.5040 <sup>a</sup>	2.7000±0.8584 <sup>a</sup>	1.2333±0.8172 <sup>a</sup>
	50 g/L	1.5200±0.5142 <sup>a</sup>	2.5667±1.1492 <sup>b</sup>	1.2000±1.0306 <sup>a</sup>
100 %	30 g/L	1.9767±0.8033 <sup>a</sup>	2.4333±0.5683 <sup>a</sup>	1.2000±0.6103 <sup>a</sup>
	40 g/L	2.0567±0.6694 <sup>ab</sup>	2.5000±1.0086 <sup>a</sup>	0.9000±0.9948 <sup>a</sup>

	50 g/L	2.1200±0.8876 <sup>b</sup>	1.9333±0.7397 <sup>a</sup>	0.8667±0.7302 <sup>a</sup>
Medias con letras diferentes indican diferencias significativas según Prueba de Tukey (p<0.05), siendo etiquetado de mayor "a" a menor "b".				

## Discusión

El cultivo *in vitro*, permite la multiplicación de plantas a gran escala, homogéneas e idénticas a la planta madre (Roca y Mroginski, 1993), siendo esta la base científica de esta investigación, donde se buscó desarrollar un protocolo eficiente para la Propagación *in vitro* del árbol de castaña *Bertholletia excelsa*, que represente una alternativa viable para su reproducción masiva con fines de conservación y empleo en programas de reforestación en los bosques amazónicos.

Generalmente las plantas leñosas presentan mayores porcentajes de contaminación; puesto que, se desarrollan en el suelo por varios años, siendo infectados por microorganismos tanto de manera exógena como endógena, dificultando el cultivo *in vitro* debido a problemas de contaminación fúngica y bacteriana. (Alonso et al. 2020). En el éxito del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es indispensable, se desarrollen métodos de asepsia mediante el uso de agentes químicos, debido a la alta carga microbiana que poseen las plantas madre por su exposición al medio ambiente del que provienen (George, 1993). por tal motivo, se aplican fungicidas y bactericidas como agentes esterilizantes para disminuir la contaminación en los explantes, el uso de estos desinfectantes debe ser lo suficientemente fuerte para eliminar los microorganismos, sin provocar el deterioro del material vegetal (Hiti-bandaralage 2017, Perea & Tirado 2011). Lo mencionado por los autores sustenta lo realizado previo a la etapa de introducción *in vitro*, donde se aplicó un protocolo de asepsia, en el cual los explantes se sumergieron en el desinfectante Hipoclorito de sodio al 2.5% y a su posterior enjuague con agua destilada estéril.

De este modo, un manejo adecuado de la asepsia garantiza la viabilidad al facilitar la reactivación del crecimiento y desarrollo del explante (Rache y Pacheco, 2012). De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, y teniendo en cuenta la estrecha relación de la viabilidad con el estado fitosanitario, se puede apreciar que durante la etapa de establecimiento el mejor tratamiento fue el medio a base de sales WPM al 50%, el cual alcanzo un 96% y 87.2% de explantes viables y libres de contaminación microbiana (hongos y bacterias) ello, se sustenta en los resultados de diversas investigaciones, en donde el uso de agentes desinfectantes en los explantes permite obtener diferentes valores de contaminación y de viabilidad; Brondani et al.

<https://doi.org/10.54353/ritp.v3i2.e002>

(2010), quienes consiguieron valores convergentes a los de la presente investigación, al establecer su protocolo de desinfección con NaOCl al 5 % (v/v) y una solución a base de Benomilo al 1 % (p/v), como ingrediente activo antifúngico, en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Liquidambar styraciflua*, obteniendo como resultado valores reducidos de contaminación fúngica (14%).

Actualmente el medio WPM es ampliamente usado en especies forestales y tiene como una de sus principales características poseer la mitad de concentración de amonio comparado al medio MS, lo que disminuye la toxicidad generada por amonio en plantas (Phillips y Garda, 2019). Entre nuestros resultados, WPM 50% tuvo mayor viabilidad durante un corto periodo de tiempo. Existen trabajos de investigación que respaldan el uso de WPM diluido para especies forestales puesto que indican que su uso en concentraciones disminuidas aumenta la tasa de enraizamiento y de multiplicación (Chalupa, 1993), además hay trabajos que indican el medio WPM como una opción para evitar la hiperhidricidad generada por el alto contenido de sales de otros medios como el MS (Murashige y Skoog, 1962; Brand, 1993).

En la etapa de multiplicación, las concentraciones de sucrosa pueden modificar el potencial osmótico del medio de crecimiento, generando una especie de estrés hídrico en la planta lo que disminuiría el crecimiento de los explantes (Grout, 1991; Withers, 1991). Según Borges et ál. (2008) señalaron que la mayor efectividad de la sacarosa en la multiplicación *in vitro* puede atribuirse a que causa cambios en las fitohormonas endógenas lo que conduce a la formación y el crecimiento de vástagos normales, quizás a través del ajuste osmótico del citosol de los tejidos o de la disponibilidad de ciertas enzimas asociadas con la utilización de la fuente de carbono. De todo lo mencionado, sumado a la baja concentración de WPM puede haber generado una limitación en la disponibilidad de nutrientes del medio, que solo fue evidenciado en los medios con WPM 50% que generaron disminución en la longitud y número de nudos, mientras que los medios con WPM 100% no presentaron disminución alguna en ninguna característica evaluada.

Si bien hay algunos trabajos que indican la sucrosa del medio es consumida en un porcentaje de 20-30% durante los primeros 28 días de siembra para especies como *Hemerocallis* o *Dephinium* (Lumsden et al., 1990), a los 90 días de evaluación aún se encuentran diferencias significativas en longitud y número de nudos que son afectados por el potencial osmótico (Ferro-Mauricio, 2021). Bajo estas condiciones, podemos indicar que el medio WPM 50%-Sucrosa 30 g/L es la mejor opción para la multiplicación de la castaña amazónica considerando que si bien no tiene diferencias significativas con otros medios de WPM 100%, la disminución del consumo de sales y reactivos lo coloca como el medio más eficiente, esto se asemeja con lo mencionado por Karunarate (1989) que al evaluar el efecto de la sacarosa y el carbón activado en el cultivo de embriones

de cocos enanos, donde observaron que al incorporar al medio 30 g/l-1 de sacarosa y 2 g/l-1 de carbón vegetal activado, los embriones germinaron rápidamente. Aproximadamente el 62% de los embriones se convirtieron en plantas jóvenes, compuestas por 2 hojas fotosintéticas y 2 hojas escamosas en un periodo de 4 meses.

## Conclusiones

Durante la etapa de establecimiento in vitro de *Bertholletia excelsa*, el mejor tratamiento fue el medio a base de sales WPM al 50%, el cual alcanzo un 96% y 87.2% de Explantes viables y libres de contaminación microbiana (hongos y bacterias) a los 15 y 30 días de crecimiento en condiciones in vitro.

En la etapa de multiplicación, se logró determinar que para la variable altura de los explante de *Bertholletia excelsa* se encontraron diferencias significativas en el tratamiento de WPM 50% por efecto de las diferentes concentraciones de sucrosa.

En cuanto a la respuesta de los Explantes de *Bertholletia excelsa*, a la generación de nudos, en la etapa de multiplicación encontramos diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el mejor, el medio WPM 50% a una concentración de 30 g/L, de sucrosa, con un promedio de 2.7 de nudos y 1.6 por Explantes

Con respecto a la variable número de hojas de los Explantes de *Bertholletia excelsa* no se han encontrado diferencias significativas entre los tratamientos tanto para WPM al 50 % y al 100%

## Agradecimientos e información de financiamiento

Los autores reconocen el apoyo financiero del Proyecto Concytec – Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia (contrato número 168-2018).

## Contribución de autoría

Henry Robles Cueva, co-investigador y responsable de la ejecución del diseño experimental. Francisco Román-Dañobeytia, investigador principal y coordinador de las actividades científicas. Jose Luis Rafael Quille, tesista y apoyo en la investigación del proyecto. Cesar Enrique Álvarez Sanchez, co-Investigador y responsable del equipamiento, compra de medios e insumos, asesoramiento en la ejecución de las tesis del proyecto. Nelson Leopoldo Meléndez Ascaño, co-investigador y responsable del equipamiento, compra de medios e insumos, asesoramiento en la ejecución de las tesis del proyecto. Renzo André De la Peña Lavander, responsable del Laboratorio de Micropropagación vegetal y responsable del análisis estadístico. Olegario Robles Cueva, responsable técnico de la ejecución del protocolo de micropropagación de castaña.

### Conflictos de interés

Ningún conflicto de interés fue reportado por los autores.

### Referencias bibliográficas

- Anis M, Ahmad N. (2016). Plant tissue culture: propagation, conservation and crop improvement. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1917-3>
- Arias, E., & Rondón, J. (2010). Manejo Forestal de *Bertholletia excelsa* HBK (castaña o nuez de Brasil). *Revista Forestal Latinoamericana*, 25(1), 93-113. <https://bit.ly/3xndGLN>
- Alonso A, Beltrán M, Gelvez J, Martínez J. (2020). Evaluación de dos protocolos de desinfección para el establecimiento in vitro de portainjertos de aguacate (*Persea americana*) var. criollo. *En II Simposio Nacional de Investigación Ciencias Pecuarias y Agroempresariales*, La Dorada, Caldas. <https://bit.ly/3KaxKbO>
- Borges, M.; Portales, S.; Malaurie, B. (2008). Efectos de diferentes concentraciones de sacarosa en el cultivo in vitro de coco (*Cocos nucifera* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 111-119. <https://bit.ly/3l2FaLB>
- Brand, M. H. (1993). Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35(3), 203-209. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00037271>

- Brondani G, Hansel F, Dutra L, Wendling I. 2010. Desinfestação e meio de cultura para o estabelecimento in vitro de segmentos nodais de *Liquidambar styraciflua*. *Floresta*, 40(3): 541-554. <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v40i3.18916>
- Carrión A, Tapia M. 2019. Yield of five potato varieties in Temporary Immersion Bioreactors. *Peruvian Journal of Agronomy*. 3, 24-28. <https://doi.org/10.21704/pja.v3i1.1281>
- Chalupa, V. (1993). Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture. In *Annales des sciences forestières*. 50, Supplement 1, 295s-307s. <https://hal.science/hal-00882901/document>
- Ferro Mauricio, R. D. (2021). Conservación de oca (*Oxalis tuberosa*) bajo condiciones in vitro y corroboración de la estabilidad genética. [Tesis de Biólogo, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <http://bit.ly/3RVdJry>
- Figueiredo, F. J. C., & de Carvalho, C. J. R. (2002). Aspectos fisiológicos de sementes de castanha-do-brasil submetidas a condições de estresse: emergência e respiração. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. <https://bit.ly/3K6klfe>
- Fry, J.C. (1993). *Biological Data Analysis: a practical approach*. Oxford University Press.
- George, E. (1993). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer.
- Grout, B. W. V. (1991, April). Conservation in vitro. *International Symposium on Plant Biotechnology and its Contribution to Plant Development, Multiplication and Improvement*, 289, 171-178.
- Hiti-Bandaralage J, Hayward A, Mitter N. 2017. Micropropagation of Avocado (*Persea americana* Mill.). *American Journal of Plant Sciences*. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.811197>
- Karunaratne, S. 1989. Informe sobre el cultivo de embriones del cocotero enano. En: *Information Express*. CIDA 13 (3).
- Lloyd, G., & McCown, B. (1981). Woody Plant Medium: A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience*, 16, 453.
- MINAM, 2014. La castaña Amazónica regalo de la biodiversidad. Sistematización de experiencias de investigación y manejo de castaña (*Bertholletia* <https://doi.org/10.54353/ritp.v3i2.e002>

ex<https://repositoriodigital.minam.gob.pe/handle/123456789/768>) en ecosistemas de terrazas altas en el departamento de Madre de Dios. <https://repositoriodigital.minam.gob.pe/handle/123456789/768>

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://bit.ly/3RSAe0l>

OSINFOR (Organismo de Supervisión de los Recursos Forestales y de Fauna Silvestre). (2018). Aprovechamiento Forestal Maderable en Concesiones de Castaña. Lima, Perú. <http://bit.ly/3K6Oqkw>

Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(3), 242-257.

Ramos Robles, L. M. (2018). Influencia del régimen de perturbación de los bosques con castaña en la calidad de las semillas y el vigor de las plántulas de Castaña (*Bertholletia excelsa* HBK) en Madre De Dios, 2018. <http://repositorio.unamad.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14070/328/004-2-3-064.pdf?sequence=1>

Rache, L. & Pacheco, J. 2012. Establecimiento de un protocolo de propagación de *Physalis peruviana* L. a partir de yemas axilares adultas. *Ciencia en Desarrollo*. 4(1). <https://doi.org/10.19053/01217488.477>

Roca, W., & Mroginski, L. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. <http://bit.ly/3E0Ae8E>

Rockwell, C. A., Guariguata, M. R., Menton, M., Arroyo Quispe, E., Quaedvlieg, J., Warren-Thomas, E., ... & Yucra Salas, J. J. (2015). Nut production in *Bertholletia excelsa* across a logged forest mosaic: implications for multiple forest use. *PLoS One*, 10(8), e0135464. <https://bit.ly/3xkeOzF>

Withers, L. A. (1991). 4. In-vitro conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 43(1), 31-42.