

UNIVERSIDAD DE HUANUCO
FACULTAD DE INGENIERIA
PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERIA AMBIENTAL



TESIS

**“Recuperación y conservación del Echinopsis Cuzcoensis
(Cactaceae) mediante el proceso de micropropagación in vitro,
Huánuco 2020”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA
AMBIENTAL**

AUTORA: Godoy Benancio, Lubyenca Melanie

ASESOR: Calixto Vargas, Simeón Edmundo

HUÁNUCO – PERÚ

2023

U

TIPO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN:

- Tesis (X)
- Trabajo de Suficiencia Profesional ()
- Trabajo de Investigación ()
- Trabajo Académico ()

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN: Modelación, análisis y control de la contaminación ambiental

AÑO DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN (2018-2019)

CAMPO DE CONOCIMIENTO OCDE:

Área: Ingeniería, Tecnología

Sub área: Biotecnología ambiental

Disciplina: Biotecnología ambiental

DATOS DEL PROGRAMA:

Nombre del Grado/Título a recibir: Título

Profesional de Ingeniera ambiental

Código del Programa: P09

Tipo de Financiamiento:

- Propio (X)
- UDH ()
- Fondos Concursables ()

DATOS DEL AUTOR:

Documento Nacional de Identidad (DNI): 71782259

DATOS DEL ASESOR:

Documento Nacional de Identidad (DNI): 22471306

Grado/Título: Maestro en administración de la educación

Código ORCID: 0000-0002-5114-4114

DATOS DE LOS JURADOS:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES	GRADO	DNI	Código ORCID
1	Jacha Rojas, Johnny Prudencio	Maestro en ingeniería de sistemas e informática con mención en: gerencia de sistemas y tecnologías de información	40895876	0000-0001-7920-1304
2	Cámara Llanos, Frank Erick	Maestro en ciencias de la salud con mención en: salud pública y docencia universitaria	44287920	0000-0001-9180-7405
3	Torres Marquina, Marco Antonio	Ingeniero metalurgista	22514557	0000-0003-4006-7683

D

H



UNIVERSIDAD DE HUÁNUCO

Facultad de Ingeniería

PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERÍA AMBIENTAL

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO(A) AMBIENTAL

En la ciudad de Huánuco, siendo las 15:00 horas del día 25 del mes de agosto del año 2023, en cumplimiento de lo señalado en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad de Huánuco, se reunieron el sustentante y el **Jurado Calificador** integrado por los docentes:

- Mg. Johnny Prudencio Jacha Rojas (Presidente)
- Mg. Frank Erick Cámara Llanos (Secretario)
- Ing. Marco Antonio Torres Marquina (Vocal)

Nombrados mediante la **Resolución N° 1707-2023-D-FI-UDH**, para evaluar la Tesis intitulada: **"RECUPERACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL Echinopsis cuzcoensis (Cactaceae) MEDIANTE EL PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN IN VITRO, HUÁNUCO 2020"**, presentado por el (la) Bach. **GODOY BENANCIO, LUBYESCA MELANIE**, para optar el Título Profesional de Ingeniero(a) Ambiental.

Dicho acto de sustentación se desarrolló en dos etapas: exposición y absolución de preguntas: procediéndose luego a la evaluación por parte de los miembros del Jurado.

Habiendo absuelto las objeciones que le fueron formuladas por los miembros del Jurado y de conformidad con las respectivas disposiciones reglamentarias, procedieron a deliberar y calificar, declarándolo(a) **APROBADA**..... por **UNANIMIDAD** con el calificativo cuantitativo de **18**..... y cualitativo de **Muy BUENO**..... (Art. 47)

Siendo las **14:28** horas del día **25**..... del mes de **AGOSTO**..... del año **2023**....., los miembros del Jurado Calificador firman la presente Acta en señal de conformidad.

Mg. Johnny Prudencio Jacha Rojas
ORCID: 0000-0001-7920-1304
Presidente

Mg. Frank Erick Cámara Llanos
ORCID: 0000-0001-9180-7405
Secretario

Ing. Marco Antonio Torres Marquina
ORCID: 0000-0003-4006-7683
Vocal



UNIVERSIDAD DE HUÁNUCO

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

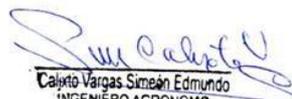
Yo, Simeón Edmundo Calixto Vargas, asesor(a) del PA de Ingeniería Ambiental y designado(a) mediante documento: RESOLUCION N°619-2017-D-FI-UDH de fecha 11 de setiembre de 2017 del Bach. **Lubyenca Melanie GODOY BENANCIO**, de la investigación titulada “RECUPERACION Y CONSERVACION DEL (*Echinopsis cuzcoensis* (*Cactaceae*) MEDIANTE EL PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN IN VITRO, HUÁNUCO 2020”

Puedo constar que la misma tiene un índice de similitud del 23% verificable en el reporte final del análisis de originalidad mediante el Software Antiplagio Turnitin.

Por lo que concluyo que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio y cumple con todas las normas de la Universidad de Huánuco.

Se expide la presente, a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Huánuco, 18 de Setiembre del 2023



Calixto Vargas Simeón Edmundo
INGENIERO AGRONOMO
Reg. CIP N° 32739

Calixto Vargas, Simeón Edmundo

DNI N° 22471306

Código ORCID: 0000-0002-5114-4114

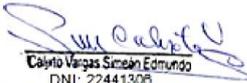
TESIS

INFORME DE ORIGINALIDAD

23%	23%	4%	7%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.udh.edu.pe Fuente de Internet	2%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
3	bdigital.dgse.uaa.mx:8080 Fuente de Internet	1%
4	repositorio.unesum.edu.ec Fuente de Internet	1%
5	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	repositorio.chapingo.edu.mx Fuente de Internet	1%
7	biblioteca.usac.edu.gt Fuente de Internet	1%
8	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
9	repositoriosdigitales.mincyt.gov.ar Fuente de Internet	<1%


Cayito Vargas Simón Edmundo
DNI: 22441308
ORCID:0000-0002-5114-4114

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis amados padres Katia y Luis y a mis hermanos Yharemi y Jared, por la motivación constante por ver cumplir mis metas y su apoyo permanente durante la elaboración de esta tesis.

En memoria de mi querido papá Oswaldo Benancio, mi gran mentor y magnífico abuelo gracias por siempre haber creído en mí, por motivarme a descubrir y construir nuevos horizontes, a enseñarme a vivir sin miedo y resistir los golpes de la vida. Fuiste participe desde el inicio de este proyecto, esta investigación es tanto tuya como mía, papá. Gracias por todo Pali

A mi mamá Natividad Borda, mi grandiosa segunda mamá, por ser mi ejemplo para salir adelante, por quererme tanto y apoyarme en todas mis aventuras y sueños, sobre todo los últimos días antes de ésta sustentación por las traspasadas que pasaste a mi lado.

A mi tío Ever Goñez que me brindó siempre su apoyo y cariño incondicional, siempre orgulloso de sus sobrinos, ejemplo de esfuerzo y dedicación.

A mis dos abuelos, mis padres y mis tíos por estar brindándome sus consejos, me encaminaron en dones con ejemplos y virtudes, fueron mi inspiración y motivación para esforzarme en este camino de ser investigador y profesional, este enorme logro se los dedico a ustedes.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad de Huánuco por ser una institución identificada con la investigación peruana y por las facilidades que ofrece para la mejora de la calidad educativa.

A mi asesor Ingeniero Simeón Edmundo Calixto Vargas por la orientación y apoyo en la presentación de esta tesis.

A mi coasesor el Biólogo Alejandro Duran Nieva, por haberme permitido la realización de la investigación en su laboratorio de Microbiología por sus sabias enseñanzas y su motivación constante en la finalización de esta investigación.

Gracias a los miembros del jurado que me apoyaron dándome sugerencias, observaciones en el desarrollo y finalización de esta investigación.

A mi familia, que soportó indirectamente este difícil pero grato camino que todo investigador debe recorrer.

Finalmente, a los maestros, aquellos que me inspiraron y marcaron mi futuro durante mi etapa universitaria, y que me ayudaron asesorándome y resolviendo dudas presentadas en el desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO	III
ÍNDICE.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	IX
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	XIV
CAPÍTULO I.....	15
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	15
1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	15
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	17
1.2.1. PROBLEMA GENERAL.....	17
1.2.2. PROBLEMAS ESPECÍFICOS	17
1.3. OBJETIVOS	17
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	17
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
1.4. JUSTIFICACIÓN	18
1.5. LIMITACIONES.....	20
CAPÍTULO II.....	21
MARCO TEÓRICO	21
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	21
2.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES	21
2.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES	25
2.1.3. ANTECEDENTES LOCALES	31
2.2. BASES TEÓRICAS.....	32
2.2.1. ORIGEN DE LAS CACTÁCEAS	33
2.2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	34
2.2.3. IMPORTANCIA.....	35
2.2.4. PROBLEMAS DE LAS CACTÁCEAS EN EL PERÚ.....	35
2.2.5. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA.....	36

2.2.6.	DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL ECHINOPSIS CUZCOENSIS	
	37	
2.2.7.	CARACTERÍSTICAS	37
2.2.8.	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL ECHINOPSIS CUZCOENSIS	41
2.2.9.	PROPAGACIÓN DEL ECHINOPSIS CUZCOENSIS.....	41
2.2.10.	MICROPROPAGACIÓN VEGETATIVA POR CULTIVO DE TEJIDO IN VITRO	43
2.2.11.	REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL.....	45
2.2.12.	PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN	45
2.3.	DEFINICIONES CONCEPTUALES.....	56
2.4.	FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS.....	58
2.4.1.	HIPÓTESIS GENERAL.....	58
2.4.2.	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	58
2.5.	VARIABLES	59
2.5.1.	VARIABLE DEPENDIENTE	59
2.5.2.	VARIABLE INDEPENDIENTE	59
2.6.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	60
	CAPÍTULO III.....	61
	METODOLOGÍA	61
3.1.	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN	61
3.1.1.	ENFOQUE	61
3.1.2.	DISEÑO METODOLÓGICO	61
3.2.	POBLACIÓN Y MUESTRA	62
3.2.1.	POBLACIÓN.....	62
3.2.2.	MUESTRA Y MÉTODO DE MUESTREO	62
3.3.	RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	63
3.3.1.	TÉCNICA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS	63
3.3.2.	TÉCNICA PARA EL ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS	64
	CAPÍTULO IV.....	65
	RESULTADOS.....	65
4.1.	RESULTADOS DESCRIPTIVOS	65
4.2.1.	RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN 1	67

4.2.2.	RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN 2	71
4.2.3.	RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN 3	78
4.3.	RESULTADOS INFERENCIALES.....	85
4.3.1.	CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS GENERAL.....	85
4.3.2.	CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS ESPECÍFICA	85
CAPÍTULO V.....		89
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....		89
5.1.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	89
CONCLUSIONES		93
RECOMENDACIONES.....		95
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		96
ANEXOS.....		99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Ubicación Taxonómica	36
Tabla 2 Composición del medio de cultivo Murashige Skoog	52
Tabla 3 Composición del medio de cultivo Murashige Skoog y concentraciones de los suplementos	52
Tabla 4 Operacionalización de variables	60
Tabla 5 Procedimiento de desinfección para los explantes	67
Tabla 6 Causas de Mortandad de explantes	67
Tabla 7 Evaluación de la sobrevivencia y crecimiento de los 3 tratamientos en función al Medio de Cultivo	69
Tabla 8 Total de sobrevivencia en función a tipo Medio de Cultivo	71
Tabla 9 Análisis de Sobrevivencia en función al Tipo de Cultivo	72
Tabla 10 Resumen del modelo	72
Tabla 11 Medias	72
Tabla 12 Diferencia de Medias de sobrevivencia entre grupos por pareja ...	73
Tabla 13 Comparaciones de Tukey para Análisis de Sobrevivencia	74
Tabla 14 Prueba de rangos múltiples de LSD de Fisher.....	75
Tabla 15 Total de Crecimiento en función a tipo Medio de Cultivo.	78
Tabla 16 Análisis del crecimiento en función al Tipo de Cultivo	79
Tabla 17 Resumen del Modelo	79
Tabla 18 Medias	79
Tabla 19 Diferencia de Medias de crecimiento entre grupos por pareja	80
Tabla 20 Comparaciones de Tukey para Análisis de Crecimiento.....	81
Tabla 21 Prueba de rangos múltiples de LSD de Fisher.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Echinopsis Cuzcoensis	38
Figura 2 Flor del Echinopsis Cuzcoensis	39
Figura 3 Cuadro Resumen de Tratamientos	66
Figura 4 Porcentaje de contaminación microbiana después de 10 días en cada tratamiento	68
Figura 5 Índice de Confianza Simultáneos de 95% para T1, T2, T3.....	74
Figura 6 Índice de confianza Individual de 95% para T1, T2, T3	75
Figura 7 Gráfica de Intervalos para T1, T2, T3.	76
Figura 8 Valores Individuales de T1, T2, T3.	76
Figura 9 Caja de T1, T2, T3.....	77
Figura 11 Índice de confianza Individual de 95% para T1, T2, T3	82
Figura 12 Gráfica de Intervalos para T1, T2, T3	83
Figura 13 Valores Individuales de T1, T2, T3.	83
Figura 14 Caja de T1, T2, T3.....	84
Figura 15 Ubicación satelital del proyecto	104

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1 Área de recolección de plantas donantes.....	105
Fotografía 2 Materiales que se utilizaron en el Laboratorio	105
Fotografía 3 Materiales para la cámara de fotoperiodo	106
Fotografía 4 Componentes para preparar el Medio de Cultivo (Agar-agar, Sacarosa, MS)	106
Fotografía 5 Preparación de la planta donadora Echinopsis Cuzcoensis (Desinfección).....	107
Fotografía 6 Preparación de la planta donadora (Desinfección y corte de púas).....	107
Fotografía 7 Medición de las concentraciones en gramos para Sacarosa..	108
Fotografía 8 Medición de las concentraciones en gramos para Agar-Agar	108
Fotografía 9 Medición del Ph para el Medio de Cultivo.....	109
Fotografía 10 Aforando con agua destilada el Medio de Cultivo a 1000ml.	109
Fotografía 11 Diluyendo el Agar con ayuda de un mechero	110
Fotografía 12 Llenamos los recipientes con el Medio de cultivo según la dosificación establecida en la cámara de flujo	110
Fotografía 13 Esterilizamos en la autoclave	111
Fotografía 14 Dejamos enfriar unos minutos	111
Fotografía 15 Dejamos reposar 3-4 días, para seguir con la introducción vegetal	112
Fotografía 16 Medio de cultivo listo para utilizarse	112
Fotografía 17 Preparación del laboratorio con materiales para la incrustación de areolas en los medios de cultivo	113
Fotografía 18 Limpieza de la cámara de fotoperiodo.....	113
Fotografía 19 Preparación de la planta donadora.....	114
Fotografía 20 Desinfección y asepsia después del corte de púas	114
Fotografía 21 Preparación para la extracción de areolas del Echinopsis Cuzcoensis	115
Fotografía 22 Extracción de las areolas del Echinopsis Cuscoensis (planta donadora)	115
Fotografía 23 Extracción de las aréolas realizada en un ambiente estéril, dentro de la cámara de flujo	116

Fotografía 24 Corte de los segmentos nodales	116
Fotografía 25 Aréolas listas para la desinfección.....	117
Fotografía 26 Lavado previo de las aréolas	117
Fotografía 27 Materiales Desinfectantes	118
Fotografía 28 Es fundamental realizar un enjuague con agua destilada para eliminar cualquier residuo de desinfectante o impurezas	118
Fotografía 29 Limpieza con etanol.....	119
Fotografía 30 Limpieza con agua destilada para eliminar residuos de etanol u otro componente	119
Fotografía 31 Proceso de oxidación con el uso de etanol, las areolas se tornaron amarillentas	120
Fotografía 32 Corte de partes dañadas	120
Fotografía 33 Segundo desinfectante peróxido de hidrogeno(agua oxigenada)	121
Fotografía 34 Efecto de desinfección del Agua oxigenada	121
Fotografía 35 Enjuagamos con agua destilada dos o tres veces para eliminar residuos del desinfectante	122
Fotografía 36 Tercer desinfectante: cloro comercial	122
Fotografía 37 Cortamos partes dañadas en la placa Petri.....	123
Fotografía 38 Proceso de incrustación del medio vegetal	123
Fotografía 39 Se toma dos areolas para cada medio de cultivo y se descarta aquellas dañadas.....	124
Fotografía 40 Areola incrustada.....	124
Fotografía 41 Se guarda cuidadosamente para llevar a la cámara de crecimiento.....	125
Fotografía 42 Los medios de cultivo deben mantenerse en oscuridad por alrededor de 24 horas.....	125
Fotografía 43 Grupo T1, T2 en la cámara de fotoperiodo	126
Fotografía 44 Cámara de crecimiento: temperatura de 25°C grados, con luz durante 16 horas y oscuridad de 8 horas.....	126
Fotografía 45 Primer tratamiento con posible contaminación	127
Fotografía 46 Aparente Necrosis y contaminación en el medio de cultivo ..	127
Fotografía 47 Explante contaminado	128
Fotografía 48 Areolas del tratamiento T3, se ve aparente crecimiento.....	128

Fotografía 49 Areola de T3 con pequeñas pelusillas en su interior (crecimiento positivo)	129
Fotografía 50 Pequeños brotes en las areolas, Tratamiento t3	129
Fotografía 51 Brotes positivos de crecimiento	130
Fotografía 52 Brotes estables	130

RESUMEN

La presente investigación sobre la Recuperación y conservación del *Echinopsis Cuzcoensis* (*Cactaceae*) mediante el proceso de micropropagación in vitro, Huánuco 2020, se realizó en la ciudad de Huánuco, distrito de Amarilis, en el laboratorio de Microbiología del Hospital Carlos Showing Ferrari. El objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia del proceso de micropropagación in vitro para la recuperación y conservación del *Echinopsis Cuzcoensis*. El presente informe final describe el diseño experimental que se llevó a cabo con el uso del medio de cultivo de Murashige y Skoog, al cual se le añadieron diversas concentraciones de reguladores de crecimiento y hormonas, MS-0 solo con regulador de crecimiento (7.5 g L⁻¹), MS-Sacarosa con regulador de crecimiento y sacarosa (30 g L⁻¹), MS-Fitohormona con regulador de crecimiento y fitohormona (4.3 g L⁻¹). En tal sentido como población de estudio tenemos a la cactácea *Echinopsis cuzcoensis* o *Echinopsis Huanucoensis* a través de sus explantes, se consideraron 3 tratamientos, cada uno con 6 repeticiones por tratamiento (18 tubos de ensayo, un tubo como unidad experimental), más 1 testigo por tratamiento; donde se observó la respuesta de la activación de aréolas. Esta investigación se realizó en 4 fases, la primera la elección del *Echinopsis Cuzcoensis* según su categoría en el Apéndice II (CITES) y por ser endémica. La segunda fase fue el protocolo de propagación en la preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog. La tercera fase un protocolo de desinfección y asepsia de los explantos previo a la introducción en el medio. La fase final fue el establecimiento in vitro, bajo condiciones asépticas. Los resultados del seguimiento de los tratamientos posteriores a las 6 semanas de la incubación, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el promedio de crecimiento y supervivencia por explante entre los grupos. obteniendo del T1 (MS-0) 0% de sobrevivencia de los explantes, y con la prueba de Tukey y Fisher se estableció que los tratamientos presentaron diferencia significativa, en cuanto al promedio de brotes por explante y mediante las pruebas se estableció que los Tratamientos T2 (MS-Aditivo) 83.3% de sobrevivencia y T3 (MS-Fitohormona) 100% de sobrevivencia, no muestran diferencia significativa. Dando como resultado que la propagación in vitro con aditivo y fitohormona del *Echinopsis Cuzcoensis/ Huanucoensis* contribuye a la recuperación. Obteniendo de 18 unidades experimentales un total de 11 ejemplares sobrevivientes, el que representa un 61.11% de sobrevivencia. Y de estos un total de 5 ejemplares mostraron crecimiento, representando un 45.45% de crecimiento del total de ejemplares vivos.

Palabras claves: Areolas, explante, cactácea, micropropagación, endémico.

ABSTRACT

The present research on the Recovery and conservation of *Echinopsis Cuzcoensis* (Cactaceae) through the in vitro micropropagation process, Huanuco 2020, was carried out in the city of Huánuco, Amarilis district, in the Microbiology laboratory of Carlos Showing Ferrari Hospital. The objective of this research was to evaluate the influence of the in vitro micropropagation process for the recovery and conservation of *Echinopsis Cuzcoensis*. This final report describes the experimental design that was carried out using Murashige and Skoog culture medium, to which various concentrations of growth regulators and hormones were added, MS-0 only with growth regulator (7.5 g L⁻¹), MS-Sucrose with growth regulator and sucrose (30 g L⁻¹), MS-Phytohormone with growth regulator and phytohormone (4.3 g L⁻¹). In this regard, the study population consists of the cactus *Echinopsis cuzcoensis* or *Echinopsis Huanucoensis* through its explants. Three treatments were considered, each with six repetitions per treatment (18 test tubes, one tube as an experimental unit), plus one control per treatment, where the response of areola activation was observed. This research was carried out in four phases. The first phase was the selection of *Echinopsis Cuzcoensis* based on its category in Appendix II (CITES) and for being endemic. The second phase was the propagation protocol in the preparation of the Murashige and Skoog culture medium. The third phase was a disinfection and asepsis protocol for the explants before introduction into the medium. The final phase was in vitro establishment under aseptic conditions. The results of the monitoring of the treatments after six weeks of incubation showed significant differences ($p < 0.05$) in the average growth and survival per explant among the groups. From T1 (MS-0), 0% survival of the explants was obtained, and with the Tukey and Fisher tests, it was established that the treatments showed a significant difference in the average number of shoots per explant. The tests established that Treatments T2 (MS-Additive) with 83.3% survival and T3 (MS-Phytohormone) with 100% survival showed no significant difference. As a result, the in vitro propagation with additive and phytohormone of *Echinopsis Cuzcoensis/Huanucoensis* contributes to recovery. Out of 18 experimental units, a total of 11 surviving specimens were obtained, representing a 61.11% survival rate. And out of these, a total of 5 specimens showed growth, representing a 45.45% growth rate of the total living specimens.

Keywords: Areolas, explant, cactus, micropropagation, endemic.

INTRODUCCIÓN

El *Echinopsis Cuzcoensis* o *Echinopsis Huanucoensis* es una especie endémica de la zona de Perú, se encuentra principalmente en Cuzco y Huánuco, tiene una similitud con el *Echinopsis peruviana*, también conocida como Antorcha peruana, se confunden con frecuencia sobre todo porque ambos crecen en la misma zona, originariamente se encuentra en zonas altas y lluviosas del Perú, así mismo puede sobrevivir semanas sin agua y hasta temperaturas de hasta -9° C.

Esta cactácea se propaga de forma natural por semillas, sin embargo, la tasa de germinación es baja, y en su ambiente natural el crecimiento es lento por su mismo metabolismo natural, la micropropagación viene siendo una alternativa para contrarrestar estas desventajas.

Actualmente en el Perú las cactáceas vienen siendo afectadas respecto a la deforestación, colección de cactus, saqueo, uso chamanístico, dado que esta especie está seriamente amenazada y en peligro de extinción, es crucial encontrar una metodología que permita reproducirla a gran escala y en el menor tiempo posible utilizando el material seleccionado.

A partir de estos problemas identificados la investigación se orienta en nuevos enfoques, como es de buscar otras alternativas de propagación del *Echinopsis Cuzcoensis*, la investigación busca un método de multiplicación in vitro capaz de poder propagarlas, a partir de las areolas con el fin de encontrar un protocolo eficaz para la micropropagación del *Echinopsis Cuzcoensis* y así contribuir a su conservación y recuperación de la especie.

CAPÍTULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

La familia de las cactáceas tiene su origen en el continente americano. Encontramos alrededor de 2000 especies, situadas en el continente desde el norte de Canadá hasta la Patagonia, y desde el nivel del mar en dunas costeras, hasta 5100 msnm en nuestro país (Jiménez-Sierra, 2011). Sin embargo, y a pesar de este supuesto bienestar en cuanto a su número de especies y a su distribución geográfica, se encuentra altamente amenazada debido a diversas actividades antropogénicas que están causando la degradación de las poblaciones de cactáceas. Dichas intervenciones de la mano del hombre se hacen patentes, por ejemplo, la pérdida de su hábitat debido a la construcción de viviendas, saqueo ilegal o la introducción de especies exóticas (Meza-Rangel, 2014).

A ello se suma el hecho de que el alto endemismo en las especies de cactáceas, el lento crecimiento y la alta especificidad ecológica de sus poblaciones, siga siendo un misterio para muchos investigadores. Lo que no quita, que lo antes mencionado sea algunas de las causas de que muchas poblaciones y especies se encuentren en riesgo de extinción, a consecuencia de la actividad humana como su proceso natural de vida. (Jiménez-Sierra, 2011).

Ante esta problemática, es importante destacar que son pocos los laboratorios de ecología de comunidades que llevan a cabo proyectos piloto para la propagación y conservación de cactáceas, que consisten básicamente en establecer mejoras en las condiciones de germinación de semillas y crecimiento de plántulas; esto los hará mucho más productivos y aumentará su eficiencia.

Por otra parte, en nuestro país, actualmente la conservación de las cactáceas resulta ser un tema irrelevante y casi sin importancia, no le toman interés a pesar de ser un tema importante de biodiversidad biológica, sobre todo en función a los procesos naturales, físicos y biológicos; como también

de importancia en el proceso económico, social y cultural, siendo pilares para poder conservar esta especie. Por lo que no debería sorprender a nadie que nuestros países vecinos comiencen a tomarnos la delantera en materia de su cultivo.

Asimismo, cabe destacar que en nuestra región existen innumerables tipos de cactáceas nativas, como el *Echinopsis Cuzcoensis* o *Echinopsis Huanucoensis*, endémica de Huánuco. No podemos dejar de mencionar que somos privilegiados en contar con una amplia variedad de cactáceas nativas, pero estas se encuentran en la Cites en grado de amenaza, ello debido a problemas ambientales causados por: la deforestación de suelos por cultivos ilícitos, las actividades de minería formal e informal, la agricultura tradicional, construcción de carreteras y otros. Naturalmente, todos estos aspectos negativos para las cactáceas nativas, contribuyen con la disminución del área de ocupación, lo que ocasiona, asimismo, la disminución del taxón.

El panorama se torna aún más sombrío para ésta cactácea ya que nuestra región no se ha propuesto ni se realiza ningún plan o medida para restaurar el material vegetal nativo bajo condiciones fitosanitarias. Demostrando así la indiferencia de nuestras autoridades para el cultivo de las cactáceas nativas. Es bien sabido que las cactáceas generalmente tienen un crecimiento natural lento y su desarrollo se ve afectado por la actividad humana. Por ello la biotecnología vegetal nos brinda la posibilidad de disminuir la pérdida de su biodiversidad genética, realizando protocolos según el tipo de especie, enfatizando en aquellas plantas que se encuentran amenazadas, por lo que debería ser una prioridad en nuestra región (Castro et al. 1993).

En base a todo lo señalado podemos estar seguros de que realizar la implementación de la micropropagación in vitro, con fines de recuperación y conservación del *Echinopsis Cuzcoensis*, esto nos permitirá investigar, explorar, descubrir y proponer alternativas que refuercen el sistema de propagación convencional de nuestros cactus; por cuanto es a todas luces relevante el preservar las especies nativas de la región, para obtener un material vegetativo de buena calidad genética y fitosanitaria.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1. PROBLEMA GENERAL

¿Cómo el proceso de micropropagación in vitro influye en la recuperación y conservación del Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020?

1.2.2. PROBLEMAS ESPECÍFICOS

- ¿Se puede desarrollar un proceso de preparación eficiente de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, bajo condiciones controladas, Huánuco, 2020?
- ¿Se puede desarrollar un proceso de micropropagación en concentraciones que favorezcan el porcentaje de desarrollo de los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020?
- ¿Se puede desarrollar la micropropagación mediante la activación de areolas en condiciones asépticas, para los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020?
- ¿Se puede determinar el porcentaje de sobrevivencia que se obtiene mediante la activación de areolas en el proceso de micropropagación de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar como el proceso de micropropagación in vitro influye en la recuperación y conservación del Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un proceso de preparación eficiente de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis bajo condiciones controladas, Huánuco, 2020.

- Desarrollar el proceso de micropropagación en concentraciones para el desarrollo de los explantes de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis*, Huánuco, 2020.
- Desarrollar la micropropagación mediante la activación de areolas en condiciones asépticas, para los explantes de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis*, Huánuco, 2020.
- Determinar el porcentaje de sobrevivencia que se obtiene mediante la activación de areolas en el proceso de micropropagación de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis*, Huánuco, 2020.

1.4. JUSTIFICACIÓN

La familia Cactaceae está constituida por 34 géneros y más de 255 especies, en nuestro país (Hunt, 1999). En Perú, estas plantas se distribuyen en casi todos los ecosistemas; así, desde el desierto costero, pasando por la vertiente occidental, punas, los valles de los andes hasta llegar al bosque tropical amazónico, por lo que tienen diferentes de adaptaciones, lo que hace posible que el Perú albergue una gran cantidad de tasa de géneros y especies endémicas distribuidas a lo largo del territorio (Calderón, 2003).

Se sabe que los cactus forman parte de la flora silvestre más representativa. En tal sentido, es bueno tener en cuenta de la importancia de su papel ecológico y de su capacidad de adaptación en ambientes extremos, característico de nuestra región. Por otra parte estas plantas son parte de nuestra tradición y cultura popular, por lo que es muy importante conservarla en su hábitat natural su extinción conllevaría a un empobrecimiento en la diversidad de comunidades, ya que sirve de alimento para muchos animales, como polinización por insectos, aves y murciélagos, contribuye en la conservación de suelos al evitar la erosión, considerando esto último muy importante, sobre todo si tenemos en cuenta el alto número de derrumbes y deslizamientos que se suscitan en la zona andina de nuestro país cada año, como consecuencia de la erosión producida por las lluvias estacionales. Con todos estos puntos positivos que tienen las cactáceas, causa preocupación es

que dichas plantas se encuentren incluidas en el “Apéndice II” de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres - CITES, por el alto valor comercial en el mercado internacional. (CITES).

Y a esto incluimos su belleza y exótica apariencia que al parecer paradójicamente será lo que le llevará a la extinción. Es este el panorama actual que presentan las cactáceas, con un 47 % en peligro de extinción y un sistema reproductivo lento en su entorno natural, incluso aquellos usados en la horticultura, que provienen de poblaciones silvestres en peligro de extinción, presentan un sistema deficiente de desarrollo, siendo su proceso de crecimiento lento, incluso toma muchos años poder reproducirlas (Bizberg, 2016, p.6).

En Perú, la exportación de muchas variedades de cactus silvestres está prohibida, excepto las flores seccionadas, y otros ejemplares que son utilizados en investigación y desarrollo científico, como también individuos obtenidos de forma controlada (artificialmente), siendo una medida que busca frenar la disminución de esta especie.(CITES, 2006) Pero pese a ello, los cactus afrontan riesgos significativos para su conservación, desde su propio metabolismo de lento crecimiento, y por actividades antropogénicas como lo son la apropiación de tierras para la agricultura y la acuicultura, su utilización industrial indiscriminada, el incremento de zonas residenciales y comerciales en áreas donde proliferan estas especies. A lo que se suma el comercio ilegal de plantas vivas y el comercio de semillas para la industria hortícola y colecciones privadas, impulsores todos ellos de su declive. (Godoy, 2019)

En tal sentido, cabe destacar esto es a causa que en nuestra región aún no hay investigación en temas de propagación in vitro, esta investigación constituye ser un punto de inicio para desarrollar y aplicar técnicas de cultivo in vitro en otras especies de cactus. Es por ello el interés de este proyecto la urgencia de realizar técnicas de micropropagación nuevas, las mismas que permitirán mejorar la calidad genética y fitosanitaria de la especie *Echinopsis Cuzcoensis*, nativa de la región y catalogada como especie Vulnerable según la CITES, Categorización DS 043- 2006-AG. Si las condiciones antes

señaladas se cumplen, se podrá, obtener en corto tiempo grandes cantidades de plantas, que contribuyan a la conservación y preservación de la especie, lo que a buen seguro garantizará la perdurabilidad de los recursos fitogenéticos por cultivo de tejidos vegetales, de modo que posteriormente puedan ser empleados eficazmente para otras especies o géneros de plantas.

1.5. LIMITACIONES

Esta investigación se refiere al proceso de Micropropagación in vitro del *Echinopsis Cuzcoensis* (*Cactaceae*), como toda investigación, presenta barreras que dificultan su culminación. A continuación, algunas de las principales limitaciones:

- La bibliografía local necesaria para la realización del proyecto no fue amplia, ya que el tema “micropropagación” aún es nuevo en nuestra región.
- La información publicada sobre esta especie de Cactácea es escasa, ello debido, al parecer, a que se ignora que está en peligro de extinción.
- La cactácea *Echinopsis Cuzcoensis* no se encuentra de manera silvestre en la región, por lo que se requirió viajar a distintos lugares en los que tenía noticias de que había evidencias de su crecimiento.
- Se requiere de un laboratorio que maneje los instrumentos, aparatos necesarios especializados para la realización de cultivo de tejidos vegetales de la especie *Echinopsis cuzcoensis* y seguir con los protocolos necesarios para conseguir condiciones de asepsia y fitosanitaria.
- Se puede propagar in vitro pero no todas las especies reúnen condiciones favorables para que funcione; algunas resultan, de hecho, incluso recalcitrantes. Lo que hace que cada especie requiera de métodos específicos.
- Infecciones o contaminación por hongos y bacterias en la fase inicial de la introducción de la plántula en el medio o durante la micropropagación, es el mayor problema en toda investigación de cultivos in vitro se pierde plantas potenciales ya que estas no resisten su presencia.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

Ordóñez (2003) en su tesis para obtener su licenciatura en Biología, denominado “Propagación in vitro de *Mammillaria voburnensis* Scheer. (Cactaceae)” Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. La investigación fue en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA). Realizó su investigación en dos etapas, primero seleccionó a la planta madre en este caso a *Mammillaria voburnensis* Scheer. Como especie a trabajar según sus características definidas, luego de recolectar los frutos de esta planta en el campo y realizar la germinación de sus semillas en condiciones in vitro, se efectuó de la siguiente manera:

Durante la fase inicial establecida de esta investigación el autor logró una tasa de germinación del 80% utilizando el (MS) de Murashige y Skoog, posterior a seis meses en invernadero las plántulas que tenían una altura aproximada de un centímetro fueron aprovechadas como material para producir los nuevos explantes.

En la segunda etapa, se indujo la formación de brotes axilares, para lo cual se compararon y evaluaron en 7 tratamientos con distintos componentes, incluyendo el medio de Murashige y Skoog (MS) como principal ingrediente, complementando con diferentes combinaciones y concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) y el testigo regulador de crecimiento.

Los últimos resultados estadísticos muestran que la cactácea *Mammillaria* requería una combinación particular de proteínas de citocinina, una concentración moderada de bencilaminopurina y auxina, y baja concentración de ácido naftalenacético para obtener brotes viables.

Para que la investigación de cultivos de tejidos in vitro sea viable, se requiere de la inducción de los brotes luego de la siembra, por ello en esta tesis se obtuvo una germinación del 80% de las semillas de *Mammillaria voburnensis* a los 22 días, para luego implantarlos en el medio MS suplementado con 0.1 mg/l de BAP + 0.01 mg/l de ANA induciendo así alrededor de 11 brotes viables por explante a los 60 días, siendo para el autor el método que más recomienda.

También recomienda realizar más investigaciones utilizando distintos reguladores de crecimiento, ya sea cinetina o 2-ip como citocininas y ácido indolbutírico como auxina, considerando la evaluación cualitativa y cuantitativa para evaluar la formación de brotes

Finalmente, el autor propone establecer un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales en la Escuela de su Universidad San Carlos de Guatemala, para promover la investigación de otras especies amenazadas y así velar por su importancia ecológica en términos de conservación o reintroducción de especies en sus hábitats naturales.

Avalos (2010) en su tesis de maestría, denominado "Cultivo y Propagación in vitro de Cactáceas de los géneros *Hylocereus* Y *Selenicereus*" realizado en la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes. El autor realizó una investigación con el objetivo de explotar racionalmente y mejorar a través de métodos biotecnológicos y propagación masiva in vitro de estas especies, realizó un protocolo para la desinfección e inoculación de los tejidos in vitro del *Hylocereus* y *Selenicereus*, el autor desarrolló el crecimiento vegetal probando los reguladores: CIN, 2Ip, TDZ, mT y BA probando el tipo de medio y porcentaje de componentes más óptima en la obtención de brotes, como ejemplar vegetal utilizó semillas del *Hylocereus undatus* y tejido vegetal de *Selenicereus validus*; el cual se estableció in vitro y desarrolló la propagación in vitro de estas especies por la activación de yemas axilares, obteniendo como resultados finales:

Durante la desinfección mediante un sistema de esterilización de las semillas de *H. undatus*, el medio MS resultó ser el más apropiado

para la germinar las semillas y el medio MS + 0.5mg/L BA fue el más favorecedor al crecimiento de las plántulas germinadas.

Se hizo un protocolo a través de la activación de areolas, diseñado y establecido para la propagación masiva, que resultó satisfactorio para ambas especies: *Hylocereus* y *Selenicereus* (Cactaceae).

Cuando se analizó estadísticamente los resultados, se demostró que el tratamiento más eficaz para la especie *H. undatus* fue la Metatopolina (mT) en una concentración de 1.5 mg/L

En cuanto para los Análisis Estadísticos para la especie *S. validus* se establece que el mejor tratamiento sobre él fue 2- isopentil-adenina (2iP) a una concentración de 1.0 mg/L y 1.5 mg/L; según las pruebas, se confirmó que para ambas especies no influye la forma con que se coloca el explante en el medio de cultivo sino la composición del medio de cultivo; por eso para el *S. validus* se obtuvo un promedio de 20 brotes por explante.

Para el enraizamiento del *H. undatus* el medio que presentó mejores resultados fue en el MS, logrando un 100% del crecimiento de raíces en los individuos utilizados, donde el 80% desarrollaron un sistema radical bueno. En condiciones de invernadero post prueba in vitro, la sobrevivencia de las plántulas llegó al 54% del total. Mientras que para enraizar las plántulas de *S. validus* el mejor medio fue MS, obteniendo un 99.5% de raíces sobre los explantes en los medios, en el invernadero (ex vitro) la sobrevivencia de las plántulas fue del 61% del total, de los cuales un 96% desarrollaron sistema radical bueno.

Acosta (2013) en su tesis de maestría, denominado "Propagación in Vitro y caracterización molecular de dos Cactáceas mexicanas Endémicas y Protegidas" Universidad Autónoma Chapingo, México. Realizó una investigación en dos cactáceas endémicas del estado de Querétaro, la *Mammillaria mathildae* y *Echinocactus grusonii* que están en peligro de extinción; para ello se aplicaron dos tratamientos de escarificación química a las dos especies ya mencionadas: ácido

clorhídrico concentrado y agua oxigenada por diferentes tiempos. Para la desinfección del *E. grusonii* fue expuesto en agua oxigenada por 3 minutos antes de sembrar las semillas; se emplearon algunas plantas germinadas in vitro para evaluar su capacidad de aclimatación, luego se llevó a cabo la formación de callos a partir de segmentos de plantas como explantes, para ambas plantas se utilizó los reguladores de crecimiento vegetal: Benciladenina (BA), Ácido Naftalenacético (ANA) o el Ácido 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4-D), los resultados finales fueron:

Previamente se había logrado la formación de brotes y una vez obtenidos se trabajó con los callos resultantes y se realizó la formación de brotes mediante organogénesis indirecta. La formación de brotes de *E. grusonii* se mejoró con los callos obtenidos del tratamiento con ANA 0.25 mg·L⁻¹ y tratados con 1.0 mg·L⁻¹ de zeatina (ZEA) obteniendo una media de 2.2 brotes por explante.

Para el *E. grusonii* los tratamientos de escarificación química (desinfección) con exposiciones cortas a ácido clorhídrico concentrado y agua oxigenada al 9 %, permitió acelerar la tasa y porcentaje de germinación, cuando se expuso a las semillas por 3 minutos en agua oxigenada al 9 %. Para *M. Mathildae*, el tratamiento aplicado no mostró aumento o disminución en la de germinación de las semillas

Las poblaciones generadas de ambas cactáceas mostraron un bajo nivel de polimorfismo genético, lo que significa que están amenazadas o en peligro de extinción.

Los métodos evaluados en la investigación brindan una buena alternativa para producir plantas mediante esta técnica, lo que reduce los factores de riesgo, y a su vez la importancia y urgencia de obtener el mismo conocimiento para el desarrollo y aplicación en otras cactáceas de diferentes países, y de crear estrategias de propagación para la conservación.

Bogado et al. (2016), en la tesis para optar el grado de ingenieros agrónomos, denominado “Uso de distintos desinfectantes superficiales

para el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Grevillea robusta*”; realizado en la Universidad Nacional de Rosario. El propósito de este trabajo analizar el empleo de diferentes desinfectantes superficiales en el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Grevillea robusta*. A. Cunn, ya que la contaminación microbiana especialmente por hongos y bacterias es un problema persistente que amenaza el correcto desarrollo de todas la técnicas in vitro en muchos laboratorios de todo el mundo. Por ello se probaron distintas soluciones de desinfectantes (hipoclorito de sodio, peroxosulfato ácido de potasio, peróxido de hidrogeno, y dos fungicidas, oxiclورو de cobre y carbendazim), en distintas concentraciones (de 0,5 a 10 g. L⁻¹) y tiempos de exposición (15, 30 o 60 minutos) con el objetivo de establecer un protocolo de desinfección efectiva para los segmentos nodales de *Grevillea* se utilizó los brotes de plantas conservadas en invernaderos. Los tejidos vegetales se cultivaron en un medio MS. Pasado los 28 días de realizado el cultivo, se evaluó los porcentajes de contaminación, oxidación y supervivencia de los tejidos. Pese a que todos los ensayos permitieron el establecimiento de los cultivos entre un 36,67± 5,77 y un 90,00± 10%; los resultados más positivos fueron obtenidos con un pre-tratamiento de desinfección con NaClO 0,25 g. L⁻¹ y Carbendazim 0,75 g. L⁻¹ por 15 minutos por lo que se consiguió un porcentaje más bajo de contaminación y efectos fitotóxicos en términos de oscurecimiento u oxidación de los tejidos, dentro de los límites.

2.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES

Ceroni et al. (2001), en el proyecto “Taxonomía, Ecología y Conservación Ex situ de las Cactáceas de Lima” Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, El proyecto fue realizado con el objetivo de fomentar la conservación ex situ de los cactus endémicos del Perú y también establecer un banco de germoplasma para futuras investigaciones relacionadas al tema, divulgaciones y reinsertar especies en peligro a sus hábitats naturales. En este contexto se realizó

la evaluación, registro y colección de especies de cactus en los valles del Chillón, Rímac, Lurín, Huaura y Pativilca, con el fin de conservarlas en el Jardín Botánico “Octavio Velarde Núñez” (cactáreo). De igual forma, se desarrollaron estudios taxonómicos del género *Haageocereus* para Lima y otros aún más específicos estudios taxonómicos y ecológicos en el cerro Umarcata y en la quebrada Orobel, en Santa Rosa de Quives, cuenca baja del río Chillón. Finalmente, esta investigación entrega conocimientos sobre los importantes avances obtenidos, en estudios taxonómicos, ecológicos y conservación ex situ.

De esta manera, el Jardín Botánico, el Laboratorio de Control Biológico y Ecología de Artrópodos y el Herbario Weberbauer que se encuentra en la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), y en apoyo con la Sociedad Peruana de Cactáceas y Suculentas (SPECS), desde el 2001 continuando ejecutando la investigación “Taxonomía, Ecología y Conservación Ex situ de las Cactáceas de Lima”, teniendo como finalidad: Determinar la taxonomía de especies y subespecies de cactáceas que se encuentren en los valles de Lima; identificarlas para determinar a que estas especies y subespecies pertenecen, realizando su descripción e ilustración.

Elaborar una colección clasificada de las cactáceas para el estudio botánico de Lima; acompañar la existencia de similitudes ecológicas, también la vegetación que se relaciona con las comunidades de la especie cactácea en Lima; establecer la situación de conservación y categorización; favorecer el desarrollo para conservar ex situ a las especies cactáceas peruanas en el cactáreo del Jardín Botánico de la UNALM, y realizar la construcción de un cactáreo en el Jardín Botánico de La Molina.

Organizaciones como esta ayudan a promover el cuidado de las cactáceas, la investigación y la protección de las plantas suculentas, fomentando la colaboración entre científicos, profesionales y público en general informando sobre su estado de conservación, uso racional de la especie e intercambiar ideas o información en general.

Del Castillo (2015) en sus tesis de investigación "Inducción del enraizamiento de vitro plantas de Croton Lechleri Muell Arg, en condiciones in vitro y ex vitro" Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. Como parte del proyecto, el autor recolectó plantas de sangre de grado en Pucallpa y en la segunda fase del proyecto, se realizó la introducción in vitro de la especie utilizando explantes de dos tipos: semillas recolectadas y explantes de yemas de tipo I, II, III, IV, el medio Murashige y Skoog MS se utilizó como insumo base y se le añadieron diversas concentraciones de hormonas y reguladores de crecimiento, posterior a esto se realizó ensayos preliminares .para las semillas, se siguió con un protocolo establecido de Donayre, que consiste en la desinfección y la introducción de las semillas en el medio MS, esto lo realizó cada mes introduciendo 50 semillas y evaluando sus resultados, se observó que de esta primera introducción las semillas no llegaron a completar el proceso de germinación como se esperaba.

Para las yemas apicales y axilares usaron el protocolo establecido de Ruiz (2003), para esta prueba utilizaron 75 explantes obteniendo resultados aceptables de un 72% de sobrevivencia, mientras que el restante murió por necrosis y contaminación. Con estos experimentos realizados previamente, se hizo también una prueba para evaluar el medio base y así diferenciar su desarrollo tanto en un medio líquido y sólido, los resultados de la prueba concluyeron que en el medio liquido se presentaron mejores resultados en comparación al sólido, contrastando los ensayos del autor De la Cruz que determinaba que el medio sólido permite una mejor formación de callos a diferencia de un medio líquido. En base a esos ensayos previos realizaron las fases siguientes de desinfección, multiplicación, enraizamiento, aclimatación, enraizamiento ex vitro. En su estudio, el investigador utilizó un diseño aleatorio con un nivel del 0.05 de significancia y se compararon las medias de los tratamientos mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%. El resultado final para el proceso de desinfección determinó que se obtuvo mejores resultados en el Tratamiento 3 y Tratamiento 4 en comparación al método de Donayre (2002) los brotes se desinfectaron, obteniendo 31.43% de mortandad de los explantes.

La prueba de introducción se realizó a los 15 días en esta etapa, a partir de la yema axilar y yema apical se evaluó el crecimiento del explante, se evaluó el enraizamiento de las vitro plantas según el tratamiento del medio de cultivo; MS, Medio Líquido y Medio Sólido, los resultados fueron analizados mediante la variable ANVA a través de los efectos de los tratamientos con el nivel de significancia al 95%, las etapas de selección de tipo de yemas y desarrollo de los explantes, no tuvieron diferencias significativas; pasado los dos meses de la aclimatación se realizó la evaluación de enraizamiento, durante este proceso de las vitroplantas lograron un 85% de sobrevivencia según su temporada de aclimatación, ya que entre mayo y junio solo se obtuvo un 30% de sobrevivencia, por ello se concluyó que para que se tenga mejor enraizamiento en este tipo de especie de plantas el autor recomienda el medio líquido de Ruiz modificado, no obstante, el medio sólido tuvo un efecto positivo en la inducción de raíces, aunque en menor medida; y en comparación de las yemas la mejor respuesta a la multiplicación fueron las yemas axilares, pero mejor calidad de vitroplantas presentaron las yemas apicales. Finalmente, el enraizamiento ex vitro permitió un alto porcentaje de vitroplantas enraizadas, siendo esta la mejor opción para propagar al *Croton Lechleri*.

Allcaco (2016) en su tesis “Estandarización de un medio de cultivo para la propagación clonal in vitro de *Rubus Idaeus* Var Heritage “frambuesa roja” de importancia comercial” Universidad Ricardo Palma, Lima. El autor realizó una investigación con el fin de estandarizar un medio de cultivo, en el que desarrolló múltiples ensayos para establecer in vitro, propagación, enraizamiento y adaptación. Se trabajó con plantas donantes de frambuesa obtenidas del criadero Los Inkas (Lima) y se almacenaron en el invernadero en la Universidad Ricardo Palma.

La metodología que uso fue por medio de mini estacas de 2 - 3 cm, se realizó la esterilización en un ambiente aséptico y se sembró los ápices meristemáticos y mini estacas en medio Murashigue and Skoog (MS) a 1/4, 1/2, 3/4 y concentración completa de sales. Las plántulas obtenidas del experimento se propagaron en el medio de cultivo y

lograron enraizar, para posteriormente transferirlas a cámaras de aclimatación. Los resultados finales fueron:

Se logró una desinfección al 100% de los explantes utilizando hipoclorito de Sodio esto les permitió estar libres de bacterias y virus, se disminuyó la probabilidad de contaminación en la introducción in vitro de ápices meristemáticos

Los resultados mostraron que las mini estacas cultivadas en medio MS que contenían sales completas les permitió un 80% de desarrollo de brotes y una altura media de 1.088 cm.

Asimismo, el medio de cultivo se complementó con 1 mg/L de AIA y obteniendo una supervivencia de 100% de las plántulas aclimatadas en sustrato turba: arena (1:1 y 2:1 v/v) utilizando cámaras de aclimatación, logrando obtener 70% de plántulas enraizadas en el medio permitió obtener 5.4 brotes de mini estaca.

Es por ello que el autor recomienda que el primer paso para que todo el procedimiento funcione es desinfectar muy bien los explantes que estén en condiciones de asepsia y libre de virus, esto permitirá el crecimiento de los explantes durante todo el proceso, por ello el considera importante realizar ensayos previos utilizando fitohormonas en el medio de cultivo para que con esto mejorar el tiempo de crecimiento de los explantes, y evaluar distintas combinaciones y concentraciones para lograr incrementar la velocidad de multiplicación, en cuanto al enraizamiento para incrementar su porcentaje debería de realizarse más ensayos con auxinas y con otras variedades de especies y comparar sus resultados.

Cornejo (2018). "Nivel de conocimiento de las cactáceas y su potencial como recurso turístico en el distrito de Tiabaya, provincia de Arequipa, 2017". Universidad Autónoma de San Francisco. Se realizó la presente investigación con el fin de adquirir los conocimientos básicos y actuales de los pobladores locales de Tiabaya en temas de las especies cactáceas para un análisis concreta. Asimismo, estudiar los beneficios de la especie y prepararlos para un plan sostenible en temas de

conservación en un lugar adecuado, para la visita de turistas, de la misma forma que se mejore el hábitat de las cactáceas. El estudio de investigación, llega a las siguientes conclusiones:

Concluyeron que debido al conocimiento insuficiente sobre cactáceas en los pobladores no brindan una información turística óptima y sostenible sobre los cactus, ya que esta especie es originaria del distrito de Tiabaya, por eso mismo debería revertirse esta situación.

Se determinó que los agricultores aprovechan las cactáceas solo para uso medicinal, por esa razón requieren más información en relación a los usos de los cactus, para de esta forma realizar un aprovechamiento sostenible de cactáceas en Tiabaya.

Se valoró que el aprovechamiento agroindustrial de las cactáceas es el más habitual, por no decir el único para el sector turístico, el cual es de mayor cotización, por medio de comercialización, siempre legal, de uso ornamental o medicinal, a nivel nacional e internacional, para conseguir un incremento económico que pueda comercializarse para uso de forma legal.

Se pudo validar la hipótesis, que la información adecuada sobre el potencial turístico de las cactáceas en el pueblo de Tiabaya, se espera la ejecución de un cactáreo, la que con un buen seguimiento y dándole la debida importancia, se logrará una atracción eco turística con diferentes beneficios para el pueblo de Tiabaya.

Zúñiga (2019) "Identificación y estado de conservación de cactáceas en Puerto Corio, distrito de Punta de Bombón, provincia de Islay y propuesta de conservación 2018". Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Realizaron este trabajo de investigación con la intención de identificar las especies de cactáceas que están distribuidas en la ciudad de Puerto Corío, Distrito de la Punta de Bombón, Provincia de Islay y determinar el estado de conservación en el que se encuentran estos cactus. De esta investigación, se llegó a las siguientes conclusiones:

Se hizo la investigación con dos especies de cactáceas endémicas de la zona la *Neoraimondia arequipensis* (Backeb.) Buxb y *Cleistocactus sextonianus* D.R. Hunt.

Las cactáceas *N. arequipensis* se clasifica como una especie casi amenazada y *C. sextonianus*, como una especie vulnerable; también se identificaron otras especies de cactáceas de la localidad de Puerto Corío que son: *Grindelia glutinosa*, *Nicotiana glauca*, *Solanum peruvianum*, *Alternanthera pubiflora*, *Croton alnifolius*, *Calliandra taxifolia*, *Spergularia collina*, *Nolana adansoni*, *Phyla nodiflora* y *Nolana* sp.

Una vez identificado y clasificado se propusieron 4 cuatro alternativas que podrían mejorar la preservación de las especies de cactus de Puerto Corío:

- Plan de Ordenamiento territorial en Arequipa con el apoyo de GRA-Arequipa
- Educación ambiental.
- Creación de un Jardín Botánico.
- Siembra de plántones de estas especies identificadas.

2.1.3. ANTECEDENTES LOCALES

Campos y Figueroa (2001), desarrollaron el proyecto denominado “Aclimatación de plántulas in vitro de papa”. La publicación se realizó en la Revista Desafíos. Vol. (2), 18-20. El objetivo del proyecto presentado fue el utilizar la biotecnología mediante el cultivo in vitro de meristemas de la papa, para mejorar la calidad, rendimiento, resistencia a plagas y enfermedades, conservación e industrialización.

Las variedades de plántulas “in vitro” fueron obtenidas a partir de meristemas de papa Yungay, canchan, amarilla, tumbay, amarilla del centro, huayro y capiro. El procedimiento se realizó en varias etapas en condiciones asépticas, para luego multiplicarlas, aclimatarlas en condiciones de invernadero y finalmente poder lograr multiplicar plantas libres de enfermedades.

La primera etapa fue la extracción del meristema, para ello primeramente se realizó la desinfección de los explantes y posteriormente a esto, se procedió a extraer los meristemas en dimensiones variables; luego se procedió con la etapa de multiplicación, que consistió en la siembra de nudos en medio de cultivo e incubados en fotoperiodo y oscuridad. La tercera etapa fue la del enraizamiento y la última etapa fue la de la aclimatación que consistió en la transferencia al suelo de las plántulas obtenidas in vitro. Como conclusiones finales se obtuvo:

- El momento óptimo para la aclimatación de plántulas in vitro, es cuando estas tengan entre 40 a 70 días como máximo, de multiplicado.
- Para la multiplicación por esquejes de plantas debe hacerse cuando las plantas tengan un promedio de 45 días (dependiendo de la variedad).
- Es por ello que el autor recomienda que el uso de semillas de calidad para incrementar la producción y capacitar a los agricultores en el manejo de siembra de plantas in vitro en invernaderos y de micro tubérculos de invernadero en campo.

2.2. BASES TEÓRICAS

En la mayoría de las zonas desérticas de América las cactáceas comprenden la flora sobresaliente, de allí que es común una interacción benéfica entre la flora de estos hábitats, ello a razón de que la elección se realiza bajo la sombra de vegetación de estrato prominente (árboles y/o arbustos).

Una planta nodriza suministra resguardo a sus semillas y retoños, de igual manera a otras especies, de estrés por irradiación, escasez de humedad, nutrientes y herbívoros (Leirana y Parra, 1999).

La familia Cactácea registra en el Perú 43 géneros y cerca de 250 especies (Brako y Zarucchi, 1993), principalmente las especies arbustivo-

columnares. Es esencial recalcar, sin embargo, que el mantenimiento y cuidado de la especie cactácea es una cuestión que en el país desafortunadamente aún existen personas que lo consideran de poca importancia, inútil e incluso fastidioso; lo que no ocurre en otros lugares, como México, Estados Unidos, Brasil o Chile, los que actualmente realizan procedimientos de conservación (Ostolaza, 2006).

Respecto de nuestro país, se sabe que existe una categorización de las especies vegetales, según la categoría de peligro de extinción, esto a efectos de alcanzar las medidas adecuadas para contrarrestar aquel riesgo. (UICN, 2001).

En tal sentido, se proporcionó una lista de 42 taxones de cactus de la región peruana estudiados y reportados, al INRENA (Departamento de Biodiversidad del Instituto Nacional de Recursos Naturales) los que de igual forma están comprendidos en el texto Cites Cactaceae Checklist (Hunt, 1999).

Este listado incluye a las especies amenazadas que se encuentran registradas para el Perú. Cabe destacar, además, que se trata de una lista dinámica cuyos cambios se producen en relación a los nuevos registros para el país, es por ello necesario contar con una Red de Centros de Conservación ex situ, que facilite la interacción de información y actualización de las especies amenazadas de la flora silvestre registradas para el Perú.

2.2.1. ORIGEN DE LAS CACTÁCEAS

La mayor cantidad en diversidad de la familia cactácea (género y especie) está ubicada en México, mientras Perú es el siguiente foco de diversificación luego de este. Nuestro país computa alrededor de 39 géneros y por encima de 255 especies (Hunt, 1999). Esta familia cactácea está distribuida en aproximadamente todos los hábitats, comenzando en las áridas zonas costeras, pendiente occidental, mesetas de alta montaña, valles interandinos y llegando exitosamente al follaje de la selva baja (Calderón et al., 2004).

Los cactus han evolucionado en los últimos 80 millones de años, han podido subsistir en entornos secos e incluso en climas templados y al frío extremo en climas áridos (Bravo,1978).

En nuestro país, la familia cactácea fue utilizado antiguamente e incluso actualmente. Nuestros antepasados, los incas los usaban en la producción de diversos artefactos como agujas, prendedores, anzuelos y peines (Piacenza y Ostolaza, 2002), también como en la elaboración de material de construcción (Álvarez y Cáceres, 2003), e igualmente como decorativas o en viajes espirituales, fantásticos y religiosos (Ostolaza, 1995).

2.2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Los cactus en nuestro país tienen mucha variedad de hábitat, que se encuentran desde las zonas áridas costeras, surcando la serranía de las cordilleras andinas y valles interandinos, incluso en la selva tropical de nuestra Amazonía (Calderón et al., 2004; Arakaki et al., 2006). Según la reciente investigación de los cactus elaborada por Ostolaza (2011) se aprecia una variedad de 262 especies ubicadas en 39 géneros. Los cactus están posicionados entre las 10 familias de flora con superior numerosidad de especies encontradas solo aquí (de todas las especies registradas, el 80% son endémicas, 199 en 32 géneros) dispersas en Perú, fundamentalmente en zonas de matorral desértico y zona tipo montaña (meso andina), comenzando a nivel del mar e inclusive llegando a los 4000 msnm de la pendiente occidental de los Andes (León et al., 2006).

Al punto que, a causa de su valiosa cotización adquisitiva, los cactus fueron incluidos en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), de la que nuestro país es participe.

El *Echinopsis Cuzcoensis* (inicialmente *Trichocereus cuzcoensis*) es un espécimen aceptado, pese a que posee una altísima semejanza con el *Echinopsis peruviana*, asimismo recordado como Antorcha

Peruana. Debido a que ambos especímenes tienen efectos que se confunden con gran facilidad puesto que sus contrastes son mínimos (Baldera, 2014).

2.2.3. IMPORTANCIA

Las cactáceas son parte de nuestro patrimonio. En tal sentido, las utilidades que nos podrían brindar si es que se llegara a considerarlas como materia de comercialización, son insospechadas, pues tienen un gran potencial y requieren de muchos casos de estudios. Sin embargo, existe poca investigación al respecto; y, sobre todo, poca inversión ya sea por parte del Estado o de empresas privadas. Asimismo, debido a que mucha vegetación son fuentes de medicamentos, contribuyen a la preservación de los suelos al reprimir la erosión, sirven de alimento para muchos animales, también de ser polinizadas por insectos, aves y murciélagos, virtudes que, lamentablemente, carecen de consideración. Además, casi sobra señalar que su conservación es sumamente importante, ya que una amplia diversidad de especies de fauna depende de ellas; a lo que se suma la importancia de preservar las especies nativas, mediante técnicas desconocidas en nuestra región, como el cultivo de tejidos vegetales (CTV), incluso conocido como cultivo in vitro, puede obtener nuevos individuos a gran escala con medios físicos y químicos controlados. (Garza et al. 2005).

2.2.4. PROBLEMAS DE LAS CACTÁCEAS EN EL PERÚ

Nuestra nación, con su extensa geografía, es la morada de cerca de doscientas cincuenta especies de cactus. Habituales en los desiertos y sierra de nuestro País, sin embargo, no está únicamente restringido a ellos, estas singulares plantas sorprenden con sus bellas flores a todo aquel que se detenga a observarlas. (Ostolaza, 2014). Algunos de los problemas que sufren estas plantas son:

- La explotación y saqueo indiscriminado de especímenes valiosos y cotizados, especialmente plantas exóticas, con fines comerciales, puede poner en riesgo la supervivencia de estas especies

- La destrucción de sus hábitats.
- La tala con fines comerciales. Esta es una actividad ilícita, actualmente existe una amplia legislación que los ampara. No obstante, como muchas ordenanzas en nuestro país, estas son ignoradas.
- Otra problemática que es parte natural de la planta, es la propagación de cactáceas, ya que influyen varios factores que disminuyen la abundancia del taxón; la rápida pérdida de viabilidad de sus semillas (Ault y Blackmon, 1978) que la imposibilita de germinar, se producen semillas estériles y un crecimiento lento (Mouseth, 1977), su metabolismo es uno de los factores que frena la regeneración de las poblaciones ya que su regeneración es lenta, lo que le impide desarrollarse en lugares donde son expuestos y hacer frente al cambio climático, el desarrollo urbano, la agricultura y el sobrepastoreo (Corona y Chávez, 1982).

2.2.5. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA

Ubicación taxonómica *Echinopsis Cuzcoensis*

Tabla 1
Ubicación Taxonómica

Nombre Científico	<i>Echinopsis cuzcoensis</i> (Britton & Rose) H. Friedrich & G.D. Rowley
Sinónimo:	<i>Trichocereus cuzcoensis</i>
Reino:	Plantae
Filo:	Tracheophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Caryophyllales
Familia:	Cactáceas
Tribu:	Trichocereae
Género:	<i>Echinopsis</i>
Especie:	<i>E. Cuzcoensis</i> / <i>E. Huanucoensis</i>

Nota: Adoptado de El nuevo léxico de cactus, 2006. Por Hunt, D., Taylor, N. y Charles, G. (compiladores y editores). dh Books, Milborne Port, Reino Unido, sobre la descripción taxonómica del *Echinopsis Cuzcoensis*

De acuerdo con Hunt (2006), *Echinopsis puquiensis* (Rauh y Backeb.) H. Friedrich y G.D. Rowley y *Echinopsis schoenii* (Rauh y Backeb.) H. Friedrich G.D. Rowley son sinónimos del *Echinopsis cuzcoensis*. Sin embargo, la taxonomía debe revisarse, ya que todos los evaluadores coinciden en que son especies diferentes que deberían considerarse por separado. Por ahora, sin embargo, se tratan como un complejo de una sola especie.

2.2.6. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL ECHINOPSIS CUZCOENSIS

El *Echinopsis Cuzcoensis* o *Echinopsis Huanucoensis* pertenece a la misma especie de cactus que San Pedro y Bolivian Torch, son tan semejantes que incluso los verdaderos conocedores y especialistas los confunden.

El cactus *Echinopsis Cuzcoensis* fue nombrado en honor a la ciudad de Cuzco, en Perú, donde fue hallado por primera vez.

2.2.7. CARACTERÍSTICAS

- Cactus de tallo robusto de 3 m de altura puede crecer hasta 6 metros con 10 - 15 cm de diámetro.
- Epidermis de color: verde azulado.
- Posee hasta 7 costillas redondeadas con areolas amarillo verdosas de 1 cm de diámetro.
- Espinas radiales de 6 a 8, de 1,5 a 3 cm de longitud.
- Espinas centrales de 1 a 3, las superiores de 2 a 4 cm, la inferior de hasta 7 cm de longitud, rectas o inclinadas hasta abajo, todas de color gris cuerno.
- Flores de gran tamaño con forma de embudo y de color blanco. Están abiertos durante el día y la noche. Las flores miden de 12 a 14 pulgadas de largo.
- Promedio mínimo Temperatura: 50 ° F (10 ° C) es la temperatura mínima que necesita para mantenerse saludable durante el invierno.

- Zona de temperatura recomendada: puesta de sol: 16,17, o de 21 - 24°C

El Cuzcoensis es fácil de cultivar y crece bien tanto en regiones secas como húmedas. En un clima húmedo y caliente, como se encuentra originalmente en zonas altas y lluviosas del Perú, el cactus está acostumbrado a cantidades más grandes de agua, necesita buen drenaje, como sus primos endurecidos del desierto. Al mismo tiempo, el cactus puede sobrevivir durante varias semanas sin agua y a temperaturas de hasta 10°C.

En su hábitat natural, el Echinopsis puede crecer extraordinariamente a una extensión de entre 5 y 6 metros, en tiesto hasta 2m de altura. Esta cactácea suele desarrollar numerosas ramas y suelen presentar una tonalidad verde claro cuando son jóvenes, y tornándose más oscuras mientras van avanzando su edad. Las flores de esta planta son grandes, blancas, y aromáticas, lo más destacado son las sustancias que se hallan en su tejido.

De acuerdo con Batis y Rojas (2002), este cactus contiene varios alcaloides, como tiramina, 3-metoxitiramina, mescalina, 3-metoxi-4, 5-dimetoxifenetilamina, en su tejido seco, que se utilizan con fines chamánicos y producen efectos similares a los del Peyote.

Figura 1
Echinopsis Cuzcoensis



Nota. Fotografía en su hábitat natural del Echinopsis Cuzcoensis

Figura 2
Flor del Echinopsis Cuzcoensis



Nota. Fotografía en su habitat natural del Echinopsis Cuzcoensis en su época de floración

Características Morfológicas

Las cactáceas son populares por ser plantas perennes, que se caracterizan por tener una amplia diversidad de formas de vida, desde las llamadas enanas que miden 1 cm de diámetro, hasta las gigantes columnares, con más de 20 m de altura. Además, las cactáceas se presentan en formas arbóreas o arbustivas, trepadoras y epífitas, simples o ramificadas, densamente cespitosas o almohadilladas, entre otras.

Las variedades más comunes son: arborescente (que se caracteriza por tener un tallo principal y varias ramas en forma de "candelabro" o solo un tallo muy grande sin ramificaciones), arbustivo (varias ramas que surgen a nivel del suelo), cilíndrico o columnar (tallo erguido en forma de columna, corto o largo, con o sin ramificaciones, segmentado o no), abultado o globular (esférico, esférico con el ápice aplanado), solitario, colonial o cespitoso (varios tallos formando una estructura almohadillada, compacta o abierta), aplanado (cladodios segmentados o juntos), epífita, litofítico, postrado, decumbente, trepador y geofítico (y tienen grandes órganos de reserva y crecen al nivel del suelo) (Anderson, 2001).

- **Raíces**

Es común que su sistema radicular sea superficial y tenga una amplia extensión. En tal contexto, está formado por una raíz principal, mayormente enroscada, napiforme, tuberosa y algo bifurcada.

- **Tallos**

Los tallos suelen tener un matiz verde; y en su etapa temprana se cubren de una gruesa cutícula cerosa debido a la lignificación, lo que minimiza perder agua por transpiración. Es fundamental resaltar que las de formas columnares o globulares se identifican por maximizar el almacenamiento de agua.

- **Costillas y tubérculos**

En todas las especies, el tallo presenta surcos longitudinales, que forman crestas llamadas costillas, las cuales resultan beneficiosas para poder clasificarlas según su especie, ya que dotan al tallo de una mayor resistencia a la torsión. En tal sentido, cabe destacar que, en muchos tipos de cactus, las costillas se encuentran repartidas por ranuras transversales, las cuales forman salientes denominadas tubérculos o mamilas.

- **Areolas**

Las areolas son una de las partes más distintivas de los cactus, y se encuentran en la superficie del tallo. Estas estructuras afelpadas, son similares a las yemas, y son rasgos únicos los cactus y contienen las espinas, las hojas, los pelos, las ramas, flores y frutos, al igual que los tallos de otras plantas dicotiledóneas. (Ceroni, 2013)

- **Espinas**

Representarían a ser las hojas en una planta común, estas se desarrollan en las areolas. Es importante señalar que las cactáceas se caracterizan por tener espinas, las cuales se encuentran en casi todas las especies, particularmente en las etapas iniciales de su vida.

Las espinas pueden presentar diferencias en su tamaño y aspecto, incluso dentro de una misma areola, y generalmente se dividen en 2 series: las centrales y las radiales.

2.2.8. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL ECHINOPSIS CUZCOENSIS

Este cactus es endémico de Perú, lo que hace que se pueda encontrar con facilidad en la región de Cuzco, por lo general a altitudes de 3,100 a 3,600 m (Arakaki et al. 2006), en Apurímac a 3000 m y en Huánuco a una altura de 1900 y 3400 m, en Cruzpampa a Tingo Chico (Blaczkowski, 2016). De acuerdo con Hunt et al. (2006) la especie se encuentra en muchos valles en el este de nuestro país, entre los que destacan Cuzco, Huánuco, Huancavelica y Ayacucho. Por estas razones, se puede afirmar que posee un amplio radio de presencia en tierras peruanas áridas.

2.2.9. PROPAGACIÓN DEL ECHINOPSIS CUZCOENSIS

Las cactáceas se pueden propagar de forma sexual o asexual, adoptando esta última en una diversidad de formas, según las características propias de la especie y las características del material deseado. Las técnicas de propagación asexual incluyen el uso de semillas, brotes o vástagos, esquejes, injerto y cultivo de tejidos vegetales. (Choreño, 2001).

La *Echinopsis cuzcoensis* es muy fácil de sembrar, ya que es relativamente resistente a la mayoría de las plagas. Uno de los mayores desafíos, no obstante, es el de obtener semilla de buena calidad porque la mayoría de las semillas de este *Echinopsis* en el mercado son viejas y algunas ni siquiera germinan.

La temperatura de germinación para *Echinopsis cuzcoensis* es entre 26°C y 30 °C. Solo necesita muy poca agua para inducir germinaciones y, si se tiene una semilla de calidad, germinará dentro de 2-6 semanas. Se debe tener presente que, si no aparece nada antes de

la sexta semana, es probable que no se obtenga germinaciones en absoluto.

También se puede agregar GA-3, que es ácido giberélico o usar una lámpara HPS o LED fuerte para activar las semillas, porque la luz ultravioleta aumenta las tasas de germinación. En general, las semillas de *Echinopsis* necesitan luz para germinar, así que no se deberán cubrir con tierra. (Patrick Noll, 2010).

La propagación por brotes o vástagos es un método comúnmente utilizado en la propagación de cactáceas. Este método es relativamente sencillo ya que implica desprender los brotes o hijuelos que crecen alrededor de la planta madre y sembrarlos individualmente; con este método es posible obtener plantas completamente desarrolladas en un tiempo más corto.(Choreño, 2001). Los vástagos del *Echinopsis Cuzcoensis* son de color verde brillante, salen de la base de la planta madre. Dicho proceso se realiza en época de primavera hasta principios de verano, ya que la planta puede recuperar su vitalidad y el esqueje enraíza con mayor facilidad. En la medida en que su desarrollo requiere tiempo, esta puede contagiarse de plagas como la cochinilla algodonosa además es más propenso a ser afectado por hongos y bacterias. La carencia de recombinación genética es una desventaja significativa, que es crucial para la conservación de especies.

La propagación por esquejes es un método de propagación vegetativa que implica cortar al cactus en trozos y permitir que cada parte cicatrice (Reyes, 1994), antes de plantarlo para promover su enraizamiento. Este método permite obtener muchas plantas de un solo individuo. Sin embargo, es importante destacar que no hay informes del método de esquejes, en su utilización en plantas como el *Echinopsis Cuzcoensis*, por lo que no se puede confirmar su efectividad.

Basándonos en lo anterior, se puede afirmar una de las mejores opciones para la propagación del *Echinopsis Cuzcoensis* es la Micropropagación vegetativa mediante el cultivo de tejido in vitro, por

cuanto presenta mayores y mejores posibilidades de obtener brotes de mejor calidad, a diferencia de los procedimientos ya dichos, que podrán tener cierta efectividad en el cultivo de las cactáceas, como por lo demás ha sido demostrado en variedad de ocasiones, pero que a la larga no nos brindan los resultados satisfactorios que sí es posible obtener si se emplea el procedimiento basado en el uso de la micropropagación, ya que dicho recurso sí garantiza la obtención de plantas en óptimas condiciones.

Otros datos sobre el Echinopsis Cuzcoensis

En el libro rojo de las plantas endémicas del Perú (2006) *Echinopsis cuzcoensis* (Britton & Rose) Friedrich & G.D. Rowley Publicación: Int. Organ. Succ. Pl. Study Bull. 3(3): 95. 1974.

- Colección tipo: C. Backeberg s.n. Herbarios: N.A
- Nombre común: Avacollay. Registro departamental: Cuzco/Huánuco.
- Regiones Ecológicas: MA; 3100—3600 m. SINANPE: Sin registro.
- Herbarios peruanos: Ninguno.

2.2.10. MICROPROPAGACIÓN VEGETATIVA POR CULTIVO DE TEJIDO IN VITRO

El cultivo de tejidos o propagación in vitro (del latín “en vidrio”) comprende el cultivo aséptico de tejidos, células y órganos. Se considera in vitro cuando se cultiva en medios en recipientes de vidrio o plástico transparente. (Manzano, 2017)

El cultivo de tejidos es una tecnología que consiste en cultivar un inocuo en condiciones de asepsia con nutrientes y hormonas balanceadas. En ese sentido se puede definir el cultivo de tejidos como un conjunto de métodos con los que alcanzamos efectuar una intervención relativa en procesos bioquímicos, morfogenéticos y fisiológicos que se dirige a la práctica en los tejidos en estudio. (Abdelnour et. al. 1994) motivo por el cual se prepara este explante (porción de tejido vegetal) en un medio artificial y se incuba en

condiciones controladas para garantizar su crecimiento óptimo. (Roca et al., 1991).

Las yemas vegetativas de las plantas se considera que el explante más adecuado para los procesos de propagación in vitro. Después de ser introducidas en el medio estas plantas se ubican en anaqueles con iluminación artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se controla la temperatura en valores que fluctúan entre los 21°C y 23°C (Olmos, 2010)

Asi mismo, se controla las horas de luz que recibirán. El medio de cultivo está conformado por una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladoras de crecimiento, azúcar, agua y agar en proporciones estandarizadas (Castillo, 2004)

Es importante tener en cuenta que la composición del medio para el cultivo dependerá de la especie vegetal con la que se esté trabajando y la fase del proceso de micropropagación de la planta materia de intervención, ya que cada planta necesita de diferentes nutrientes para su crecimiento.

Muchos autores coinciden en clasificar los factores no biológicos que pueden influir en el desarrollo del cultivo in vitro, tales como:

- Ambiente químico.
- Ambiente físico
- Composición del medio de cultivo
- Ph
- Temperatura
- Humedad
- Luz y fotoperiodo

Son estos factores muy importantes y se debe de considerar en la multiplicación de plantas in vitro, y en cada caso se podrán adaptar o cambiar según las características que la planta requiera, por ello es que son generalmente habituales en el proceso de propagación in vitro (Castillo, 2004).

2.2.11. REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Se trata de sustancias que influyen sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas, y son mayormente activas a bajas concentraciones. Dentro de este grupo de moléculas se puede diferenciar entre las de origen vegetal y las de origen sintético. Las que se encuentran de forma natural en las plantas se denominan hormonas vegetales o fitohormonas (Canna, 2018). Las más comunes se constituyen en cinco categorías: ácido abscísico, auxinas, giberelinas, citoquininas y etileno. Además, existen otros productos que pueden ser utilizados como reguladores del crecimiento en los cultivos.

Los principales agentes reguladores del crecimiento utilizados en el cultivo de tejidos son:

- Auxinas.
- Citoquininas.
- Giberelinas.
- Etileno Acido Abscísico Poliaminas.
- Brasinoesteroides.
- Oligosacarinas.

2.2.12. PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN

Establecimiento de un protocolo eficiente de desinfección. Para este punto se realizaron las actividades siguientes:

1) Preparación de la planta madre

Todos los procedimientos de cultivo in vitro se deben realizar en condiciones asépticas, y para ello se requieren explantes de alta calidad nutricional y con un nivel de desarrollo óptimo. Para obtener explantes libres de virus, es recomendable tener bajo custodia a la planta donadora, es decir, a la planta madre, que puede mantenerse en el invernadero durante varias semanas a meses en condiciones

controladas. En un entorno controlado, la planta podrá crecer en condiciones sanitarias ideales, con una nutrición y riego controlado lo que permitirá un crecimiento fuerte, saludable y sin enfermedades. (De la Cruz, 2018).

2) Fases de la micropropagación

Fase 1: Desinfección del Material Vegetal

Una vez seleccionada la planta donadora, se extraen muestras de la misma para obtener los explantes, los cuales pueden ser trozos de hojas, yemas, semillas, porciones de raíces, etc (Indacochea et al.,2017). Previamente a la extracción de los explantes se procederá a desinfectar a la planta madre con el objetivo de eliminar cualquier contaminante externo. Los contaminantes más frecuentes son hongos y bacterias que coexisten en su hábitat natural. Para mantener las condiciones de asepsia después de desinfectar el material vegetal, es necesario trabajar en cabinas de flujo laminar donde se realizan todos los procedimientos desde la extracción de explantes a partir del material vegetal, hasta la introducción en el medio.

Algunos autores inspeccionan la salud y viabilidad con la asepsia vegetal con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial), pura o diluida de 05 a 15 minutos, seguido por 03 a 04 enjuagues en agua esterilizada, luego proceden a introducir los explantes en un tubo de cultivo que contiene el medio de iniciación. (Castillo, 1992).

Fase 2: Introducción del material in vitro

Una vez realizado lo anterior, la desinfección superficial, dependiendo del material seleccionado (semillas o yemas), serán colocadas en medio de cultivo estéril. Marcando el inicio del ciclo de cultivo in vitro, se inicia el proceso de regeneración de nuevos tejidos vegetales o germinación, que tiene una duración de entre siete y quince días.

Fase 3: Multiplicación de los brotes

Después de las fases previas, los explantes que sobrevivieron a la Fase 1 y 2 generan nuevos brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas, la yema ubicada en la base de cada hoja se desarrollará después de entrar en contacto con el medio de cultivo. Posteriormente a esto se puede sub cultivar los nuevos brotes en medio de cultivo diferente, mediante una resiembra en tubos de cultivo u otros recipientes apropiados.

Todos los procedimientos se llevan a cabo en una cámara de flujo laminar que es un ambiente estéril que nos facilita conservar las condiciones de asepsia requerida. Esto es un factor crucial para aumentar el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El total de plantas obtenidas estará sujeto a las condiciones del medio de cultivo y del tipo de planta a propagar. Por ello es importante que todos los factores que puedan afectar el desarrollo sean optimizados para alcanzar incrementos exponenciales. (Castillo, 1992).

Fase 4: Elección de un medio de enraizamiento

Se seleccionan principalmente plantas individuales de aproximadamente 2 centímetros de tamaño para enraizar los explantes. Aquellos brotes obtenidos en la Fase 3 son transferidos a un medio de cultivo que no tengan reguladores de crecimiento o que solamente contengan hormonas como las auxinas. Hay algunas especies que no necesitan de este procedimiento ya que emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollaron, en consecuencia, el proceso de multiplicación y enraizamiento se lleva a cabo simultáneamente (Castillo, 1992).

Fase 5: Aclimatación de los explantes enraizados

En esta fase final los explantes sufren cambios de diferentes tipos, que permitirá que puedan adaptarse a vivir en condiciones naturales de su propio hábitat. Los explantes que acaban de ser enraizados son muy

sensibles a cualquier cambio en su entorno, y la adecuada aclimatación es un factor esencial que puede influir significativamente en el resultado final de todo el proceso (Castillo, 1992)

A continuación, se presenta una lista donde autores comparan las particularidades de una vegetación desarrollada en situación de laboratorio (in vitro) relación a una vegetación en su medio natural (in vivo):

In vitro

- No ejecuta fotosíntesis.
- Desarrollo en ambientes controlados.
- Desarrollo en situaciones de asepsia.
- Alta humedad relativa.
- Estomas no funcionales.
- Ausencia de pelos radiculares.

In vivo

- Ejecuta fotosíntesis
- Desarrollo en ambientes no controladas
- Exposición a los patógenos y gérmenes del ambiente
- Humedad relativa variable
- Estomas funcionales
- Presencia de pelos radiculares
- Presencia de cera en la cutícula (Castillo, 1992)

Un factor crucial para obtener resultados satisfactorios en esta fase de aclimatación consiste en la elección correcta del sustrato, que cumple con las características físicas óptimas para su desarrollo.

En este proceso, se debe minimizar el estrés y los cambios bruscos, estos deben ser de forma gradual para tener mayor tasa de sobrevivencia. Dado que este es una consecuencia de las condiciones de cultivo in vitro, también se debe considerar que pueden ocurrir

cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de la planta (Sauro, 2013)

3) Medios de cultivo in vitro

El medio de cultivo es el principal componente que influye directamente en el crecimiento y la morfogénesis de los tejidos, ya que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo del explante. Además, el medio de cultivo aporta carbohidratos y diversas sustancias orgánicas como son las hormonas (reguladores del crecimiento), vitaminas, etc.

Actualmente se están desarrollando diferentes medios de cultivos, diseñados para proporcionar los nutrientes requeridos para estimular el crecimiento de los tejidos vegetales cultivados in vitro. Por ello los medios de cultivo deben contener nutrientes similares a los que puede tener bajo condiciones naturales en su hábitat.

También existen otros medios de uso general, es decir, pueden ser aplicados en distintas especies o diferentes tejidos (Pérez - Molphe et al. 1990). Es esencial proporcionar los nutrientes y minerales en concentraciones y condiciones adecuadas durante la preparación del medio de cultivo. La composición del medio debe incluir tanto los macroelementos (K, N, S, Ca, C, H, O, P y Mg) como los microelementos (Mn, Cu, Mo, B, Zn, Fe, Cl), (Roca et al. 1993). Los medios se modifican agregándoles reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones.

Un medio de cultivo frecuentemente empleado en la propagación in vitro es el de Murashige y Skoog (1962) (MS) el mismo que se empleó en este estudio de investigación.

4) Ventajas de la micropropagación

Según Murashige (1978), Caldaza (1980), Hartman (1995) y otros investigadores, concluyen como los primeros beneficios de la micropropagación:

- Genéticamente plantas uniformes.
- El mayor aumento posible en el número de plantas derivadas del genotipo
- Multiplicación en menor tiempo.
- Ventaja de ser económicamente viable, requiere poco espacio y permite la multiplicación de altas cantidades de plantas en un tiempo razonable.
- Control máximo en la salubridad del elemento in vitro a otros lugares, con mayores facilidades aduaneras.
- Conveniente y rápida multiplicación de una especie del cual se tiene conocimiento de la poca densidad de individuos.

5) Problemas asociados al cultivo in vitro

Contaminación

De acuerdo con Debergh y Zimmerman (1991), la presencia de microorganismos constituye ser un factor determinante en el fracaso de los cultivos in vitro, especialmente durante las primeras fases. Esto se debe a que las condiciones físicas del cultivo generan un medio inadecuado para su desarrollo. Por eso hay que descartar a los individuos en mal estado fitosanitario con el fin de prevenir la contaminación superficial, para ello se realiza una desinfección adecuada, con desinfectantes superficiales y fungicidas. Por ello es importante realizar esa fase de desinfección adecuadamente para evitar la aparición de microorganismos sistemáticos y superficiales del cactus donante. No obstante, pocos de estos microorganismos son tratados con antibióticos o tratamientos de quimioterapia y termoterapia (Casells, 1991). Añadiendo a la utilización de productos químicos para la desinfección, es preciso realizar el procedimiento en lugares óptimos, esterilizar los medios de cultivo, los materiales de laboratorios, etc., es posible prevenir la presencia de microorganismos mediante la implementación de normas de asepsia o protocolos adecuados, según Roca y Mroginski (1991)

Oxidación o Fenolización

A lo largo de proceso el individuo (explante) sufre constantemente situaciones de estrés, a causa de lesiones mecánicas o por las condiciones del medio de cultivo (composición del medio). Los compuestos fenólicos son incitados en su metabolismo con estas condiciones. De igual manera, las células que no parecen haber sido lesionadas durante el proceso de desinfección pueden sufrir daños debido a su proximidad a las células lesionadas lo que puede resultar en una muerte precoz (Debergh, 1991).

Por lo mencionado anteriormente, es necesario el control del efecto de oxidación en los cultivos de tejidos. Por ello se debe evitar el estrés que estimula la biosíntesis del compuesto fenólico (Debergh, 1991). De acuerdo con Debergh y Zimmerman (1991), Thomas y Ravindra (1997) y Toledo et al. (1998), una forma de identificarlos es porque al poco tiempo de ser aisladas los explantes se vuelven marrones o negruzcos. Cuando esto ocurre, el crecimiento se inhibe y el tejido generalmente muere. Los tejidos más jóvenes en comparación con los tejidos más maduros son menos susceptibles al oscurecimiento.

Vitrificación o Hiperhidratación

Este trastorno fisiológico es comúnmente observado en las hojas de los tejidos cultivados in vitro y puede tener un impacto negativo en procesos cruciales como la fotosíntesis y el intercambio gaseoso. En las raíces y tallos se presentan con menor frecuencia, estas anomalías anatómicas en algunos casos pueden afectar en condiciones ex vitro el establecimiento de las plantas propagadas. (Ziv et al., 1991)

6) Protocolos

Protocolo de preparación del medio de cultivo de Murashige y Skoog

La preparación de los sustratos nutritivos se obtuvo disolviendo las soluciones preparadas previamente y agregando fuentes de carbono y

el gelificante, como el agar. Como apoyo del MS, las vitaminas, sales minerales y fuente de carbono, de este producto es posible obtener variados sustratos nutritivos, alterando la concentración o reguladores de crecimiento.

Formulación del medio de cultivo

Tabla 2

Composición del medio de cultivo Murashige Skoog

Macronutrientes		
Compuesto	Fórmula	Concentración mg/L
Nitrato de amonio	(NH ₄ NO ₃)	1,650 mg/l
Cloruro de calcio	(CaCl ₂ · 2H ₂ O)	440 mg/l
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ · 7H ₂ O)	370 mg/l
Fosfato de potasio	(KH ₂ PO ₄)	170 mg/l
Nitrato de potasio	(KNO ₃)	1,900 mg/l
Micronutrientes		
Compuesto	Fórmula	Concentración mg/L
Ácido bórico	(H ₃ BO ₃)	6.2 mg/l
Cloruro de cobalto	(CoCl ₂ · 6H ₂ O)	0.025 mg/l
Sulfato cúprico	(CuSO ₄ · 5H ₂ O)	0.025 mg/l
Sulfato ferroso	(FeSO ₄ · 7H ₂ O)	27.8 mg/l
Sulfato de manganeso	(MnSO ₄ · 4H ₂ O)	22.3 mg/l
Yoduro de potasio	(KI)	0.83 mg/l
Molibdato de sodio	(Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O)	0.25 mg/l
Sulfato de zinc	(ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	8.6 mg/l
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O		37.2 mg/l

Nota: Formulación tradicional del medio Murashige & Skoog (MS)

Tabla 3

Composición del medio de cultivo Murashige Skoog y concentraciones de los suplementos

Vitaminas	
Compuesto	Concentración mg/L
i-Inositol	100 mg/l
Niacina	0.5 mg/l
Piridoxina · HCl	0.5 mg/l
Tiamina · HCl	0.1 mg/l
Glicinas	2 mg/l
Azucres	
Sacarosa	30g/l
Agente Gelificante	
Agar	7,5 g/l

Nota: Componentes del Murashige Skoog en concentraciones y suplementos utilizados

7) Preparación del medio de cultivo

La elaboración de los medios de cultivos se realiza con varios días de antelación al establecimiento in vitro

Para ello preparamos 1000 ml de sustrato y se realizó el siguiente protocolo:

- Colocamos en un agitador de laboratorio un recipiente de 1000 ml de capacidad con 400 ml de agua desionizada y agregar los minerales y las vitaminas (MS) 4,3 g/L
- Adicionamos el valor aproximado de las soluciones de fitohormonas.
- Adicionamos 30 g sacarosa y esperamos a que se diluya.
- Añadimos agua desionizada hasta alcanzar el volumen de 1000 ml.
- Colocamos la solución en un recipiente y ajustamos en un pH metro, el pH de la solución (con NaOH, HCl o KOH) en 5.8.
- Añadimos 7,5 g de agar y lo disolvimos haciéndolo hervir con ayuda de un mechero
- Agitamos la solución, a continuación, verterlos por dosis en los envases de cultivo, poner las tapas y sellar con cinta.
- Esterilizamos el sustrato en el recipiente de esterilización (autoclave) por el tiempo de 20 min a 120oC y 1 Kg/cm² de presión.
- Dejamos templar el sustrato antes de usarlo, 03 a 04 días antes de la introducción del material vegetal. (Godoy.2021)

8) Fase 1: De desinfección

• PREPARACIÓN DE LA PLANTA MADRE

Una vez elegida la planta madre se desarrolló un proceso de preparación eficiente de la planta donadora, que comenzó con la mejora del sustrato mediante la adición de nutrientes para fomentar un crecimiento vigoroso y prevenir enfermedades, luego días

previos al experimento se realizó una pre desinfección con Alcohol (70%) Peróxido de Hidrogeno 3% (10 vol) y fungicidas durante una semana por 3 días para la eliminación de patógenos (hongos y bacterias).

- **DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

De cada planta madre se extrajo los explantes requeridos a partir de fragmentos extraídos de ella. El explante elegido fueron las areolas del cactus de 1,5- 2 cm de longitud, por tener una gran cantidad genética, con la planta madre preparada se siguió el siguiente protocolo:

- Se desinfectó muy bien los instrumentos, pinzas, envases, superficies y máquinas del laboratorio.
- Primero se eliminó las espinas de la cactácea con cuidado, y se colocó en un recipiente con agua destilada Se cortó segmentos nodales de desarrollo activo y de una longitud un poco mayor al requerido.
- Se lavó los segmentos nodales con abundante agua desionizada y se colocó en papel filtrante para quitar el agua excedente.
- El primer desinfectante utilizado fue el Etanol, para ello lo sumergimos en etanol 70% solo por 30 segundos para evitar dañar el tejido
- Luego enjuagamos con agua estéril para sacar los restos del Etanol, por lo menos dos veces por 1 minuto
- El siguiente desinfectante será el Peróxido de hidrogeno (Agua oxigenada) 3 % por 3-5 minutos, evitando la oxidación y enjuagamos.
- Finalmente usamos para la esterilización lejía o cloro comercial al 4 %, durante 8-12 minutos
- Evitamos el daño del tejido y enjuagamos con abundante agua estéril.

- Cortamos las partes dañadas sobre una placa Petri esterilizado
- Cortamos del extremo de los segmentos nodales una mínima fracción (en el mismo lugar en el que se seccionó al inicio) y hundimos perpendicularmente la fracción basal (inferior) en el centro del sustrato.

Todo este procedimiento se realiza dentro de la cabina de flujo laminar, y los explantos se introducen en los envases con el medio previamente preparados y luego son llevados al cuarto de cultivo.

9) Fase 2: Establecimiento in vitro

Los explantes que superan la fase de desinfección son introducidos en el medio de cultivo en estudio. Para introducir in vitro un material vegetal se siguió con el protocolo establecido para evitar posibles contaminaciones que puedan establecerse.

Se realizan dentro de una cámara de flujo laminar y se utilizan instrumentos esterilizados, dado que es esencial mantener condiciones estériles durante el procedimiento. El área se mantuvo sin impurezas y el área a trabajar se desinfectó con etanol al 70% y alcohol al 70%, previa, durante y al término de su uso. Se realizó un lavado de manos previos y uso de guardapolvo.

- Una mínima fracción (en el mismo lugar en el que se seccionó al inicio) y hundimos perpendicularmente la fracción basal (inferior) en el centro del sustrato.
- Rotular los envases con un código apropiado que identifique el sustrato, la especie y la fecha.
- Repicándose 2 explantes por unidad experimental. Los que son ubicados en gradillas al azar y mantenidos en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25°C grados, con luz durante 16 horas y oscuridad de 8 horas.

Inmediatamente después de haber concreto el procedimiento in vitro, es importante establecer el respectivo monitoreo del material

botánico para identificar a tiempo una posible contaminación y retirar de la cámara de cultivo los envases enfermos.

10) Fase 3: Desarrollo del material vegetal in vitro

Las evaluaciones de la investigación se realizaron con los sustratos nutritivos, en los cuales cuyos tejidos vegetales no presentaban indicios de contaminación.

- El primer sustrato nutritivo empleado es el MS-O (medio con ningún regulador de crecimiento), sólo agente gelificante.
- El segundo sustrato nutritivo empleado es el Murashige Skoog MS-Sacarosa (medio con reguladores del crecimiento)
- El tercer sustrato nutritivo empleado es el Murashige Skoog MS-Fitohormona (medio con reguladores del crecimiento)

11) Fase 4: Enraizamiento in vitro

Continuando el proceso de micropropagación, el siguiente paso radica en evaluar la inducción del enraizamiento mediante los sustratos utilizados en inducir el enraizamiento de microtallos obtenidos, raíces y formación de callos viables.

2.3. DEFINICIONES CONCEPTUALES

Cultivo de tejidos vegetales. Se entiende como una serie de técnicas y procedimientos que posibilitan propagar por medio de un medio nutritivo artificial, tejidos, órganos, células y protoplastos extraídos de la planta en estudio, en condiciones ambientales controladas. (Pérez, 1998).

Micropropagación. Se trata del proceso mediante el cual se multiplican plantas en condición in vitro, se llega a obtener una descendencia uniforme en condiciones de asepsia (Murashige, 1974) , autores concluyen en 3 fases fundamentales: 1) el establecimiento aséptico del cultivo; 2) su multiplicación;

3) el enraizamiento y la preparación para el trasplante al suelo del inóculo conocido como aclimatación. (Roca, 1991).

Areola. La areola es una yema axilar altamente especializada. Se trata de zonas meristemáticas, son estructuras similares a yemas existentes en los tallos de las demás dicotiledóneas.(MINAM, 2013)

Explante. Se define a una parte del tejido u órgano que se extrae de una planta con fines de cultivo. Para establecer cultivos, el primer paso es seleccionar un explante adecuado; lo cual depende de las características de la especie vegetal a utilizar y el objetivo perseguido. (Roca, W. 1991).

Medio de cultivo. Es donde se introducen los explantos que darán soporte a las vitroplantas, esta contiene micro y macro nutrientes, compuestos inorgánicos necesarios para simular su ambiente natural, todos, además se complementa con las vitaminas y carbohidratos.

Reguladores de crecimiento. Las hormonas o también conocidas como reguladores del crecimiento, son compuestos orgánicos sintéticos que influyen sobre el crecimiento y desarrollo de una planta cultivada in vitro; generalmente actúan sobre ellas complementando el desarrollo de estas en comparación a lo que se desarrollarían bajo condiciones naturales; además se han creado compuestos sintéticos que tienen actividades semejantes a las hormonas naturales. (Pierik, 1990)

Contaminación microbiana. La presencia de microorganismos contaminantes es uno de los problemas más importantes que enfrentan los investigadores ya que provocan cuantiosas pérdidas, generalmente por bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Estos microorganismos contaminantes actúan sobre las vitroplantas provocando daños directos e indirectos al medio de cultivo (Alvarado, 1998)

Organogénesis. Se trata del proceso que da lugar a la diferenciación de órganos vegetativos que comienza a partir de grupos celulares (Krikorian, 1982) que hace que no se consigan plantas idénticas a la original. Los brotes se pueden formar directamente a partir de explantes (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (Jiménez, 1998).

2.4. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

2.4.1. HIPÓTESIS GENERAL

Hi: El proceso de micropropagación in vitro influye en la recuperación y conservación del Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.

Ho: El proceso de micropropagación in vitro no influye en la recuperación y conservación del Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.

2.4.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

Hi1: Se puede desarrollar un proceso de preparación eficiente de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis bajo condiciones controladas, Huánuco, 2020.

Ho1: No se puede desarrollar un proceso de preparación eficiente de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis bajo condiciones controladas, Huánuco, 2020.

Hi2: Se puede desarrollar el proceso de micropropagación en concentraciones para el desarrollo de los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.

Ho2: No se puede desarrollar el proceso de micropropagación en concentraciones para el desarrollo de los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.

Hi3: Se puede desarrollar la micropropagación mediante la activación de areolas en condiciones asépticas, para los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.

Ho3: No se puede desarrollar la micropropagación mediante la activación de areolas en condiciones asépticas, para los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.

Hi4: Se puede determinar el porcentaje de sobrevivencia que se obtiene mediante la activación de areolas en el proceso de

micropropagación de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.

Ho4: No se puede determinar el porcentaje de sobrevivencia que se obtiene mediante la activación de areolas en el proceso de micropropagación de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.

2.5. VARIABLES

2.5.1. VARIABLE DEPENDIENTE

Recuperación y conservación del Echinopsis Cuscoensis

2.5.2. VARIABLE INDEPENDIENTE

Micropropagación

2.6. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 4

Operacionalización de variables

VARIABLES	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSION	INDICADORES	UNIDAD	TECNICA E INSTRUMENTO
INDEPENDIENTE: Micropropagación	La micro propagación o propagación in vitro, es una herramienta biotecnológica de gran Utilidad para la producción de plantas genéticamente homogéneas, que presenta importantes Ventajas con respecto a la propagación vegetativa tradicional, pero también puede presentar Algunos inconvenientes (George y Debergh, 2008)	Luego de haber seleccionado el material vegetal de acuerdo a una serie de fases. Según Murashige (1974), definió etapas en la propagación in vitro de plantas mediante el Cultivo de tejidos. Establecen 5 fases, siendo la fase preparativa la fase 0 (Debergh y Maene, 1981). Bhojwani y Razdan (1996) y George y Debergh (2008) diferencian también Fase 1: Inicio; Fase 2: Multiplicación; Fase 3: Enraizamiento in vitro; Considerando en cada una distintos procesos para lograr el éxito en la propagación	Preparación de Planta Madre	Nutrientes	gr/L	Ficha Técnica: Micropropagación In vitro, Evaluación y Observación
				Ciclo de crecimiento	Diámetro. factor de crecimiento	
DEPENDIENTE: Recuperación y Conservación del Echinopsis Cuzcoensis	La restauración forestal es la intervención que a través de distintas herramientas logra el restablecimiento de la estructura, la productividad y la diversidad de las especies originalmente presentes en el bosque. Con el tiempo, los procesos ecológicos y las funciones coincidirán con las del bosque original. (Vanegas, 2016)	La Recuperación y conservación de la especie Echinopsis Cuzcoensis (Cactaceae), pasará por un proceso de propagación utilizando la parte vegetativa del cactus, las areolas; seleccionado como mejor vía de multiplicación por ser zonas que presentan tejidos meristemáticos, las cuales son responsables del crecimiento vegetal, sembrados en el medio MS Murashige que inducirá a la formación de callos y brotes. (Godoy, 2019)	Fase de Micropropagación	Explante	Tamaño	Ficha técnica de Trabajo en campo
				Elongación y Enraizamiento	Tipo	
				Desinfección del material vegetativo (NaClO, H ₂ O ₂ , Etanol 70%)	Días	
				Elección del medio de cultivo	% Minutos	
			Fase de Micropropagación	Ph	Murashige & Skoog (gr.L)	
				Reguladores de Crecimiento	Acido/ base mg.L	
				Factores físicos	Intensidad	
				Porcentaje de formación de callos	Fotoperiodo cm	
			Areolas	Enraizamiento	Días	

Nota. Variables dependientes e independientes Adoptado del presente trabajo de investigación.

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

El nivel en esta investigación es de tipo Descriptivo, ya que se tomó información de manera conjunta sobre las variables en estudio y se detalló las características más significativas de la unidad de análisis, con el fin de revelar nuevos significados analizando lo que existe, determinando la constancia con la que ocurre algo, y categorizando información (Galeano,2004)

3.1.1. ENFOQUE

En esta investigación el enfoque utilizado fue mixto combinando técnicas (cualitativo – cuantitativo). Se aplicó el enfoque cuantitativo para medir las dosis de tratamiento, porcentajes de crecimiento, contaminación y para la preparación del medio. Y el enfoque cualitativo se utilizó porque se evaluó las características de la planta madre y de las plántulas obtenidas.

De acuerdo a Hernández, Fernández y Baptista (2010), refieren que la investigación se sustenta en dos enfoques principales: el enfoque cuantitativo y el enfoque cualitativo. Estos, a su vez, empleados de manera conjunta, conforman un tercer enfoque: El enfoque mixto, que consiste en la integración sistemática de estos dos métodos cualitativos y cuantitativos en un solo estudio, de tal manera que sus evaluaciones cualitativas y cuantitativas conserven sus estructuras y procedimientos originales esto permite obtener una imagen más completa del fenómeno.

3.2.1. DISEÑO METODOLÓGICO

El diseño empleado en mi investigación fue Experimental y fue de la siguiente manera:



- G = Grupo de muestras
- O1 = Sin intervención
- X = Tratamiento
- O2 = Con intervención

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1. POBLACIÓN

Tuvimos como población de estudio a la planta cactácea *Echinopsis cuzcoensis* o *Echinopsis Huanucoensis* (Britton y Rose) H. Friedrich y G.D. Rowley, anteriormente conocida como *Trichocereus Cuzcoensis*, a través de sus explantes, dos aréolas por unidad experimental, haciendo un total de 12 aréolas por tratamiento, provenientes de los tallos de consistencia dura. Según Gómez (2006), entenderemos por población al conjunto completo de individuos, objetos o medidas que comparten en un lugar y momento específicos características observables similares.

3.2.2. MUESTRA Y MÉTODO DE MUESTREO

De acuerdo con Gómez (2006), consideraremos como muestra al subconjunto que representa fielmente a la población.

En esta investigación, se utilizó un método de muestreo sistemático, pues se seguirá un patrón o criterio al seleccionar la muestra. La muestra de la planta *Echinopsis Cuzcoensis* no se pudo obtener de cultivos localizados en la zona, así que se adquirió un ejemplar de un jardín botánico de Lima. El material vegetal utilizado se extrajo a partir de un fragmento (explante) de la planta madre, areolas, para obtener plantas genéticamente idénticas.

Método de muestreo

En este trabajo, la muestra corresponde al tipo probabilístico: Al azar, la metodología que se utilizó para la producción de brotes in vitro es a partir de la activación de areolas del *Echinopsis Cuzcoensis*.

El modelo lineal para un diseño completamente al azar:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

Y_{ij} = Valor de la característica en estudio

μ = Media general

t_i = Efecto del tratamiento e_{ij} = Error

Para determinar la mejor concentración del crecimiento, se considerarán 03 tratamientos, cada uno con 6 repeticiones por tratamiento (18 tubos de ensayo, un tubo como unidad experimental) mas 1 testigo por tratamiento; donde se observará la respuesta de la activación de aréolas. Por el número limitado de plántulas obtenidas, se considerará un frasco como unidad experimental conteniendo dos plántulas.

La unidad experimental está conformada por 36 areolas, cada par de areolas fue implantada en recipientes individuales

3.3. RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

3.3.1. TÉCNICA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

Se empleó las siguientes técnicas:

- Observación
- Técnica de fichaje.

El procesamiento de datos se realizó mediante el uso del programa Minitab, el uso de tablas y gráficos como instrumento para tabular y expresar los valores obtenidos de la muestra y la ficha de monitoreo.

3.3.2. TÉCNICA PARA EL ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

Se realizó un análisis de varianza (Anova) para los datos obtenidos y se utilizó la prueba de Tukey HSD (Honestly Significant Difference) para comparar las medias y determinar las diferencias significativas a un nivel de $P \leq 0.05$ y de rangos múltiples de LSD de Fisher.

Análisis estadístico

Se empleó un método de análisis estadístico llamado ANOVA (análisis de varianza) que en este caso es varianza simple para el análisis de las variables cuantitativas, con mediciones repetidas en el tiempo sobre la misma unidad experimental. El diseño experimental fue completamente al azar y constó de 3 tratamientos, cada uno con 6 repeticiones (18 tubos de ensayo, un tubo como unidad experimental) y un testigo por tratamiento. Este modelo es adecuado para la estructura de los datos recopilados en este ensayo y también tiene en cuenta la variación de los mismos dentro de cada semana de observación.

Las variables de respuesta evaluadas fueron el porcentaje de supervivencia, explantes que sobrevivieron y lograron crecimiento y el porcentaje de crecimiento en cada tratamiento.

CAPÍTULO IV

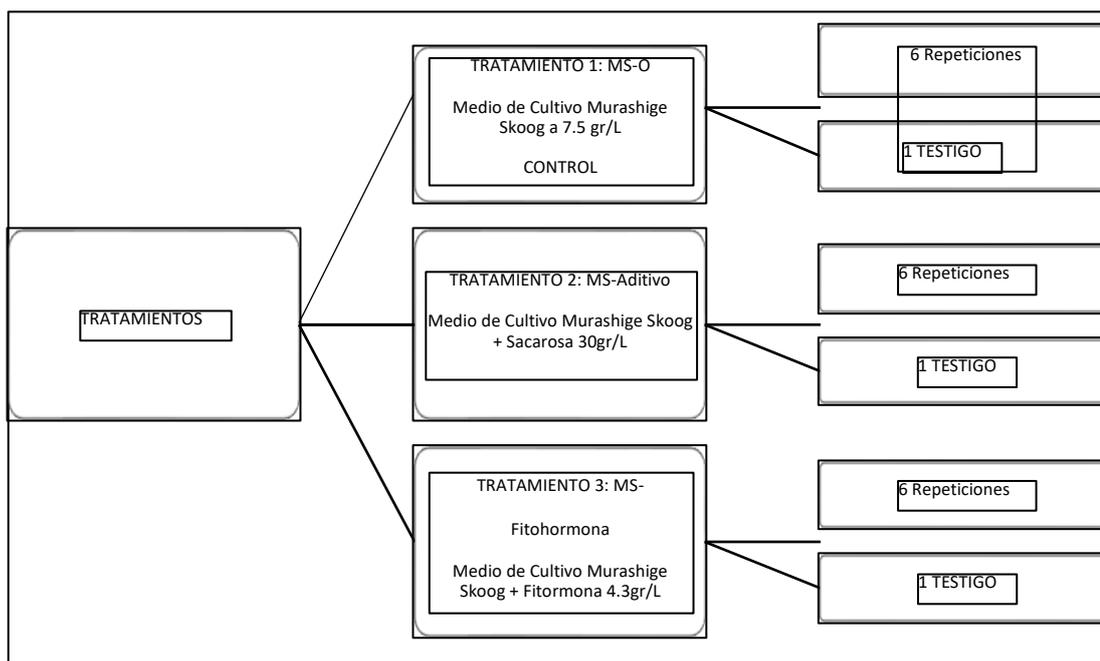
RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DESCRIPTIVOS

Evaluaciones que se realizó:

- En la fase de preparación de la planta madre: se realizó una pre desinfección de la planta con fungicidas y alcohol (70%) una semana previa.
- En la fase de desinfección: se consideró un tratamiento para la desinfección de los explantes, se utilizó como agente desinfectante Etanol, Peróxido de hidrogeno, Hipoclorito de sodio y alcohol al 70%, se modificó el tiempo de exposición en cada uno de los tratamientos.
- En la fase de establecimiento in vitro: se realizó la evaluación a los 10 días posteriores a la introducción del explante en el medio de cultivo, con el fin de observar si estaba o no contaminado por algún tipo de patógeno, aquí se realizó tres tratamientos:
 - El primer medio de cultivo que se emplea es el MS-O (medio regulador del crecimiento), agente gelificante (Agar).
 - El segundo medio de cultivo que se emplea es el Murashige Skoog MS-Aditivo (medio con reguladores del crecimiento y sacarosa)
 - El tercer medio de cultivo que se emplea es el Murashige Skoog MS-Fitohormona (medio con reguladores del crecimiento)

Figura 3
Cuadro Resumen de Tratamientos



Nota: Análisis de los tres tipos de tratamientos con distintos componentes

En la fase de crecimiento; se realizó la evaluación a los 2 meses posteriores a la introducción del explante en el medio de cultivo, evaluando el crecimiento, sobrevivencia y formación de callos en cada una de las plántulas por tratamiento.

4.2.1. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN 1

Tabla 5

Procedimiento de desinfección para los explantes

Agente Desinfectante	T1		T2		T3	
	Concen-tración	Tiempo (minutos)	Concen-tración	Tiempo (minutos)	Concen-tración	Tiempo (minutos)
Etanol	70	30 seg	70	30 seg	70	30 seg
Peróxido de Hidrogeno	3%	3-5m	3%	3-5m	3%	3-5m
Hipoclorito de Sodio	4%	8-12 m	4%	8-12 m	4%	8-12 m
Alcohol	70%	1	70%	1	70%	1
Antifúngico			1ml	Adicionado	1ml	Adicionado

Nota: Tratamientos de desinfección con concentraciones definidas, para cada tipo de tratamiento propuesto en esta investigación.

Para las pruebas se utilizó 36 explantes en total y se obtuvo 100 % de contaminación en el Tratamiento 1, siendo un porcentaje bajo de sobrevivencia para las condiciones in vitro (Tabla 7), mientras que un 16.7% y 0% de contaminación en los explantes en los Tratamientos 2 y 3, respondieron positivamente. La presencia de necrosis y contaminación fue la causa de la muerte de los explantes. (Tabla 6).

Tabla 6

Causas de Mortandad de explantes

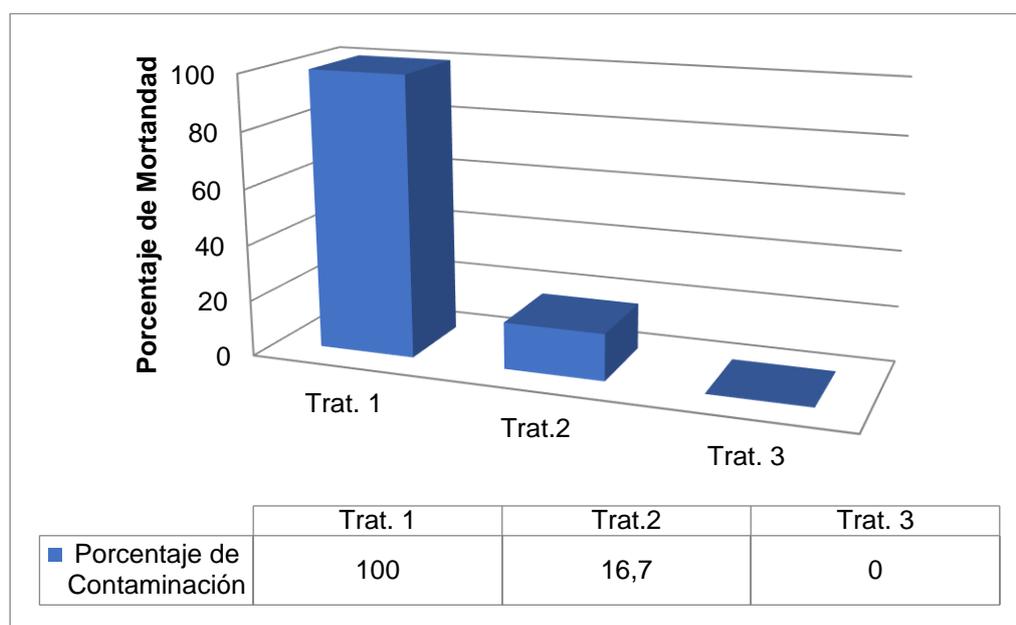
Explantes	Tratamiento			Nº Unidad Experimental	Porcentaje de Contaminación (%)
	1	2	3		
Contaminados	3	1	0	4	57.14
Necrosis	2	0	0	2	28.57
Ambos	1	0	0	1	14.29
Total	6	1	0	7	100

Nota: Análisis de Porcentaje de muertes causadas por necrosis, contaminación o ambos, por cada tratamiento propuesto.

Para los Tratamientos 1 y 2, se observó que los explantes que no lograron la formación de callos o brotes fue porque presentaban contaminación o necrosis en sus unidades experimentales, donde el Tratamiento 1 presenta porcentaje de crecimiento y sobrevivencia bajo.

Figura 4

Porcentaje de contaminación microbiana después de 10 días en cada tratamiento



Nota: Porcentajes de contaminación, necrosis o ambos, adoptado de los resultados de la Ficha de Monitoreo del presente trabajo de investigación.

Se observó que los tratamientos expuestos a un antifúngico, esto permitió obtener un porcentaje más alto de explantes sin la presencia de hongos ni bacterias. El tratamiento T1 sin la utilización de un antifúngico no se podía asegurar una respuesta adecuada dado que los explantes provenían de un cactus de alrededor de 7 años de edad. Como tratamiento de desinfección, se aplicó en el Tratamiento T2 y T3, un antifúngico farmacéutico durante todo el proceso de introducción in vitro. Durante la desinfección de los explantes, se ajustó el tiempo en función de su estado, (observando signos de oxidación o deterioro). Se introdujeron in vitro 2 areolas por envase y se realizó 6 repeticiones, se trabajó con explantes de 1.5 a 2 cm, después de someter los explantes a un proceso de desinfección, se registró una tasa de mortalidad del 38,88% debido a la presencia de contaminación, necrosis o ambas causas. (Figura 4).

Procesamiento de datos de la Evaluación de la sobrevivencia y crecimiento del *Echinopsis Cuzcoensis* en medio de cultivo.

Tabla 7

Evaluación de la sobrevivencia y crecimiento de los 3 tratamientos en función al Medio de Cultivo

SEMANA	T1=MS-0		T2=MS/Aditivo		T3=MS/Fitohormona	
	Sobrevivencia	Crecimiento	Sobrevivencia	Crecimiento	Sobrevivencia	Crecimiento
1	6	0	6	0	6	0
2	5	0	6	0	6	0
3	5	0	5	1	6	1
4	4	0	5	1	6	1
5	3	0	5	1	6	3
6	0	0	5	2	6	3

Nota: Adoptado de los resultados de la Ficha de Monitoreo del presente trabajo de investigación, donde se evalúa la sobrevivencia y crecimiento en los 3 tratamientos propuestos.

Esta tabla 7 muestra el resultado de los tres ensayos de introducción en el medio de cultivo, lo cual presenta datos poco satisfactorios para el tratamiento 1 (grupo control). Se puede observar que en el segundo y tercer tratamiento el porcentaje de sobrevivencia y crecimiento asciende ya sea esto por la técnica empleada o aditivos.

Para el cálculo del porcentaje de sobrevivencia se utilizó la siguiente ecuación:

% Sobrevivencia:	$\frac{Pv}{(pv + pm)} \times 100$
------------------	-----------------------------------

Dónde:

Pv: plantas vivas

Pm: plantas muertas.

Porcentaje de Crecimiento (%)

$$T_1 = 0\%$$

$$T_2 = \frac{2 \times 100}{2 + 4} = 33.33\%$$

$$T_3 = \frac{3 \times 100}{3 + 3} = 50.00\%$$

Se llevó a cabo la evaluación del crecimiento hasta dos meses después de la introducción. Los explantes que no recibieron tratamiento con fitohormonas y aditivos presentaron un porcentaje de crecimiento del 0%.

Por otro lado, los explantes que recibieron tratamiento mostraron una respuesta significativa en cuanto al crecimiento in vitro, obteniéndose un 33,33% de crecimiento en aquellos tratados con aditivos, Los explantes que fueron sometidos al tratamiento con fitohormonas lograron un porcentaje de crecimiento del 50,00%, y también se observó un aumento en el porcentaje de sobrevivencia.

Porcentaje de Sobrevivencia (%)

$$T_1 = 0\%$$

$$T_2 = \frac{5}{5 + 1} \times 100 = 83.33\%$$

$$T_3 = \frac{6}{6 + 0} \times 100 = 100.00\%$$

Igualmente, que lo anterior, se evaluó la supervivencia hasta dos meses después de la introducción. En el caso de los explantes que no recibieron tratamiento con fitohormonas y aditivos, se observó un porcentaje de supervivencia del 0%. Mientras que los explantes con tratamiento, tuvieron una gran respuesta a la supervivencia, se obtuvo un 83.33%, explantes sanos, los explantes que recibieron tratamiento con fitohormonas lograron un porcentaje de supervivencia del 100,00%. teniendo un incremento en la misma.

La evaluación de los explantes del *Echinopsis Cuzcoensis* a las 6 semanas de la introducción en el medio de cultivo, y se observa que el T1 el porcentaje de crecimiento y sobrevivencia es nulo, en cambio se obtuvo mejores resultados en el tratamiento T3 con medio Murashige Skoog y fitohormona.

4.2.2. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN 2

En la tabla 8 de los resultados ANOVA, se observan diferencias significativas en cuanto al nivel de sobrevivencia, lo que indica que el efecto de los tratamientos no se comporta de la misma manera en los diferentes medios de cultivo.

Totales y Medias

Tabla 8

Total de sobrevivencia en función a tipo Medio de Cultivo

SEMANA	T1=MS-0	T2=MS/Aditivo	T3=MS/Fitohormona	
	Sobrevivencia	Sobrevivencia	Sobrevivencia	
1	6	6	6	
2	5	6	6	
3	5	5	6	
4	4	5	6	
5	3	5	6	
6	0	5	6	
n	6	6	6	18=N
Y _i	0	5	6	11=Y _{..}

Nota: Cuadro resumen de la cantidad de explantes sobrevivientes en la investigación mediante análisis de totales y medias en función al medio de cultivo

n : Número de repeticiones por tratamiento

N : Total de numero de repeticiones

Y_i : Número de sobrevivencia por tratamiento

Y_{..} : Total de numero de sobrevivencia

Tratamientos

$$K - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$N - K = 18 - 3 = 15 \quad \mathbf{K:}$$
 Numero de tratamiento

$$N - 1 = 18 - 1 = 17 \quad \mathbf{N:}$$
 Total de número de repeticiones

Para la Media de sobrevivencia tenemos:

$$SC_{Tot} = \sum_{i=1}^n (y_i - y)^2 = 38.94$$

$$SC_{Trt} = \sum_{i=1}^n (y_i - y)^2 = 14.78$$

$$SC_{error} = SC_{Tot} - SC_{Trt} = 38.94 - 14.78 = 24.17$$

En las ecuaciones anteriores se puede ver que las sumas de cuadrados son los numeradores de las varianzas respectivas, esto nos permite estimar la eficiencia de uno o más tratamientos evaluados, a continuación, en la tabla 9 hacemos el análisis de la varianza.

Análisis para la evaluación sobrevivencia - Varianza

Tabla 9

Análisis de Sobrevivencia en función al Tipo de Cultivo

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	14.78	37.95%	14.78	7.389	4.59	0.028
Error	15	24.17	62.05%	24.17	1.611		
Total	17	38.94	100.00%				

Nota. Evaluación estadística en función a la varianza de sobrevivencia en función al tipo de cultivo

El análisis de Varianza en la tabla 9 señala que para las fuentes de variación puestas en evaluación: Los tratamientos de T1 (MS-0) T2 (MS-Aditivo) y el T3 (MS- Fitohormona) con un nivel de significancia de 0.05 y con un valor de p de 0.028 se aprecia que hay una diferencia estadística significativa en cuanto al crecimiento en los medios de cultivos evaluados, a un nivel de significancia de 95% de confianza experimental de los resultados obtenidos. Para validar este resultado se realizó la prueba de Tukey y Fisher a continuación.

Tabla 10

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad.	PRESS	R-cuad.
1.2693	37.95%	29.67%	34.8	10.64%

Nota. Análisis estadístico resumen para la distancia entre los valores de datos y valores ajustados

Tabla 11

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
t1	6	3.833	2.137	(2.729, 4.938)
t2	6	5.333	0.516	(4.229, 6.438)
t3	6	6	0	(4.896, 7.104)

Nota. Análisis estadístico comparación con la desviación estándar por cada dato de la tabla

La desviación estándar agrupada en la Tabla 10. nos muestra la distancia entre los valores de datos y los valores ajustados, este resultado ($S = 1.2693$) se compara con la desviación estándar de cada dato de la Tabla 11. ($T1=2.137$, $T2=0.516$ y $T3=0$), los valores que son menores indican un mejor ajuste y los valores mayores indican un peor ajuste.

Desviación estándar agrupada = 1.26930

Test HSD de Tukey

$$HSD = a \sqrt{\frac{b}{c}} = 1.9019$$

$a = \text{Multiplicador} = 3.67$

$$b = MSe = \frac{24.17}{15} = 1.6113$$

$c = n = 6$

Tabla 12

Diferencia de Medias de supervivencia entre grupos por pareja

	T1	T2	T3
T1	X	1.5	2.167
T2		X	0.667
T3			X

Nota. Análisis estadísticos de la diferencia de supervivencia entre grupos

No se observó una diferencia significativa entre los tratamientos T2 y T3.

Información utilizando el método de Tukey y nivel de confianza de 95%.

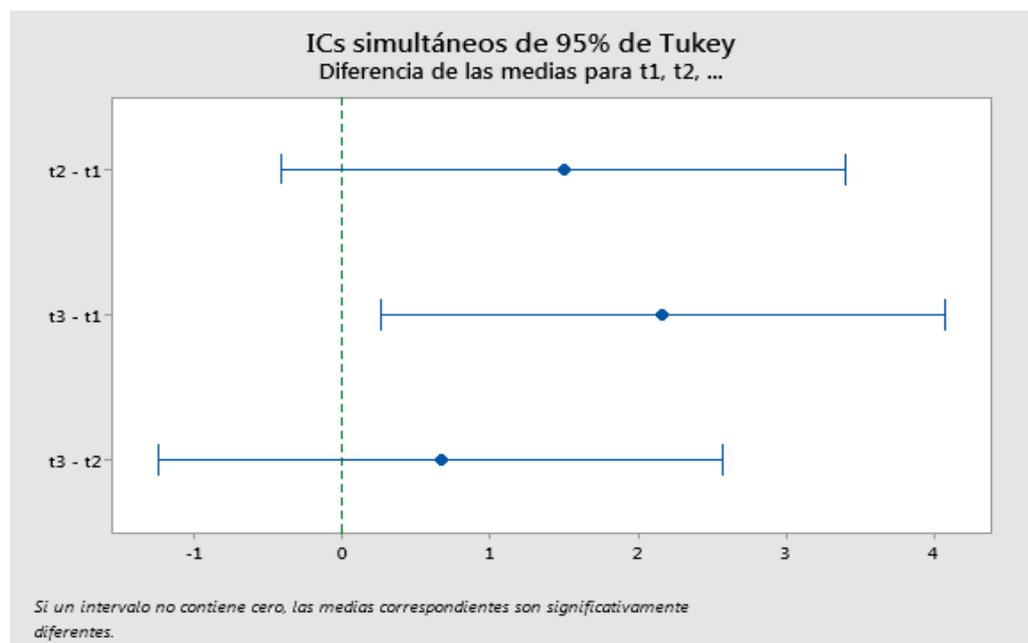
Tabla 13
Comparaciones de Tukey para Análisis de Supervivencia

Factor	N	Media	Agrupación	
t3	6	6	A	
t2	6	5.333	A	B
t1	6	3.833	B	

Nota. Análisis utilizando el método de Tukey al 95%

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Figura 5
Índice de Confianza Simultáneos de 95% para T1, T2, T3



Nota. Análisis del índice de confianza al 95% de Tukey para cada tratamiento de la investigación.

En la figura 5 se puede contrastar que T3 posee una media significativamente mayor que el T1.

Información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%.

Tabla 14
Prueba de rangos múltiples de LSD de Fisher

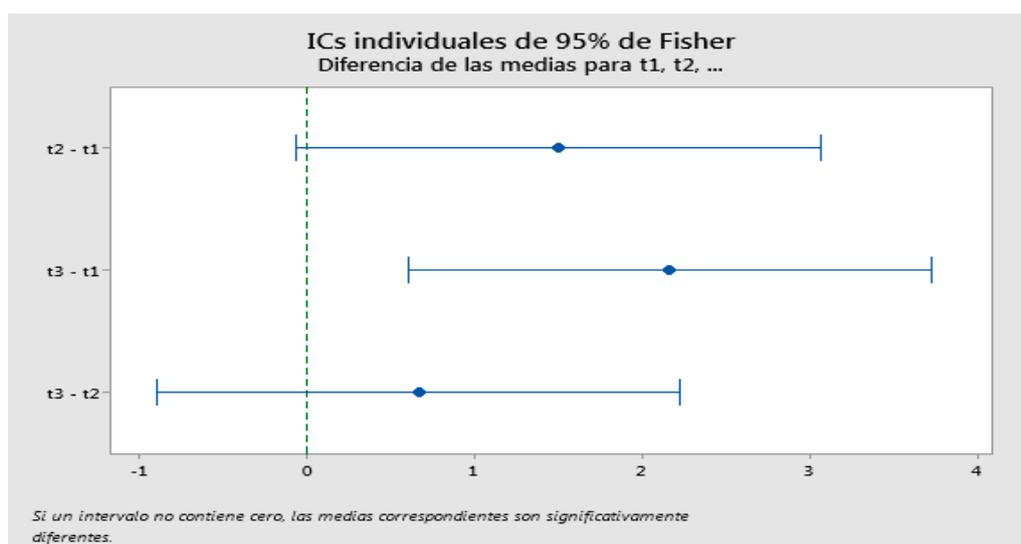
Factor	N	Media	Agrupación	
t3	6	6	A	
t2	6	5.333	A	B
t1	6	3.833		B

Nota. Análisis estadísticos de rangos de Fisher

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

De acuerdo con los análisis de Tukey y Fisher, se concluye que los tratamientos aplicados (explantos con Murashige Skoog con fitohormona y solo con Murashige Skoog) son significativos en los resultados obtenidos. Los explantes solo con MS no llegan a sobrevivir en un medio sin otros aditivos correspondientes.

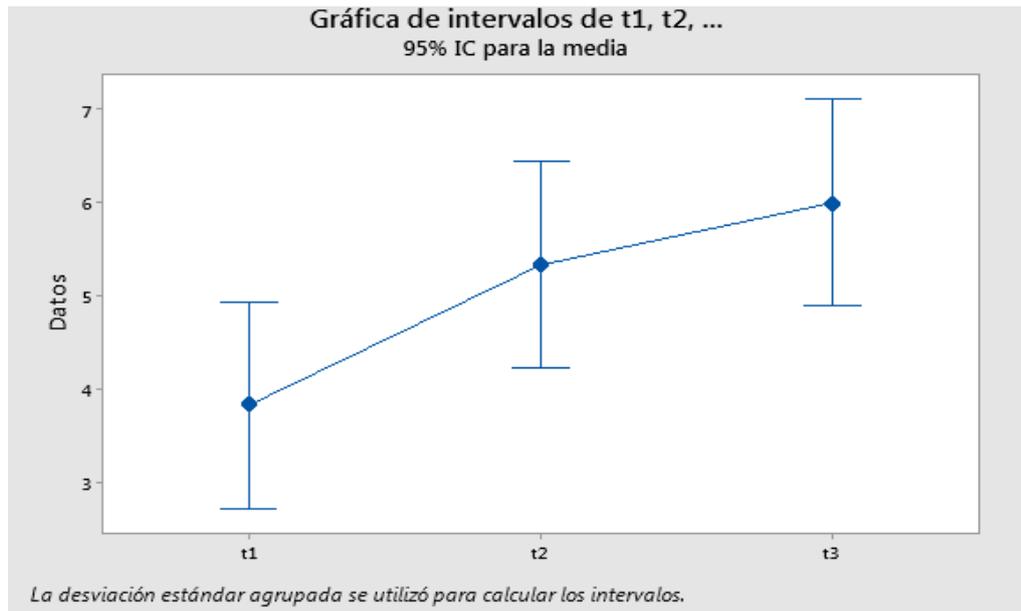
Figura 6
Índice de confianza Individual de 95% para T1, T2, T3



Nota. Análisis del índice de confianza de Fisher, individual por tratamiento

En la figura 6, al igual que en la figura 5, se puede contrastar que T3 posee una media significativamente mayor que el T1.

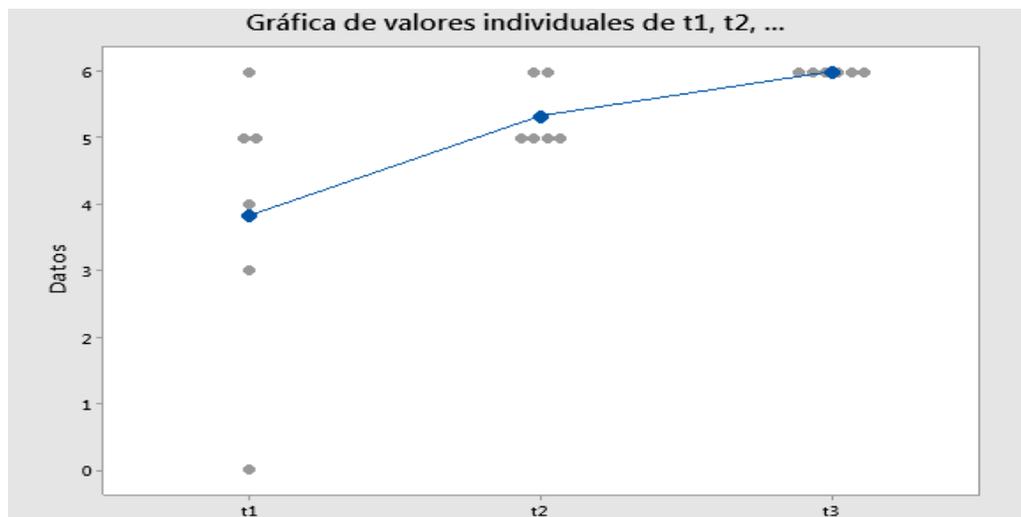
Figura 7
Gráfica de Intervalos para T1, T2, T3.



Nota. Análisis de índice de confianza para la media

En la figura 7, de intervalos, el T1 tiene la media más baja y T3 tiene la media más alta.

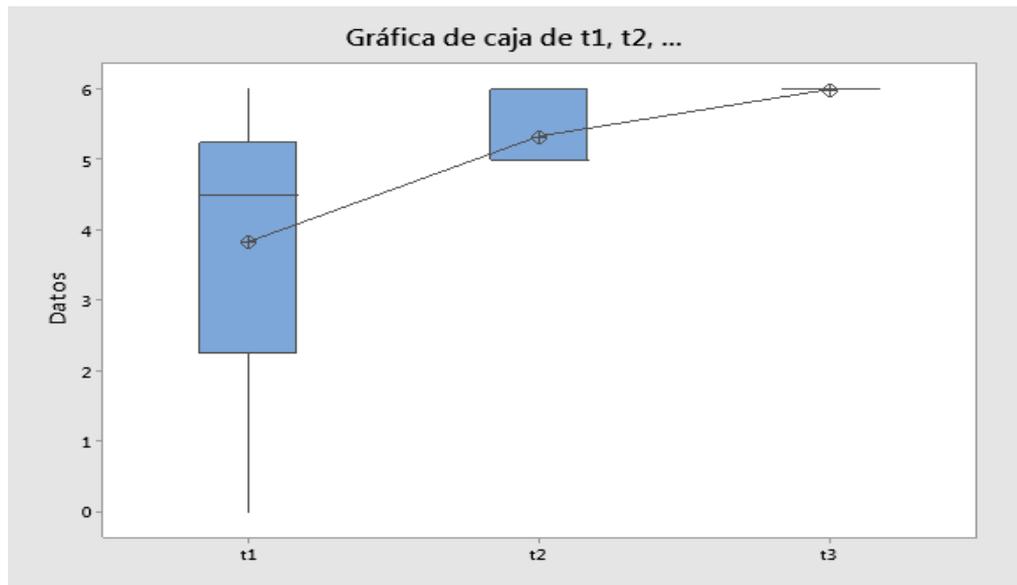
Figura 8
Valores Individuales de T1, T2, T3.



Nota: Adoptado de los resultados de la Ficha de Monitoreo del presente trabajo de investigación.

En la figura 8. de valores individuales, el T1 tiene una mayor dispersión en cuanto a su valor real, mientras T2 y T3 tienen una menor dispersión, siendo el T3 con mejor distribución de datos.

Figura 9
Caja de T1, T2, T3.



Nota: Comparaciones mediante análisis de caja para cada tratamiento

En la figura 9 de caja, al igual que en la figura 8, se muestra que el T1 tiene una mayor dispersión en cuanto a su valor real, mientras T2 y T3 tienen una menor dispersión, siendo el T3 con mejor distribución de datos.

4.2.3. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN 3

Crecimiento en función a tipo de medio de cultivo Totales y Medias

Tabla 15

Total de Crecimiento en función a tipo Medio de Cultivo.

SEMANA	T1=MS-0	T2=MS/Aditivo	T3=MS/Fitohormona	
	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	
1	0	0	0	
2	0	0	0	
3	0	1	1	
4	0	1	1	
5	0	1	3	
6	0	2	3	
n	6	6	6	18=N
Yi	0	2	3	5=Y..

Nota: Análisis estadístico en función al tipo de medio de cultivo

n: Número de repeticiones por tratamiento

N: Total de numero de repeticiones

Yi: Número de sobrevivencia por tratamiento

Y..: Total de numero de sobrevivencia

Tratamientos

$$K - 1 = 3 - 1 = 2; \quad N - K = 18 - 3 = 15; \quad N - 1 = 18 - 1 = 17$$

$$SC_{Tot} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 = 17.611$$

$$SC_{Trt} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 = 5.444$$

$$SC_{error} = SC_{Tot} - SC_{Trt} = 17.611 - 5.444 = 12.167$$

En las ecuaciones anteriores se puede ver que las sumas de cuadrados son los numeradores de las varianzas respectivas, esto nos permite estimar la eficiencia de uno o más tratamientos evaluados.

Análisis de la varianza de crecimiento

Tabla 16

Análisis del crecimiento en función al Tipo de Cultivo

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	5.444	30.91%	5.444	2.7222	3.36	0.062
Error	15	12.167	69.09%	12.167	0.8111		
Total	17	17.611	100.00%				

Nota: análisis de la varianza en función al análisis de crecimiento

Aunque el análisis de varianza (ANOVA) indica que no existen diferencias significativas y sugiere que es indiferente utilizar cualquier tipo de medio de cultivo, se opta por seleccionar los tratamientos T2 y T3 debido a que, tras una evaluación cuantitativa, se observó que los explantes presentaron un mayor número de crecimientos, lo que indica un mejor desarrollo en comparación con los otros tratamientos. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe una relación entre el número de crecimiento y el tipo de medio de cultivo utilizado a un nivel de significancia del 95% de confianza experimental. Para validar este resultado se realizó la prueba de Tukey y Fisher, a continuación.

Tabla 17

Resumen del Modelo

S	R-cuad.	R-cuad.	PRESS	R-cuad.
0.901	30.91%	21.70%	17.52	0.52%

Nota. Análisis estadístico resumen para la distancia entre los valores de datos y valores ajustados

Tabla 18

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T1	6	0	0	(-0.783682, 0.783682)
T2	6	0.833	0.753	(0.050, 1.617)
T3	6	1.333	1.366	(0.550, 2.117)

Nota. Análisis estadístico comparación con la desviación estándar por cada dato de la tabla

Desviación estándar agrupada = 0.900617

Test HSD De Tukey

$$\text{HSD} = a \sqrt{\frac{b}{c}} = 1.3494$$

$$a = \text{Multiplicador} = 3.67$$

$$b = \text{MSe} = \frac{12.167}{15} = 0.8111$$

$$c = n = 6$$

Tabla 19

Diferencia de Medias de crecimiento entre grupos por pareja

	T1	T2	T3
T1	X	0.833	1.333
T2		X	0.5
T3			X

Nota. Análisis estadísticos de la diferencia de crecimiento entre grupos

No hay diferencia significativa entre T2 y T3.

Información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%.

Tabla 20
Comparaciones de Tukey para Análisis de Crecimiento

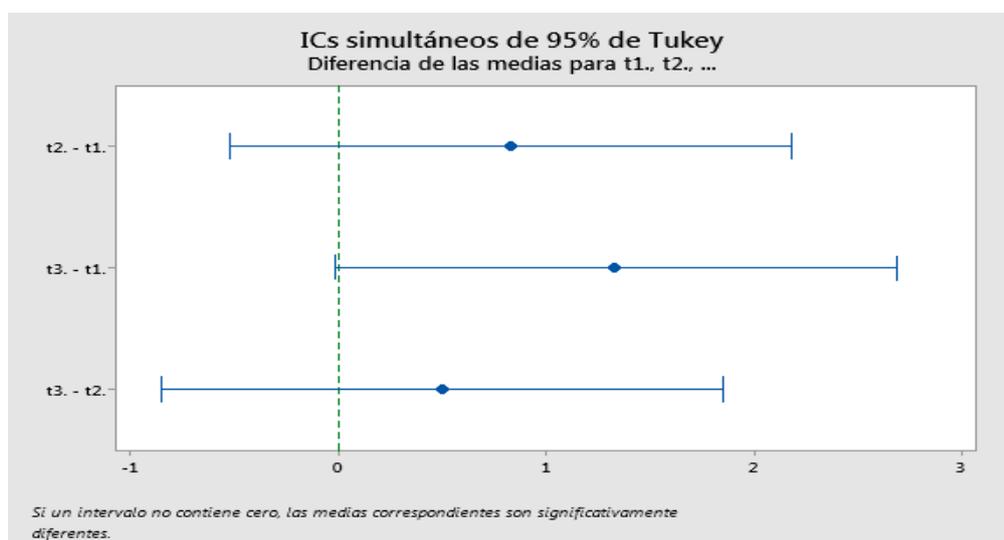
Factor	N	Media	Agrupación
T3	6	1.333	A
T2	6	0.833	A
T1	6	0	A

Nota. Análisis utilizando el método de Tukey al 95% para el análisis de crecimiento

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

La composición de los medios de cultivo que favorece el crecimiento, T2 y T3, contiene aditivos y fitohormonas. Según Pierik (1990), estas hormonas promueven la formación de raíces. Además, el medio T2 está compuesto por MS y sacarosa (hidrato). Aunque T1 tiene igualdad esto lo validaremos con LSD de Fisher

Figura 10
Índice de Confianza Simultáneos de 95% para T1, T2, T3



Nota. Análisis del índice de confianza al 95% para cada tratamiento de la investigación.

En la figura 10, se puede observar que ningún tratamiento tiene medias significativamente diferentes.

Información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%.

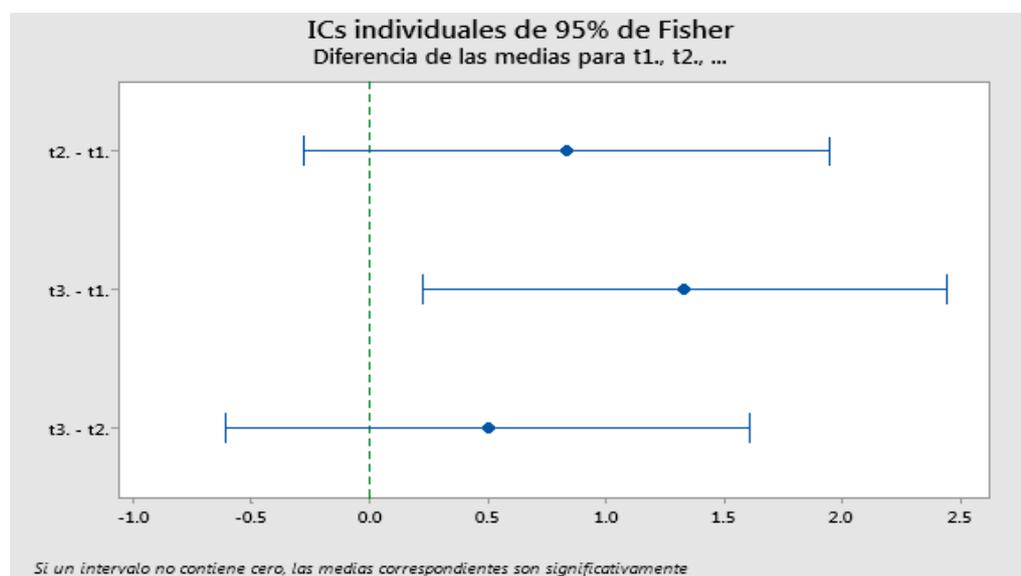
Tabla 21
Prueba de rangos múltiples de LSD de Fisher

Factor	N	Media	Agrupación	
T3	6	1.333	A	
T2	6	0.833	A	B
T1	6	0		B

Nota. Análisis estadísticos de rangos múltiples de Fisher

De acuerdo con el análisis de Fisher, se concluye que los tratamientos aplicados (explantos con Murashige Skoog con fitohormas de crecimiento y solo con Murashige Skoog) son significativos en los resultados obtenidos. Además, se observó que los explantes que solo se cultivaron en MS no lograron desarrollar su crecimiento en un medio sin la presencia de aditivos o fitohormonas.

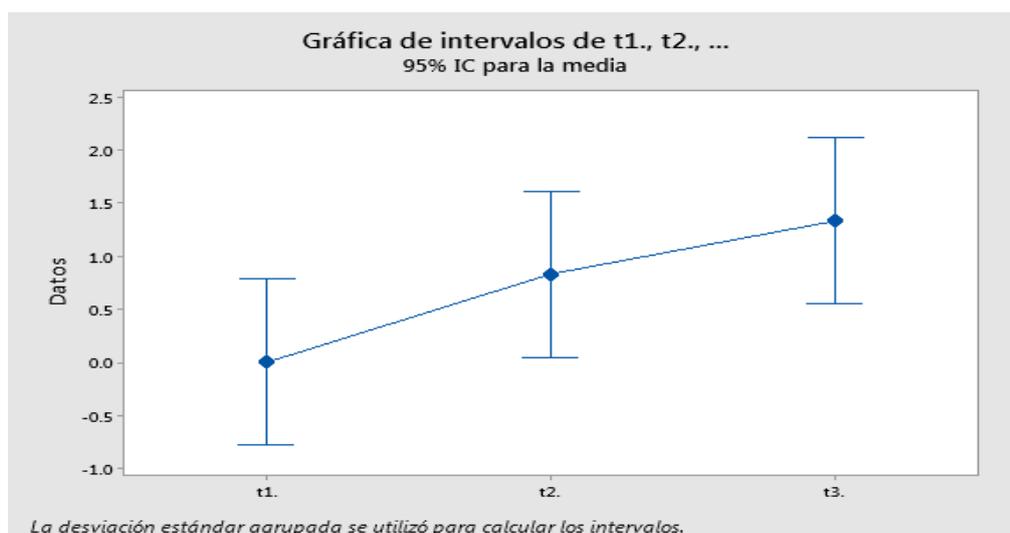
Figura 11
Índice de confianza Individual de 95% para T1, T2, T3



Nota: Análisis del índice de confianza de Fisher, individual por tratamiento

En la figura 11, usando el método de Fisher, si se puede contrastar que T3 posee una media significativamente mayor que el T1

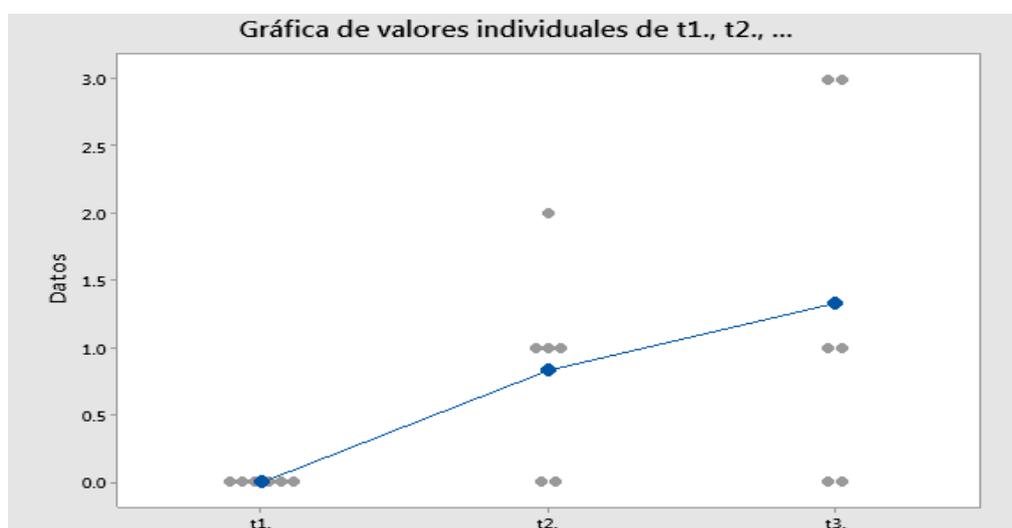
Figura 12
Gráfica de Intervalos para T1, T2, T3



Nota. Análisis de índice de confianza para la media

En la figura 12, de intervalos, el T1 tiene la media más baja y T3 tiene la media más alta.

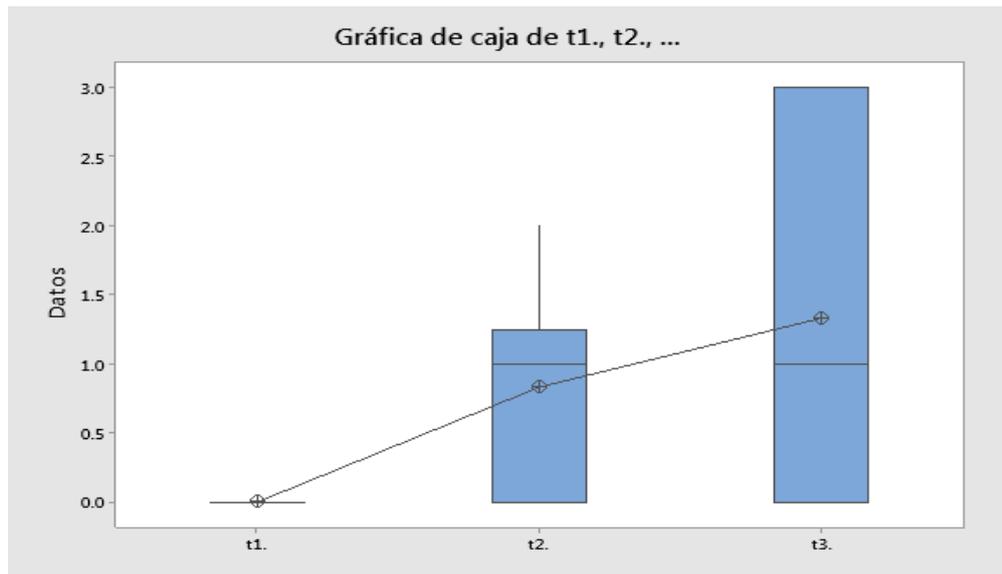
Figura 13
Valores Individuales de T1, T2, T3.



Nota: Adoptado de los resultados de la Ficha de Monitoreo del presente trabajo de investigación.

En la figura 13. de valores individuales, en cuanto al crecimiento el T1 tiene una menor dispersión igual a 0, en cuanto a su valor real, mientras T2 y T3 tienen una mayor dispersión, siendo el T3 el de mayor dispersión, indicando que el T3 tuvo mayor tendencia al crecimiento.

Figura 14
Caja de T1, T2, T3



Nota: Comparaciones mediante análisis de caja para cada tratamiento

En la figura 14, grafica de caja, al igual que en la figura 13, se muestra que el T1 tiene una menor dispersión igual a 0, en cuanto a su valor real, mientras T2 y T3 tienen una mayor dispersión, siendo el T3 el de mayor distribución de datos, indicando que el T3 tuvo mayor tendencia al crecimiento.

4.3. RESULTADOS INFERENCIALES

4.3.1. CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS GENERAL

Se llevó a cabo pruebas estadísticas para contrastar las hipótesis específicas, utilizando el análisis de ANOVA para comparar las medias de los tratamientos evaluados y se procesó con la prueba de rangos múltiples de HSD (Honestly Significant Difference) de Fisher. Además, se utilizó la prueba de Tukey para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos evaluados con un nivel de confianza del 95% ($P \leq 0.05$), ya que todas las muestras fueron evaluadas con la misma cantidad de repeticiones por tratamiento.

Hi: La micropropagación in vitro del *Echinopsis Cuzcoensis* influye en la obtención de plántulas viables, para la recuperación y conservación Huánuco, 2020.

Ho: La micropropagación in vitro del *Echinopsis* no influye en la obtención de plántulas viables, para la recuperación y conservación, Huánuco, 2020.

Interpretación

Se utilizó la varianza Anova para contrastar la hipótesis propuesta, demostrando así que micropropagación in vitro influye positivamente en la recuperación de la especie del *Echinopsis Cuzcoensis* ya que los valores obtenidos con la prueba de HSD Tukey y Fisher demuestran que no hay significancia en el tratamiento 2 y tratamiento 3, rechazando la hipótesis nula y aceptando la alternativa Hi.

4.3.2. CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS ESPECÍFICA

Contrastación de las hipótesis específica Hi1 y Ho1

Hi1: La preparación de la planta madre bajo condiciones controladas contribuye a la recuperación y conservación del *Echinopsis Cuzcoensis* Huánuco, 2020.

Ho1: No se puede desarrollar un proceso de preparación eficiente de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis* bajo condiciones controladas, Huánuco, 2020.

Interpretación

Para poder establecer la asepsia de los explantes, se mantuvo a la planta madre bajo condiciones controladas y condiciones sanitarias optimas previas a la introducción en el medio y durante la manipulación en la introducción de explantes, obteniendo un 100 % de sobrevivencia en el Tratamiento 3, mientras que un 100% y 16.7% de contaminación en los explantes en los Tratamientos 1 y 2 respectivamente, estos porcentajes son relativamente bajos en las condiciones in vitro. La muerte de los explantes se debió a la presencia de necrosis y contaminación.

Contrastación de las hipótesis específica Hi2 y Ho2

Hi2: El proceso de micropropagación favorece el porcentaje de desarrollo de los explantes del *Echinopsis Cuzcoensis* para su conservación y recuperación, Huánuco, 2020

Ho2: No se puede desarrollar el proceso de micropropagación en concentraciones para el desarrollo de los explantes de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis*, Huánuco, 2020.

Interpretación

Luego de evaluar los resultados del crecimiento T1 (0%), T2 (33.33%) y T3 (50%) a la par de la sobrevivencia 0%, 83.33% y 100% respectivamente, Se puede confirmar que, el proceso de micropropagación si favorece el porcentaje de desarrollo, tomando en cuenta la elección del medio de cultivo y reguladores de crecimiento se obtienen mejores resultados.

Contrastación de las hipótesis específica Hi3 y Ho3

Hi3: La activación de areolas en condiciones asépticas logra la conservación y recuperación del Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.

Ho3: No se puede desarrollar la micropropagación mediante la activación de areolas en condiciones asépticas, para los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.

Interpretación

En la Tabla 7 “Evaluación de la sobrevivencia y crecimiento de los 3 tratamientos” se puede determinar que los ensayos que no fueron sometidos a un antifúngico no permitieron obtener resultados favorables; mientras que El sistema de esterilización utilizado para desinfectar los explantes de Echinopsis Cuzcoensis en los tratamientos T2 y T3 fue efectivo, ya que el 91.6% de los explantes sobrevivieron.

Contrastación de las hipótesis específica Hi4 y Ho4

Hi4: Mediante la activación de areolas del Echinopsis Huanucoensis en la micropropagación in vitro el porcentaje de sobrevivencia es óptimo

Ho4: No se puede determinar el porcentaje de sobrevivencia que se obtiene mediante la activación de areolas en el proceso de micropropagación de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.

Interpretación

Según los datos de la Tabla N° 8 “Total de sobrevivencia en función a tipo Medio de Cultivo”, el número de sobrevivencia por tratamiento varía según el medio de cultivo utilizado, como es MS-O, MS-Aditivo, MS- Fitohormona, siendo estos los porcentajes de sobrevivencia por tratamiento.

Porcentaje de Supervivencia (%)

$$T_1 = 0\%$$

$$T_2 = \frac{5}{5+1} \times 100 = 83.33\%$$

$$T_3 = \frac{6}{6+0} \times 100 = 100.00\%$$

Presentando el T2 y T3 componentes especiales para una mayor activación de areolas y supervivencia del *Echinopsis Cuzcoensis*.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En relación al objetivo específico 1. Desarrollar un proceso de preparación eficiente de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis* bajo condiciones controladas, Huánuco, 2020.

Al analizar los resultados en nuestra investigación acerca del proceso de preparación eficiente de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis* bajo condiciones controladas, Huánuco, 2020, se concluyó que para poder desarrollar un proceso de preparación eficiente de la planta madre (*Echinopsis Cuzcoensis*) se debe realizar la pre desinfección de la planta donadora con fungicidas, para evitar contaminaciones por parte de esta; estos resultados guarda similitud en el uso de fungicida como uno de los mejores medios para obtener plantas libre de contaminantes y que se sustentan con lo publicado Bogado et al. (2016), en la tesis para optar el grado de ingenieros agrónomo, denominado “Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Grevillea robusta*”; la tesis se enfocó en la evaluación del uso de diferentes tipos de desinfectantes superficiales en el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Grevillea robusta*. A. Cunn, dado que la contaminación microbiana es un problema recurrente es fundamental implementar medidas para evitar su contaminación en los métodos in vitro.

En relación al objetivo específico 2. Desarrollar el proceso de micropropagación en concentraciones para el desarrollo de los explantes de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis*, Huánuco, 2020.

Al evaluar los datos obtenidos en nuestra investigación acerca del proceso de micropropagación en concentraciones para el desarrollo de los explantes de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis*, Huánuco, 2020, Se determinó que el medio de cultivo Murashige Skoog suplementado con fitohormonas es más efectivo para el crecimiento, debido al mayor porcentaje

de explantes y su mejor desarrollo. No obstante, el medio con MS y sacarosa también favorece la inducción del crecimiento. pero en menor proporción; estos resultados guardan similitud con lo obtenido por Ordóñez (2003) en la tesis para optar el grado de Licenciada en Biología, denominado “Propagación in vitro de *Mammillaria voburnensis* Scheer. (Cactaceae)” realizada en la Universidad de San Carlos de Guatemala. Realizó su investigación en dos etapas, primero seleccionó a la planta madre en este caso a *Mammillaria voburnensis* Scheer. Como especie a trabajar según sus características definidas, luego de recolectar los frutos de esta planta en el campo y realizar la germinación de sus semillas en condiciones in vitro, se efectuó de la siguiente manera:

Durante la fase inicial establecida de esta investigación el autor logró una tasa de germinación del 80% utilizando el (MS) de Murashige y Skoog, posterior a seis meses en invernadero las plántulas que tenían una altura aproximada de un centímetro fueron aprovechadas como material para producir los nuevos explantes. En la segunda etapa, se indujo la formación de brotes axilares, para lo cual se compararon y evaluaron en 7 tratamientos con distintos componentes, incluyendo el medio de Murashige y Skoog (MS) como principal ingrediente, complementando con diferentes combinaciones y concentraciones de bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) y el testigo regulador de crecimiento.

Los últimos resultados estadísticos muestran que la *Mammillaria voburnensis* Scheer requería una porción determinada de proteínas de citocinina, una concentración moderada de bencilaminopurina y auxina, y baja concentración de ácido naftalenacético para obtener brotes viables.

En relación al objetivo específico 3. Desarrollar la micropropagación mediante la activación de areolas en condiciones asépticas, para los explantes de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis*, Huánuco, 2020.

Al evaluar los datos obtenidos en nuestra investigación acerca de desarrollar la micropropagación mediante la activación de areolas en condiciones asépticas, los tejidos vegetales extraídos de la planta donante de

Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020, se tiene que durante el desarrollo del proceso de micropropagación se debe seguir las fases que favorezca el desarrollo de los explantes, para ello se debe conseguir la asepsia en cada uno de los procesos importantes para evitar contaminación y lograr la sobrevivencia de los tejidos vegetales introducidos en las soluciones de agar para el cultivo del estudio; estos resultados guardan similitud con lo obtenido por Avalos (2010) en su tesis de maestría, denominado "Cultivo y Propagación in vitro de Cactáceas de los géneros Hylocereus Y Selenicereus" realizado en la Universidad Autónoma de Aguascalientes. El autor realizó una investigación con el objetivo de explotar racionalmente y mejorar a través de métodos biotecnológicos y propagación masiva in vitro de estas especies, realizó un protocolo para la desinfección e inoculación, logrando los tejidos in vitro del Hylocereus y Selenicereus, el autor desarrolló el crecimiento vegetal probando los reguladores: CIN, 2Ip, TDZ, mT y BA y probando el tipo de medio y porcentaje de componentes más óptima para la obtención de brotes, como ejemplar vegetal utilizó semillas del Hylocereus undatus y tejido vegetal de Selenicereus validus; el cual se estableció in vitro y desarrolló la propagación in vitro de estas especies por la activación de yemas axilares, llegó a las siguientes conclusiones:

Realizó la desinfección mediante un sistema de esterilización de las semillas de H. undatus. El medio MS fue el más idóneo para la germinación de las semillas, mientras que el medio MS + 0.5mg/L BA fue el más favorecedor al crecimiento de las plántulas germinadas.

Se hizo un protocolo a través de la activación de areolas, diseñado y establecido para la propagación masiva, que resultó satisfactorio para ambas especies: Hylocereus y Selenicereus (Cactaceae).

En relación al objetivo específico 4. Determinar el porcentaje de sobrevivencia que se obtiene mediante la activación de areolas en el proceso de micropropagación de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.

Al evaluar los datos obtenidos en nuestra investigación acerca de determinar el porcentaje de sobrevivencia que se obtiene por medio de la

activación de las yemas axilares o areolas en el proceso de micropropagación de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis*, Huánuco, 2020, se encontró que la micropropagación in vitro contribuye con la propagación del *Echinopsis Cuzcoensis*, obteniendo de 18 repeticiones un total de 11 ejemplares sobrevivientes, el que representa un 61.11% de sobrevivencia. Y de estos un total de 5 ejemplares mostraron crecimiento, representando un 45.45% de crecimiento del total de ejemplares vivos; Los resultados obtenidos en este estudio presentan similitudes con los resultados obtenidos por Avalos en su tesis de maestría, denominado “Cultivo y Propagación in vitro de Cactáceas de los géneros *Hylocereus* Y *Selenicereus*” (Avalos, 2010) realizado en la Universidad Autónoma de Aguascalientes. El autor realizó un protocolo a través de la activación de areolas, diseñado y establecido para la propagación masiva, siendo satisfactorios para ambas especies: *Hylocereus* y *Selenicereus* (Cactaceae).

Cuando se analizó estadísticamente los resultados, se demostró que el tratamiento más eficaz para la especie *H. undatus* fue la Meta- topolina (mT) en una concentración de 1.5 mg/L,

En cuanto para los Análisis Estadísticos para la especie *S. validus* se establece que el mejor tratamiento sobre él fue 2- isopentil-adenina (2iP) a una concentración de 1.0 mg/L y 1.5 mg/L; según las pruebas, se confirmó que para ambas especies no influye la forma con que se coloca el explante en el medio de cultivo sino la composición del medio de cultivo; por eso para el *S. validus* se obtuvo un promedio de 20 brotes por explante.

Para el enraizamiento del *H. undatus* el medio que presentó mejores resultados fue en el MS, logrando un 100% del crecimiento de raíces en los individuos utilizados, se observó que el 80% de las plantas desarrollaron un sistema radical bueno. En condiciones de invernadero post prueba in vitro, la sobrevivencia de las plántulas llegó al 54% del total. Mientras que para enraizar las plántulas de *S. validus* el mejor medio fue MS, obteniendo un 99.5% de raíces sobre los explantes en los medios, en el invernadero (ex vitro) la sobrevivencia de las plántulas fue del 61% del total, de los cuales un 96% desarrollaron sistema radical bueno.

CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos en el presente estudio, según los objetivos trazados en la investigación, se concluye que:

Del objetivo general

Respecto al objetivo general; sobre evaluar como el proceso de micropropagación in vitro influye en la recuperación y conservación del *Echinopsis Cuzcoensis*, Huánuco, 2020, basándose en los resultados descriptivos obtenidos, se puede deducir que el sistema de esterilización empleado para la desinfección de los explantes del *Echinopsis Cuzcoensis* fue lo suficientemente efectivo para continuar con la investigación. El medio MS demostró ser adecuado para la generación de plántulas, mientras que el medio MS + Fitohormonas favoreció el crecimiento, por tanto, en la recuperación y conservación del *Echinopsis Cuzcoensis*.

De los objetivos específicos:

Respecto al objetivo específico 1; acerca de desarrollar un proceso de preparación eficiente de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis* bajo condiciones controladas, Huánuco, 2020., se encontró que para poder desarrollar un proceso de preparación eficiente de la planta madre (*Echinopsis Cuzcoensis*) se debe realizar la pre desinfección de la planta donadora con fungicidas, para evitar contaminaciones por parte de esta.

Respecto al objetivo específico 2; acerca de desarrollar el proceso de micropropagación en concentraciones para el desarrollo de los explantes de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis*, Huánuco, 2020, se estableció que el medio de cultivo Murashige Skoog (MS) suplementado con fitohormonas responde a un mejor crecimiento, por el mayor porcentaje de explantes y mejor desarrollo de las mismas. Sin embargo, el medio con MS y Sacarosa también favorece la inducción del crecimiento, pero en menor proporción.

Respecto al objetivo específico 3; acerca de desarrollar la micropropagación mediante la activación de areolas en condiciones asépticas,

para las muestras de tejido de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis*, Huánuco, 2020, se tiene que durante el desarrollo del proceso de micropropagación se debe seguir las fases que favorezca el desarrollo de los explantes, para ello se debe conseguir la asepsia en cada uno de los procesos importantes para evitar contaminación y lograr la sobrevivencia de los segmentos de tejido vegetal introducidos en los medios de propagación de estudio.

Respecto al objetivo específico 4; acerca de determinar el porcentaje de sobrevivencia que se obtiene mediante la estimulación de las yemas axilares en el proceso de micropropagación de la planta madre de *Echinopsis Cuzcoensis*, Huánuco, 2020, se determinó que la micropropagación in vitro contribuye con la propagación del *Echinopsis Cuzcoensis*. Obteniendo de 18 repeticiones un total de 11 ejemplares sobrevivientes, el que representa un 61.11% de sobrevivencia. Y de estos un total de 5 ejemplares mostraron crecimiento, representando un 45.45% de crecimiento del total de ejemplares vivos.

RECOMENDACIONES

Debido a que no existe información suficiente en cuanto a la micropropagación de cactáceas y en particular estudios sobre el *Echinopsis Cuzcoensis*, abre un amplio campo para la exploración y el avance de nuevas metodologías y procesos que permitan una mayor obtención de brotes por explantes, inducir la formación de explantes in vitro e incluso un establecimiento ex vitro como adaptación en condiciones de invernadero.

Algunas otras recomendaciones:

- Realizar más investigaciones sobre micropropagación in vitro en diferentes cactáceas a nivel Huánuco.
- Buscar mejorar el entorno de los explantes mediante la evaluación de diferentes tipos de medios de propagación
- La sobrevivencia y crecimiento de los explantes se ven afectados significativamente por las variables de contaminación.
- Utilizar o probar distintos tiempos de desinfección y otros componentes para los explantes de esta especie.
- Fomentar con este proyecto una base para futuros investigadores en temas de biotecnología aplicada en Micropropagación in vitro en nuestra región, siendo Huánuco una región con gran cantidad de material vegetal endémico y exótico a conservar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón, J., Martínez, D., Quintana, J. Jiménez, S., Díaz, A., Jiménez, I. (2008). *Propagación in Vitro de Renealmia Alpinia (rottb), planta con actividad antiofídica*. Revista de la facultad de química farmacéutica 15(1):61-69
- Aquino J. (1998). *Semillas*. Ed. Red Andina de Semillas Forestales. RASEFOR, COSUDE. Interoperación. Cajamarca.
- Ar - Vitro. (2004). *Un sistema de apoyo para el sector agro biotecnológico de Uruguay*. I Seminario de Arándanos y Frambuesas. Uruguay
- Avalos, R. (2010). *Cultivo y Propagación in vitro de cactáceas de los géneros hylocereus y selenicereus*. (Tesis de maestría), Universidad autónoma de Aguascalientes. México.
- Avalos, A (2010). *Niveles de concentraciones de fitoreguladores BAP y AIB y su efecto en la multiplicación in vitro de segmentos nodales en Myrciaria Dubia (h.b.k.) Me Vaugh, Camu Camu*. (Tesis de Maestría), Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Iquitos.
- Baldera, P (2014). *Estudio fitoquímico de Echinopsis Peruviana*. Revista de la Sociedad Química del Perú. 40(3), p.202-210.
- Batis, A y Rojas M. (2002). *El peyote y otros cactus alucinógenos de México*. CONABIO. Biodiversitas 40(1):12-17
- Bogado, F. A.; Vera Bravo, C.; Ayala, P. G.; Sansberro, P. A.; Luna, C. V. (2016). *Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento in vitro de segmentos nodales de Grevillea robusta*; Universidad Nacional de Rosario; Ciencia Agronómica; 16; 27; 3-2016; 11-16
- Campos, B. y Figueroa M. (2001). *Aclimatación de plántulas "in vitro" de papa*. Revista Desafíos. Vol. (2), 18-20.
- Choreño, J., González, H., Terrazas, T., y Hernández, A. (2002). *Propagación in vitro de Cephalocereus senilis a partir de aréolas*. Revista Chapingo Serie Horticultura 8(2): 183-196.

- Cortés, C., Sánchez, J., Alvarado, M. (2008). *Establecimiento de un sistema de micropropagación de Peniosereus greggii (Engelml.) Britton & Rose, especie cactácea en peligro de extinción*. Revista Investigación Científica 4(2): 1-7
- De la cruz, L. (2018). *Propagación clonal por cultivo in vitro*. Genética forestal. Zacatlán Puebla.
- Galeano, M. E. (2004). *Diseño de Proyectos en la investigación cualitativa*. Fondo Medellín, Colombia. Editorial Universidad EAFIT.
- Gómez, Marcelo M. (2006). *Introducción a la Metodología de la Investigación Científica*. Córdoba, Argentina. Edit. Brujas.
- Indacochea B., Gabriel J., Parrales J. (2017). *UNESUM aporta a la biotecnología de plantas*. Universidad Estatal del Sur de Manabí. Jipijapa, Ecuador.
- Mejía, R, y Vitorelli, C. (1988). *Cultivo in vitro de plantas de papa*. Primera edición. Lima - Perú. 112 p. En: Gonzales Ortiz C.; Vilca
- Molina, J. (2012) *Evaluación de cinco medios de cultivo (Phytamaz, Murashige Skoog, Knudson, Lindermann y Casero) y tres dosis de auxina y citoquinina para la germinación de semilla en Compartmentia speciosa Rchb.f.* (Tesis de pregrado) Universidad de Cuenca. Ecuador
- Montalvo, G., Quiala, E., Mederos, R., Matos, J., Chávez, M., León, M. (2004). *Propagación in vitro de Pilosocereus sp. Biotecnología Vegetal 4(1): 43-48*.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). *Un medio revisado para crecimiento rápido y bioensayos con cultivos de tejidos de tabaco*. Fisiol. Planta, 15: 473-497.
- Ojeda, M., Rodríguez, H., y Gutiérrez, A. (2009). *VII Simposio Taller Producción y Aprovechamiento del Nopal en el Noreste de México*. Revista Salud Publica y nutrición (2): 143-147.
- Ordóñez Medina, M. A. (2003). *Propagación in vitro de Mammillaria voburnensis Scheer. (Cactaceae)*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala

- Ostolaza, C (2014). *Cactus del Perú*. Rumbos. Recuperado de <https://revistarumbos.lamula.pe/>
- Quijala, E., Montalvo, G., Matos, J. (2004). *Empleo de la Biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas*. *Biotecnología Vegetal* 4(4): 195- 199.
- Retes, J., Valadez, M., Pérez, M. y Pérez, E. (2007). *Propagación in vitro de especies de Echinocereus, Escontria, Mammillaria, Melocactus y Polaskia (cactaceae)*. *Boletín de la sociedad botánica de México* 81:9-16
- Reyes, S. (1994). *Propagación de Cactáceas Mexicanas: Una alternativa para la conservación de especies amenazadas y en peligro de extinción*. Memoria del Encuentro Internacional sobre el impacto de la biotecnología en el desarrollo sustentable. OEA. pp. 107-119.
- Sauro, R. (2013). *Micropropagación vegetal*. Segundo congreso Marianista. Buenos aires. Argentina. Pp. 10-11.
- Tamayo y Tamayo, Mario (2004). *El Proceso de la Investigación Científica*. Cuarta Edición. México. Editorial Limusa.

COMO CITAR ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Godoy Benancio, L. (2023) *Recuperación y conservación del Echinopsis Cuzcoensis (Cactaceae) mediante el proceso de micropropagación in vitro, Huánuco 2020* [Tesis pregrado, Universidad de Huánuco]. Repositorio institucional UDH. <http://...>

ANEXOS

ANEXO 1

MATRIZ DE CONSISTENCIA

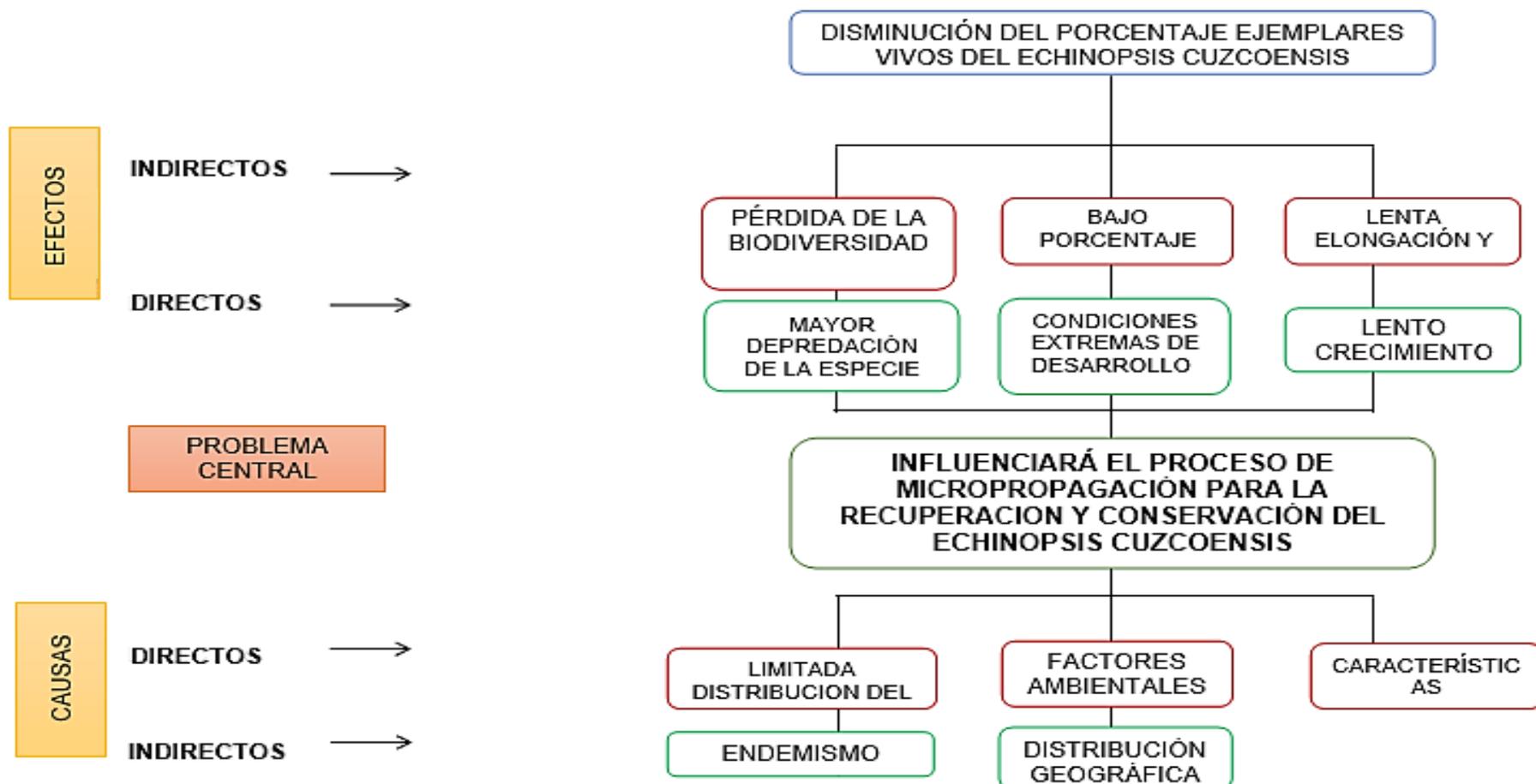
“RECUPERACION Y CONSERVACION DEL ECHINOPSIS CUZCOENSIS (*Cactaceae*) MEDIANTE EL PROCESO DE MICROPROPAGACION IN VITRO, HUANUCO 2020”

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	VARIABLE	INDICADOR	METODOLOGÍA	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS
<p>Problema general ¿Cómo el proceso de micropropagación in vitro influye en la recuperación y conservación del echinopsis cuzcoensis, Huánuco, 2020?</p> <p>Problemas específicos ¿Se puede desarrollar un proceso de preparación eficiente de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020? ¿Se puede desarrollar un proceso de micropropagación en concentraciones que favorezcan el por-</p>	<p>Objetivo general Evaluar como el proceso de micropropagación in vitro influye en la recuperación y conservación del echinopsis cuzcoensis, Huánuco, 2020.</p> <p>Objetivos específicos -Desarrollar un proceso de preparación eficiente de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis bajo condiciones controladas, Huánuco, 2020. -Desarrollar el proceso de micropropagación en concentraciones para el desarrollo de los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020. -Desarrollar la micropropagación mediante la activación</p>	<p>Hipótesis general Hi: El proceso de micropropagación in vitro influye en la recuperación y conservación del echinopsis cuzcoensis, Huánuco, 2020. Ho: El proceso de micropropagación in vitro no influye en la recuperación y conservación del echinopsis cuzcoensis, Huánuco, 2020.</p> <p>Hipótesis específicas Hi1: Se puede desarrollar un proceso de preparación eficiente de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis bajo condiciones controladas, Huánuco, 2020. Ho1: No se puede desarrollar un proceso de preparación eficiente de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis bajo condiciones controladas, Huánuco, 2020. Hi2: Se puede desarrollar el proceso de micropropagación en concentraciones para el desarrollo de los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020. Ho2: No se puede desarrollar el</p>	<p>Variable Independiente Micropropagación</p> <hr/> <p>Variable dependiente Recuperación y Conservación del Echinopsis Cuzcoensis</p>	<p>- Viable - No viable</p>	<p>Diseño: En el presente estudio se utilizó como diseño de estudio el cuasi experimental G O1 → X → O2</p> <hr/> <p>G: Grupo de muestras. O1: Sin intervención X: Tratamiento O2: Con intervención</p> <p>POBLACIÓN: Un explante con 02 aréolas por</p>	<p>TECNICA Observación. Técnica del fichaje. Procesamiento de datos.</p> <p>INSTRUMENTOS: Ficha Técnica: Micropropagación In vitro, Evaluación y Observación.</p> <p>Ficha técnica de Trabajo en campo.</p> <hr/> <p>Análisis estadístico El Modelo Lineal para un diseño completamente al azar</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> $Y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$ </div> <p>Cálculo del porcentaje de sobrevivencia</p>

<p>centaje de desarrollo de los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020?</p> <p>¿Se puede desarrollar la micropropagación mediante la activación de areolas en condiciones asépticas, para los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020?</p> <p>¿Se puede determinar el porcentaje de sobrevivencia que se obtiene mediante la activación de areolas en el proceso de micropropagación de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020?</p>	<p>de areolas en condiciones asépticas, para los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.</p> <p>-Determinar el porcentaje de sobrevivencia que se obtiene mediante la activación de areolas en el proceso de micropropagación de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.</p>	<p>proceso de micropropagación en concentraciones para el desarrollo de los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.</p> <p>Hi3: Se puede desarrollar la micropropagación mediante la activación de areolas en condiciones asépticas, para los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.</p> <p>Ho3: No se puede desarrollar la micropropagación mediante la activación de areolas en condiciones asépticas, para los explantes de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.</p> <p>Hi4: Se puede determinar el porcentaje de sobrevivencia que se obtiene mediante la activación de areolas en el proceso de micropropagación de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.</p> <p>Ho4: No se puede determinar el porcentaje de sobrevivencia que se obtiene mediante la activación de areolas en el proceso de micropropagación de la planta madre de Echinopsis Cuzcoensis, Huánuco, 2020.</p>	<p>Nutrientes</p> <p>Ciclo de crecimiento</p> <p>Explante</p> <p>Sustrato</p> <p>Elongación y Enraizamiento</p> <p>Desinfección del material vegetativo (NaClO, H2O2, Etanol 70%)</p> <p>Elección del medio de cultivo pH</p> <p>Reguladores de Crecimiento</p> <p>Factores físicos</p> <p>Porcentaje de formación de callos</p> <p>Enraizamiento</p>	<p>tratamiento.</p> <p>MUESTRA: 03 tratamientos, cada uno con 6 repeticiones por tratamiento (18 tubos de ensayo, un tubo como unidad experimental) mas 1 testigo por tratamiento; donde se observará la respuesta de la activación de aréolas.</p> <p>La unidad experimental está conformada por 42 areolas, cada par de areolas fue implantada en recipientes individuales</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin-bottom: 10px;"> $\% \text{Sobrevivencia} = \frac{pv}{(pv + pm)} \times 100$ </div> <p>Media de Sobrevivencia</p> $SCT_{ot} = \sum_{i=1}^n (y - \bar{y})^2 = 38.94$ <p>Análisis de la varianza. Prueba de Tukey</p> <p>Test HSD De Tukey</p> $HSD = \alpha \sqrt{\frac{b}{c}} = 1.9019$
---	---	---	---	--	---

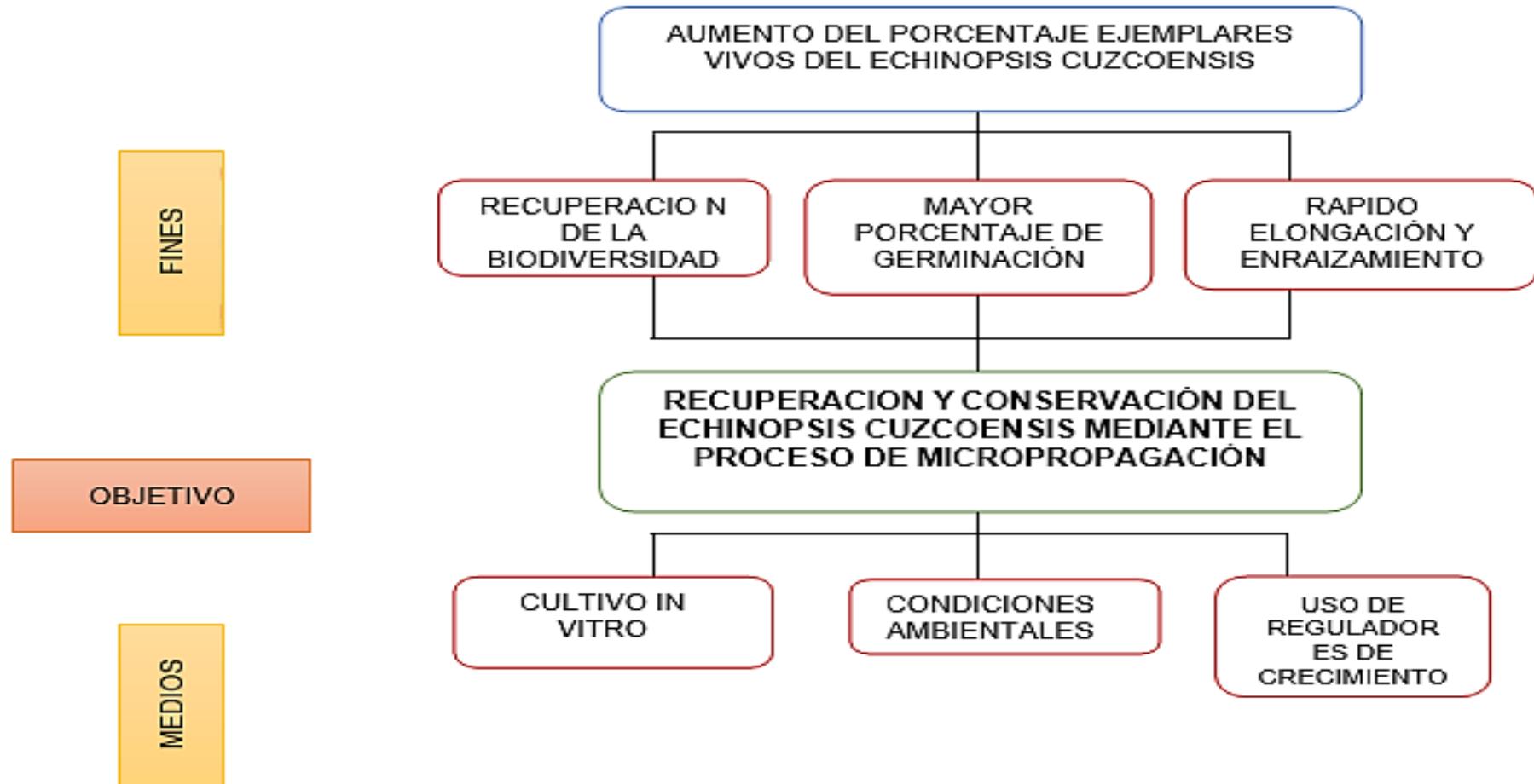
ANEXO 2

ÁRBOL DE PROBLEMA CAUSA – EFECTO



ANEXO 3

ÁRBOL DE OBJETIVOS MEDIOS – FINES I



ANEXO 4

ÁMBITO GEOGRÁFICO

Figura 15
Ubicación satelital del proyecto



La investigación se realizó en la ciudad de Huánuco, en el Laboratorio de Microbiología del Hospital “Carlos Showing Ferrari”, DIRESA, ubicado en Paucarbamba, Amarilis. Donde el *Echinopsis Cuzcoensis* dentro de las instalaciones del laboratorio, fue cortado y envasado según los protocolos establecidos.

Ubicación Política

Región : Huánuco

Departamento : Huánuco

Provincia : Huánuco

Distrito : Amarilis

Posición Geográfica

Altitud : 1920 msnm

ANEXO 5

PANEL FOTOGRAFICO

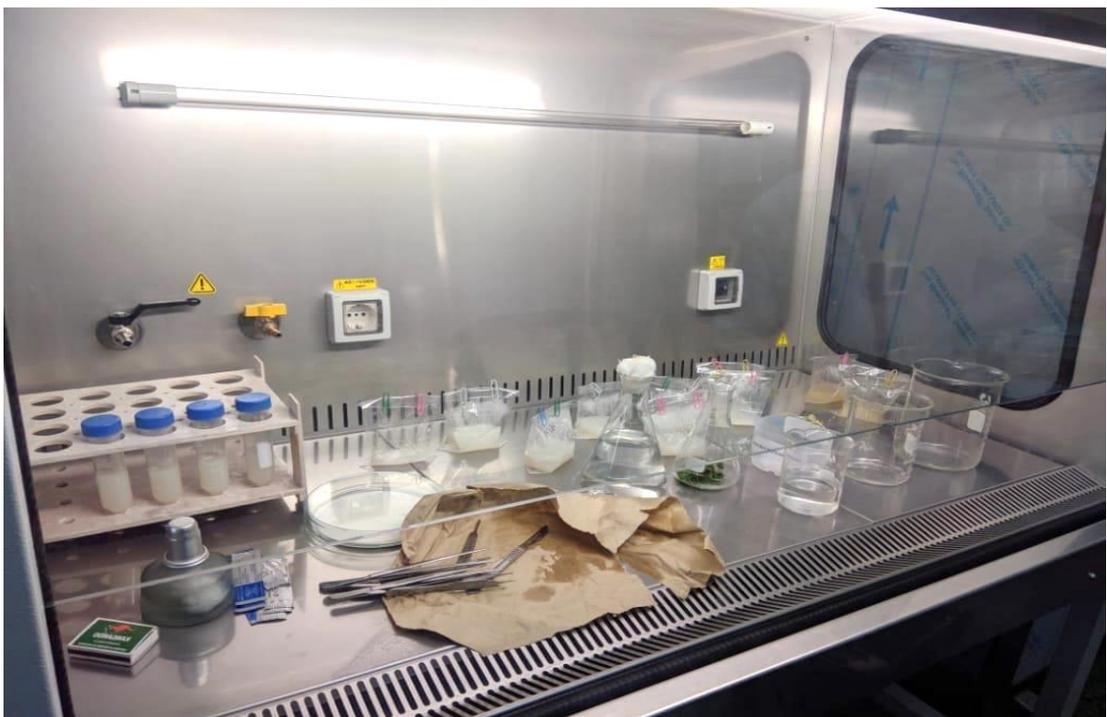
Fotografía 1

Área de recolección de plantas donantes



Fotografía 2

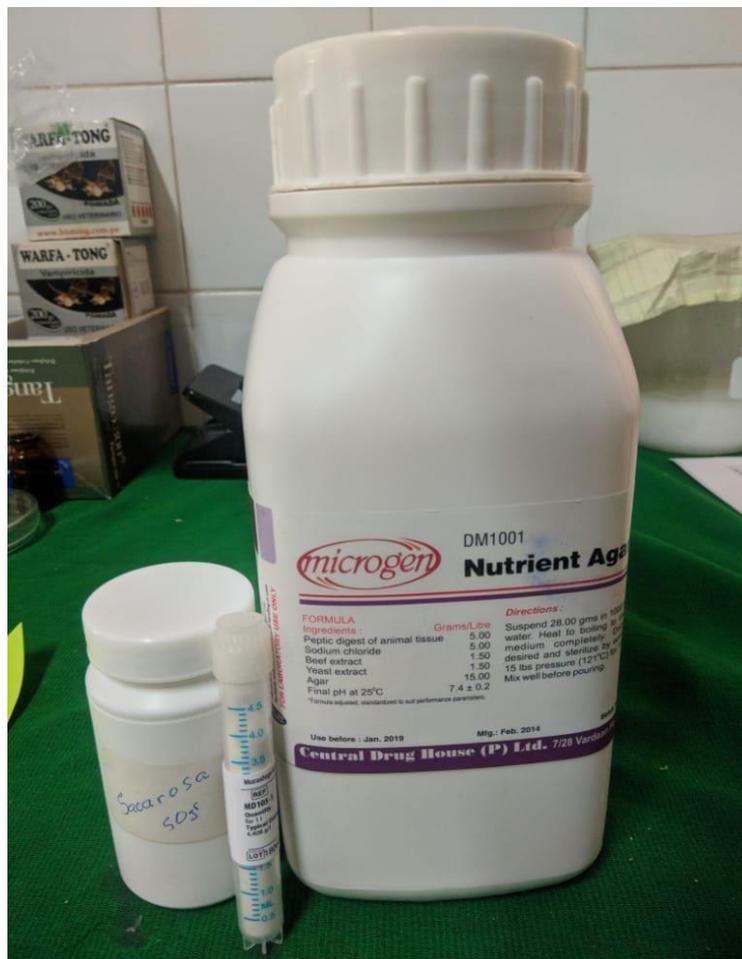
Materiales que se utilizaron en el Laboratorio



Fotografía 3
Materiales para la cámara de fotoperiodo



Fotografía 4
Componentes para preparar el Medio de Cultivo (Agar-agar, Sacarosa, MS)



Fotografía 5

Preparación de la planta donadora Echinopsis Cuzcoensis (Desinfección)



Fotografía 6

Preparación de la planta donadora (Desinfección y corte de púas)



Fotografía 7

Medición de las concentraciones en gramos para Sacarosa



Fotografía 8

Medición de las concentraciones en gramos para Agar-Agar



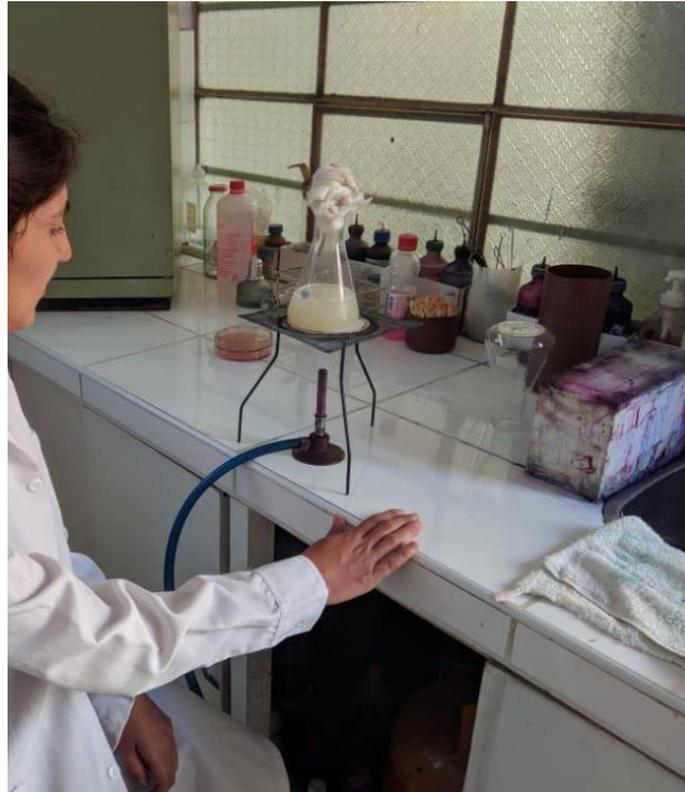
Fotografía 9
Medición del Ph para el Medio de Cultivo



Fotografía 10
Aforando con agua destilada el Medio de Cultivo a 1000ml



Fotografía 11
Diluyendo el Agar con ayuda de un mechero



Fotografía 12
Llenamos los recipientes con el Medio de cultivo según la dosificación establecida en la cámara de flujo



Fotografía 13
Esterilizamos en la autoclave



Fotografía 14
Dejamos enfriar unos minutos



Fotografía 15

Dejamos reposar 3-4 días, para seguir con la introducción vegetal



Fotografía 16

Medio de cultivo listo para utilizarse



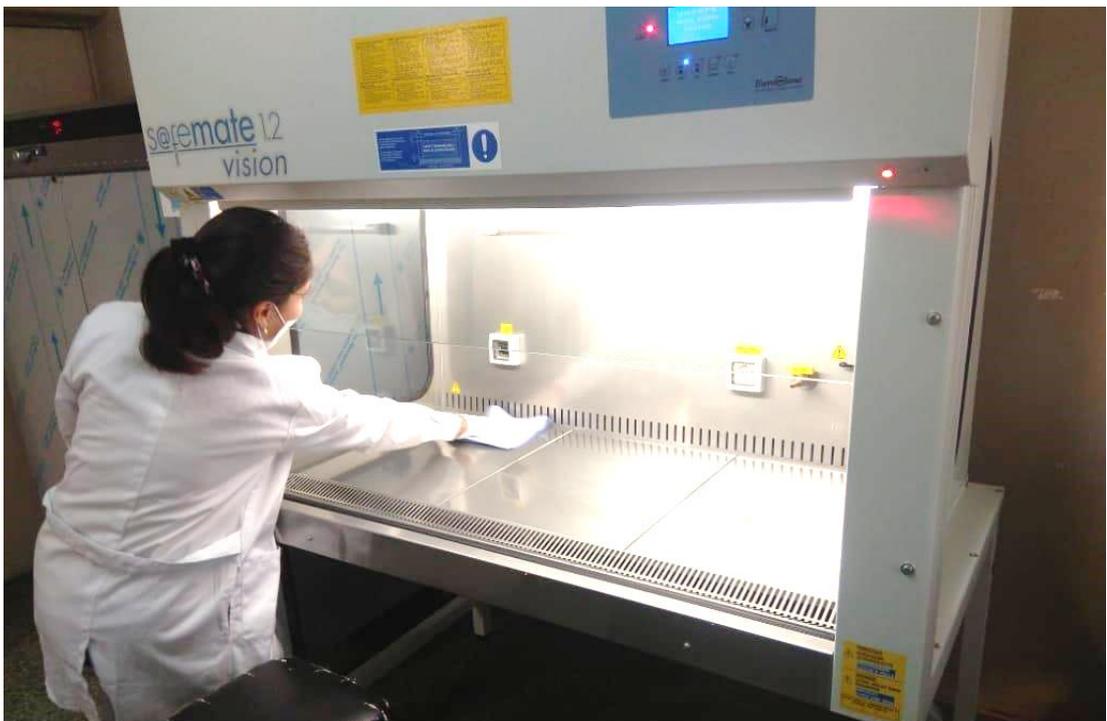
Fotografía 17

Preparación del laboratorio con materiales para la incrustación de areolas en los medios de cultivo



Fotografía 18

Limpeza de la cámara de fotoperiodo



Fotografía 19
Preparación de la planta donadora



Fotografía 20
Desinfección y asepsia después del corte de púas



Fotografía 21

Preparación para la extracción de areolas del Echinopsis Cuzcoensis



Fotografía 22

Extracción de las areolas del Echinopsis Cuscoensis (planta donadora)



Fotografía 23

Extracción de las aréolas realizada en un ambiente estéril, dentro de la cámara de flujo



Fotografía 24

Corte de los segmentos nodales



Fotografía 25
Aréolas listas para la desinfección



Fotografía 26
Lavado previo de las aréolas



Fotografía 27
Materiales Desinfectantes



Fotografía 28
Es fundamental realizar un enjuague con agua destilada para eliminar cualquier residuo de desinfectante o impurezas



Fotografía 29
Limpeza con etanol



Fotografía 30
Limpeza con agua destilada para eliminar residuos de etanol u otro componente



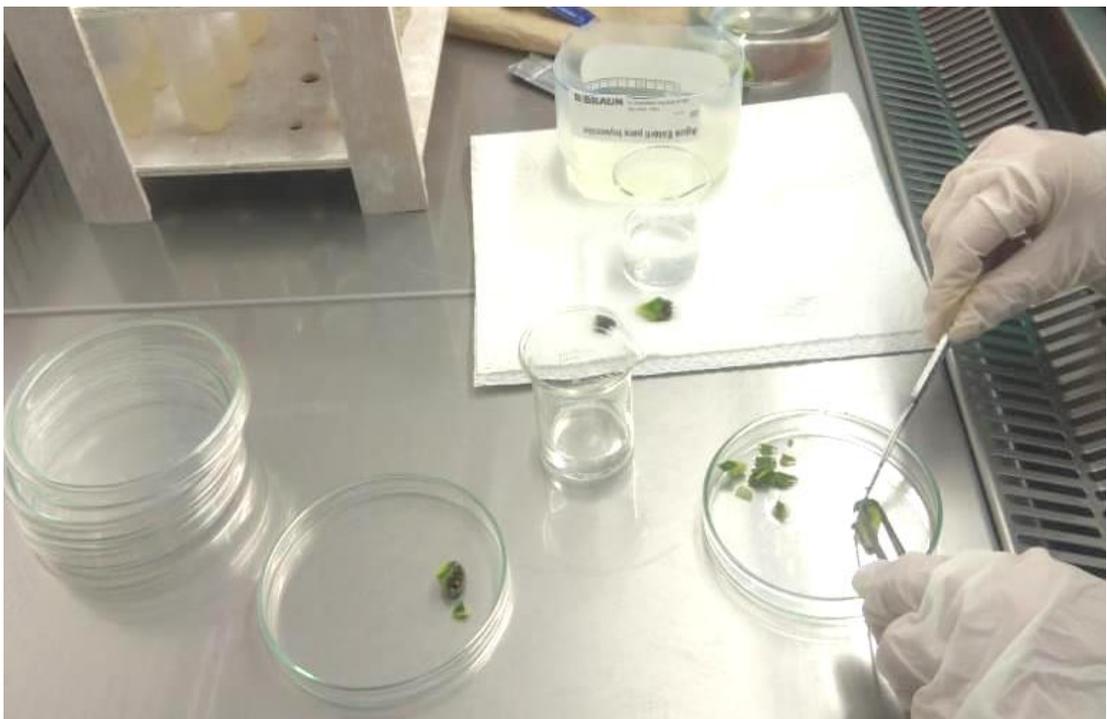
Fotografía 31

Proceso de oxidación con el uso de etanol, las areolas se tornaron amarillentas



Fotografía 32

Corte de partes dañadas



Fotografía 33

Segundo desinfectante peróxido de hidrogeno(agua oxigenada)



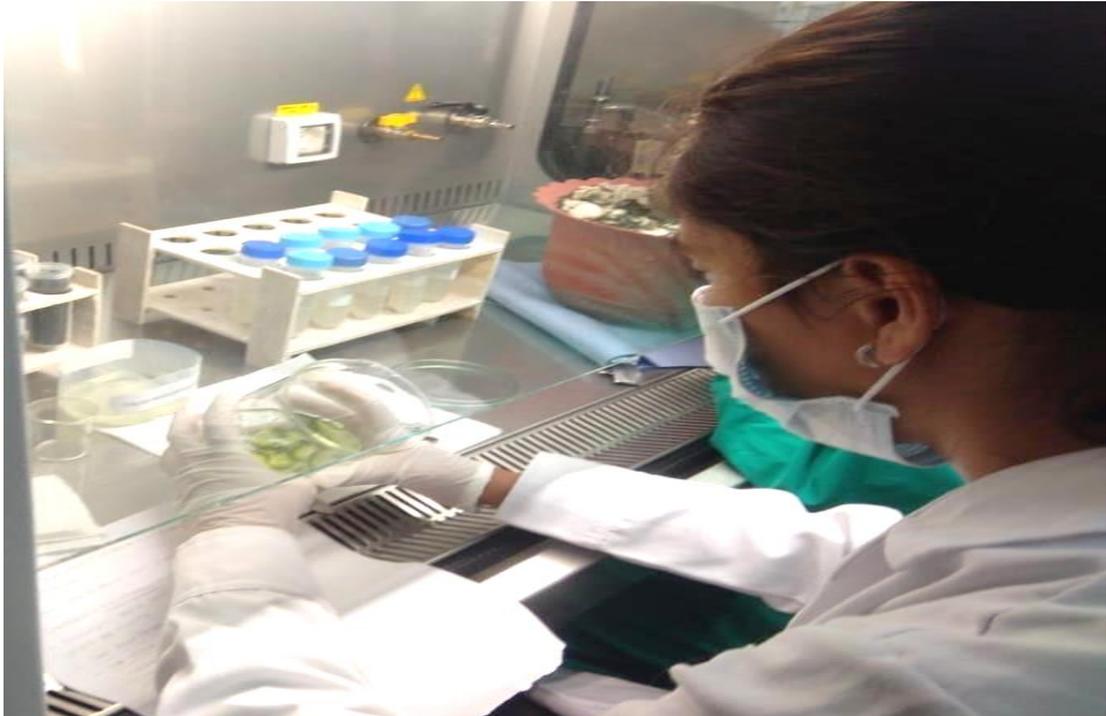
Fotografía 34

Efecto de desinfección del Agua oxigenada



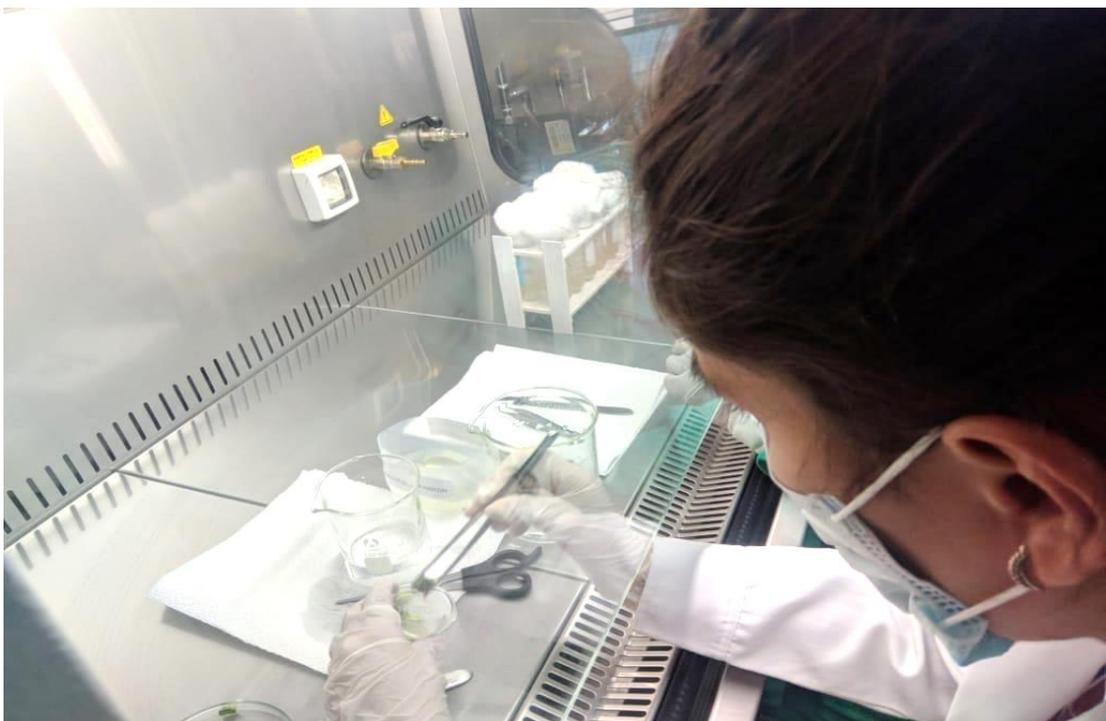
Fotografía 35

Enjuagamos con agua destilada dos o tres veces para eliminar residuos del desinfectante



Fotografía 36

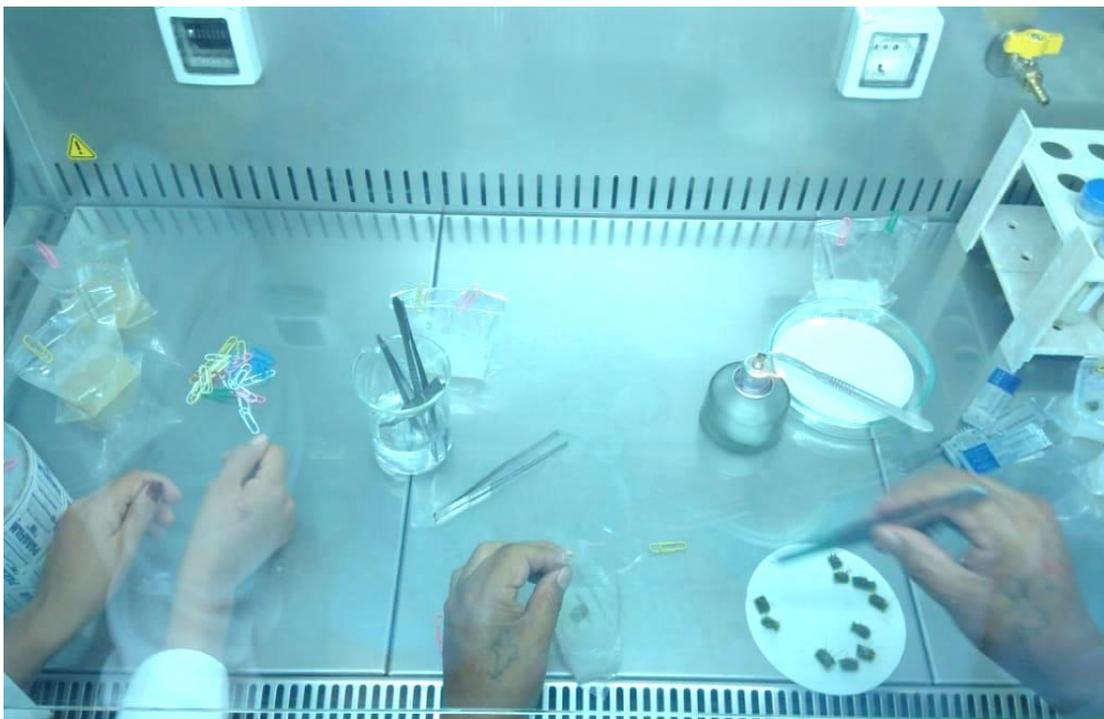
Tercer desinfectante: cloro comercial



Fotografía 37
Cortamos partes dañadas en la placa Petri



Fotografía 38
Proceso de incrustación del medio vegetal



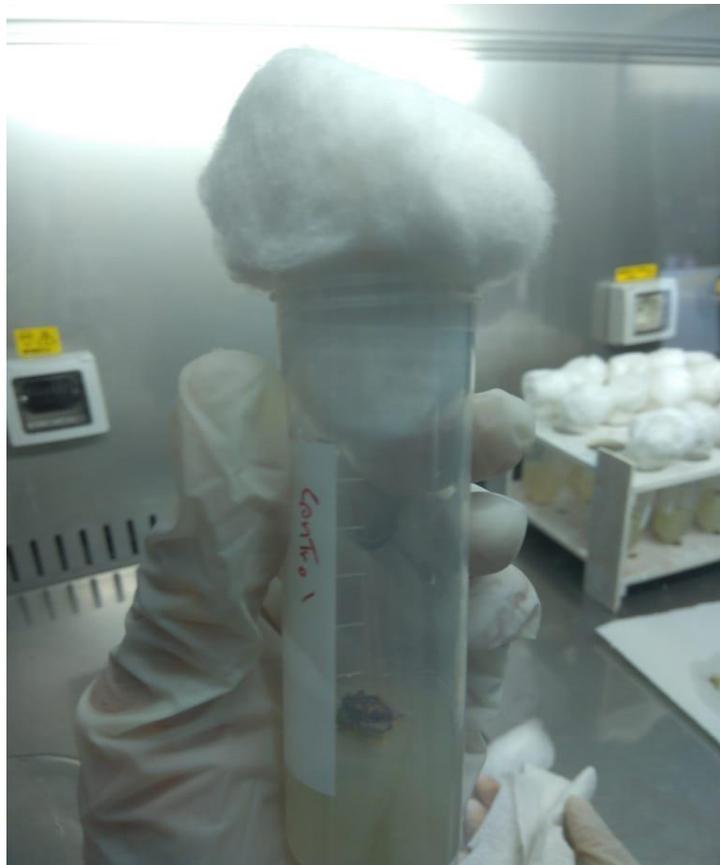
Fotografía 39

Se toma dos areolas para cada medio de cultivo y se descarta aquellas dañadas



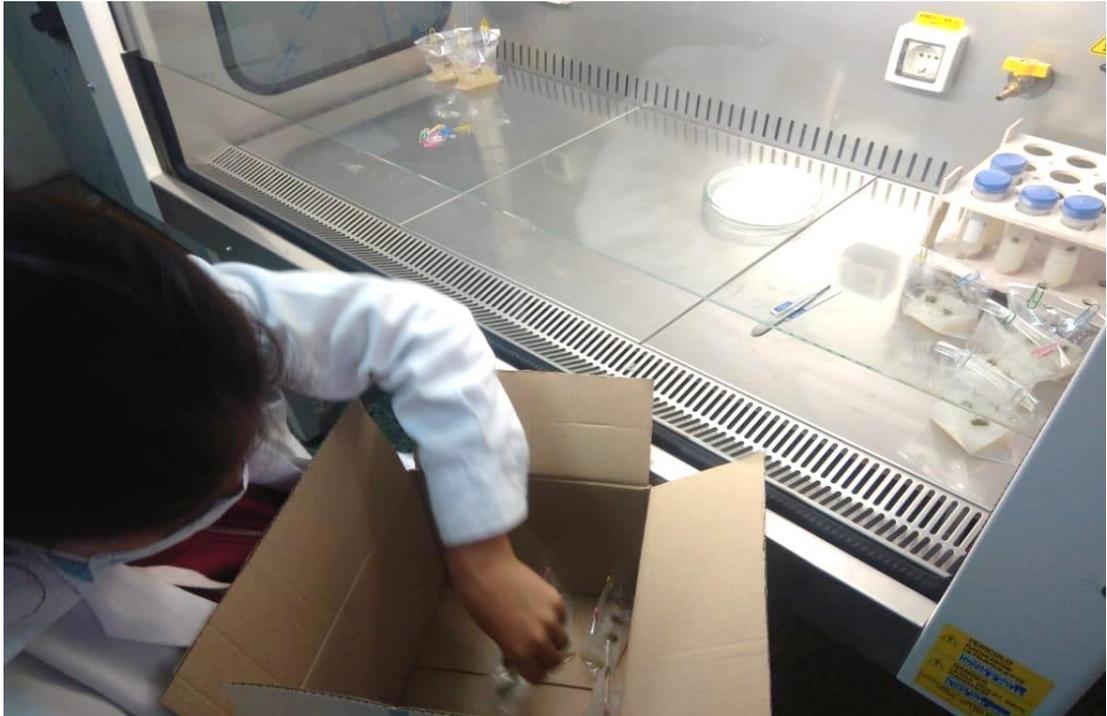
Fotografía 40

Areola incrustada



Fotografía 41

Se guarda cuidadosamente para llevar a la cámara de crecimiento



Fotografía 42

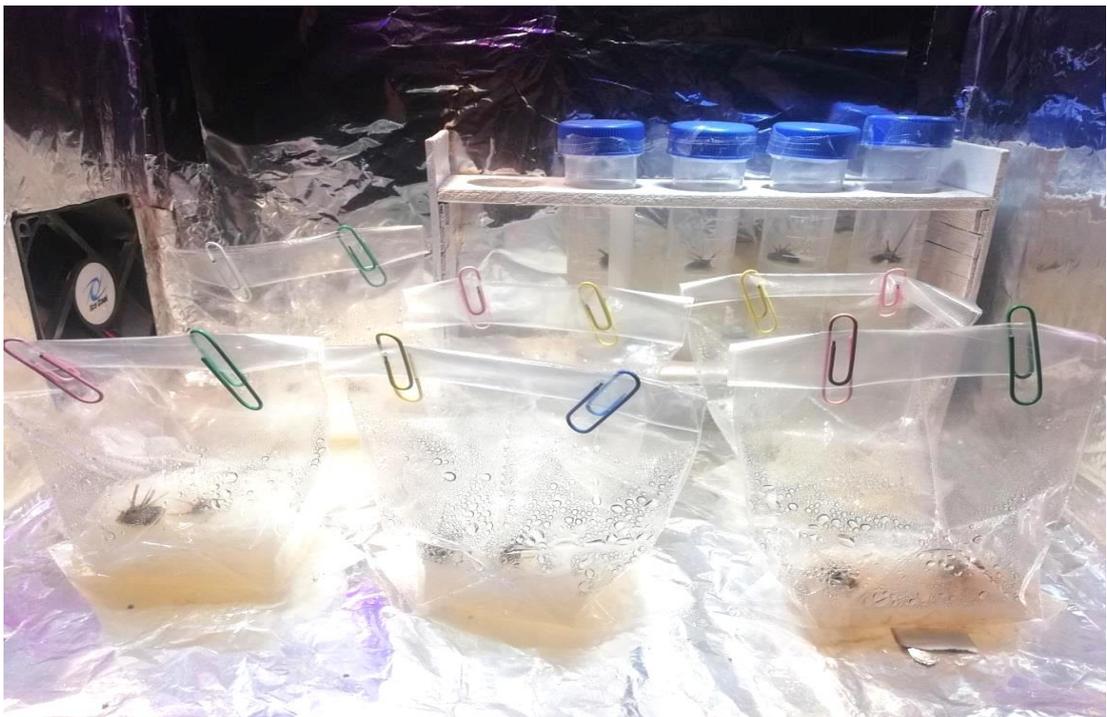
Los medios de cultivo deben mantenerse en oscuridad por alrededor de 24 horas



Fotografía 43
Grupo T1, T2 en la cámara de fotoperiodo



Fotografía 44
Cámara de crecimiento: temperatura de 25°C grados, con luz durante 16 horas y oscuridad de 8 horas



Fotografía 45
Primer tratamiento con posible contaminación



Fotografía 46
Aparente Necrosis y contaminación en el medio de cultivo



Fotografía 47
Explante contaminado



Fotografía 48
Areolas del tratamiento T3, se ve aparente crecimiento



Fotografía 49

Areola de T3 con pequeñas pelusillas en su interior (crecimiento positivo)

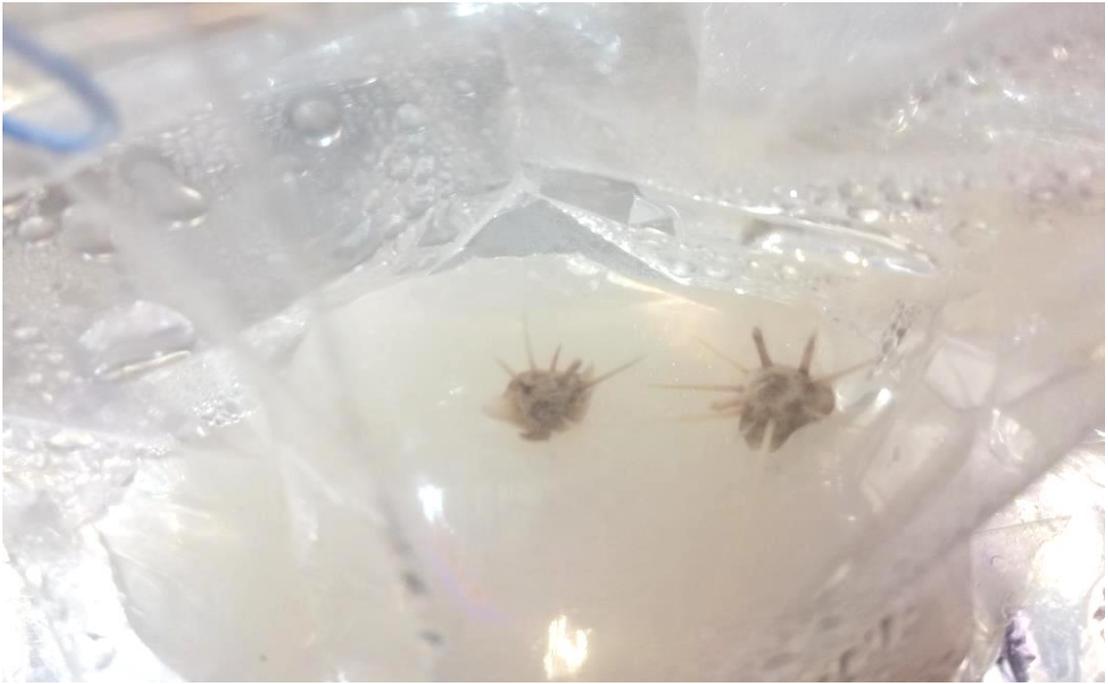


Fotografía 50

Pequeños brotes en las areolas, Tratamiento t3



Fotografía 51
Brotos positivos de crecimiento



Fotografía 52
Brotos estables



ANEXO 6

FICHA DE MONITOREO



UNIVERSIDAD DE HUANUCO
FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL

FICHA DE MONITOREO

PROYECTO DE INVESTIGACION:

"RECUPERACION Y CONSERVACION DEL *Echinopsis Cuzcoensis* (Cactaceae) MEDIANTE EL PROCESO DE MICROPROPAGACION IN VITRO, HUANUCO 2020"

NOMBRE DEL TESISISTA: LUBYESCA MELANIE GODOY BENANCIO

MES	ACTIVIDAD	OBSERVACION	RESULTADOS
11/SET/2019	INSTALACION DEL LABORATORIO	6 tubos / 1 testigo (PRIMER LOTE)	x
12/SET/2019	CÁMARA OSCURA 24 HORAS	✓	x
13/SET/2019	RAYOS UV (16 horas luz / 8h oscuridad)	✓	x
14/SET/2019	CORTE: 9am REINICIO: 5pm	TESTIGO CONTAMINADO	-1 TESTIGO
15-20 SET	CORTE: 9am REINICIO: 5pm	Intactos	x
21/SET/2019	CORTE: 9am REINICIO: 5pm	2 contaminados presentan neurosis	-2 tubos (contaminados)
23/SET/2019	CORTE: 9am Reinicio: 5pm	1 contaminado por oxidación	- 1 explante
24/SET/2019	CORTE: 9am REINICIO: 5pm	Presencia de contamin. en 2 explantes	x
25/SET/2019	CORTE: 9am REINICIO: 5pm	3 Explantos contam. (neurosis)	- 3 explantos
27/SET/2019	SE reincorporan 6 tubos más (MS-Aditiv)	En cámara oscura 24h	✓
28/SET/2019	RAYOS INFRAROJO (16 horas luz / 8h osc)	6 contaminados (FASE 1) SEG. LOTE (OK!)	✓
29/SET/2019	CAMBIO DE HORARIO DE LUZ	TESTIGO CONTAMINADO	- 1 TESTIGO
30SET / 15 OCT	CORTE: 10am RECONEXIÓN: 6pm	OK	✓

2DA ETAPA

	16/OCT/2019	CORTE: 10am		OK!
	17/OCT/2019			
	18/OCT/2019	CORTE: 10am : 6pm	INDICIO DE CONTAMINACION (PELUCITAS BLANCAS)	
	19/OCT/2019	RECONEXION: 6pm		
	20/OCT/2019	CORTE: 10am : 6pm CORTE: 10am	PELUCILLAS POR LA AREOLA INDICIO DE CREC.	
	22/OCT/2019	CORTE: 10am RECONEXION: 6pm	INDICIO DE CRECIMIENTO ARREDEDOR AREOLA	
	23-2NOV/2019	CORTE: 10am RECONEXION: 6pm	CONTAMINACION EN 1 EXPLANTO	-1 EXPLANTO CONTAMINADO
3RA ETAPA)	3/NOV/2019	SE REINCORPORAN 6 EXPLANTOS MAS		
	4/NOV/2019	PREPARACION DEL MS-FITOHORMONA	PREPARACION EN LABORATORIO	
	8/NOV/2019	MEDIO DE CULTIVO	CON FITOHORMONA,	✓
	10/NOV/2019	REINCORPORACION DE T3 (MS-FITOHORM)	PREPARADA PREVIAMENTE 2 dias antes	✓
	11/NOV/2019	16h. luz/8h oscuridad,	OK	-TESTIGO
	12/NOV/2019	CORTE: 10am	INDICIO DE CRECIMIENTO	+1 EXPLANTO
	13/NOV/2019	CORTE: 10am		
	14/NOV/2019	RECONEXION: 6pm		
	15/NOV/2019	CORTE: 10am RECONEXION: 6pm		
	16/NOV/2019	CORTE: 10am RECONEXION: 6pm		
	17/NOV/2019	CORTE: 10am RECONEXION: 6pm	INDICIO DE CRECIMIENTO ARREDEDOR DE LA AREOLA	+1 EXPLANTO EN CRECIMIENTO
	18/NOV/2019			

ANEXO 7

PERMISO PARA LA EJECUCION Y SUPERVISION EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DEL HOSPITAL

CARLOS SHOWING FERRARI



“AÑO DE LA UNIVERSALIZACION DE LA SALUD”

HOSPITAL MATERNO INFANTIL “CARLOS SHOWING FERRARI”

CONSTANCIA

Conste por la presente, que la Bachiller; **GODOY BENANCIO, Lubyenca Melanie** de la Universidad de Huánuco de la Facultad de Ingeniería, del Programa Académico de Ingeniería Ambiental, ha realizado la ejecución de la parte práctica su Tesis intitulado **“RECUPERACION Y CONSERVACION DEL Echinopsis Cuzcoensis (cactácea) MEDIANTE EL PROCESO DE MICROPROPAGACION IN VITRO, HUANUCO 2020”**, dicho trabajo fue ejecutado en el Laboratorio de Microbiología y Patología Clínica. Desde el día 11 de Diciembre 2019 hasta 11 de Abril DEL 2020.

Habiendo demostrado, responsabilidad y eficiencia en el desarrollo del trabajo de investigación bajo la mi supervisión (Miembro del Grupo IN VITRO PERU S.A.C)

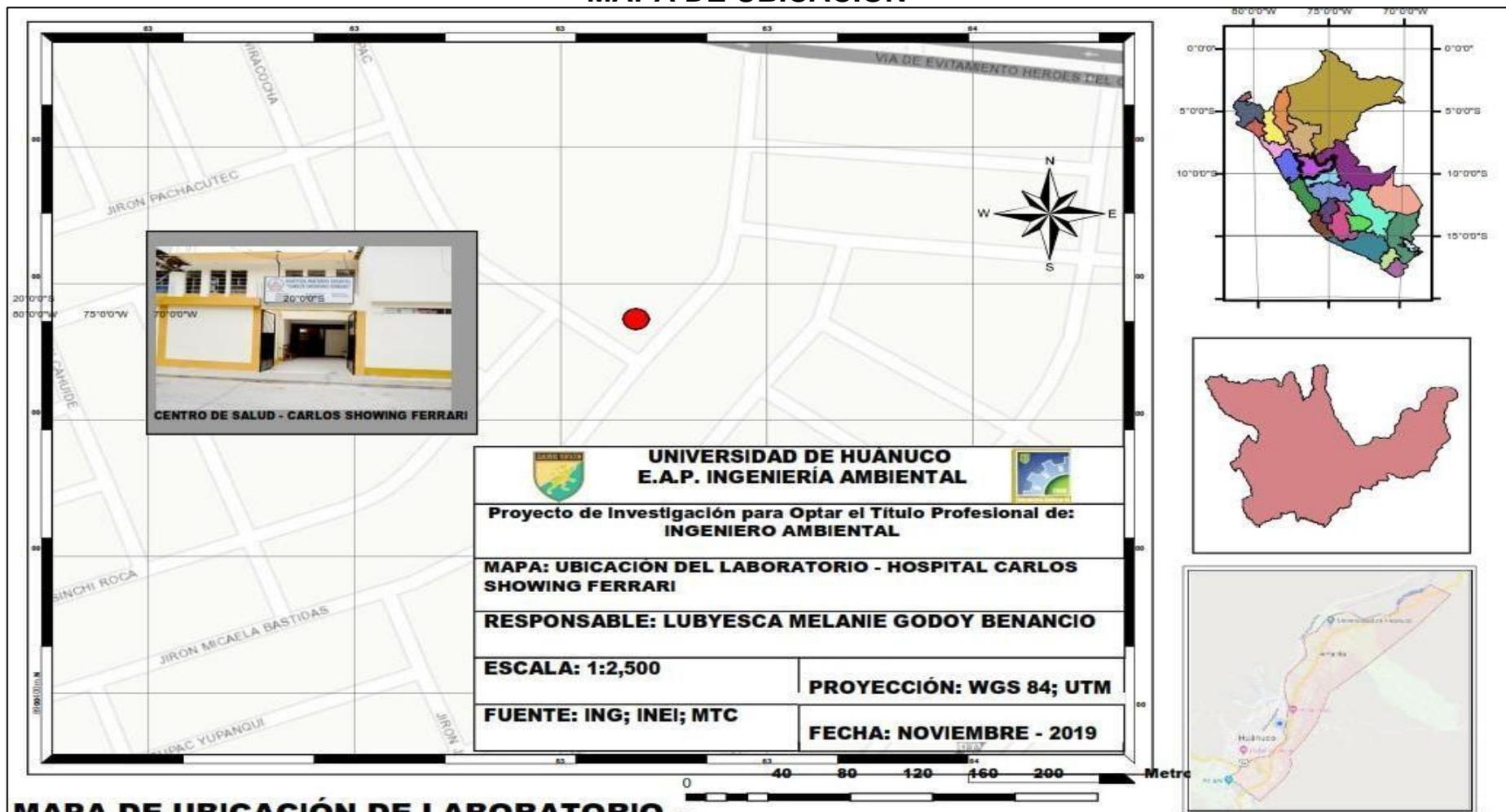
Amarilis, lunes 13 de Abril del 2020

MINISTERIO DE SALUD
GOBIERNO REGIONAL HUANUCO
MICRO RED DE AMARILIS

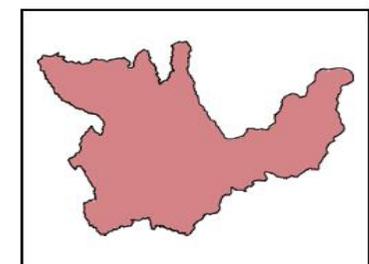
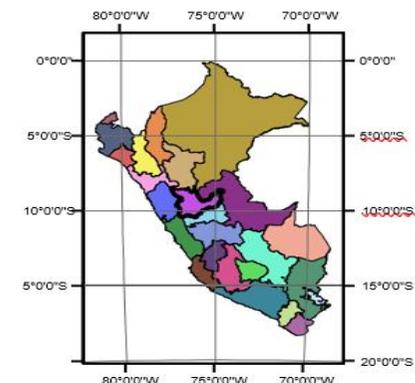
Bigo Alejandro Duran Nievo
Laboratorio
CRP 2068

*Este documento no tiene validez para acciones legales

ANEXO 8 MAPA DE UBICACIÓN



ANEXO 9 MAPA DE UBICACIÓN



MAPA DE UBICACIÓN DE LABORATORIO