

## Protocolo para la propagación *in vitro* de la castaña (*Bertholletia excelsa*)

Gabriela Ancasi; Julio Montero; Ronald Maygua;  
Israel Muñoz; Fabián Usnayo

*Universidad Amazónica de Pando, Área de Ciencias Biológicas y Naturales,  
Laboratorio de Biotecnología Vegetal*

*E mail: gaby luz862@hotmail.com*

**Resumen.** Esta investigación fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales de la Universidad Amazónica de Pando, en el año 2014 con el objetivo de evaluar un mejor protocolo en la fase de establecimiento para la propagación *in vitro* de la castaña (*Bertholletia excelsa*). Fueron seleccionados 40 plantas madres del *Vivero Agroforestal Agua Rica*. Para la experimentación se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio con tres diferentes medios de cultivo, dos protocolos de desinfección y siete repeticiones. Los medios de cultivo fueron los siguientes: M1) Murashige y Skoog fue suplementado con L-cysteine 0.50 g/l, Bap 1.5 ml; M2) Murashige y Skoog fue suplementado con ácido cítrico 0.50 g/l, Bap 2.5 ml; M3) Murashige y Skoog suplementado con carbón activo 0.50 g/l, Bap 3.5 ml. La variable de respuesta fue la sobrevivencia de los explantes, donde se observó el grado de oxidación y contaminación. Los resultados mostraron que en la primera fase de establecimiento, en el medio de cultivo 3, no se observó oxidación, sin embargo se observó contaminación del total de los explantes, mientras que en los medios de cultivo 1 y 2 se observó oxidación, sin contaminación. Todos los explantes no llegaron a la fase final del establecimiento.

**Palabras clave:** Biotecnología vegetal; Explantes; Oxidación; Contaminación

**Summary. Protocol for the *in vitro* propagation of the chestnut (*Bertholletia excelsa*).** In the year 2014, this research was carried out in the Plant Biotechnology Laboratory of the Biological and Natural Sciences Area of the Amazonian University of Pando, with the objective of evaluating a better protocol in the establishment phase for the *in vitro* propagation of the chestnut (*Bertholletia excelsa*). A total of 40 mother plants were selected from the *Agua Rica Agroforestry Nursery*. For the experimentation, a completely random experimental design was used with three different culture media, two disinfection protocols and seven replicates. The culture media were as follows: M1) Murashige and Skoog was supplemented with L-cysteine 0.50 g/l, Bap 1.5 ml; M2) Murashige and Skoog was supplemented with citric acid 0.50 g/l, Bap 2.5 ml; M3) Murashige and Skoog supplemented with active carbon 0.50 g/l, Bap 3.5 ml. The response variable was the survival of the explants, where the degree of oxidation and contamination were observed. The results showed that in the first stage of establishment, in the culture medium 3, no oxidation was observed; however, contamination from the total explants was observed, while in culture media 1 and 2, oxidation was observed, without contamination. All the explants did not reach the final phase of the establishment.

**Keywords:** Plant biotechnology; Explants; Oxidation; Contamination

## Introducción

La castaña es uno de los productos no maderables que tiene un importante aporte económico para el departamento de Pando. Los beneficios socioeconómicos del comercio de la castaña son especialmente significativos en la región del norte de Bolivia, pues alrededor del 70% de las fuentes de empleo están relacionadas con esta industria, además, de existir pocas alternativas laborales para la población. La castaña se encuentra en planicies y colinas fuertemente disectadas, en partes altas con buen drenaje, relacionadas con otras especies arbóreas (ZONISIG, 1997).

Según plantearon Pinheiro y Albuquerque en 1968, a las almendras de esta especie, bajo condiciones normales, les toma entre 12 y 18 meses para germinar. Sin embargo, cuando Muller en 1982, utilizó almendras desprovistas de tegumento, tratadas previamente con acetato de fenilmercurio, obtuvo germinación a los 20 días después de la siembra. Otros estudios realizados demostraron que la propagación asexual es una herramienta que puede ser utilizada para sustituir el proceso de germinación de las almendras en el establecimiento de cultivos de especies forestales, aumentando su calidad genética y fitosanitaria, y de esta forma acelerar su ciclo productivo.

A través de técnicas *in vitro*, el ciclo productivo de las especies trabajadas puede ser acelerado y la producción de posturas de calidad genética y fitosanitaria puede ser implementada, teniendo en vista la gran necesidad del abastecimiento del mercado interno y externo (Fachinello *et al.*, 2005).

El objetivo de esta investigación fue evaluar un protocolo en la fase de establecimiento para mejorar y acelerar la propagación *in vitro* de la castaña (*Bertholletia excelsa*).

## Materiales y métodos

**Ubicación.** El presente trabajo de investigación se realizó en el año 2014, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Área de Ciencias Biológicas y Naturales de la Universidad Amazónica de Pando.

**Material biológico.** El material vegetal usado en esta investigación fue recolectado del *Vivero Agroforestal Agua Rica*.

### Metodología

**1. Recolección del material vegetal de campo:** Se seleccionaron las plantas de 12 meses que tenían mejor desarrollo, con buenas condiciones fitosanitarias (plantas sanas).

**2. Protocolo para cultivo *in vitro* de castaña en la fase de establecimiento.** Para evaluar los protocolos en la fase de establecimiento se siguieron los siguientes tres pasos:

⇒ Desinfección del material vegetal. Los protocolos de desinfección para el establecimiento, se describen en el Cuadro 1, en base a recomendaciones del Laboratorio *Microplant* Quito (Pilar, 2010).

⇒ Medios de cultivo. Los medios de cultivo se describen en el Cuadro 2.

⇒ Establecimiento: Dentro de una cámara de flujo laminar, los entrenudos fueron reducidos en segmentos de un solo nudo de 0.5 a 1 mm y se dejó cada uno de los protocolos de desinfección (Cuadro 1).

Para el establecimiento, se dejó a una temperatura promedio de 21°C, humedad relativa de 60% a 70%, fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas de oscuridad (González y Vilca, 1998).

El porcentaje de contaminación se determinó cada 5 días, durante 30 días, en base a la siguiente fórmula.

$$\% \text{ contaminación} = \frac{\text{explante contaminado}}{\text{total de explantes}}$$

El grado de oxidación se evaluó con una escala de 1 (5–15%) a 5 (100%), según escala de Novak *et al.* (1989).

**Cuadro 1.** Protocolo de desinfección

Tipo de explante	Desinfección fuera de la cámara de flujo laminar		Desinfección dentro de la cámara de flujo laminar			
	Producto	Tiempo	Pro-tocolo	Producto	Concen-tración	Tiempo
- Entrenudo - Meristemo apical	Jabón	1 min	1	Alcohol	75%	1 min
				Cloro comercial	50%	2 min
	Cloro comercial	20%		3 min		
	Fungicida	10 min	2	Alcohol	75%	1 min
	Povidin	10 min		Cloro comercial	75%	3 min
				Cloro comercial	10%	5 min

**Cuadro 2.** Medios de cultivo para la fase de establecimiento

Componentes químicos	M1	M2	M3
MS	Completo	Completo	Completo
My-inositol	0,1 g/l	0,1 g/l	0,1 g/l
Bap	1,5 ml	2,5 ml	3,5 ml
AG3	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
L-cysteine	0,50 g/l	---	---
Ácido cítrico	---	0,50 g/l	---
Carbón activado	---	---	0,50 g/l
Azúcar	30 g/l	30 g/l	30 g/l
Phytigel	3,5 g/l	3,5 g/l	3,5 g/l
pH	5,6	5,6	5,6

El experimento fue implementado bajo un diseño experimental completamente aleatorio (DCA) con los siguientes seis tratamientos:

- T 1    Explante sano sin oxidación
- T 2    15% de oxidación
- T 3    25% de oxidación
- T 4    50% de oxidación
- T 5    75% de oxidación
- T 6    100% de oxidación planta muerta

Estos seis tratamientos fueron evaluados en los tres medios de cultivo para la fase de establecimiento (Cuadro 2).

**Análisis estadístico.** Se realizaron análisis de varianza con seis grados de libertad previa verificación de normalidad y homogeneidad de las variables.

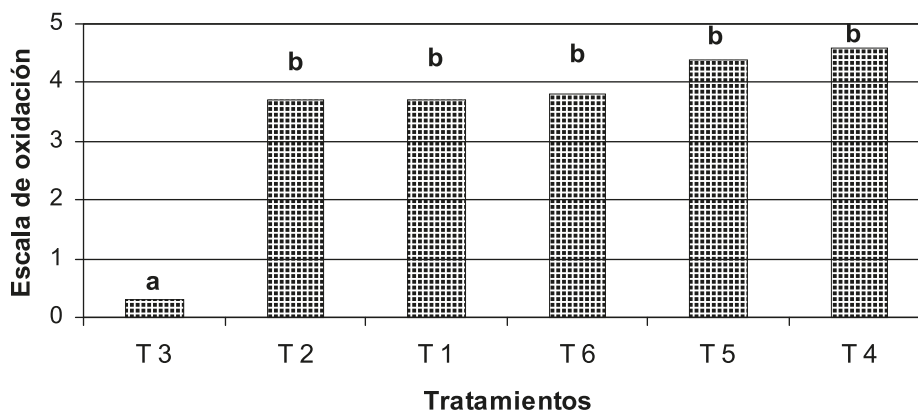
Las comparaciones de medias fueron realizadas a una probabilidad de  $P < 0,01$ , mediante la prueba de Tukey, utilizando el procedimiento Proc GLM y Mixed del SAS (SAS, 2004).

## Resultados y discusión

### Grado de oxidación

El análisis de varianza (ANVA) mostró un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,85 y un coeficiente de variación (CV) de 12%; según el modelo estadístico existió un 85% de variación, por lo que el modelo fue apropiado para explicar la variación existente en los datos. Por otra parte, el CV fue inferior al 35%; lo cual, significa que las transformaciones realizadas, homogeneizaron adecuadamente los datos. Asimismo el ANVA para el grado de oxidación por efecto de fenolización, mostró que hubo diferencias altamente significativas entre los tratamientos ( $P < 0,01$ ).

Cuando se realizaron las comparaciones de medias, se observó que el tratamiento 3, tuvo el menor grado de oxidación (0,27). En cambio, la oxidación de los otros medios fueron estadísticamente superiores (3,5 - 4,7) (Figura 1).



**Figura 1.** Grado de oxidación en los explantes de castaña (*Bertholletia excelsa*) sometidas a tres diferentes medios

**Porcentaje de contaminación de los explantes**

La contaminación se evaluó durante 30 días; los resultados del efecto de los tratamientos de desinfección demuestran que los tratamientos T2 y T1 no presentaron signos de contaminación, tanto en el explante como en el medio de cultivo, mientras que en los tratamientos T4 y T5 presentaron contaminación alrededor de un 65% y para los tratamientos T3, T6 presentó el 100% de contaminación (Figura 2).

Las oxidaciones fenólicas, en ocasiones, pueden constituirse en un serio problema en el establecimiento y supervivencia de meristemos y ápices, los cuales se manifiestan como un ennegrecimiento del medio de cultivo que comienza por la zona cercana al explante y puede extenderse a todo el medio produciendo una seria afectación en el crecimiento del explante, al que puede provocar la muerte (Pérez, 1998).

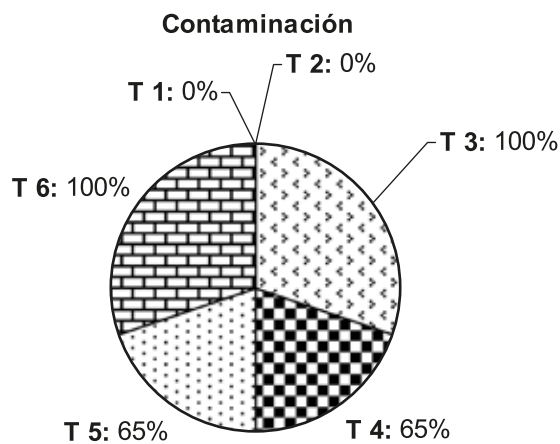
Según Aliyu (2005), mediante la adición de carbón activo se evita la oxidación del

explante. Sin embargo en el presente estudio se observó que el tratamiento 3, suplementado con carbón activo, obtuvo menor grado de oxidación (0.27) que con el tratamiento 2, suplementado con ácido cítrico, obtuvo un mayor grado de oxidación (3.5- 4.7).

Otro de los factores causantes de los principales problemas para la propagación *in vitro* es la contaminación (Alonso, 2002).

En la presente investigación se utilizó alcohol con concentración de 75% por 1 min, Cl comercial 50% por 2 min, Cl 20% por 3 min, donde el tratamiento uno y dos obtuvo el 0% de explantes sin contaminación (hongos y bacterias).

Según Verçosa *et al.* (2012), la alta tasa de contaminación por bacterias está asociada con la fuerte oxidación fenólica emitida por los explantes de brotes apicales de castaña de Brasil. Estas oxidaciones son ocasionadas por la liberación de fenoles a través de las heridas realizadas en la extracción de los explantes.



**Figura 2.** Porcentaje de explantes contaminados

Los fenoles liberados en este proceso son altamente tóxicos e inhiben la absorción de los nutrientes del medio, lo que favorece el establecimiento de contaminaciones bacterianas y perjudican el desarrollo de los explantes, causando incluso necrosis de los tejidos.

## Conclusiones

- En la evaluación de sobrevivencia en la micro propagación de la castaña, bajo condiciones controladas de laboratorio, se observó que el tratamiento 3 tuvo el menor grado de oxidación (agentes internos); sin embargo, presentó contaminación en su totalidad (agente externo).
- En los tratamientos 1 y 2 se observó oxidación, sin contaminación en la fase de establecimiento *in vitro* de la castaña. Sin embargo, en el proceso de evaluación de sobrevivencia, ninguno de los tratamientos llegó a la fase final de establecimiento.

## Referencias citadas

- Aliyu M. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: An appraisal. *Afric J Biotechnol.* 2005; 4: 1485-89.
- Fachinello J.; Hoffmann A.; Nachtgal J.; Kersten E. 2005. Propagação frutíferas. Pelotas: Embrapa Informações Tecnológicas.
- González C.; Vilca J. 1998. Micropropagación vegetativa *in vitro* de aliso (*Alnus acuminata*). Edición Graficas de ADEFOR. Cajamarca, Perú.
- Muller C. 1982. Quebra da dormência da semente e enxertia em castanha do Brasil: Estudos Agronômicos. Belém. EMBRAPA, CPATU (Documento 16). 40 p.
- Novak F.; Afza R.; Van Duren M., Perrea-Dallos M.; Conger B.; Xiaolang T. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of de-ssert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio Technology.* 7:147-158.
- Pérez J. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba. 83 - 295.
- Pinheiro E.; Albuquerque M. 1968. Ministerio da Agricultura. Libro Anual da Agricultura. Brasilia.
- Vercosa N. 2012. Influencia del cloranfenicol y polivinilpirrolidona (PVP) en la regeneración *in vitro* de la castaña de Brail (*Bertholletia excelsa* HBK). *En línea:* Disponible en: [www.google.com.bo/#q=vercosa+2012+cultivo+in+vitro+casta%C3%B1a](http://www.google.com.bo/#q=vercosa+2012+cultivo+in+vitro+casta%C3%B1a) Consultado el 11 de noviembre de 2015
- ZONISIG. 1997. Zonificación agroecológica y socioeconómica y perfil ambiental del departamento de Pando. Ed. Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente. La Paz, Bolivia. pp. 23 – 57.

Trabajo recibido el 20 de junio de 2016 - Trabajo aceptado el 20 de julio de 2016

### Agradecimientos:

*A la Dirección de Investigación de Ciencias y Tecnología de la Universidad Amazónica de Pando, por el financiamiento de esta investigación. Asimismo al Dr. Julio Gabriel por la revisión y contribución al presente artículo.*