

UNIVERSIDAD AMAZÓNICA DE PANDO
ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y NATURALES
CARRERA DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA



Determinación de tratamientos de desinfección *ex vitro* para la germinación de semillas de castaña (*Betholletia excelsa*) en el laboratorio de biotecnología vegetal

Tesis de Grado para optar al título de Licenciado en biología

PRESENTADO POR: Univ. Madeleine Duri Yaca.

ASESOR: Ing. Ruth Gabriela Ancasi Espejo.

COBIJA – PANDO – BOLIVIA

Gestión 2021

HOJA DE APROBACIÓN

.....
Ing. Elisabeth Aguada Taborga
TRIBUNAL

.....
Lic. Julio R. Montero Tonconi
TRIBUNAL

.....
Ing. David Gómez Roca
TRIBUNAL

.....
Ing. Ruth Gabriela Ancasi Espejo
ASESOR

Cobija, Junio 2021

DEDICATORIA.

*DEDICADA AL DIOS ÚNICO
CREADOR DE LOS CIELOS Y LA
TIERRA POR DARME LA VIDA Y UNA
GRAN ADMIRACIÓN POR TAN BELLA
CREACIÓN QUE ES EL PLANETA
TIERRA.*

*DEDICADO A MIS PADRES POR
TODO EL ESFUERZO QUE
HICIERON PARA QUE PUEDA
CULMINAR MIS ESTUDIOS
UNIVERSITARIOS.*

*DEDICADO A TODOS AQUELLOS
BIÓLOGOS QUE CONTRIBUYEN A
LA SOCIEDAD CON SUS GRANDES
Y ASOMBROSOS
DESCUBRIMIENTOS.*

AGRADECIMIENTOS

*A NUESTRO DIOS, PADRE
POR BRINDARME LA
FORTALEZA FÍSICA Y
MENTAL EN LA VIDA
COTIDIANA Y GUIARME
POR EL BUEN CAMINO
DURANTE MI FORMACIÓN
PROFESIONAL.*

*A MIS PADRES: GERARDO DURI M. Y
MADELEINE YACA M. POR APOYARME
ECONÓMICAMENTE, DARME EL
ALIENTO PARA SEGUIR SUPERANDO MIS
METAS Y POR TODO EL ESFUERZO QUE
HICIERON PARA EDUCARME Y
SOSTENERME ENTRE SACRIFICIOS,
AMOR Y PACIENCIA.*

*AGRADECER A MI ASESORA ING.
RUTH G. ANCASI E. POR
HABERME APOYADO Y ENSEÑADO
EN EL TRASCURSO DE LA
INVESTIGACIÓN, AL LIC. ISRAEL
GUZMÁN M. POR LA
ORIENTACIÓN Y LA AYUDA EN
LOS DIFERENTES
PROCEDIMIENTOS DE LA TESIS.*

*AGRADECER A LA LIC. SALLY
CALDERÓN V. E ING. GRISELDO
CARPIO T. POR GUIARME EN LA
REDACCIÓN DE LA
INVESTIGACIÓN.*

*AGRADECER A MI COMPAÑERO ROY
PEÑA Q. POR HABERME AYUDADO
EN LA RECOLECCION DEL
MATERIAL VEGETAL PARA LA
INVESTIGACION.*

RESUMEN

La presente investigación fue realizada en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales de la Universidad Amazónica de Pando. El objeto de estudio fueron los tratamientos de desinfección *ex vitro* para la germinación en semillas de castaña (*Bertholletia excelsa*) en el laboratorio de biotecnología vegetal. Fueron seleccionadas y recolectadas del municipio de Filadelfia de la propiedad del señor Adaildo Nascimento. Se empleó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con 6 tratamientos y 20 repeticiones en los cuales se utilizaron tres fungicidas: Benomyl, Cobrethane y Mancozeb, con dos tipos de sustrato: tierra vegetal y arena autoclavada. Las semillas pasaron por un protocolo de desinfección a base de jabón líquido, hipoclorito de sodio (NaClO), etanol al 70%, agua esterilizada y culminó con la aplicación de fungicidas y giberilina (AG3). En total fueron sembradas 120 plantas; 40 para cada tipo de fungicidas, de las mismas 20 para cada tipo de sustrato. En cuanto a la germinación por tipo de sustrato se obtuvo mejores resultados con la tierra vegetal, y de tipo de fungicida el Cobrethane fue óptimo para disminuir la contaminación, obteniendo así 25 plantas germinadas siendo superior a los fungicidas Benomyl (8 plantas germinadas) y Mancozeb (15 plantas germinadas).

ABSTRACT

This research was carried out in the Plant Biotechnology laboratory of the Biological and Natural Sciences Area of the Amazon University of Pando. The object of study was *ex vitro* disinfection treatments for germination in Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) seeds in the plant biotechnology laboratory. They were selected and collected from the municipality of Philadelphia from the property of Mr. Adaildo Nascimento. A completely randomized experimental design (DCA) was used with 6 treatments and 20 repetitions in which three fungicides were used: Benomyl, Cobrethane and Mancozeb, with two types of substrate: topsoil and autoclaved sand. The seeds went through a disinfection protocol based on liquid soap, sodium hypochlorite (NaClO), 70% ethanol, sterilized water and culminated with the application of fungicides and giberillin (AG3). In total, 120 plants were planted; 40 for each type of fungicides, of the same 20 for each type of substrate. Regarding germination by type of substrate, better results were obtained with topsoil, and Cobrethane type of fungicide was optimal to reduce contamination, thus obtaining 25 germinated plants being superior to Benomyl (8 germinated plants) and Mancozeb fungicides (15 germinated plants).

INDICE GENERAL

I.	CARATULA	
II.	HOJA DE APROBACIÓN	
III.	DEDICATORIA	
IV.	AGRADECIMIENTOS	
V.	RESUMEN	
VI.	ABSTRACT	
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1.	General	3
2.2.	Específicos	3
3.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
3.1.	Origen y distribución	4
3.2.	Descripción taxonómica de <i>Bertholletia excelsa</i>	5
3.3.	Descripción del fruto	5
3.4.	La semilla	6
3.5.	Producción de la castaña	6
3.6.	Clima y suelo	7
3.7.	Aspecto de su propagación	7
3.7.1.	Reproducción	7
3.7.2.	Propagación	7
3.8.	Biotecnología vegetal	8
3.9.	Contaminación ex vitro	9
3.10.	Tipos de contaminación <i>ex vitro</i>	9
3.10.1.	Contaminaciones de hongos en el cultivo <i>ex vitro</i>	10
3.11.	Desinfección	10
3.11.1.	Desinfección del material vegetal	11

3.12. Hipoclorito de sodio	11
3.13. Jabón comercial	11
3.14. Alcohol o etanol	12
3.15. Fungicidas	12
3.15.1. Mancozeb	12
3.15.2. Cobrethane	13
3.15.3. Benomyl	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. Ubicación del área de estudio	15
4.2. Materiales	15
4.2.1. Material vegetal	15
4.2.2. Materiales de trabajo	16
4.3. Métodos y procedimientos	17
4.3.1. Procedimiento	17
4.4. Tipos de sustratos	19
4.5. Diseño estadístico	19
4.5.1. Modelo estadístico	20
4.6. Variable de respuesta	20
4.6.1. Contaminación de semillas de castaña	20
4.6.2. Número de plantas germinadas de castaña	21
4.6.3. Altura de plantas de castaña	22
4.6.4. Diámetro de plantas de castaña	22
5. RESULTADOS	23
5.1. Análisis de varianza	23
5.1.1. Análisis de varianza para numero de plantas germinadas	24

5.1.2. Análisis de varianza para altura de plantas	25
5.1.3. Análisis de varianza para tipo de sustrato	26
6. DISCUSIÓN	27
7. CONCLUSIÓN	31
8. RECOMENDACIONES	32
9. BIBLIOGRAFÍA	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hojas y flor de la castaña (<i>Bertholletia excelsa</i>).	4
Figura 2. Fruto de la castaña (<i>Bertholletia excelsa</i>).	5
Figura 3. Semillas de castaña (<i>Bertholletia excelsa</i>).	6
Figura 4. Ubicación del laboratorio en el campus universitario.....	15
Figura 5. Semillas de castaña colectadas para la investigación.....	15
Figura 6. Identificación del hongo <i>Aspergillus spp</i> y <i>A. niger</i>	21
Figura 7. Plantas germinadas de castaña (<i>Bertholletia excelsa</i>)	21
Figura 8. Medición de las plantas de castaña con una regla.	22
Figura 9. Medición de la planta de castaña con el Vernier	22
Figura 10. Contaminación de semillas de castaña.	24
Figura 11. Tipos de fungicidas en la variable germinación.....	25
Figura 12. Tipos de fungicidas en la variable altura de planta.....	25
Figura 13. Tipos de sustratos en la variable altura de planta.	26

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales de laboratorio.....	16
Tabla 2. Protocolos de desinfección para las semillas de castaña.	17
Tabla 3. Tipos de sustratos utilizados en la siembra.	19
Tabla 4. Análisis de varianzas de las variables.....	23

Anexos

Anexo 1. Semillas de castaña remojando.....	43
Anexo 2. Semillas de castaña secando.....	43
Anexo 3. Semillas de castaña peladas.....	43
Anexo 4. Preparación de NaClO.....	43
Anexo 5. Semillas en solución jabonosa.....	43
Anexo 6. Semillas en etanol	44
Anexo 7. Mancozeb, Cobrethane y Benomyl.....	44
Anexo 8. Preparación de los fungicidas	44
Anexo 9. Remojo de semillas en los fungicidas.....	44
Anexo 10. Semillas secando	45
Anexo 11. Preparación de la arena para el sembrado.....	45
Anexo 12. Sembrado de las castañas	45
Anexo 13. Sembrado de semillas en arena.....	46
Anexo 14. Plántulas de castaña germinadas.....	46
Anexo 15. Plántulas de castaña en arena y tierra vegetal.....	46

1. INTRODUCCIÓN

La castaña (*Betholletia excelsa*) perteneciente a la familia Lecythidaceae es una de las especies más emblemáticas e importantes de la Amazonia (Peres, 2003). Sus poblaciones se distribuyen en las Guayanas, Colombia, Venezuela, Perú, Bolivia y Brasil, sus mayores densidades ocurren en parte del Brasil: Pará, Amazonas, Acre y Rondônia, Perú: Madre de Dios y Bolivia: Pando, norte del Beni y norte de La Paz, (Zuidema, 2003; *Thomas et al.*, 2014). Se tratan de árboles emergentes, que en Bolivia pueden llegar a medir hasta 50m de altura y superar los 3m de diámetro a la altura del pecho (DAP), (Zuidema, 2003; *González et al.*, 2012). La castaña o nuez de Brasil (*Betholletia excelsa*) es una especie no maderable que existe en la Amazonia, de alto valor nutricional, que constituye un elemento importante para la alimentación de los pueblos nativos y colonizadores de las regiones Boliviana, Peruana, Brasileña y Venezolana (*Sujii et al.*, 2015). Teniendo una importancia económica en estos países ya que es uno de los productos que contribuye a aumentar el PBI local y generan puestos de trabajo en todo el proceso de extracción y comercialización, tanto a nivel urbano como rural (IIAP, 2000). La producción de castaña a nivel mundial es 120 mil toneladas anuales, entre los principales países con mayor producción son Bolivia, Brasil, y Perú, en Bolivia la producción es de 14 mil toneladas (Tridge, 2018), en el departamento de Pando y la provincia Vaca Diez del Beni, se cuenta con un potencial productivo total anual de 168.753 toneladas de castaña (*Vos et al.*, 2016). La producción varía fuertemente de año en año, porque la castaña es una planta silvestre (Maués, 2002).

La castaña al ser una planta silvestre, es por eso que su germinación es extremadamente lenta, variando de 6 a 8 meses en condiciones naturales, esto limita la producción de plantines (Lorenzi, 1992).

La biotecnología vegetal es una alternativa para la producción en escala mayor de plantines uniformes, en un corto tiempo, a través de células totipotentes, que tienen la información genética y las propiedades fisiológicas de producir una nueva planta con iguales características de la planta madre, siendo que cualquier parte de una planta puede dar origen a otra de iguales características según sean las condiciones de crecimiento (luz, temperatura, nutrientes, sanidad, etc.) (Rojas, *et al.*, 2004). La micro propagación *in vitro* y *ex vitro*, son alternativas para las especies forestales que tienen problemas de germinación lentas variables y desuniformes, permitiendo la producción de plántulas sanas, vigorosas en grandes cantidades y producidas en condiciones asépticas, constituyendo una alternativa económica apropiada para la producción de plántulas (Pinhal *et al.*, 2011; Pelegrini *et al.*, 2013).

El principio básico para el cultivo *in vitro* es controlar la contaminación microbiana de bacterias, hongos y levadura en función al medio ambiente (Leifert *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2004). Asimismo estos pueden comprometer el trabajo de la micro propagación en condiciones *ex vitro* e *in vitro*, para minimizar la contaminación microbiana, numerosos protocolos de esterilización son presentados por diversos autores (Pereira *et al.*, 2009). Dentro de las sustancias utilizadas en la desinfección del material vegetal se encuentran el hipoclorito de sodio (NaClO), que es el compuesto más usado, con buenos resultados para la desinfección del material vegetal en concentraciones y tiempos diferentes de aplicación, este producto es efectivo, económico y de fácil adquisición; en cuanto a fungicidas, los más utilizados para los cultivos dentro del laboratorio son: Mancozeb, Cobrethane, Benomyl entre otros, ayudando en la disminución de agentes patógenos que atacan al cultivo (Cruz *et al.*, 1998).

2. OBJETIVOS

2.1. General

- Determinar tratamientos de desinfección *ex vitro* para la germinación en semillas de castaña (*Betholletia excelsa*) en el laboratorio de biotecnología vegetal.

2.2. Específicos

- Describir el proceso de desinfección de la semilla (*Betholletia excelsa*) en cada tratamiento empleado.
- Identificar los hongos que contaminan las semillas de castaña (*Betholletia excelsa*) en la etapa de germinación *ex vitro*.
- Determinar el porcentaje de germinación en semillas de castaña (*Bertholletia excelsa*) en los diferentes tratamientos.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Origen y distribución

Los árboles de castaña (*Betholletia excelsa*), son individuos dominantes del dosel en los bosques tropicales de Sud América, se encuentran presentes en la Amazonia, con mayor densidad en los países de Brasil, Bolivia, Perú, Colombia, Venezuela y Guyana, no es claro si estos individuos fueron transportados por el hombre o se dispersaron en forma natural (Mori y Prance, 1990).

La castaña puede llegar a alcanzar hasta los 50 metros de altura con un diámetro (DAP) de 2 a 4 metros su sistema radicular es muy ramificada, con una raíz vigorosa y profunda; el tallo o tronco es cilíndrico, desprovisto de ramificaciones hasta la copa, especialmente en su forma natural o silvestre, en sus hojas presentan un pecíolo de 3 a 5 cm de largo, acanalado y cubierto de fino tomento y un limbo grande de 25 a 37 cm de largo por 8 a 15 cm de ancho, de color verde brillante en el haz y verde pálido en el envés; la nervadura central es muy prominente en la cara inferior o envés (Fig. 1); presenta una flor completa en forma de capuchón de color amarillo cremoso, subsésiles, con tres bractéolas en la base, 2 o 3 sépalos, caducifolia y de constitución floral zigomorfa (de simetría bilateral) (Cuculiza, 1991). (Fig. 1).



Figura 1. Hojas y flor de la castaña (*Betholletia excelsa*).

3.2. Descripción taxonómica de *Bertholletia excelsa*

La clasificación taxonómica de *Bertholletia excelsa* HBK según GENTRY (1993):

Reino :	Plantae
División :	Magnoliophyta
Clase :	Magnoliopsida
Sub clase :	Dilleniidae
Orden :	Lecythidales
Familia :	LECYTHIDACEAE
Género :	<i>Bertholletia</i>
Especie :	<i>Bertholletia excelsa</i> HBK
Nombre vulgar :	Nuez del Brasil, Castaña de América, castaña de Marañón

3.3. Descripción del fruto

El fruto es de cápsula leñosa de unos 8 a 15 cm de diámetro, dentro del fruto se encuentran 15 a 20 semillas de unos 3 a 5 cm de largo (Fig. 2); es casi esférico que presenta un epicarpio carnoso con un espesor de 3-5 mm, el mesocarpio tiene un grosor de 6-8 mm, es duro rugoso y con grietas longitudinales; el endocarpio es una película delgada (Figueroa, 1976). (Fig. 2)



Figura 2. Fruto de la castaña (*Bertholletia excelsa*).

3.4. La semilla

Las semillas de castaña tienen tamaños y pesos diferentes, presentan un lado cóncavo y dos aplanados; el primero está inmediato a la pared interna del pixidio y los otros dos se aplanan por la presión contra las semillas; se igualan a los segmentos de la naranja que miden de 3 a 5 cm de largo (hasta 7 cm) y pesan de 6 a 12 gramos; las castañas están en el interior de los frutos dispuestas simétricamente en dos capas superpuestas alrededor de un eje (Bollati, 1993). (Fig. 3).



Figura 3. Semillas de castaña (*Bertholletia excelsa*).

3.5. Producción de la castaña

Un árbol de castaña llega a producir entre 200 a 600 cocos por año, con un peso promedio de 500 gramos por coco y un promedio de 17 castañas por unidad, lo que implica una producción anual de alrededor de 60 kg de castaña con cáscara por árbol, a nivel de cada árbol, la producción varía mucho de año a año; se ha podido demostrar que los árboles que reciben mucha luz pueden producir mucho más que los que se encuentran parcialmente en la sombra o que están cubiertos por lianas y bejucos (Zuidema, 2003; Kainer *et al.*, 2007). Tomando en cuenta una producción promedio de dos cajas de castaña por árbol y la cantidad de árboles estimados mediante el estudio SIG (Sistema de Información Geográfica), entre el departamento de Pando y la provincia Vaca Diez del Beni, se cuenta con un potencial productivo total anual de 168.753 toneladas de castañas (Vos *et al.*, 2016).

3.6. Clima y suelo

La castaña está presente en regiones de clima húmedo tropicales y lluviosos, con temperaturas que varían 24,3 a 27,2°C con valores máximos de 30,6 y 32,6°C y mínimos de 19,9 y 23,5°C (Corvera, 2006). Esta especie se adapta a suelos de tierras firmes y libres de encharcamientos, de textura media a pesados, de naturaleza franco - arcillosos, franco-arcillo-arenoso, con pH entre 4,5 y 6,0 (TCA 1997, citado por Corvera, 2006).

3.7. Aspecto de su propagación

3.7.1. Reproducción

La Castaña (*Bertholletia excelsa*) es una planta de reproducción con el sistema de polinización melitofila, que es por medio de las cual ciertas especies de plantas atraen a insectos himenópteros, en particular abejas y avispas, para que éstos realicen la polinización, las flores atraen a las abejas por medio de una combinación de formas, fragancias y colores (Müller *et al.*, 1980). Sus flores tienen una morfología que restringe la entrada de muchos insectos visitantes lo que ocasiona que los polinizadores necesiten tener la fuerza física y el tamaño del cuerpo compatible con la estructura de la flor (Argolo *et al.*, 2003).

3.7.2. Propagación vegetativa

La reproducción de la castaña es a través de la propagación asexual y sexual, por el método tradicional (sexual) su reproducción es tardía de 9 a 12 meses es lo que la semilla tarda en germinar en estado natural; en cultivos intervenidos la semilla es sembrada siguiendo un proceso de sembrado controlado su germinación es de 2 a 3 meses; es por ello que se utiliza la propagación asexual, por esquejes o injertos que es una propagación vegetativa más rápida, en Brasil se tiene algunos avances sobre este tipo de propagación, por ejemplo; en el proceso de obtener porta injerto (patrón) para la castaña, los primeros trabajos que se realizaron consistieron en evaluar la viabilidad de enraizamiento de estacas leñosas y herbáceas, con tratamientos hormonales de las especies;

castaña de macao (*Couroupita guianensis* Aubl.); geniparana (*Gustavia augusta* L.); sapacala (*Lecythis usitata* Miers) y churo (*Allontoma lineada* (Berg) Miers), quien mostró mejor resultado fue la geniparana que enraiza fácilmente con un porcentaje de 100% de eficiencia (Muller *et al.*, 1980). La propagación vegetativa es muy eficiente y más rápida para conservar la especie ya que las poblaciones de castaña se ven afectadas por la deforestación, en su Atlas Socio Ambiental de las Tierras Bajas y Yungas de Bolivia (2015), la Fundación Amigos de la Naturaleza estima que, anualmente el departamento de Pando pierde el 3% de sus bosques por la modificación de las vegetaciones naturales en beneficio del gentío, por ello las poblaciones de la castaña se ve reducida, las principales causas de la deforestación a nivel nacional son la ganadería (50%), la agricultura mecanizada (30%) y la agricultura campesina e indígena (20%) (Müller *et al.*, 2014).

3.8. Biotecnología vegetal

Un ex plante se define como un fragmento de una planta (célula, tejido u órgano; el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc.), que se prepara de forma aséptica para su cultivo *in vitro* y *ex vitro* (Blanca Indacochea, 2017). La Biotecnología Vegetal es una rama de la Biología que se está expandiendo rápidamente, que abarca una serie de técnicas, entre las que se encuentra el cultivo de células, tejidos *in vitro* que se ha convertido en una valiosa herramienta en el mejoramiento genético de especies de importancia económica (Lindsey, 1992; Jiménez, 1998 b).

Es por ello que biotecnología vegetal constituye una herramienta para complementar las acciones enfocadas a la conservación *ex situ* de especies vegetales, sobre todo de aquellas que están en peligro de extinción (Barnicoat *et al.*, 2010). Estas técnicas resultan de mayor importancia sobre todo cuando el material vegetal disponible bajo condiciones ambientales es escaso o las tasas de propagación vegetativa o sexual son bajas (Kitamura *et al.*, 2002). Es por esto,

que en jardines botánicos se cuenta con laboratorios de biotecnología vegetal para la propagación y conservación de especies vegetales (Fay, 1992).

3.9. Contaminación *ex vitro*

Ex vivo o *ex vitro* se refiere a los medios o medidas realizados en o sobre tejidos biológicos de un organismo vivo en un ambiente artificial fuera del organismo con las alteraciones máximas de las condiciones naturales; las condiciones *ex vitro* permite experimentos en células o tejidos de organismos bajo condiciones menos controladas de lo que son posibles en experimentos *in vivo* o *in vitro* (en el organismo con tacto), a costa de alterar el medio "artificial", uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es el de la contaminación con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, virus), el ambiente generado por el explante, es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos; es difícil cuantificar el impacto de estas pérdidas, pero en promedio, en laboratorios se lo puede estimar en alrededor del 10%, en el mejor de los casos, estos microorganismos no destruyen los cultivos, pero compiten con el explante por los nutrientes del sustrato de cultivo o bien lo modifican, es muy difícil conseguir cultivos estrictamente asépticos dado que en la mayoría de los casos es altamente probable que los mismos contengan agentes patógenos, por lo que, en la práctica, cuando se refiere a cultivos asépticos, en general se refiere al cultivo donde no se produce la proliferación de hongos y bacterias (Blanca Indacochea, 2017).

3.10. Tipos de contaminación en el cultivo *ex vitro*

Dos son las fuentes de contaminaciones: a) microorganismos presentes en el interior o en la superficie de los explantes y b) fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio (Blanca Indacochea, 2017). La correcta detección de estas fuentes y del tipo de microorganismo son aspectos importantes para el éxito de los cultivos, pues por un lado ayuda a determinar la fuente de contaminación

por otro lado, ayuda a la planificación de los procedimientos para controlarlos (Blanca Indacochea, 2017).

3.10.1. Contaminaciones de hongos cultivo *ex vitro*

Las contaminaciones de hongos son filamentosas (*Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Neurospora*) están frecuentemente en los cultivos, es conveniente inspeccionar los cultivos en forma periódica (por lo menos semanalmente) y visualmente con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Blanca Indacochea, 2017).

3.11. Desinfección

Para la bioseguridad en el laboratorio es fundamental disponer de conocimientos básicos sobre la desinfección y la esterilización, teniendo en cuenta de que los objetos muy sucios no pueden desinfectarse o esterilizarse rápidamente, es igualmente importante comprender los conceptos básicos de la limpieza previa, a este respecto, los siguientes principios generales se aplican a todas las clases conocidas de microbios patógenos (O.M.S, 2005).

Los requisitos particulares de la descontaminación dependerán del tipo de trabajo experimental y de la naturaleza de los agentes infecciosos que se estén manipulando, la información genérica que aquí se ofrece puede utilizarse para elaborar procedimientos tanto normalizados como más específicos para hacer frente a los peligros biológicos que existan en un laboratorio concreto (O.M.S, 2005).

Los tiempos de contacto con los desinfectantes son distintos para cada material y cada fabricante. Así pues, todas las recomendaciones para el uso de desinfectantes deben seguir las especificaciones del fabricante, según la (O.M.S, 2005) en la esfera de la desinfección y la esterilización se utilizan muchos términos diferentes.

3.11.1. Desinfección del material vegetal

En el proceso de desinfección (equipos, áreas y material vegetal) se debe tener mucho cuidado con la desinfección de diferentes partes de la planta, se han empleado básicamente productos mercuriales y clorados, con un tratamiento previo o a la vez con algún tipo de detergente. El cloro es llamado principalmente como hipoclorito de sodio (NaClO), y es usado a concentraciones de 0.5%, 2%, 2,5% o 3% por 20 min, también está el etanol al 70% por 20 seg (Gutiérrez, 1988).

3.12. Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio es un compuesto químico altamente oxidante, que suele ser llamado también cloro o lejía, su fórmula química es NaClO; sus características químicas hacen que el hipoclorito de sodio (NaClO) sea un agente eficaz en la eliminación de ciertos hongos, bacterias y microorganismos, sin embargo, no es tan eficaz ante virus; por su capacidad de desinfección es utilizado en diferentes ámbitos, desde el hogar hasta en hospitales y la industria (QUIMINET, 2011). El cloro, es un germicida químico de uso muy extendido, normalmente se vende en forma de lejía una solución acuosa de hipoclorito sódico (NaOCl) que puede diluirse en agua para conseguir distintas concentraciones de cloro libre (O.M.S, 2005).

3.13. Jabón comercial

El jabón además de limpiar las superficies contaminantes, debe a su vez, eliminar las células muertas, elimina los hongos bacterias y agentes externos; de hecho, muchos expertos consideran que no utilizar un jabón apropiado para la piel, puede descompensar su pH, resecarla, hacer que pierda su elasticidad, o volverla más grasa de lo normal (QUIMINET, 2011).

3.14. Alcohol o etanol

El etanol (alcohol) un desinfectante que se lo puede utilizar en diferentes concentraciones para su uso, lo podemos encontrar a concentración del 96%, para eliminar un gran porcentaje de bacterias, hongos en superficies y en la piel, para evitar futuras enfermedades en seres humanos, animales y plantas (QUIMINET, 2011).

El etanol (alcohol) formula química C_2H_5OH , es un activo contra las bacterias, los hongos y los virus, para conseguir la máxima eficacia deben utilizarse en concentraciones acuosas de aproximadamente un 70% (v/v): las concentraciones más altas o más bajas pueden no tener tanto poder germicida.; una de las grandes ventajas de las soluciones acuosas de alcoholes es que no dejan residuo alguno en los objetos tratados (O.M.S, 2005).

3.15. Fungicidas

Un fungicida es un tipo particular de plaguicida que controla enfermedades fúngicas, inhibiendo o eliminando al hongo que causa la enfermedad, no todas las enfermedades causadas por hongos pueden controlarse adecuadamente con fungicidas, por esto es esencial determinar la causa de los síntomas antes de la aplicación de un fungicida para contrarrestar la contaminación en los cultivos (José Carlos&McGrath, M.T, 2004). Entre ellos se encuentran: Mancozeb, Benomyl y Cobrethane.

3.15.1. Mancozeb

El Mancozeb es un fungicida de Contacto o preventivo acondicionado con aceites vegetales y minerales que le brindan adherencia y distribución; pertenece al grupo de fungicidas más versátiles y ampliamente utilizados a nivel mundial, el Mancozeb es un fungicida protector que está indicado para la prevención de numerosas enfermedades fungosas de una amplia variedad de cultivo; actúa por estricto contacto con las esporas del hongo sobre la superficie del tejido a proteger, no penetra en la hoja tiene mayor poder fungicida que otros

ditiocarbamatos considerados individualmente o en mezcla con otros producto, no desarrolla resistencia debido a que actúa en distintos puntos; por eso se aconseja su mezcla con otros fungicidas de acción sistémica, es compatible con fertilizantes foliares y aceites de uso agrícola, como actúa por contacto se aconseja cubrir totalmente los brotes, hojas y frutos antes que se produzca la aparición de las enfermedades (Guía de Productos Fitosanitarios – CASAFE, 2009).

3.15.2. Cobrethane

El Cobrethane tiene efecto fungicida y bactericida, es un fungicida debido a la presencia de Mancozeb + Cobre, que poseen un amplio espectro de acción sobre enfermedades, además es un bactericida por la presencia del Oxiclورو de Cobre, siendo el cobre un elemento por excelencia para el control de bacterias fitopatógenas, este fungicida contiene en su formulación elementos menores altamente disponibles y asimilables, de gran importancia para la nutrición de las plantas, aplicado en la semilla se convierte en fuente primaria de nutrientes para la planta en germinación, asimismo la protege y le da vigor, Cobrethane ofrece el reverdecimiento de las plantas debido al efecto fungicida-bactericida preventivo que permite que la planta permanezca sana por más tiempo y ayuda a fortalecer las hojas, así como el aporte de elementos como el Zn, Mn, Fe y Cu que actúan en procesos de síntesis de clorofila, fotosíntesis y crecimiento de la planta, también puede ser aplicado en cualquier etapa de desarrollo del cultivo: semilla, etapa vegetativa y etapa de floración, es por ello que el efecto y bactericida de Cobrethane es preventivo por lo tanto, es necesario aplicarlo al parecer los primeros síntomas porque el Cobrethane aniquila las esporas del hongo, inhibiendo su germinación y evitando el desarrollo de la enfermedad, destruyendo la membrana y pared celular del hongo. (Guía de Productos Fitosanitarios – CASAFE, 2009).

3.15.3. Benomyl

El Benomyl es un fungicida sistémico, su acción es preventiva y curativa, controlando a los hongos patógenos antes de su penetración en las plantas, o bien cuando la infección recién se ha producido. (Guía de Productos Fitosanitarios – CASAFE, 2009).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del área de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el Departamento de Pando; Municipio Cobija; en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal perteneciente al Área de Ciencias Biológicas y Naturales de la Universidad Amazónica de Pando, ubicada a $11^{\circ} 01' 59,20''$ de Latitud Sur y $62^{\circ} 45' 31,13''$ de Longitud Oeste (Fig. 4).



Figura 4. Ubicación del laboratorio en el campus universitario.

4.2. Materiales

4.2.1. Material vegetal

Las semillas fueron colectadas del municipio de Filadelfia de la propiedad del señor Adaildo Nascimento C. (Fig. 5).



Figura 5. Semillas de castaña colectadas para la investigación.

4.2.2. Materiales de trabajo

Los materiales que se emplearon en la investigación fueron los siguientes (Tabla 1).

Tabla 1. Materiales de laboratorio utilizados en el transcurso de la investigación.

<i>Materiales y Equipos de Laboratorio</i>	<i>Materiales de Campo y de Gabinete</i>	<i>Materiales e Insumos de Desinfección y Reguladores de Crecimiento</i>
<ul style="list-style-type: none"> ✓ EQUIPOS • Balanza analítica • Autoclave • Lupa • Vernier ✓ INSTRUMENTOS Y MATERIALES • Jeringas 1ml • Pinzas • Vasos precipitados de 800 y 1000 ml • Caja Petri • Espátula • Vasos de plástico • Sellador 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ MATERIAL VEGETAL Y DE CAMPO • Semillas • Arena • Tierra vegetal ✓ MATERIAL DE GABINETE • Cámara fotográfica • Computadora • Cuadernillo • Impresora • Internet • Lápiz • Planillas de registro • Regla 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ MATERIALES DE DESINFECCION • Agua de botellón • Agua destilada esterilizada • Cobrethane • Benomyl • Mancozeb • Jabón liquido • NaClo • Etanol ✓ REGULADORES DE CRECIMIENTO • Giberilinas




Fuente: Elaboración propia.




4.3. Métodos y procedimientos

4.3.1. Procedimiento

En el laboratorio de biotecnología vegetal se elaboró el procedimiento y se llevó a cabo el protocolo de desinfección para la castaña (*Betholletia excelsa*). (Tabla 2).

Tabla 2. Protocolos de desinfección para las semillas de castaña.

PROTOCOLO	DESCRIPCIÓN
 <p>Semillas en la técnica de flotación</p>	<p>1. Se seleccionó la semilla por tamaño, se utilizó la técnica de flotación y se observó en el estereoscopio para mayor viabilidad de la semilla.</p>
 <p>Jabón líquido</p>	<p>2. Se remojo las semillas seleccionadas, en una solución jabonosa por 10 min, luego se enjuago 3 veces con agua destilada autoclavada.</p>
 <p>Etanol 70%</p>	<p>3. Se remojo las semillas en etanol al 70% durante 20 seg, y se enjuago 3 veces con agua destilada (para los 3 tratamientos).</p>

 <p style="text-align: center;">NaClO</p>	<p>4. Se remojo en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2,5 todas las semillas por 15 min.</p>
 <p style="text-align: center;">Fungicidas</p>	<p>5. Se remojo 40 semillas en una solución de Benomyl 5g/L por 2 horas, removiendo cada 10 min. Para el tratamiento 1</p> <p>6. Se remojo 40 semillas en una solución de 5g/L Cobrethane por 2 horas, removiendo cada 10 min. Para el tratamiento 2</p> <p>7. Se remojo 40 semillas en una solución de Mancozeb 5g/L por 2 horas, removiendo cada 10 min. Para el tratamiento 3</p>
 <p style="text-align: center;">Sembrado de semillas.</p>	<p>8. Se sembró las semillas en arena autoclavada y tierra vegetal.</p>

Fuente: Elaboración propia.

4.4. Tipos de sustratos

El sembrado de cada tratamiento, se realizó en ambientes totalmente esterilizado, que consistió en aplicar dos tipos de sustratos (arena y tierra vegetal), para cada tratamiento (Tabla 3), asimismo se colocó giberilina en las semillas. Obteniendo 6 tratamientos con 20 repeticiones, y luego fueron trasladados con cuidado a la sala de crecimiento donde se controló a una temperatura media de 27 C°, para ser evaluadas.

Tabla 3. Tipos de sustratos utilizados en la siembra.

Factor A	Factor B	Tratamiento
Benomyl (B)	Arena (A)	RA=r 20
	Tierra vegetal (TV)	RTV=r 20
Cobrethane (C)	Arena (A)	RA=r 20
	Tierra vegetal (TV)	RTV=r 20
Mancozeb (M)	Arena (A)	RA=r 20
	Tierra vegetal (TV)	RTV=r 20

Fuente: Elaboración propia.

Difactorial $2 \times 3 = 6 \times 20 = 120$ und

Los factores de varianza en estudio son:

- 3 tipos de funguicidas: B, C y M
- 2 tipos de sustratos: A y TV.

4.5. Diseño estadístico

El diseño que se empleó para el trabajo de investigación es completamente al azar con 20 repeticiones, por lo tanto el número de unidades experimentales fue de $3 \times 2 = 6 \times 20 = 120$. Con un arreglo Difactorial distribuidos completamente al azar. (Tabla 3).

4.5.1. Modelo estadístico

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + T_j + E_k + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

μ = Media general

B_i = Efecto del i-ésimo bloque o repetición

T_j = Efecto de la j-ésima de sustratos

E_k = Efecto del k-ésimo tipos de funguicidas

$I.j.k$ = Efecto de la interacción

ϵ_{ijkl} = Error experimental

4.6. Variable de respuesta

Las variables de respuesta a evaluar, en el proceso de germinación son:

4.6.1. Contaminación de semillas de castaña

La contaminación se evaluó durante tres meses, cada dos semanas, donde se tomó 30 muestras del material vegetal contaminado, aplicando los métodos de tinción en las muestras y se procedió a observar en el microscopio compuesto con una resolución de 40x, (Fig. 6) para su identificación de los microorganismos se guio con el “MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HONGOS” (Instituto nacional de salud de Perú, 2007).

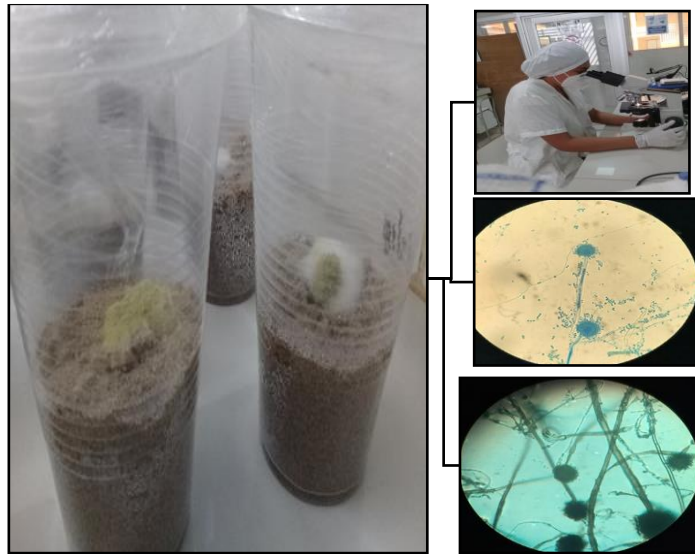


Figura 6. Identificación del hongo *Aspergillus spp* y *A. niger*, en el cultivo de castaña.

4.6.2. Número de plantas germinadas de castaña

Se determinó el número de plantas germinadas (*Bertholletia excelsa*), cada 10 días durante tres meses para cada tratamiento. (Fig. 7)



Figura 7. Plantas germinadas de castaña (*Bertholletia excelsa*)

4.6.3. Altura de planta de castaña

Se evaluó la altura de cada planta utilizando una regla de 30cm y se midió cada planta a los 5 días de germinación y luego se evaluó la altura cada 10 días durante 2 meses. (Fig. 8).

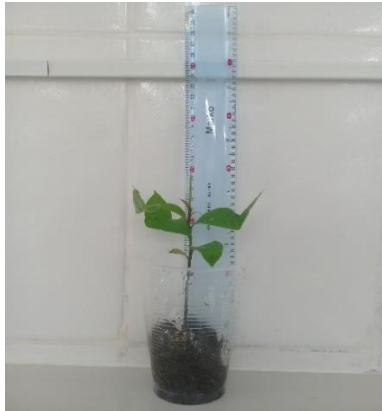


Figura 8. Medición de las plantas de castaña con una regla.

4.6.4. Diámetro de plantas de castaña

Se obtuvo el diámetro de cada planta con la ayuda del Vernier utilizando este aparato se midió cada planta a los 60 días de germinación. (Fig. 9).



Figura 9. Medición de la planta de castaña con el Vernier

5. RESULTADOS

5.1. Análisis de varianza

El análisis de varianza mostro que no existe diferencia significativa para la interacción entre sustrato y fungicida al $p < 0,01$, para las variables contaminación, número de plantas germinadas, altura de planta, y diámetro. Por lo tanto, las variables son independientes. Para el análisis de varianza, para el factor tipos de fungicida mostro que existe diferencia significativa, al $p < 0,01$ para la variable contaminación, número de germinación por planta y altura de planta (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de varianzas de las variables.

F.V	Análisis de varianza			
	Cuadrados Medios			
	Contaminación	Número de Planta germinada	Altura	Diámetro
Funguicidas	3.30**	4.23**	15.31**	0.01ns
Sustratos	1.89ns	0.74ns	23.87**	0.025ns
Fungicida* Sustrato	0.17ns	0.01ns	0.03ns	0.026ns
CV (%)	29.26	25.67	22.30	28.11

Fuente: Elaboración propia.

C.V.= Coeficiente de Variación **=Significativo al 95% ns= No Significativo

Para el análisis de comparaciones de medias, se observó que el fungicida Cobrethane es estadísticamente inferior 1.17 (55%) de plantas contaminadas a diferencia de los otros fungicidas que se mostraron superior 1.47-1.75 (75% y 90%). (Fig.10).

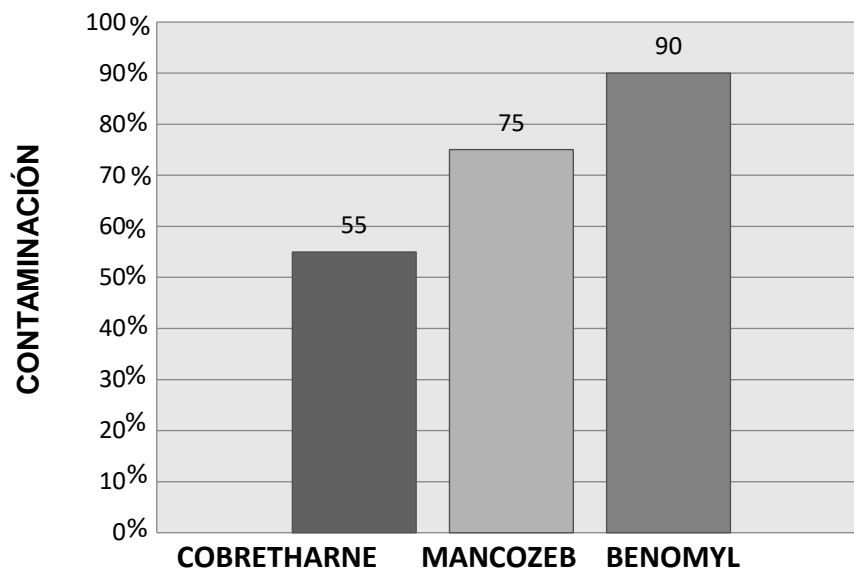


Figura 10. Contaminación de semillas de castaña.

5.1.1. Analisis de varianza para número de planta germinada

El análisis para comparaciones de medias para el número de planta germinada en relación al tipo de fungicida, se observó que obtuvo 25 plantas germinadas con el fungicida Cobrethane, estadísticamente superior en comparación a los otros que son estadísticamente inferior (15-8 de planta germinadas) (Fig.11).

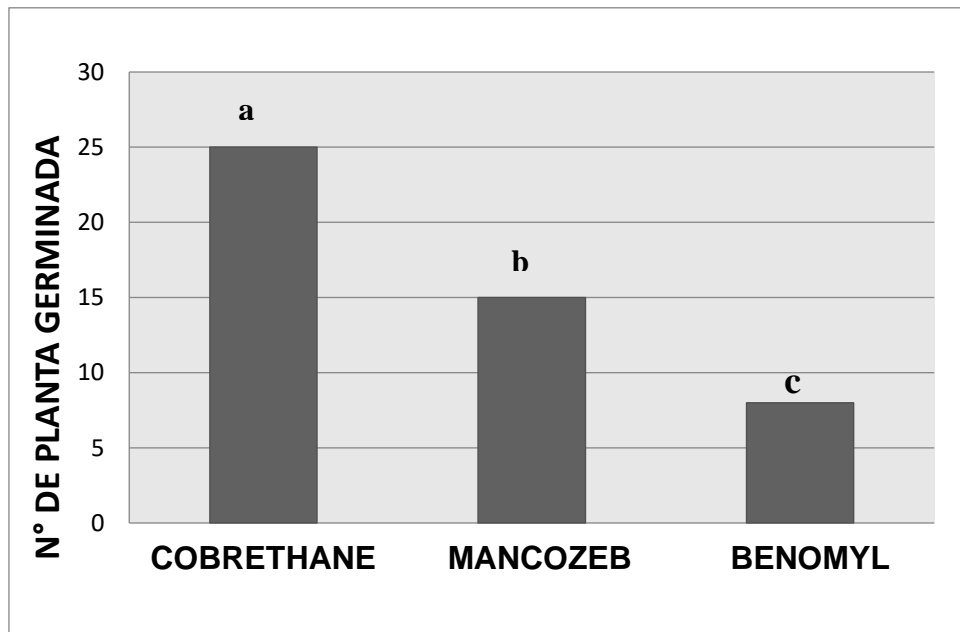


Figura 11. Tipos de fungicidas en la variable germinación de plantas de castaña.

5.1.2. Análisis de varianza para altura de planta

Para comparaciones de medias en la variable altura de planta en relación al tipo de fungicida, se obtuvo mayor altura estadísticamente de (8.27) para el fungicida Cobrethane, en comparación a los otros que son estadísticamente inferior (1.97-4.20). (Fig. 12).

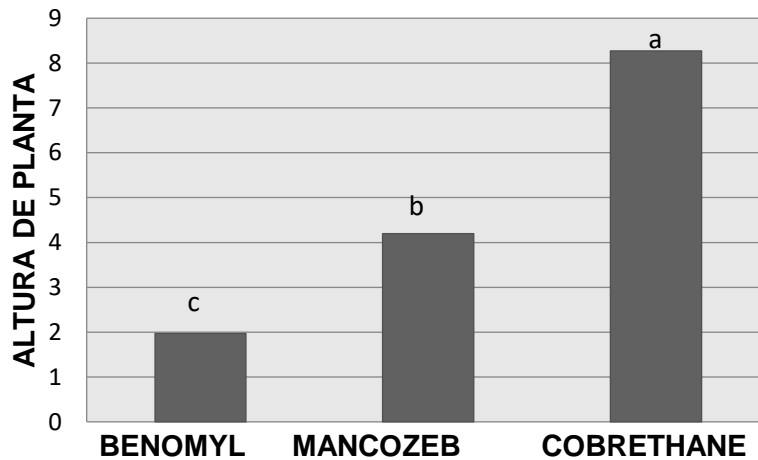


Figura 12. Tipos de fungicidas en la variable altura de planta.

5.1.3. Analisis de varianza tipo de sustrato

Para el análisis de variancia del factor tipo de sustrato muestra que no existe diferencia significativa para las variables número de plantas germinadas y diámetro $p < 0,05$, existe diferencia significativa al $p < 0,05$ para la variable altura de planta (Fig. 13).

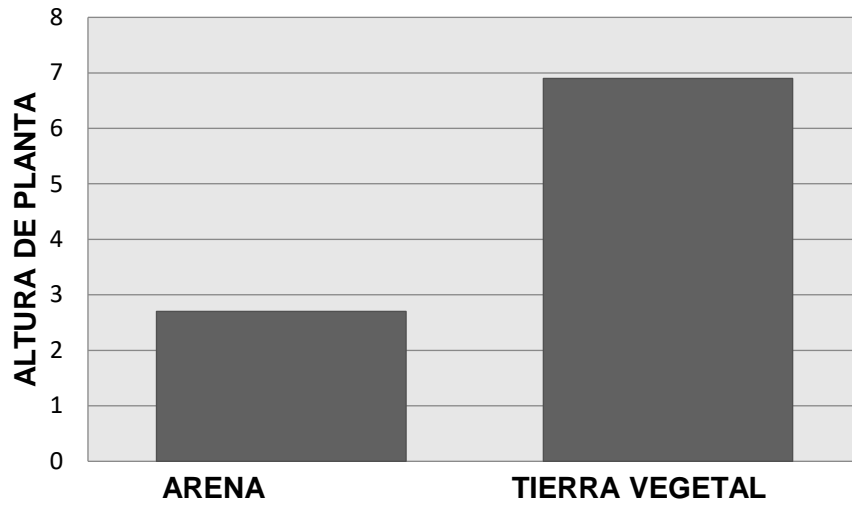


Figura 13. Tipos de sustratos en la variable altura de planta.

El análisis de comparación de medias para la variable altura de planta, mostró que si hay diferencia significativa ($p < 0,01$) en función al tipo de sustrato. Se observó mayor altura de planta, estadísticamente con tierra vegetal (6.9), a comparación de la arena que fue estadísticamente inferior (2.7). (Fig. 13).

6. DISCUSIÓN

a) Contaminación

La presencia de agentes contaminantes ya sean bacterias u hongos en los cultivos *ex vitro* se debe a varios factores, entre los que sobresalen la asociación del ex plante a su medio, así como las condiciones de la introducción y la fuente origen del material vegetal; de ahí la importancia de obtener un material vegetal adecuado para usarlo como ex plante (Mroginski y Roca, 1991). Esto fue evidente en la presente investigación, ya que cuando se introdujo material proveniente de campo, hubo altos porcentajes de contaminación.

Se menciona que la contaminación, más que matar a los embriones directamente, invade el cultivo haciendo que la semilla no sea apta para su desarrollo dentro del laboratorio (Alonso y Gómez, 2002). En la presente investigación se observó que la contaminación por hongos impidió el primer brote apical en las semillas.

Según (Acosta et al., 2005) indica que la aplicación de fungicidas preventivos de contacto Mancozeb (10 g/l) controlan las contaminaciones. En la presente investigación se utilizó Cobrethane, Mancozeb y Benomyl como previa desinfección para las semillas, lo cual el fungicida Mancozeb tuvo menor reacción con las semillas provocando así en su mayoría la muerte del material vegetal, sin embargo el fungicida cobrethane obtuvo un mejor resultado disminuyendo la contaminación en las semillas de castaña.

b) Germinación de plántulas

(Loomis y Connor, 2002) afirman que la germinación es el proceso de reactivación metabólica de la semilla y la emergencia de la radícula (raíz) y la plúmula (tallo), a través del tegumento externo de la semilla (testa).

Para una evaluación de germinación se utilizan semillas viables (morfología normal, completas, testa entera, coloración característica de acuerdo a la especie, los cuales se observa con un estereoscopio, o con el método de flotación.

(Emongor *et al.*, 2004). En la presente investigación se usó el método de flotación y luego se observaron las semillas con el estereoscopio para obtener mayor viabilidad de germinación.

Aunque a nivel regional no se ha determinado cual es el fungicida apropiado para la desinfección de las almendras, se recomienda el uso de Benomyl (benlate) por ser un producto de amplio espectro, la solución deber ser preparada en una concentración del 0.03%, es decir, 3 gr de benlate por cada litro de agua, las semillas deben permanecer completamente inmersas en esta solución por un periodo de 90 minutos, debiendo agitarse periódicamente el caldo fúngico para evitar la sedimentación del producto (Muller, *et al.*, 1989). En la presente investigación se utilizaron tres fungicidas: Mancozeb, Benomyl y Cobrethane, se utilizó 5gr del fungicida Benomyl y Mancozeb en el cultivo de castaña, obteniendo un resultado no favorable en cuanto a la germinación de plántulas, debido a que estos fungicidas no controlan a los microorganismos, impidiendo la germinación y desarrollo del ápice apical, mientras que en la aplicación del fungicida Cobrethane se obtuvo mejores resultados en germinación obteniendo plántulas libre de patógenos, mejor que en la aplicación de los otros fungicidas.

Existen compuestos que estimulan la germinación, entre los más usados están: nitrato de potasio, tiourea, etileno, giberilina (GA3), entre otros, todo este tipo de sustancias se emplean a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, dependiendo de la especie de que se trate (INTA, 2011). En la presente investigación se utilizó 3ml de la hormona giberilina así, se ha comprobado que, en numerosas semillas el (GA3), contrarresta el efecto de latencia en las semillas de castaña.

c) Altura de planta

Para un mayor crecimiento y desarrollo de las plántulas se requiere de un buen sustrato que le brinde todos los nutrientes necesarios a la planta y abundante agua para la formación de un buen sistema radicular, el cual es un factor muy

importante para la supervivencia y para un buen crecimiento inicial en campo, la tierra vegetal es una mezcla de arena, limo, arcilla y materia orgánica, junto con los microorganismos correspondientes proporcionando los nutrientes necesarios para que la planta crezca vigorosamente (Strauch, 2001). En la presente investigación se utilizó arena autoclavada y tierra vegetal, quien favoreció al crecimiento de la plántula fue la tierra vegetal obteniendo plántulas vigorosas y grandes, este sustrato ayudo a la plántula a crecer satisfactoriamente, asimismo el fungicida Cobrethane disminuyo la contaminación, permitiendo la germinación de la plántula.

d) Sustratos

La cantidad de materiales orgánicos usados en los sustratos varía considerablemente, generalmente entre 25 a 50 % (del volumen), pero a veces alcanza el 100%, las mezclas que contienen más del 50 % de materia orgánica, pueden tener menos espacio poroso (Ruano, 2008). En la presente investigación se utilizó dos tipos de sustrato arena y tierra vegetal.

La arena de río es un material inorgánico que forma parte de un sustrato, tiene como función principal la de producir y mantener una estructura de macroporos que aporta aireación y drenaje, presenta una nula capacidad de intercambio catiónico y proporciona al medio una base química inerte (Landis *et al.*, 1990).

El mejor sustrato para la germinación es la arena pura lavada (sin lodo); la arena es un material que no ocurre descomposición de sus elementos y no hay mucha proliferación de patógenos que pueden causar pudrición de las semillas y mejor aireación; además, este sustrato no se compacta, y permite que las plántulas puedan ser retiradas sin dañar su sistema radicular, se debe evitar el uso de materia orgánica fresca, ya que puede causar fermentación y consecuentemente aumento de hongos (Muller, *et al.*, 1989). En la presente investigación se utilizó dos tipos de sustratos: arena autoclavada y tierra vegetal; en el sembrado del cultivo con la arena autoclavada se obtuvo la pudrición e inhibición de las semillas

en la mayoría de las repeticiones, se observó bajos resultados de germinación, debido a que la arena es muy porosa estimulando la humedad en el cultivo, provocando la pudrición de las semillas. La tierra vegetal contiene muchos microorganismos y nutrientes que benefician a la planta en su desarrollo (Ruano, 2008). En la presente investigación se utilizó este sustrato en el cultivo de castaña donde se observó que la tierra vegetal fue más eficiente que la arena, obteniendo en su mayoría la germinación de plántulas vigorosas de castaña.

7. CONCLUSIÓN

Sobre la base de los objetivos planteados y los resultados obtenidos se llegaron a las siguientes conclusiones:

- ✓ Para la propagación *ex vitro* de castaña por semillas libre de microorganismos y con mayor germinación, el mejor fungicida es Cobrethane con un 29% de plantas germinadas.
- ✓ Para la identificación de los hongos que contaminan las semillas de castaña en la etapa de germinación *ex vitro*, se observó al *Aspergillus spp* y *A. niger*, causantes de la contaminación en el cultivo.
- ✓ Para la determinación del porcentaje de germinación en semillas de castaña (*Bertholletia excelsa*) en los diferentes tratamientos, se observó un total de 51% de germinación de plántulas (Cobrethane 29%, Mancozeb 15%, Benomyl 7%).

8. RECOMENDACIONES

- ❖ Desinfectar cuidadosamente las semillas para no causar rajaduras en las mismas.
- ❖ Sembrar la semilla a 5cm para que pueda brotar rápidamente.
- ❖ Utilizar las semillas de castañas de una sola planta madre.
- ❖ Se recomienda aumentar la dosis de Cobrethane dependiendo a la cantidad de semillas.
- ❖ Usar giberilina (GA3), en diferentes cantidades.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, 1958.** Agricultural Geography of Latin America. FAS/USDA – Superintendent of Documents U.S.A. Government Printing Office – Miscellaneous Publication No. 743. Washington D.C. USA.
- Arias N., E. 2001b.** Propagación vegetativa de la castaña (*Bertholletia excelsa* HBK) en Madre de Dios. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP). En revisión.
- Arias N., E. 2001c.** Selección de árboles de castaña (*Bertholletia excelsa* HBK) de alta producción en la provincia de Tambopata. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP). En revisión.
- Arias N., E. 2001d.** Selección de árboles nativos de castaña de alto rendimiento. Manual Técnico. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP). En revisión.
- Arias N., E. 2002b.** Técnicas de injertación de castaña (*Bertholletia excelsa* HBK). Documento técnico. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP). En revisión.
- Argolo, V. M.; WADT, L. H. O. 2003.** Abelhas visitantes de flores de *Bertholletia excelsa* em área de plantio e floresta nativa - Rio Branco Acre. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 2003, Fortaleza, CE. Anais Fortaleza: Editora da Universidade do Ceará. 2003.
- Arguedas, M., Torres, G. 1996.** Problemas fitosanitarios en semillas forestales. ITCRCIT. No. 11.
- Arguedas, M. 1997.** Plagas de semillas forestales en América Central y el Caribe. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

- Blanca indacochea. 2017.** Las técnicas de cultivo in vitro y ex vitro de células y tejidos vegetales pp 14-15.
- Bogado f; Vera Bravo C; Ayala P; sansberro p; luna c. 2016.** Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Grevillea robusta*.
- Bollati, H.G. 1993.** La castaña su germinación y crecimiento en vivero. Universidad Técnica del Beni, Mariscal José Ballivan. Bolivia. Riberalta – Beni. 7-24p.
- Barnicoat, R. Cripps, J. Kendon, V. Sarasan,** “Conservation in vitro of rare and threatened ferns –case studies of biodiversity hotspot and island species”, *In Vitro Cell.Dev.Biol. –Plant*, Vol. 47, 2011, 37-45.
- Cavalcante MC, Oliveira FF, Maués MM, Freitas BM., 2012.** Pollination requirements and the foraging behavior of potential pollinators of cultivated Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) trees in central Amazon rainforest. *Psyche* 2012:doi:10.1155/2012/978019.
- Cynthia Isabel Ilanos buendia 2015.** Micropropagación in vitro de piña, ananas comosus (L.) Merr var. md2 (bromeliaceae) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal 50p.
- Corvera R; Arcos M; Canal A. (2006).** Manual técnico: Buenas prácticas de Cultivo en Castaña. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. 32 p.
- Cuculiza, P. 1,991.** La Castaña del Brasil (Inédito). 393 p. 1998. Baja Productividad de los Castaños Cultivados 30 p.
- Derek, J.B., Black, M., 1994.** Seeds: physiology of development and germination. Plenum Publishing Corporation. Springer Street, New York.

- Emongor, V.E.;** T. Mathowa y S. Kabelo. 2004. "The effect of hot water, sulphuric acid, nitric acid, gibberellic acid and ethephon on the germination of *Corchorus* (*Corchorus tridens*) seed". *J. Agronomy*, 3(3): 196-200.
- Evenari, M., 1957.** Les problemes physiologiques de la germination. *Bull. Sot. Franc. Physiol. Vtg.* 3, 105-124.
- Fao., 1991.** Guía para la manipulación de semillas forestales. Roma, Italia. En línea disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/ad232s/ad232s00.htm#TOC>.
- Figuroa, R. 1976.** La castaña (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). En: simposio internacional sobre plantas de interés económico de la Flora Amazónica, Programa Cooperativo para el Desarrollo del Trópico Americano (IIACA-TROPICOS). Informe de conferencias. Cursos y reuniones. N°93. Turrialba, Costa Rica. 256-263p.
- F. Fay,** "Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods", *In Vitro Cell. Dev. B-Pl.*, Vol. 28, 1, 1992, 1-4.
- Fundación Amigos de la Naturaleza (2015).** Atlas socioambiental de las tierras bajas y yungas de Bolivia. Santa Cruz de la Sierra: Editorial Fundación Amigos de la Naturaleza.
- Geilfus, F. 1994.** El árbol al servicio del agricultor. Manual de Agroforestería para el Desarrollo Rural. Vol. N°2. Guía de especies. CATIE-ENDA-CARIBE. Turrialba – Costa Rica. 777p.
- Gentry, A. 1993.** A. Field Guide to the Families and Genera of Woody Plants of Northwest South America. Conservación Internacional Washington DC 1993.895 p.

Gonzales, M. (1993). Estudios del efecto de diferentes regímenes de nacondicionamiento en plantas de Rauli. Tesis Ing. For. Valdivia, Universidad Austral de Chile, Fac. de Cs. Forestales. Chile.

González, M.J., M.F. Terán, A. Poma, S. Condo, N. Mercado & F. González. 2012. La senda de la castaña. Retos para el manejo sostenible de la castaña en diez comunidades del norte amazónico de Bolivia. Fundación PIEB, Embajada Real de Dinamarca, La Paz, Bolivia, 207 pp.

Gutiérrez E., M.A. 1988. Efecto de la Benciladenina, ácido indolacético, niveles de agar y carbón activado en la micropropagación de la piña Ananas comosus L. Merry cultivar “cayana lisa’ México, 70 p. Tesis (Maestría en Ciencias, Especialista en Fruticultura). Centro de Fruticultura Chapingo. Colegio de Postgraduados.

Hess, R.; Wangaard, F. and F. Dickinson. 1950. Properties and uses of Tropical Woods, II. Tropical Woods, 97:42-46.

IIAP, CTAR, BIOFOR, CAR-CONAM, INADE, 2000. Extracción de Castaña. En: Zonificación Ecológica Económica de Madre de Dios, VOLUMEN IV, Medio Socioeconómico: 50-51 p.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA. 2011.

Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. Serie

técnica: “Sistemas Forestales Integrados” Área Forestal – INTA EEA.

Jiménez, E. 1998. Cultivo de ápices y meristemas.— p. 45-56. En: Pérez, J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología.— Santa Clara: IBP, [b].— 390 p.

José Carlos Ureta R., McGrath, M.T. 2004. ¿Qué son los fungicidas? Trans. Luisa Santamaria

- Jurado, E., 2000.** Germination in Tamaulipan thornscrub of north-eastern Mexico. Journal of Arid Environments. 46, 413-424.
- Kainer KA, Wadt LHO, Staudhammer, CL., 2007.** Explaining variation in Brazil nut fruit production. Forest Ecol. Manage. 250:244-255.
- Kainer KA, Wadt, LHO, Staudhammer CL., 2014.** Testing a silvicultural recommendation: Brazil nut responses 10 years after liana cutting. Journal of Applied Ecology 51: 655-663.
- Kitamura, K. Kubo, L. u. Rahman, T. Ikenaga,** "Reproduction of *Sedum drymarioides*, an Endangered Rare Species, by Micropropagation", Plant Biotechnol., 19, 5, 2002, 303-309.
- LaFleur, J.R. 1992.** Marketing of Brazil nut. A case study from Brazil prepared for the Forest Products Division. FAO, Rome.
- Landis, T. D., Tinus, R. W., McDonald, S. E. & Bamett, J. P. (1990).** Containers growing media. Volumen 2. The container Tree Nursery Manual. Agric. Handbook. 674. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service.
- Llanque Espinoza, O.E., Llanque Zonta, V.E.; Zonta, A. (2008).** Comportamiento de árboles adultos de castaña (*Bertholletia excelsa*) en grandes aberturas de bosque en la Amazonia Sudoccidental. En: PROMAB & FORLIVE. Memoria IV Reunión Nacional Sobre Investigación Forestal. Riberalta: Programa Manejo de Bosques de la Amazonía Boliviana.
- Lindsey, K. 1992.** Biotecnología Vegetal Agrícola. / M. G. K. Jones.— España: Editorial Acribia, — 276 p.
- Loomis, R.S., Connor D.J. 2002.** Ecología de cultivos: productividad y

manejo de sistemas agrarios. España.

Matilews, V. and Rangan, T.S. 1979. Growth and regeneration of plantlets in callus cultures of pineapple. En: *Scientia Horticulturae*. Vol. II p. 319-328.

Maués MM., 2002. Reproductive phenology and pollination of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. Lecythidaceae) in Eastern Amazonia. Pollinating bees. pp. 245-254 in *The Conservation Link Between Agriculture and Nature*, Ministry of Environment, Brasilia, Brasil.

Ministerio de Comercio Interno y Exportación, PROMUEVE BOLIVIA 2017. “Perfil Productivo Castaña” La Paz Bolivia.

Morpeth, D.R., Hall, A.M., 2000. Microbial enhancement of seed germination in *Rosa corymbifera* ‘Laxa’. *Seed Sci Res.* 10:489-94.

Mori, Scott; Prance, Ghillea. 1990. Taxonomy, ecology, and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). En: *Advances in Economic Botany* 8: 130-150. The New York Botanical Garden.

Mori, S.A. 1992. The Brazil nut industry-past, present and future. En: Plotkin, M. y Famolare, L. (eds.) *Sustainable Harvest and Marketing of rain Forest products*, 241-251. Island Press, Washington D.C.

Müller, R.; Pacheco, P.; Montero, J.C. (2014). El contexto de la deforestación y degradación de los bosques en Bolivia. Causas, actores e instituciones. Bogor (Indonesia): CIFOR. Documentos Ocasionales, 100.

Müller CH, Rodrigues IA, Müller AA, Müller NRM., 1980. Castanha-do-Brasil: Resultados de pesquisa. EMBRAPA/Centro de Pesquisa Agropecuária do Tropicó Úmido, *Miscelânea* 2, pp. 1–25.

- Muller, C.; Rodrigues, I.; Muller, A.; Maradei, N. 1980.** Castanha do Brasil, Resultado de Pesquisa. EMBRAPA/CPATU. Belem do Pará, Brasil. Miscelânea No 02, 24 p.
- Pachón, C.E., Castaño, J., 1999.** Identificación de hongos en semillas almacenadas de maíz y frijol. FITOPATOLOGIA. No. 23. En línea disponible: <http://ciagrope.tripod.com/fitote23.html>
- POH, T. and KHOON, C.B. 1975.** Tissue culture of pineapple. P. 51-58. En: Natural Plant Tissue Culture Symposium. Malasia: Kuala Lumpur.
- Rojas, F., 2006.** Viveros Forestales, second ed. San José, Costa Rica.
- Ruano, J.R. (2008).** Viveros forestales. 2a Ed. España: Mundi-Prensa.
- Ohashi, S.T., Daniel, O. y Costa, L.G. da S. 1995.** A Castanha-do-brasil- *Bertholletia excelsa* H.B.K. facultades de Ciências Agrárias do Pará. Belém, Brasil.
- Organización Mundial de la Salud, 2005.** Manual de bioseguridad en el laboratorio. Tercera edición. Ginebra-2005. Pag: 89-97.
- Peres, C.A. & C. Baider. 1997.** Seed dispersal, spatial distribution and population structure of Brazil nut trees (*Bertholletia excelsa*) in southeastern Amazonia. *Journal of Tropical Ecology* 13: 595-616.
- Peres, C. A., C. Baider, P. A. Zuidema, L. H. Wadt, K. A. Kainer, D. A. P. Gomes-Silva, R. P. Salomão, L. L. Simões, E. R. N. Franciosi, F. Cornejo Valverde, R. Gribel, G. H. Shepard JR., M. Kanashiro, P. Coventry, D. W. YU, A. R. Watkinson & R. P. Freckleton. 2003.** Demographic threats to the sustainability of Brazil nut exploitation. *Science* 302: 2112-2114.

- Pinheiro E. y de Albuquerque, M. 1968.** Castanha-do-Pará. En: Libro anual da Agricultura-Brasil. 223-233 p.
- QUIMINET, 2011.** Información y Negocios Segundo a Segundo. Consulta. <http://www.quiminet.com/articulos/usos-y-aplicaciones-del-hipoclorito-de-sodio-2555821.htm> Acceso: 28/05/2015; 08:40 pm.
- Salhuana, J. 1973.** Exploración y comercialización de la Castaña en Madre de Dios. En: Dirección General Forestal y Caza. Nº 30. Ministerios de Agricultura. Lima- Perú. 85p.
- Sarasan, R. Cripps, M. M. Ramsay, C. Atherton, M. McMichen, G. Prendergast, J. K. Rowntree, 2006.** “Conservation in vitro of threatened plants –progress in the past decade”, In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant, Vol. 42, 2006, 206-214.
- Scoles, R., 2011.** Do rio Madeira ao rio Trombetas: novas evidências ecológicas e históricas da origem antrópica dos castanhais amazônicos. Novos Cadernos NAEA 14(2): 265-282.
- Scoles, R. & R. Gribel. 2011.** Population structure of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae) stands in two areas with different occupation histories in the Brazilian Amazon. Human Ecology 39: 455-464
- Strauch, R. (2001).** Desarrollo de plantas de Roble-Raulí (tipo 1-1) durante el primer periodo vegetativo y costos asociados al proceso. Tesis Ing. For. Fac. de Cs. Forestales. Universidad Austral de Chile. Valdivia..
- Sujii PS, Martins K, Wadt LHO, Azevedo VCR, Solferini VN., 2015.** Genetic structure of *Bertholletia excelsa* populations from the Amazon at different spatial scales. Conserv Genet. doi: 10.1007/s10592-015-0714-4.

- Tratado de Cooperación Amazónica - TCA. (1997).** Cultivos de Frutales Nativos Amazónicos- Secretaria Pro- Tempore, Lima, Perú. 195 p.
- Thomas, E.; C. Alcázar Caicedo; J. Loo & R. Kindt. 2014.** The distribution of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) through time: from range contraction in glacial refugia, over human-mediated expansion, to anthropogenic climate change. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.*, Belém 9: 267-291.
- Thomas, E.; C. Alcázar Caicedo; C.H. McMichael; R. Corvera & J. Loo. 2015.** Uncovering spatial patterns in the natural and human history of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) across the Amazon Basin. *Journal of Biogeography* 42: 1367-1382.
- Unalm. 1993.** Estudio de mercado de la castaña. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias Forestales. Lima-Perú. 16p.
- Vega-Villasante, F.; H. Nolasco, C. Montaña, H.L. Romero-Schmidt y E. Vega-Villasante, 1996.** “Efecto de la temperatura, acidez, iluminación, salinidad, irradiación solar y humedad sobre la germinación de semillas de *Pachycereus pecten-aboriginum* “cardón barbón” (Cactaceae)”. *Cact. Suc. Mex.*, 41: 51-61.
- Vieira, S.; S. Trumbore; P. B. Camargo; D. Selhorst; J. Q. Chambers; N. Higuchi & L. A. Martelli. 2005.** Slow growth rates of Amazonian trees: consequences for carbon cycling. *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences)* 102: 18502–18507.
- Vos, V.A., Chávez, R.; Arteaga R.; Ayoroa K.T.; Teco L., H.; Gonzales M., V.; Menchaca M., R.; Sánchez G., D. (2016).** Estudio del impacto de las inundaciones sobre la producción familiar en el norte amazónico de Bolivia. Riberalta: CIPCA Norte.

Wildbergt, G. 2000. Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Editorial Acribia. Zaragoza- España. 1-16, 287-307.

Zuidema, P. A. 2003. Ecología y manejo del árbol de castaña (*Bertholletia excelsa*). PROMAB (Serie Científica, 6), Riberalta.117 p.

Zuidema, P. A. & R. G. A. BOOT. 2002. Demography of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*) in the Bolivian Amazon: impact of seed extraction on recruitment and population dynamics. *Journal of Tropical Ecology* 18: 1-31.

ANEXOS



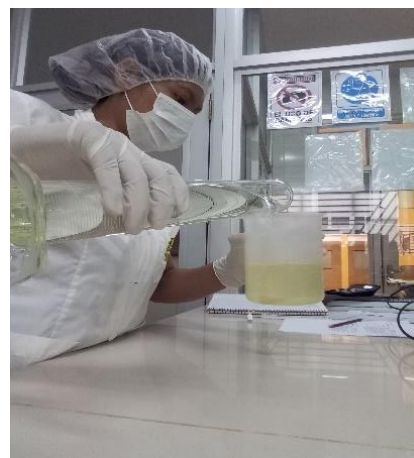
Anexo 1. Semillas de castaña remojando



Anexo 2. Semillas de castaña secando



Anexo 3. Semillas de castaña peladas



Anexo 4. Preparación de NaClO



Anexo 5. Semillas en solución jabonosa



Anexo 6. Semillas en etanol



Anexo 7. Mancozeb, Cobrethane y Benomyl



Anexo 8. Preparación de los fungicidas



Anexo 9. Remojo de semillas en los fungicidas



Anexo 10. Semillas secando



Anexo 11. Preparación de la arena para el sembrado



Anexo 12. Sembrado de las castañas



Anexo 13. Sembrado de semillas en arena



Anexo 14. Plántulas de castaña germinadas



Anexo 15. Plántulas de castaña en arena y tierra vegetal