

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES**



**DETERMINACIÓN DE MEDIOS DE  
CULTIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO  
*IN VITRO* DE BAMBÚ (*GUADUA  
WEBERBAUERI*)**

Presentado por:

**Fabiola Estefania Casanova Alvino**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO FORESTAL

---

Lima - Perú  
2018

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos para calificar la sustentación del Trabajo de Tesis, presentado por la ex-alumna de la Facultad de Ciencias Forestales, Bach. FABIOLA ESTEFANIA CASANOVA ALVINO, intitulado “DETERMINACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE BAMBÚ (*GUADUA WEBERBAUERI*)”.

Oídas las respuestas a las observaciones formuladas, lo declaramos:

.....

con el calificativo de .....

En consecuencia queda en condición de ser considerada APTA y recibir el título de INGENIERO FORESTAL.

La Molina, 4 de Diciembre de 2017

.....  
Ing. Ignacio Rómulo Lombardi  
Indacochea  
Presidente

.....  
Ing. Carlos Fernando Bulnes Soriano  
Miembro

.....  
PhD. Héctor Enrique Gonzales Mora  
Miembro

.....  
PhD. Gilberto Domínguez Torrejón  
Asesor

.....  
Mg. Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa  
Coasesor

## *DEDICATORIA*

*A mis padres.*

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Dios por haberme dado fortaleza y salud para cumplir mis metas.*

*Mi más sincero agradecimiento a los profesores Gilberto Domínguez y Lourdes Tapia por todo el apoyo brindado durante la elaboración de la tesis.*

*Un especial agradecimiento al PhD. Héctor Gonzales Mora y a todos los miembros del “Círculo de Investigación en la cadena de valor del bambú para su desarrollo científico y tecnológico” por haberme permitido formar parte de este importante proyecto, haciendo posible la ejecución de esta investigación.*

*Agradezco a mis padres por siempre apoyarme, motivarme y creer en mí.*

*Un agradecimiento especial a Milagritos, Sra. Olga, Andrea, Roxana, Sra. Gaby, Raquel por toda la ayuda y apoyo durante mi estancia en el Instituto de Biotecnología de la UNALM.*

*Gracias a mis compañeros y amigos tesistas Luis Márquez, Deysi Huayllacallan, María Riva, Mónica Ñahuinlla, por el apoyo y consejos.*

*Por último agradezco a mis amigos incondicionales Natalia Barba, Melina Bocanegra, Lasmit Cerón, Guillermo Huayama, Ana Laura, Alejandra Muñoz, Diego Saavedra, Úrsula Tafur, Linda Zegarra por sus palabras de aliento, amistad sincera y por siempre creer en mí.*

*Este trabajo de investigación se realizó con el apoyo y financiamiento de FONDECYT-CONCYTEC, programa Ciencia Activa, del convenio N° 174-2015 “Círculo de Investigación para el Desarrollo de la Cadena de Valor del Bambú para el Desarrollo Científico Tecnológico”*

## *RESUMEN*

Los bambúes son gramíneas que tienen condiciones únicas de sostenibilidad, rápido crecimiento y gran versatilidad, características que han convertido a esta planta en protagonista del siglo XXI. (Añazco, 2013). En la propagación de especies de bambú, se utilizan generalmente métodos de reproducción asexual debido a que la floración de estas especies sólo se presenta a intervalos o ciclos muy largos, por lo tanto no es común el empleo de semilla en su propagación. La micropropagación es una alternativa para superar los problemas que se presentan en la propagación convencional de estas especies. Para lograr la micropropagación de *Guadua weberbaueri* se probaron tres tratamientos de desinfección usando alcohol al 70%, hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones y Tween 20. El mejor tratamiento fue el tratamiento 3 que consistió en una limpieza con hipoclorito de sodio al 2,5% por 10 minutos y luego otra vez una desinfección con hipoclorito de sodio al 1,5% por 3 minutos. Para la fase de iniciación se probaron tres medios basales: MS, MS modificado y 1/2MS. El medio de cultivo más adecuado para la especie *Guadua weberbaueri* resultó ser el medio MS. Además, se hicieron ensayos preliminares de multiplicación con tres medios: MS + bencilaminopurina + ácido naftalenacético, MS modificado + bencilaminopurina y MS + tidiazurón + ácido naftalenacético. El medio de multiplicación que mostró mejor comportamiento para el desarrollo de la especie *Guadua weberbaueri* fue el MM3 que consistía en sales de MS modificadas por Mathur *et al.* (1992) más 2 mg/l de bencilaminopurina.

Palabras clave: Micropropagación; bambúes; cultivo in vitro; desinfección; cultivo de tejidos

# ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Revisión de Literatura .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Aspectos generales del género <i>Guadua</i> Kunth .....</b>	<b>3</b>
1.1. Taxonomía .....	3
1.2. Distribución.....	4
1.3. Factores climáticos .....	4
1.3.1. Precipitación .....	4
1.3.2. Temperatura .....	5
1.4. Factores edáficos .....	5
1.4.1. Suelo .....	5
1.4.2. Ph del suelo .....	5
1.4.3. Profundidad efectiva .....	5
1.4.4. Topografía .....	5
1.5. Propagación .....	6
1.5.1. Propagación sexual .....	6
1.5.2. Propagación asexual.....	6
1.6. Usos.....	7
<b>2. Especies nativas del género <i>Guadua</i> Kunth.....</b>	<b>8</b>
2.1. Descripción botánica de <i>Guadua weberbaueri</i> y <i>Guadua sarcocarpa</i> .....	8
2.1.1. <i>Guadua weberbaueri</i> .....	9
2.1.2. <i>Guadua sarcocarpa</i> .....	9
<b>3. Aspectos generales del Cultivo <i>in vitro</i>.....</b>	<b>10</b>
3.1. Definición .....	10
3.2. Micropropagación.....	10
3.2.1. Fases de la micropropagación.....	11
3.2.2. Ventajas y desventajas de la micropropagación.....	13
3.3. Medios de cultivo.....	13
3.3.1. Componentes del medio de cultivo .....	14
3.4. Cultivo de segmentos nodales.....	18
3.5. Factores que afectan la micropropagación de plantas .....	18
3.5.1. El explante .....	18
3.5.2. El genotipo.....	19
3.5.3. Factores físicos.....	19
3.5.4. Efecto del medio de cultivo.....	20
3.5.5. Asepsia .....	20
3.5.6. Agar .....	21
3.5.7. Ph.....	21
<b>4. Especies de bambú trabajadas en cultivo <i>in vitro</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>III. Materiales y Métodos .....</b>	<b>23</b>
<b>1. Lugar de ejecución .....</b>	<b>23</b>
<b>2. Materiales.....</b>	<b>23</b>
2.1. Material vegetal.....	23
2.2. Materiales y equipos de laboratorio.....	24
2.2.1. Material de vidrio y plástico.....	24
2.2.2. Equipos e instrumentos.....	25
2.2.3. Otros materiales .....	25
2.2.4. Compuestos químicos.....	26

<b>3. Métodos</b> .....	<b>27</b>
3.1. Selección de explantes .....	27
3.2. Desinfección de explantes .....	27
3.3. Ensayo de medios de cultivo .....	31
3.3.1. Preparación de los medios de cultivo .....	31
3.4. Parámetros evaluados .....	35
3.4.1. Tratamientos de desinfección .....	35
3.4.2. Ensayos con medios de cultivo .....	35
3.5. Diseño de la investigación .....	36
3.5.1. Tratamientos de desinfección .....	36
3.5.2. tratamientos de medios de cultivo .....	36
<b>IV. Resultados y discusión</b> .....	<b>39</b>
<b>1. Tratamientos de desinfección</b> .....	<b>39</b>
1.1. Contaminación de explantes .....	39
1.2. Supervivencia de explantes .....	43
<b>2. Evaluación de los parámetros para la selección del medio de cultivo de establecimiento</b> .....	<b>45</b>
2.1. Longitud del explante .....	45
2.2. Número de hojas .....	50
2.3. Color de hojas .....	51
3.2. Longitud de brotes .....	56
<b>V. Conclusiones</b> .....	<b>59</b>
<b>VI. Recomendaciones</b> .....	<b>61</b>
<b>VII. Referencias bibliográficas</b> .....	<b>63</b>
<b>VIII. Anexos</b> .....	<b>69</b>

## *Índice de tablas*

	Página
Tabla 1: Tratamientos de desinfección .....	29
Tabla 2: Composición de los medios de cultivo para la fase de iniciación.....	33
Tabla 3: Codificación para los medios de cultivo.....	33
Tabla 4: Medios de cultivo para multiplicación .....	34
Tabla 5: Escala de colores .....	35
Tabla 6: Porcentaje de desinfección de explantes.....	39
Tabla 7: Supervivencia de explantes.....	43
Tabla 8: ANOVA para la longitud del explante (SC tipo III) .....	46
Tabla 9: Prueba de Tukey para longitud de explantes.....	47
Tabla 10: Prueba de Kruskal-Wallis para el número de hojas .....	50
Tabla 11: Resultados de promedio de hojas por tratamiento .....	50
Tabla 12: Prueba de Kruskal-Wallis para color de hojas .....	51
Tabla 13: Número de microplántulas por color y tratamiento. ....	52
Tabla 14: Prueba de Kruskal-Wallis para número de brotes.....	55
Tabla 15: Promedio de brotes por explante por tratamiento. ....	55
Tabla 16: ANOVA para la longitud de brotes en medios de multiplicación.....	56

## Índice de figuras

	Página
Figura 1: <i>Guadua weberbaueri</i> en invernadero .....	24
Figura 2: Segmento nodal sin hoja caulinar de rama primaria de <i>Guadua weberbaueri</i> . ...	27
Figura 3: Explantes antes de ser lavados. ....	29
Figura 4: Explante nodal listo para la siembra. ....	30
Figura 5: Explante desarrollado con hongo en la base.....	30
Figura 6: Macronutrientes.....	32
Figura 7: Preparación de medios de cultivo. ....	32
Figura 8: Escala de colores de hoja .....	36
Figura 9: Tasa de desinfección .....	40
Figura 10: Explante muerto y con hongo. ....	42
Figura 11: Explante contaminado con hongo.....	42
Figura 12: Número de explantes sobrevivientes por tratamiento .....	44
Figura 13: Gráfico de barras de longitud promedio (cm) de explantes. ....	46
Figura 14: Plantita en medio MMS. ....	49
Figura 15: Plantita en medio MS/2.....	49
Figura 16: Vástago en medio MMS a los 21 días con 2 hojas.....	52
Figura 17: Vástago en medio MS a los 14 días con 1 hoja.....	53
Figura 18: Vástagos en medios MMS+BAP, MS+TDZ+ANA y MS +ANA+BAP a las 8 semanas de haber sido sembrados. ....	58

## *Índice de anexos*

	Página
ANEXO 1 EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN MEDIO MS.....	69
ANEXO 2 EVALUACIÓN DE EXPLANTES EN MEDIO MMS.....	70
ANEXO 3 EVALUACIÓN DE EXPLANTES EN MEDIO MS/2.....	71

## I. INTRODUCCIÓN

El bambú es una planta perteneciente a la familia de las gramíneas con propiedades únicas, que la convierten en la actualidad, en un recurso vegetal de mucha importancia. Gracias a sus propiedades, los usos del bambú se han diversificado de modo tal, que sus aplicaciones se extienden desde el sector de la construcción hasta la industria textil. Por esa razón, es necesario y útil conocer esta planta que ofrece grandes beneficios.

Las plantas de bambú se encuentran distribuidas en todo el mundo con 75 géneros y 1250 especies. Aunque la mayoría de estos se presenta en los trópicos, se encuentran también, en zonas subtropicales y templadas (Mudoí *et al.*, 2013). En nuestro país, se pueden encontrar 8 géneros y 36 especies de bambú, distribuidas en las tres regiones: costa, sierra y selva. Dentro de estas 36 especies, existen especies exóticas y nativas, como: *Guadua angustifolia*, *Dendrocalamus asper*, *Guadua weberbaueri* y *Guadua sarcocarpa*, por mencionar algunas. Cabe resaltar que, en las regiones de Pasco y Cusco se encuentra la mayor diversidad de especies y que la mayor área cubierta de bambú se encuentra en Madre de Dios y Amazonas (Londoño, 2012).

Por la presencia que tiene el bambú en el Perú, el rango amplio de usos que tiene y el gran mercado mundial que existe, el cultivo de bambú tiene una importancia económica que puede beneficiar al país (López, 2011). Gracias a su rápido crecimiento, corto periodo de rotación, a la protección que brinda a los suelos y como captadores de CO<sub>2</sub>, el bambú tiene una gran importancia social y ambiental. Debido a las características mencionadas en varias regiones del país, el bambú es usado como material de construcción, en obras de defensa ribereña y para la elaboración de artesanías.

Actualmente, el conocimiento que se tiene de las especies de bambú nativas del Perú es limitado tanto en taxonomía, como en propagación e industrialización. Por esa razón, la mayoría de especies nativas no es aprovechada al máximo, desperdiciando el gran potencial que tienen.

*Guadua weberbaueri* y *Guadua sarcocarpa* son dos especies nativas que al igual que el resto de especies de bambú, tienen un periodo vegetativo muy largo y llegan a la floración después de 30 o 35 años. Por ese motivo, la propagación de estas especies se hace por el método de propagación vegetativa utilizando ramas, rizomas u otras partes de la planta. Sin embargo, estos métodos no son los mejores cuando se quiere hacer una propagación a gran escala. Y, para satisfacer la alta demanda que existe de este recurso en el país, se debe tener un método de propagación que permita obtener grandes cantidades de plántulas y que permita el desarrollo de plantaciones con plantas de calidad.

Actualmente en el mundo se utiliza la micropropagación como la principal biotécnica aplicada a varias especies de bambú: *Dendrocalamus strictus*, *Dendrocalamus asper* y *Bambusa glaucescens*, por citar algunas (Marulanda *et al.* 2005). Este tipo de propagación tiene ventaja sobre los demás métodos debido a la múltiple obtención de material que se consigue a partir de una yema meristemática, ya que la multiplicación es logarítmica, además se facilita el intercambio de germoplasma a nivel internacional por el tamaño de la muestra (Londoño, 2002).

En este trabajo se propone contribuir con el protocolo para la propagación *in vitro* de bambú (*Guadua weberbaueri*) mediante la obtención de explantes libres de virus o bacterias para su aplicación en un medio de multiplicación.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. ASPECTOS GENERALES DEL GÉNERO *GUADUA* KUNTH

#### 1.1. TAXONOMÍA

- Reino : Vegetal
- División : Fanerógamas
- Sub-división : Angiosperma
- Clase : Monocotiledónea
- Orden : Poales
- Familia : Poaceae (Gramineae)
- Subfamilia : Bambusoideae A.& G.
- Tribu : Bambuseae Nees
- Subtribu : Guadinae
- Género : *Guadua* Kunth
- Especie : *Guadua weberbaueri*

Taxonómicamente el género *Guadua* pertenece a la familia Poaceae, subfamilia Bambusoideae, tribu Bambuseae, subtribu Guadinae.

*Guadua* fue descrita por el botánico alemán Karl Sigmond Kunth en 1822, como un género segregado del género asiático *Bambusa*. Luego Munro en 1868 señala una serie de caracteres morfológicos y resalta la distribución geográfica tan distinta de estas dos taxas. En 1973, McClure reconoce *Guadua* como un subgénero de *Bambusa*. Sin embargo,

después de estudios morfológicos, anatómicos y moleculares realizados por Soderstrom y Londoño (1987), Soderstrom y Ellis, (1987) y Clark *et al.* (1995) la Guadua se establece claramente como un género endémico de América (Londoño s/f).

## **1.2. DISTRIBUCIÓN**

Este género reúne aproximadamente 30 especies que se distribuyen desde los 23° de latitud Norte en México hasta los 35° de latitud Sur en Argentina; crece naturalmente en todos los países de América Latina con excepción de Chile y las Islas del Caribe, sin embargo en esta región del Caribe la especie *Guadua angustifolia* ha sido introducida a islas como Puerto Rico, Cuba, Haití y Trinidad. Altitudinalmente el género Guadua se distribuye desde el nivel del mar hasta los 2000 metros pero es mucho más abundante y diversa en elevaciones por debajo de los 1500 metros sobre el nivel del mar; crece en diversos tipos de hábitats incluyendo la selva húmeda tropical, el bosque montano bajo, las sabanas, los cerrados, los bosques de galería y los valles interandinos, sin embargo se puede considerar un género amazónico con el 45% de sus especies habitando la cuenca Amazónica y la Orinoquía (Añazco,2013). Las especies *Guadua weberbaueri* y *Guadua sarcocarpa* son las que más abundan en estas áreas (Villegas, s/f).

Las especies de este género se pueden distinguir de los demás bambúes principalmente por los culmos gruesos, largos y espinosos, por las bandas de pelos blancos en la región del nudo y por las hojas caulinares de forma triangular. Sin embargo, su carácter más fuerte es la presencia de quillas aladas en la palea del flósculo de la espiguilla, la presencia de tres estigmas plumosos al final del estilo, seis estambres, de estomas en ambas superficies de la lámina del follaje y de un número cromosómico  $2n=46$  (Villegas, s/f).

## **1.3. FACTORES CLIMÁTICOS**

### **1.3.1. PRECIPITACIÓN**

La precipitación es el factor climático que más afecta el desarrollo y crecimiento de la Guadua, es así, como en sitios secos o muy húmedos, se encontraron los guaduales con las características de desarrollo más deficientes. Dependiendo de la latitud, el bambú crece bien en zonas cuyas precipitaciones alcanzan rangos hasta los 4,050 mm/año. Se encuentran en bosques desarrollándose en rangos comprendidos entre los 1270 mm/año y los 5000 mm/año; pero los desarrollos óptimos de los rodales se presentan cuando el rango de precipitación se ubica entre los 1,500 mm/año y los 2,500 mm/año (Fernández, 2012).

La distribución de las lluvias también influye, a su vez, en el comportamiento de la especie. Los sitios con épocas secas prolongadas (superiores a tres meses) son los que más limitan su desarrollo (Castaño y Moreno, 2004).

### **1.3.2. TEMPERATURA**

La temperatura es un factor importante para el crecimiento del bambú. Generalmente, altas temperaturas promueven el crecimiento y bajas temperaturas lo inhiben. La mayoría de bambús crecen en rangos de temperatura entre 9°C y 36°C. Las especies del género *Guadua* crecen bien en temperaturas que van de 20°C a 26°C y con una humedad relativa de 80% (Hidalgo, 2003).

## **1.4. FACTORES EDÁFICOS**

### **1.4.1. SUELO**

Los suelos preferentes por la *Guadua* comprenden los suelos aluviales, de ceniza volcánica e ígneos. Por lo general son suelos francos, de buena fertilidad y buen drenaje, ubicados en valles interandinos y en zonas onduladas de montaña (Castaño y Moreno, 2004).

Suelos sueltos y fértiles con alto contenido de materia orgánica, buena retención de agua y buena permeabilidad facilitan el crecimiento del rizoma (Banik, 2015).

### **1.4.2. PH DEL SUELO**

Los emplazamientos de bosques de *Guadua* se presentan en suelos con pH entre 5.5 y 6.0, presentándose el mayor desarrollo en suelos con pH promedio a 5.8, tendientes moderadamente al ácido. El grado de adaptabilidad a condiciones de pH inferiores a 5.5 afecta notablemente. Un pH salino no favorece el desarrollo de la planta (Fernández, 2012).

### **1.4.3. PROFUNDIDAD EFECTIVA**

Es la altura, medida en centímetros, desde la superficie del suelo hasta donde las raíces se pueden desarrollar libremente. Aunque la *Guadua* no tiene raíces profundas sino superficiales, es conveniente que esta profundidad efectiva sea mayor a un metro (Castaño y Moreno 2004).

### **1.4.4. TOPOGRAFÍA**

La topografía tiene una gran influencia en el crecimiento del bambú, es decir en la calidad de caña que se cosechará. Cañas cosechadas de plantas sembradas en las laderas de las montañas presentaron mejores propiedades físico-mecánicas que aquellas sembradas en los

valles (Hidalgo, 2003). Por otro lado, Castaño y Moreno (2004) mencionan que los suelos de relieve plano (valles interandinos) o los de pendientes suaves (0-5%) y onduladas (5-25%) son más apropiados para el desarrollo de bambú que los suelos quebrados y escarpados.

## **1.5. PROPAGACIÓN**

Existen dos formas de propagación de la guadua: 1) la reproducción sexual o por semilla, que no es un método fácil ni práctico, pues la floración de la guadua es esporádica y la poca semilla que se obtiene es vana y de bajo vigor; y 2) la propagación asexual o vegetativa, la cual, consiste en la propagación a partir de partes vegetativas de la planta, como ramas, yemas, tallos y rizomas (Castaño y Moreno 2004).

### **1.5.1. PROPAGACIÓN SEXUAL**

La propagación por semilla es ideal para obtener plantas a gran escala. Bambúes obtenidos a partir de semillas generan culmos por mayor tiempo, por tener una máxima duración del estadio vegetativo. Además mediante esta propagación se mantiene la variabilidad genética (Banik, 2015).

Según Ahlawat *et al.* (2002), una gran cantidad de semillas es producida durante la floración gregaria, pero las semillas sólo se mantienen viables de uno a seis meses.

Sin embargo, como mencionan Castaño (2004), López (2011), Hidalgo (2003) este tipo de propagación no es recomendable debido a que la mayor parte de semillas son infértiles; y por otro lado la floración del bambú es esporádica y puede tardar en este género hasta 30 a 35 años.

### **1.5.2. PROPAGACION ASEXUAL**

#### **a. Por secciones de tallo**

Esta técnica de propagación se realiza a partir de culmos moderadamente maduros, de 8 cm de diámetro, de los que se cortan secciones con dos o más nudos y que se siembran en forma horizontal o vertical. Con este método se obtiene entre el 50% y 80% de prendimiento (Castaño, 2004).

#### **b. Por chusquines**

El chusquín brota del rizoma y está compuesto por tallo, hojas, ramas y raíz. Cada uno de estos retoños puede producir entre siete y diez nuevas plantas en cuatro meses (Castaño y

Moreno, 2004). La extracción de los hijuelos se realizará durante el invierno, periodo en donde las plantas se encuentran en reposo vegetativo (López, 2011).

**c. Por rizoma**

Es uno de los mejores métodos de propagación para bambús con rizoma paquimorfo. En este caso, se utilizan plantas de 3 años de edad. Se extrae parte del rizoma de la planta madre con raíces y una sección de culmo de por lo menos 30 cm. Luego pueden ser sembrados en bancos de propagación o en el sitio definitivo (Hidalgo, 2003).

**d. Por segmentos de ramas**

Se utilizan ramas con 3 nudos colectadas de plantas de 2 a 3 años de edad. Se debe tener cuidado de no dañar las yemas en dormancia. Los segmentos de ramas deben ser tratados con auxinas para lograr el enraizamiento (Hidalgo, 2003). Las ramas gruesas y robustas que presentan raíces aéreas son ideales para este tipo de propagación (Banik, 2015).

**e. Micropropagación**

Consiste en la propagación masiva de bambú utilizando técnicas de cultivo de tejidos. Se utilizan partes pequeñas de la planta como yemas, segmentos nodales, meristemas, etc. (López, 2011).

## **1.6. USOS**

Donde dominan el componente de flora los bambúes cumplen un rol importante en el desarrollo de las sociedades humanas, económico, ecológico y espiritualmente. Se utilizan en construcción, como materia prima para papel, mueblería, arte y manualidades, medicina tradicional, sistemas de creencia popular y ceremonias. Para conservar cuencas y suelos, y como producto comestible para humanos y animales domésticos (Reátegui, 2009).

Los culmos de especies de *Guadua weberbaueri* se utilizan para confeccionar flechas y flautas (Judziewicz *et al.*, 1999).

En el Perú los internudos de *Guadua weberbaueri* son utilizados por los Piro y Machiguengas en la confección de instrumentos musicales, objetos ceremoniales, redes para cazar guacamayos, para almacenar comida, flechas, tamiz para cernir la harina de yuca, y para hacer tintes (Judziewichs *et al.*, 1999).

Muchas otras especies de *Guadua* son utilizadas o tienen potencial como elementos de construcción a menor escala, algunas especies son: *G. amplexifolia*, *G. chacoensis*, *G. macrostachya*, *G. sarcocarpa*, *G. superba*, *G. trinii* y *G. velutina* (Judziewicz *et al.*, 1999).

Otras especies de bambúes leñosos, como *Guadua paniculata*, *Guadua tagoara*, *Guadua weberbaueri*, se caracterizan por tener culmos más pequeños, esbeltos y con paredes delgadas. Estos tienen potencial en construcción como vigas para techos (Reátegui, 2009).

De acuerdo con las propiedades físico-mecánicas de *Guadua weberbaueri*, es una especie que puede ser utilizada como material para construcción civil, pudiendo sustituir maderas e incluso el acero (De Lima, 2006).

## **2. ESPECIES NATIVAS DEL GÉNERO GUADUA KUNTH**

El Perú puede ser uno de los países más ricos en los Andes en diversidad de especies de bambú, pero se debe hacer más trabajo de campo e investigación en taxonomía de estas especies. Actualmente el Perú tiene 8 géneros y 36 especies, con la mayor diversidad de bambú en las regiones Cusco y Pasco y con la mayor área de bambú en Madre de Dios y Amazonas.

Las especies nativas de este género son las siguientes: *Guadua glomerata* Munro, *Guadua sarcocarpa ssp. purpuracea* X. Londoño & Peterson, *Guadua sarcocarpa ssp. Sarcocarpa* X. Londoño & Peterson, *Guadua superba* Huber, *Guadua weberbaueri* Pilger.

*Guadua weberbaueri* y *Guadua sarcocarpa* están distribuidas en la región Amazónica del Perú (regiones de Amazonas, Cusco, Huánuco, Junín, Loreto, Madre de Dios, Pasco y San Martín), cubriendo más de 500 000 ha en una elevación de 100 a 1500 m en sitios donde existen bosques maduros y secundarios en suelos aluviales (OIMT, 1995).

### **2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *GUADUA WEBERBAUERI* Y *GUADUA SARCOCARPA***

A continuación se describen dos especies nativas del género *Guadua* que son muy parecidas morfológicamente y que presentan dificultades en la identificación. Según Olivier y Poncy (2009) las especies *Guadua weberbaueri* y *Guadua sarcocarpa subsp purpuracea* podrían ser el mismo individuo.

### **2.1.1. *GUADUA WEBERBAUERI***

Bambú leñoso. Rizomas paquimorfos con cuellos de más de un metro de largo, posición de las raíces es aleatoria, 2 o más culmos por mata (Reátegui, 2009).

Culmos 2.5 metros de altura, 5-7 cm de diámetro, erecto y arqueado en la punta. Intemudo 40 cm, verde, hueco, lleno de líquido, sulcado en sección transversal, 0.5 cm de pared. Nudos solitarios, línea nodal deprimida, la línea nodal superior bien marcada, horizontal, superficie pubescente blanca bajo la línea nodal y el ensanchamiento del nudo. Región nodal ensanchada. Hoja caulinar decidua, solitaria, triangular, amarillenta, de superficie pubescente en el haz, pelos de 1 mm blancos, textura dura, envés lustroso, glabro. Vaina 22-34 \* 16-20 cm, coriácea. Lámina caulinar 6-10 \* 5-9 cm, erecta, se mantiene unida a la vaina. Lígula triangular, irregular, presenta aurículas fimbriadas. La ramificación solo en los nudos superiores. Ramificación intravaginal, en ángulo hacia arriba. Una rama dominante con más ramas desde el nudo, su origen es en la línea nodal, esta rama elevada en un promontorio, presenta de 1 a 2 espinas pequeñas 0.8-1 mm en los nudos. Ortiz (2017) menciona que pueden encontrarse hasta 3 espinas. Lámina foliar de dos tamaños: 12\* 1 cm y 15-20\* 1.3 cm, lanceoladas. Las láminas presentan el envés pubescente, nervadura central de diferente color cerca al pseudo peciolo, este es fimbriado, el hábito es reflexo de color verde oscuro en el haz y verde claro en el envés. No presenta inflorescencia ni frutos (Reátegui, 2009).

### **2.1.2. *GUADUA SARCOCARPA***

*Guadua sarcocarpa* es la primera especie del género *Guadua* con fruto carnoso y además es el primer bambú que se informa como comestible. Presenta dos subespecies *Guadua sarcocarpa subsp. sarcocarpa* y *G. sarcocarpa subsp. Purpuracea*, ambas difieren en el color y en la longitud de las pseudoespiquillas (Londoño y Peterson 1991).

Bambú leñoso, con espinas en los nudos. Cañas de 10-20 m de altura, 8-10 cm de diámetro, erguidas hacia la base y arqueadas hacia el ápice; ramas intravaginales, solitarias y con la edad desarrollan de tres-cinco ramas secundarias. Hojas de las ramas de siete a nueve por complemento; pseudopeciolo de 5-8 mm de largo, glabro; láminas foliares de 13-24 cm de largo por 1,8-3,5 cm de ancho, aovado-lanceoladas. Inflorescencia en la parte terminal de ramas sin hojas; pseudoespiquilla de 1-7 cm de largo, lanceolada, multifloras; lema de 2,3 cm de largo, aovado-lanceolada; palea de 2-2,5 cm de largo; estambres seis; ovario de 7-8 mm de largo por 1 mm de diámetro, fusiforme; fruto cariósida carnoso, de 1,5-5 cm de

largo por 0,6-2 cm de diámetro, oblongo, con endospermo líquido o gelatinoso (Tovar, 1993).

### **3. ASPECTOS GENERALES DEL CULTIVO *IN VITRO***

#### **3.1. DEFINICIÓN**

El cultivo de tejidos *in vitro*, es un grupo heterogéneo de técnicas, mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, células, tejidos, embriones, etc.) con potencialidad de diferenciación puede ser cultivado bajo condiciones asépticas, en presencia de un medio de cultivo constituido por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, hormonas que se incuban en condiciones controladas. Esta técnica de cultivo aséptico se basa fundamentalmente en el principio de totipotencialidad, que establece que cualquier célula somática joven o en proceso de diferenciación tiene una alta capacidad o potencialidad para regenerar una planta completa si se le coloca en condiciones adecuadas (Luna, 2002).

#### **3.2. MICROPROPAGACIÓN**

La micropropagación es un procedimiento que consiste en el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células o protoplastos en un medio de cultivo artificial para lograr el desarrollo y producción de plantas completas *in vitro*. Es también una de las aplicaciones del cultivo de tejidos donde ha habido más avances y es aplicada comercialmente a un mayor número de especies (Barba, Luna y Romero, 2001).

En la actualidad el cultivo *in vitro* se utiliza cada vez más para la propagación de especies amenazadas, con el fin de aumentar rápidamente el número de individuos, superar problemas de fertilidad y de biología reproductiva, así como proporcionar material para su reintroducción en la naturaleza y contribuir a la conservación de la diversidad a mediano y largo plazo (Pedroza, 2008).

Además, la propagación de plantas leñosas a través del cultivo de tejidos ha sido lograda en varias especies de frutales y forestales cultivadas con el fin de multiplicar genotipos de interés (Pedroza, 2008).

### **3.2.1. FASES DE LA MICROPROPAGACIÓN**

Fases de la micropropagación según Castillo (2004):

- Fase 0: preparación de la planta madre

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

- Fase 1: desinfección del material vegetal

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia. A efectos de obtener las condiciones de asepsia, se trabajará en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos explantes se introducirán en un tubo de cultivo conteniendo medio de iniciación para poder controlar la sanidad y la viabilidad, luego de realizar la desinfección del material con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial), puro o diluido durante un período de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada.

- Fase 2: introducción del material in vitro

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo in vitro.

- Fase 3: multiplicación de los brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la FASE 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.

- Fase 4: elección de un medio de enraizamiento de los explantes

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

- Fase 5: aclimatación de los explantes enraizados

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes o plantines enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la

humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta.

### **3.2.2. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN**

A continuación se mencionan ventajas y desventajas de la micropropagación según Barba, Luna y Romero, 2001:

Ventajas:

- Producción de un gran número de plantas a partir de un inóculo.
- La obtención de plantas puede ser en cualquier época del año.
- Las plantas pueden almacenarse *in vitro* ocupando poco espacio.
- Permite la obtención de clones de plantas donadoras de alta calidad.
- En la mayoría de los casos la producción comercial de las especies resulta redituable.

Desventajas:

- No todas las especies responden igual al cultivo *in vitro*.
- Cada especie requiere de métodos particulares de cultivo.
- La fase de investigación es costosa.

### **3.3. MEDIOS DE CULTIVO**

La adecuada selección de los medios de cultivo es fundamental para el éxito en el cultivo de los tejidos vegetales. El medio básico utilizado no puede suplir el desarrollo de todas las células; es necesario realizar cambios para obtener las respuestas requeridas en el crecimiento de un explante. Generalmente, los medios de cultivo contienen sales inorgánicas, reguladores de crecimiento vegetal, vitaminas, carbohidratos y un agente gelificante, aunque no siempre este último es indispensable (Perea y Tirado, 2011).

Uno de los medios de cultivo más usados en la actualidad es el medio de cultivo que fue propuesto por Murashige & Skoog (1962). Este medio se recomendó para ensayos de médula de tabaco con el fin de obtener una alta tasa de crecimiento y un aumento en la respuesta a los factores orgánicos de crecimiento con un mínimo de interferencia con otros nutrimentos orgánicos e inorgánicos. Los extractos foliares del tabaco producían un aumento en el crecimiento de tejido medular aislado o en cultivos de callo de *Nicotiana tabacum* var. Havana Wisconsin 38; esto se debía, en parte a constituyentes inorgánicos del extracto, especialmente el N y el K. Este medio se considera como alto en sales y puede esperarse que sustente el crecimiento de ciertos cultivos que requieren concentraciones más altas de iones (Roca y Mogrinski, 1991).

### **3.3.1. COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO**

#### **a. Elementos minerales**

El medio de cultivo requiere una combinación de macro y micro nutrientes para el correcto desarrollo de la planta. Esta combinación de nutrientes va a variar dependiendo de la especie a propagar (Caula A. 2011).

Los macronutrientes son requerido en cantidades milimolares (mMol) en la mayoría de medios. El nitrógeno (N) es usualmente añadido en forma de iones amonio y nitrato aunque también se utilizan formas orgánicas como aminoácidos (Caula A. 2011). Las necesidades totales de N, varían entre 12-60 mmol l<sup>-1</sup>, de los cuales al amonio le corresponden 6-20 y al nitrato 6-40 mmol l<sup>-1</sup>. La mayor parte de las plantas prefieren el nitrato al amonio, aunque en algunos casos puede ocurrir lo contrario. Es necesario encontrar la mejor proporción nitrato/amonio para conseguir un crecimiento y desarrollo óptimos in vitro (Pierik, 1990).

El nitrógeno es necesario para que la planta fabrique proteínas, una planta con hojas amarillas indica deficiencia de este nutriente. El fósforo, es un elemento crítico en la estructura de la planta, da energía y es parte del ADN. La falta de este elemento genera que la planta tenga un color morado. El potasio está involucrado en las enzimas. El magnesio es parte de la clorofila.

El calcio, está involucrado en un gran número de procesos y ayuda a la planta a mantenerse verde y florecer. El azufre, también es necesario para la elaboración de proteínas como el Nitrógeno y también está involucrado en la generación de energía (Dorris, 2010).

Además del nitrógeno, potasio, fósforo, magnesio, calcio, fósforo, azufre son añadidos al medio como diferentes compuestos químicos conocidos como macrosales. Algunos de ellos son:  $MgSO_4 \cdot H_2O$  que provee magnesio y azufre;  $NH_4 H_2PO_4$ ,  $KH_2PO_4$  proveen fósforo;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  o  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  provee calcio y  $KCl$ ,  $KNO_3$  o  $K_2HPO_4$  proveen potasio (Caula, 2011).

Los micronutrientes son requeridos por la planta en menor cantidad, los elementos que forman parte de este grupo son: hierro, manganeso, zinc, cobalto, cobre y molibdeno. Estos elementos intervienen en procesos químicos de la planta por ello es necesario que estén presentes en el medio de cultivo en las cantidades necesarias, debido a que si son añadidos en grandes cantidades pueden causar daño a la planta (Dorris, 2010). En el caso del hierro se debe añadir conjuntamente con un agente quelante ( $Na_2EDTA$ ) que permite que este elemento esté disponible en un amplio rango de pH. (Márgara, 1988).

## **b. Componentes orgánicos**

### **b.1. Carbohidratos**

Son compuestos orgánicos como el azúcar y la celulosa. (Mejía, 1994) Los carbohidratos no son dados a la planta porque generalmente ellas mismas los generan. Sin embargo, plantas en laboratorio son o muy pequeñas o están incompletas para sintetizar todos los compuestos orgánicos que necesitan (Kyte, 1987).

Sacarosa o glucosa son comúnmente usadas en la preparación de medios de cultivo, de 2-5% (p/v). Otras fuentes de carbohidratos como fructosa o almidón, también pueden ser utilizadas (Smith, 2013).

### **b.2. Vitaminas**

Para alcanzar el mejor crecimiento de tejidos es comúnmente esencial suplementar el medio con uno o más vitaminas y aminoácidos. De estos, la tiamina (vitamina B1), generalmente es el ingrediente esencial. Otras vitaminas, especialmente piridoxina (vitamina B6), ácido nicotínico (vitamina B3) y pantetonato de calcio (vitamina B5) y myo-inositol, son también conocidos como mejoradores del desarrollo de plántulas in vitro (Mejía, 1994).

Myo-inositol es un interesante hexitol involucrado en la biosíntesis de cyclitol, almacenamiento de compuestos polihídricos como reservas, germinación de semillas,

transporte de azúcares, nutrición mineral, metabolismo de carbohidratos, estructura de la membrana celular, en la formación de la pared celular, en la homeostasis hormonal y en el estrés fisiológico (Loewus y Loewus, 1993 citado por Smith, 2013).

### **c. Reguladores de crecimiento**

En algunos casos se obtienen en cultivos de tejidos *in vitro* las respuestas deseadas mediante el empleo de un medio básico sin reguladores de crecimiento. Sin embargo, en la mayoría de los casos se hace necesario agregar al medio sustancias reguladoras de crecimiento, generalmente auxinas y citoquininas (Roca y Mogrinski, 1991).

Las hormonas son, por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en lugar diferente del que han sido producidos y son activas en muy pequeñas cantidades. Aparte de estos productos naturales, se han desarrollado también otros de tipo sintético, que pueden tener una actividad semejante a la de los primeros. Al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas, se denominan reguladores de crecimiento y son los responsables, en primer lugar, de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza (Luna, 2002).

En el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, los reguladores, especialmente auxinas y citoquininas, juegan un papel importante. Estos compuestos controlan y modulan la iniciación y desarrollo de brotes y raíces en explantes y embriones en medios de cultivo semisólidos o líquidos. También estimulan la división y expansión celular (Caula, 2011).

Según Dodds y Roberts (1995), los reguladores de crecimiento más requeridos por la mayoría de cultivos son las auxinas y citoquininas. Los efectos relativos de las auxinas y citoquininas en la morfogénesis de tejidos cultivados fueron demostrados por Skoog & Miller en 1957 y hasta ahora sirven como base para la manipulación de cultivos de tejidos vegetales (Caula, 2011).

Las auxinas promueven la elongación celular, mientras que las citoquininas promueven la división celular y la aparición de brotes (Kyte, 1987).

#### **c.1. Auxinas**

En la naturaleza las hormonas de este grupo están identificadas por ocasionar elongación de tallo e internudos, tropismo y dominancia apical, abscisión y enraizamiento, etc. (Mejía, 1994)

Las auxinas son requeridas por la mayoría de las células vegetales para la división celular y el enraizamiento. Sin embargo, en altas concentraciones, las auxinas pueden suprimir la morfogénesis. La auxina 2,4-D es usada para la inducción de callos, mientras que IAA, IBA y NAA son usadas para el enraizamiento (Smith, 2013).

El modo de acción de las auxinas en la promoción del crecimiento está dado por la inducción y liberación de los iones hidrógeno a través de la pared celular, con la consiguiente alteración en la composición lipídica y acidificación de la pared celular, incrementando su extensibilidad. Los iones potasio se incorporan a la célula para contrarrestar la liberación de iones hidrógeno o por una disminución del potencial de agua en la célula, favoreciendo su ingreso y expansión. Su acción en la morfogénesis consiste en la liberación genética del programa fisiológico del tejido, las células responden a las auxinas revirtiendo a un estado de dediferenciación para iniciar su posterior división (Luna, 2002).

### **c.2. Citoquininas**

Las citoquininas promueven la división celular, ayudan a la germinación, afectan la abscisión de hojas, influyen en el transporte de auxina, permitiendo a las giberelinas trabajar superando la presencia de inhibidores, y retrasan la senescencia, por ejemplo estos reguladores posponen la descomposición de la clorofila, proteínas (Kyte, 1987).

Las citoquininas más usadas comúnmente son zeatina, dihidrozeatina, kinetina, benzyladenina, tidiazurón e isopentil adenina 2iP. En altas concentraciones (1-10uM) este grupo de hormonas induce la aparición de brotes adventicios pero inhibe el enraizamiento (Caula, 2011).

Para preparar stock de citoquininas se debe usar HCl 1N y unas cuantas de gotas para disolver los cristales (Smith, 2013).

### **d. Agente gelificante**

La mayoría de experimentos en cultivo de tejidos utilizan como soporte un agente gelificante (Smith, 2013). Básicamente el agar mantiene a las plantas a flote en el medio. El agar es un polisacárido de alto peso molecular derivado de las algas (Caula, 2011) y en el proceso puede absorber gran cantidad de sal lo cual no es bueno para la planta. Este compuesto hace que el medio de cultivo sea medio amarillo y turbio. (Dorris, 2010) Es añadido al medio de cultivo en concentraciones que van de 0,5 a 1,0 % (p/v) (Caula, 2011).

Varios sustitutos del agar han sido desarrollados. Uno de ellos, Gelrite, es derivado de la bacteria *Pseudomona sp.*) y se puede adquirir en el mercado. Al igual que el agar es un polisacárido refinado. Mantiene el medio claro y no se han observado efectos adversos en el medio de cultivo (Kyte, 1987).

### **3.4. CULTIVO DE SEGMENTOS NODALES**

Con este nombre se conoce el aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, para obtener un vástago a partir de la yema. Este es el método más natural de propagación vegetativa de las plantas *in vitro*, ya que también puede aplicarse *in vivo*. Dada una de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas, idénticas a la del ápice del tallo, pueden ser aisladas sobre un medio nutritivo, intentándose así su desarrollo *in vitro*, realizándose los repicados cuando son necesarios. Cuando se obtiene un número suficientemente grande de vástagos, éstos son enraizados y finalmente se realiza la transferencia al suelo (Pierik, 1988).

### **3.5. FACTORES QUE AFECTAN LA MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS**

#### **3.5.1. EL EXPLANTE**

La edad del explante a utilizar puede ser muy importante, debido a que tejidos jóvenes responden mejor *in vitro*. En muchos casos, tejidos viejos no forman callos que sean capaces de regeneración. Además el tejido joven, como ha sido recién formado generalmente reacciona mejor a los desinfectantes (Smith, 2013). También se ha encontrado, por ejemplo, que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas (Styer *et al.*, 1983).

Existen otros factores que pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados, como la época del año en que se realizan los cultivos, explantes obtenidos de invernadero o campo, los pretratamientos a los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos (Roca y Mroginski, 1991).

Pierik (1991), menciona que la posición del explante en la planta madre influye sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* después del aislamiento. Por ejemplo, cuanto más alto es el vástago aislado de un árbol menor es la probabilidad de que se formen raíces adventicias, ya que las proporciones más altas son más adultas que las más bajas.

Smith (2013), señala que dependiendo de la posición del explante en la planta, el contenido de hormonas en el explante variará.

El tamaño del explante también tiene un efecto en la respuesta del tejido. Generalmente, mientras más pequeño el explante, más difícil es de cultivar. Se deben añadir componentes adicionales al medio de cultivo para que el explante pueda desarrollar. Explantes grandes probablemente contengan mayores reservas de nutrientes y reguladores de crecimiento para mantener el cultivo (Smith, 2013).

El efecto de la estación también ha sido observado en varias especies cultivadas *in vitro* (Trigiano, 2011). La época en que se extraiga el explante puede tener efectos en la contaminación y respuesta del mismo. Por ejemplo, yemas o brotes tomadas durante la primavera, cuando estos están en época de crecimiento responden mejor *in vitro* que las yemas en dormancia. Además, las tasas de contaminación aumentan conforme el verano avanza; en otoño e invierno la contaminación de explantes puede alcanzar el 100% (Smith, 2013).

### **3.5.2. EL GENOTIPO**

El crecimiento del cultivo de tejidos u órganos y la morfogénesis *in vitro* están probablemente más influenciados por el genotipo que por cualquier otro factor. El medio de cultivo y el ambiente necesitan ser variados dependiendo del género o especie incluso, para variedades estrechamente relacionadas, los requerimientos del medio de cultivo pueden ser diferentes. Algunos cambios en la composición de los medios de cultivo, especialmente en lo que se refiere a los reguladores de crecimiento, pueden ser suficientes para mejorar la respuesta del genotipo (Luna 2002).

### **3.5.3. FACTORES FÍSICOS**

Los principales factores físicos que influyen durante la incubación del cultivo son: la luz, la temperatura y la concentración de gases como O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y el etileno (Calderón, *et al.* 1995 citado por Luna, 2002).

Los factores luz y temperatura han sido los más estudiados. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28°C (Roca y Mogrinski, 1991).

Para acelerar el crecimiento y morfogénesis *in vitro*, los cultivos son mantenidos generalmente a temperaturas medias las cuales son más altas que las temperaturas que experimentarían las mismas plantas si crecieran *in vivo*. Plantas tropicales y subtropicales como el algodón, arroz, tienden a ser cultivadas *in vitro* a temperaturas ligeramente mayores

que las especies de regiones templadas (temperatura media 27,7°C, rango 24°C-32°C) (George *et al.*, 2008).

No existe una temperatura definida para el cultivo de tejidos de ninguna especie y las temperaturas generalmente variarán en los estudios de acuerdo al tipo de experimento a realizar y el tipo de órgano o tejido que se cultivará (George *et al.*, 2008).

El fotoperiodo, la longitud de onda y la intensidad lumínica deben ser tomados en cuenta cuando se realiza el cultivo de tejidos; además de alguna forma parece que existe un reflejo de los requisitos de temperatura de las plantas crecidas en condiciones de campo (Montoya, 1991)

Debido a factores económicos la intensidad de luz en la mayoría de salas de incubación se mantiene en 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (aproximadamente 5000 lux). Este nivel es claramente mucho más bajo que el de la luz del día. Por ello se les añade fuentes de carbohidratos a los medios de cultivo. (Lees, 1991)

A pesar que un pequeño flujo de gas dentro y fuera del cultivo será causado por fluctuaciones en la temperatura y en la presión atmosférica de la sala de incubación, el mayor intercambio de oxígeno se da por difusión. (George *et al.*, 2008)

El oxígeno disponible será influenciado por: la concentración del gas en la atmósfera del ambiente, la tasa de difusión dentro del recipiente de la planta y la tasa de difusión dentro de las células cultivadas o tejidos (George *et al.*, 2008).

#### **3.5.4. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO**

La formación de brotes de algunas especies se logra solamente en agua. En otras plantas el medio sólido necesita contener una adecuada concentración de sales minerales y sucrosa. Así mismo, el tipo de cultivo está influenciado por la naturaleza física del medio. Sin embargo, la morfogénesis depende del medio empleado y es esencial un balance correcto entre las sales inorgánicas, orgánicas y reguladores de crecimiento. (Luna, 2002)

#### **3.5.5. ASEPSIA**

Una vez seleccionado el mejor explante se requiere desinfectarlo superficialmente; la razón: en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacteria y hongos, que competirán ventajosamente con el explante. Para esta desinfección se han empleado diferentes compuestos siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y de

calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, el alcohol a diferentes porcentajes, y otros (Roca y Mogrinski, 1991).

Los explantes deben estar libres de contaminantes cuando van a ser sembrados en el medio de cultivo. Para lograr eso, generalmente se tiene a las plantas donadoras de explante en condiciones que minimizan la contaminación bacteriana y por hongos. Los contaminantes pueden estar confinados en las superficies de la planta, sin embargo, algunos microbios y virus pueden encontrarse dentro de los tejidos (Cassells, 1997, citado por George, 2008).

También deben esterilizarse las herramientas usadas para la disección, como pinzas, bisturí, platos, etc. Y los recipientes en donde los explantes desarrollarán y crecerán. (George, 2008)

### **3.5.6. AGAR**

El tipo de agar usado para preparar el medio de cultivo puede afectar la respuesta de los experimentos. Si el agar no está bien lavado o puro, generalmente presentará impurezas que perjudiquen el medio de cultivo. Como el agar es un producto derivado de las algas, puede tener actividad fisiológica en contacto con el tejido vegetal. (Smith, 2013). Ácidos orgánicos, componentes fenólicos y ácidos grasos de cadena larga son algunos contaminantes que pueden estar presentes en el agar (Caula, 2011).

La consistencia del agar puede también influenciar el crecimiento de la planta, si está muy duro, el crecimiento de la planta será reducido. Si está muy suave, las plantas sufrirán de hiperhidricidad (Caula, 2011).

### **3.5.7. PH**

El pH del medio de cultivo se ajusta generalmente entre 5,5 y 6. Debajo de 5,5 el agar no solidificará correctamente y sobre 6, el gel estará muy firme (Smith 2013).

El pH del medio va a influenciar en que las sales del medio de cultivo se mantengan en forma soluble, en la toma de nutrientes, reguladores de crecimiento y el efecto gelificante del agar (George, 2008).

## **4. ESPECIES DE BAMBÚ TRABAJADAS EN CULTIVO *IN VITRO***

Hasta ahora 20 géneros y 73 especies de bambú han sido investigadas bajo el cultivo *in vitro*. Casi todas las especies listadas por INBAR como prioridad han sido investigadas. Para el bambú, el primer estudio en cultivo de tejidos fue conducido por Alexander y Rao en

1968, quienes germinaron embriones in vitro. La investigación ha incrementado desde los años 80 luego del trabajo de Mehta y colaboradores en 1982 quienes realizaron investigación en la producción de plántulas de *Bambusa arundinacea* a través de embriogénesis somática. (Zamora, 1994)

Una extensa investigación en micropropagación de especies de bambú ha sido realizada a través del uso de tejidos vegetales jóvenes y de tejidos maduros. Algunas de las especies que se micropropagaron a partir de tejidos jóvenes han sido: *Bambusa arundinacea*, *Bambusa nutans*, *Bambusa vulgaris*, *Bambusa tulda*, *Dendrocalamus* sp, *Dendrocalamus asper*, *Dendrocalamus giganteus*, *Dendrocalamus stricutus*, *Gigantochloa levis*. Las especies en las que se usaron tejidos maduros han sido: *Bambusa arundinacea*, *Bambusa balcooa*, *Bambusa edulis*, *Bambusa nutans*, *Bambusa vulgaris*, *Dendrocalamus asper*, *Dendrocalamus giganteus*, *Dendrocalamus hamiltonii*, *Guadua angustifolia* (Londoño, 2012).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

El estudio se llevó a cabo en los ambientes del laboratorio de cultivo de tejidos del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

#### **2. MATERIALES**

##### **2.1. MATERIAL VEGETAL**

El material vegetal utilizado (segmento nodal) fue colectado de ramas primarias de plantas de *Guadua weberbaueri* provenientes de Satipo, región Junín; las cuales se obtuvieron mediante propagación por rizoma con segmentos de culmo. El número de plantas madre fue de 60.

De acuerdo a las características morfológicas de la planta se determinó como *Guadua weberbaueri*. Sin embargo, como esta especie comparte gran cantidad de caracteres morfológicos con la especie *Guadua sarcocarpa*, se realizó un estudio a nivel molecular con hojas de las mismas plantas de bambú que se utilizaron para la propagación de las plantas donadoras de explantes (plantas madre). Este estudio se elaboró en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Programa de Cereales de la UNALM. De acuerdo al resultado de este análisis, la especie que se ha trabajado es *Guadua weberbaueri* Pilger (Quispe, 2017).

Las plantas madre se mantuvieron en un invernadero de policarbonato. Se les aplicó un fungicida de amplio espectro (Benlate) a 2 mg/L y Phyton 2 ml/L a nivel foliar. La frecuencia de aplicación fue interdiaria. Esto se hizo con el fin de disminuir la contaminación de los explantes.



**Figura 1:** *Guadua weberbaueri* en invernadero

*FUENTE: Elaboración propia*

## **2.2. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO**

### **2.2.1. MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO**

- Baguetas
- Botellas de vidrio de 1 L.
- Encendedor
- Jeringa de 1 mL.
- Jarra con medida
- Mechero
- Pipeta de 5 mL.
- Placas Petri
- Probeta de 25, 50 y 1000 mL.
- Frascos de vidrio
- Plástico film

### **2.2.2. EQUIPOS E INSTRUMENTOS**

- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Cámara fotográfica
- Termo-higrómetro
- Timer (Regulador de fotoperiodo)
- pH-metro

### **2.2.3. OTROS MATERIALES**

- Agua destilada
- Alcohol 96°
- Benlate
- Detergente Comercial
- Fluorescentes
- Guantes quirúrgicos
- Hipoclorito de sodio al 2, 4 y 8%
- Hojas Bond
- Guardapolvos
- Mascarillas
- Papel toalla
- Papel Aluminio
- Pinza recta

- Pinza Curva
- Platos metálicos
- Phytton
- Tijera de podar

#### **2.2.4. COMPUESTOS QUÍMICOS**

- Medio de cultivo de Murashige & Skoog (MS) 1962.
- Medio de cultivo Murashige & Skoog Modificado (Mathur *et al.* 1995)
- Citoquinina
- Auxina
- Tiamina HCL
- Piridoxina
- Ácido Nicotínico
- Glicina
- Myo inositol
- Azúcar
- Agar
- Plant Preservative Mixture (PPM)

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. SELECCIÓN DE EXPLANTES

Se seleccionaron segmentos nodales con una yema, de la parte media de ramas primarias de *Guadua weberbaueri* con las mejores características fenotípicas (hojas más verdes y sanas, altura de 60 cm, vigorosas) como lo proponen Corrales (2017) y Marulanda *et al.* (2005). Se cortaron los explantes con tijera de podar esterilizada con alcohol al 96%. Los explantes fueron llevados al laboratorio en un frasco previamente esterilizado.



**Figura 2:** Segmento nodal sin hoja caulinar de rama primaria de *Guadua weberbaueri*.

*FUENTE:* elaboración propia

#### 3.2. DESINFECCIÓN DE EXPLANTES

Los tratamientos utilizados para la desinfección de los explantes de *Guadua weberbaueri* se basaron en trabajos realizados en la especie *Guadua angustifolia*, especie del mismo género que ha sido más estudiada.

La desinfección y limpieza de explantes se hizo fuera y dentro de la cámara de siembra. Se propusieron tres tratamientos de desinfección para la desinfección dentro de la cámara de flujo laminar.

El tratamiento fuera de cámara, se basó en el propuesto por Corrales (2017). Éste consistió en el lavado de los explantes en detergente comercial a una concentración de 10g/500ml con un cepillo de dientes, inmersión de los explantes en una solución de Benlate a una concentración de 0,005 mg/0,5l por una hora, e inmersión de los segmentos nodales en una

solución de Phyton a una concentración de 7ml/0,5l durante una hora. Por último, se enjuagaron con abundante agua antes de ser llevados a la cámara de siembra en un frasco esterilizado.

Cada uno de los explantes fue cortado previamente a ser desinfectado dentro de la cámara de siembra. Se redujo el tamaño del explante a 1 cm para evitar mayor contaminación.

Para la desinfección dentro de la cámara de flujo laminar se probaron tres tratamientos en los cuales se usaron alcohol de 70%, hipoclorito de sodio (NaOCl) en distintas concentraciones, Tween 20 y agua destilada estéril. Los tratamientos fueron los siguientes:

- Tratamiento 1: los explantes fueron inmersos en alcohol de 70% por 1 segundo, se enjuagaron con agua destilada estéril y luego se colocaron en un frasco estéril con 100 ml de hipoclorito de sodio al 2,5% por 15 minutos con 4 gotas de Tween 20. A continuación se enjuagaron los explantes tres veces con agua destilada estéril. Por último se colocaron en un frasco estéril con 50 ml de hipoclorito de sodio al 0,5 % con 4 gotas de Tween 20 por 1 minuto. Finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.
- Tratamiento 2: los explantes se colocaron en un frasco estéril con 100 ml de hipoclorito de sodio al 2,5% por 6 minutos con 4 gotas de Tween 20. A continuación se enjuagaron los explantes tres veces con agua destilada estéril. Después, se colocaron en un frasco estéril con 100 ml de hipoclorito de sodio al 1,5% con 4 gotas de Tween 20 por 3 minutos. Por último, se sumergieron en alcohol de 70° por 1 segundo. Finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.
- Tratamiento 3: los explantes fueron sumergidos en alcohol de 70% por 1 segundo. Luego, se colocaron en un frasco estéril con 100 ml de hipoclorito de sodio al 2,5% por 10 minutos con 4 gotas de Tween 20. A continuación se enjuagaron los explantes tres veces con agua destilada estéril. Por último se colocaron en un frasco estéril con 100 ml de hipoclorito de sodio al 1,5% con 4 gotas de Tween 20 por 3 minutos. Finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

**Tabla 1: Tratamientos de desinfección**

<b>Tratamientos</b>	<b>Alcohol 70%</b>	<b>NaOCl 2,5%</b>	<b>NaOCl 1,5%</b>	<b>0,5% NaOCl</b>
T1	1s	15min	-	1min
T2	1s	6 min.	3 min	-
T3	1s	10 min	3 min	-

El número de repeticiones por tratamiento fue 12, se colocó un explante por repetición. Cada explante fue sembrado en un frasco con medio MS (Moorashige & Skoog) al cual se le adicionó 2ml/l de Plant Preservative Mixture (PPM).



**Figura 3: Explantes antes de ser lavados.**

*FUENTE: Elaboración propia.*



**Figura 4: Explante nodal listo para la siembra.**

*FUENTE: Elaboración propia*



**Figura 5: Explante desarrollado con hongo en la base**

*FUENTE: Elaboración propia.*

### **3.3. ENSAYO DE MEDIOS DE CULTIVO**

Se realizó un ensayo de medios de cultivo basado en el medio basal establecido por Murashige & Skoog (1962) (MS), con tres tratamientos los cuales fueron: Medio MS, MS modificado (Mathur, *et al.* 1995) y ½ MS.

Para la desarrollo de esta prueba, se realizó nuevamente la introducción de segmentos nodales de ramas primarias de *Guadua weberbaueri* utilizando el tratamiento 3, el cual resultó ser el mejor para la desinfección de explantes.

Por cada tratamiento se trabajó con 10 repeticiones y cada explante se consideró como una repetición. Las repeticiones estuvieron en función al material vegetal disponible, y al resultado obtenido en la desinfección. Como el resultado que se obtuvo fue aceptable ya no fue necesario utilizar una mayor cantidad de explantes.

#### **3.3.1. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

Cada uno de los diferentes tratamientos fue preparado en la Sala de medios del laboratorio de biotecnología utilizando macronutrientes y micronutrientes requeridos por cada tratamiento. Cada uno de los macro y micronutrientes fueron pesados y diluidos en agua destilada, al igual que las vitaminas, hormonas y fuentes de sacarosa.

El pH de los medios fue calibrado en el phmetro a 5.7. Se utilizaron hidróxido de potasio KOH y ácido clorhídrico HCL para la calibración. Esta se hizo previa a la adición del agar. Luego de haber sido calibrados, se agregó el agar y se calentó en microondas por 10 minutos, después se removió con una bureta y se volvió a calentar en microondas por 5 minutos hasta que el agar este bien disuelto.

Los medios de cultivo fueron vertidos en frascos de vidrio y se taparon con papel aluminio. Una vez llenos los frascos se llevaron a la sala de autoclavado para la respectiva esterilización, ésta se hizo a 125°C y 1,1 Kg/cm<sup>2</sup> por un tiempo de 25 minutos. Posterior a la esterilización se sellaron con papel film y se almacenaron en la sala de medios de cultivo.

Se esperaron mínimo 7 días para poder utilizar los medios de cultivo. Se hizo esto para observar si aparecía algún agente patógeno que perjudicara al medio de cultivo.



**Figura 6: Macronutrientes.**

*FUENTE: Elaboración propia*



**Figura 7: Preparación de medios de cultivo.**

*FUENTE: Elaboración propia.*

**Tabla 2: Composición de los medios de cultivo para la fase de iniciación.**

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>		
	<b>Murashige and Skoog (1962)</b>	<b>Murashige and Skoog Modificado (Mathur et al. 1995)</b>	<b>Murashige y Skoog ½</b>
<b>Macronutrientes</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,0	2475	825
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370	185
KNO <sub>3</sub>	1900	3800	950
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	440	220
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	85
Na <sub>2</sub> -EDTA	37,3	37,3	18,65
<b>Micronutrientes</b>			
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	13,9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,125
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,0125
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,0125
KI	0,83	0,83	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	3,1
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	4,3
<b>Vitaminas</b>			
Glicina	2,0	2,0	2,0
Ácido Nicotínico	0,5	0,5	0,5
Piridoxina	0,5	0,5	0,5
Tiamina	0,1	0,1	0,1
myo-Inositol	100	100	100

*FUENTE: Elaboración propia.*

**Tabla 3: Codificación para los medios de cultivo**

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Código</b>
MS	M1
MS modificado	M2
½ MS	M3

*FUENTE: Elaboración propia.*

De acuerdo al desarrollo de los explantes observado en la realización de las pruebas de medios de cultivo de establecimiento, se hizo una prueba preliminar de medios de

multiplicación. Esta prueba servirá para orientar la investigación en el protocolo de propagación in vitro de esta especie. Se probaron tres diferentes tratamientos. Los medios de cultivo usados fueron los siguientes:

**Tabla 4: Medios de cultivo para multiplicación**

<b>Código</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Componentes</b>
MM1	Medio de multiplicación 1	MS + 5mg/l de BAP + 4mg/l ANA
MM2	Medio de multiplicación 2	MS modificado (Mathur et. al, 1995) + 2mg/l de BAP
MM3	Medio de multiplicación 3	MS + TDZ 0,45uM + NAA 2mg/l

*FUENTE: Elaboración propia*

Los medios de multiplicación se escogieron en base a estudios previos realizados en especies de bambú, donde también se usaron segmentos nodales para la micropropagación.

La prueba con los medios de multiplicación se hizo después de dos meses de introducidos los explantes de *Guadua weberbaueri*. Se seleccionaron las plántulas más desarrolladas para esta prueba. Es decir, aquellas que medían de 3 cm a más, que presentaban de 2 a más hojas, y que se observaban vigorosas. Se utilizaron 3 repeticiones por tratamiento.

### 3.4. PARÁMETROS EVALUADOS

#### 3.4.1. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN

En esta primera parte de la investigación se hicieron 3 evaluaciones semanales y se evaluó lo siguiente:

- Contaminación de explantes.
- Supervivencia de explantes.

En cada evaluación semanal, se contabilizaron los explantes contaminados, por hongos o bacterias, y también se contabilizaron los explantes vivos y los explantes muertos.

#### 3.4.2. ENSAYOS CON MEDIOS DE CULTIVO

##### a. Fase de iniciación

Para la fase de iniciación se hicieron 3 evaluaciones semanales en donde se evaluó lo siguiente:

- Altura del explante
- Número de hojas
- Color de hoja
- Número de brotes

Para hacer la evaluación del color de hoja se hizo la siguiente escala, la cual estuvo basada en los colores observados que tomaban las hojas conforme iban desarrollando *in vitro*. Esta escala sirvió para tomar como referencia la deficiencia de nutrientes en las plantas.

**Tabla 5: Escala de colores**

<b>Color</b>	<b>Valor</b>
Verde	1
Verde pálido	2
Amarillo	3
Amarillo amarronado	4
Marrón	5

*FUENTE: elaboración propia.*



**Figura 8: Escala de colores de hoja**

*FUENTE: Elaboración propia.*

#### **b. Fase de multiplicación**

Para la fase de multiplicación se hizo una evaluación a las ocho semanas de iniciada la prueba y se evaluaron las siguientes variables:

- Número de brotes
- Longitud de brotes.

### **3.5. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

La presente investigación fue conducida con un diseño completamente al azar (DCA), a un nivel de significancia  $\alpha=0,05$ . La comparación entre medias de los tratamientos se realizó mediante la prueba de Tukey al 95 % de confianza.

#### **3.5.1. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN**

En el caso de los resultados de los tratamientos de desinfección, las evaluaciones se realizaron considerando la contaminación y sobrevivencia porcentual de los explantes.

#### **3.5.2. TRATAMIENTOS DE MEDIOS DE CULTIVO**

En los casos de las fases de iniciación y multiplicación se realizó el análisis de varianza a un nivel de significancia del 95% y en los resultados donde se encontró diferencia significativa se sometieron a una prueba de Tukey al 95%.

En el caso de los resultados de color de hojas, al haber más de una hoja por explante se usó la moda de cada repetición para hacer el análisis de resultados.

Para las variables color de hojas, número de hojas y número de brotes se usó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con un nivel de significancia del 95%

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software estadístico Infostat versión 2008.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN

En esta primera parte de la investigación se probaron tres tratamientos para desinfectar los explantes de *Guadua weberbaueri*. La introducción de los explantes se realizó durante los meses de verano, porque como menciona Corrales (2017), en el cultivo *in vitro* de explantes de bambú en la estación previa y/o posterior al invierno, se reporta una mayor efectividad de los tratamientos de desinfección. Los resultados luego de las evaluaciones se pueden observar en las tablas 6, 7, 8 y figuras 9, 10, 11 y 12.

#### 1.1. CONTAMINACIÓN DE EXPLANTES

Se considera a los explantes contaminados cuando estos han sido atacados por hongos o bacterias. Los agentes pueden aparecer en la misma yema, en la sección de ramita, o en la superficie del medio.

**Tabla 6: Porcentaje de desinfección de explantes**

<i>Tratamiento</i>	<i>N° explantes</i>	<i>% Contaminación</i>	<i>% de desinfección</i>
T1	12	75 %	25%
T2	12	83 %	17%
T3	12	33 %	67%

*FUENTE: Elaboración propia.*

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 6 y en la figura 9, el tratamiento que presenta menor porcentaje de contaminación es el tratamiento 3, que consistió en desinfección con alcohol de 70° por 1 segundo, luego enjuagar y desinfectar con NaOCl al 2,5% por 10 minutos . Después, desinfectar nuevamente con NaOCl al 1,5% por 3 minutos.

Puede observarse también que los tratamientos 1 y 2 no tuvieron tanto éxito en la limpieza de los explantes nodales de *Guadua weberbaueri*. El primero presentó más de 60 % de contaminación y el segundo poco más de 80%.

Los agentes patógenos observados durante las evaluaciones fueron hongos y bacterias. Cabe resaltar que los hongos fueron los que contaminaron con mayor frecuencia los explantes.



**Figura 9: Tasa de desinfección**

*FUENTE: Elaboración propia.*

Se puede decir que la mayor concentración y el tiempo de exposición de los explantes al hipoclorito de sodio fueron favorables para disminuir la contaminación. La utilización de alcohol al 70% y el agente surfactante Tween 20 fueron de bastante ayuda para controlar la presencia de hongos y bacterias. Sin embargo, se puede ver que en el tratamiento 1 a pesar de que los explantes han estado expuestos a los desinfectantes por más tiempo no se logró tener una desinfección favorable. Esto puede deberse a varios factores como hongos y bacterias innatos a la planta.

En un estudio realizado por Zevallos (2009) se reporta un resultado similar en la desinfección de yemas de Marigold, donde el mejor tratamiento resultó ser aquel que consideraba un menor tiempo de desinfección con hipoclorito de sodio al 3.12 %. Dos de los cinco tratamientos propuestos en ese ensayo, consideraban mayor tiempo de remojo en

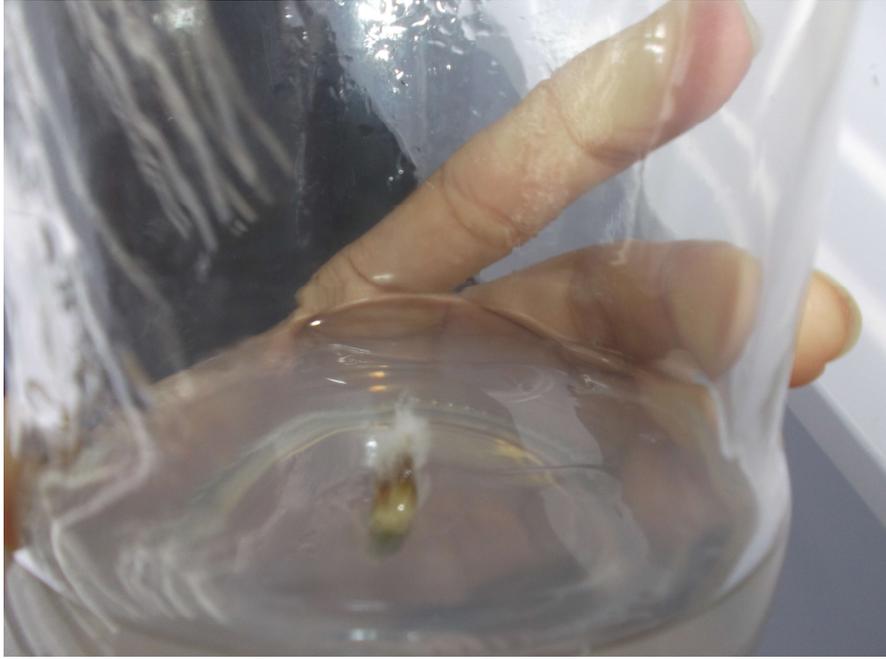
hipoclorito al 3.12% e incluso una segunda desinfección en hipoclorito de sodio al 5.62%; y en ninguno de los dos casos se obtuvo una respuesta de limpieza de explantes favorables.

Fajardo (2006) utilizó diferentes tiempos de desinfección (5, 10 y 20 minutos) con NaOCl al 1% en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. , y muestra que el tiempo de desinfección no tuvo diferencias estadísticas entre los tratamientos para las variables porcentaje de contaminación y sobrevivencia de explantes.

La concentración de hipoclorito de sodio del tratamiento 3 se encuentra dentro del rango propuesto por Roca y Mogrinski (1991) que mencionan que el NaOCl en concentraciones de 1 % a 3% es una de las preparaciones más útiles como germicida y agente oxidante; y no produce lesiones debido a su acción blanqueadora en diversos explantes de muchas especies vegetales.

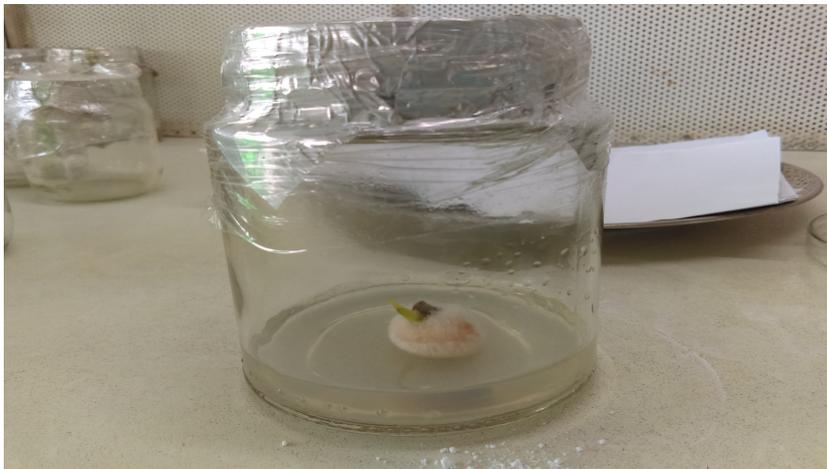
Como se puede observar en la tabla N° 6 y la figura N° 9 el porcentaje de contaminación es relativamente alto, al ser de 33%. Lo ideal sería llegar a tener un protocolo con el que se pueda obtener menos del 5% de contaminación o si es posible 0%. Como mencionan Ramírez *et al.* (2011) la contaminación microbiana consituye una limitante para el establecimiento *in vitro* de bambúes. Ramírez *et al.* (2009) también mencionan que el cultivo *in vitro* de segmentos nodales (medio y basal), de ramas de chusquines de *Guadua angustifolia* Kunth, presenta un alto grado de contaminación afectando la micropropagación durante la fase de establecimiento.

Los resultados obtenidos en este experimento concuerdan con los obtenidos por García *et al.* (2004), quienes también usaron hipoclorito de sodio como agente desinfectante para introducir segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth. Ellos registraron porcentajes de contaminación de 45% y 50% para los explantes desinfectados sólo con NaOCl al 1%, y porcentajes de contaminación de 20 y 25% para los explantes desinfectados con detergente y NaOCl al 2% por 20 minutos.



**Figura 10: Explante muerto y con hongo.**

*FUENTE: Elaboración propia.*



**Figura 11: Explante contaminado con hongo.**

*FUENTE: Elaboración propia*

## 1.2. SOBREVIVENCIA DE EXPLANTES

En la tabla 7 y figura N° 12 se pueden observar los resultados obtenidos para la sobrevivencia de explantes en la introducción de *Guadua weberbaueri*. Los explantes que han sido considerados como sobrevivientes a los efectos de los tratamientos, son aquellos que han sido desinfectados y mantuvieron intacta su capacidad de poder crecer y desarrollarse.

**Tabla 7: Sobrevivencia de explantes.**

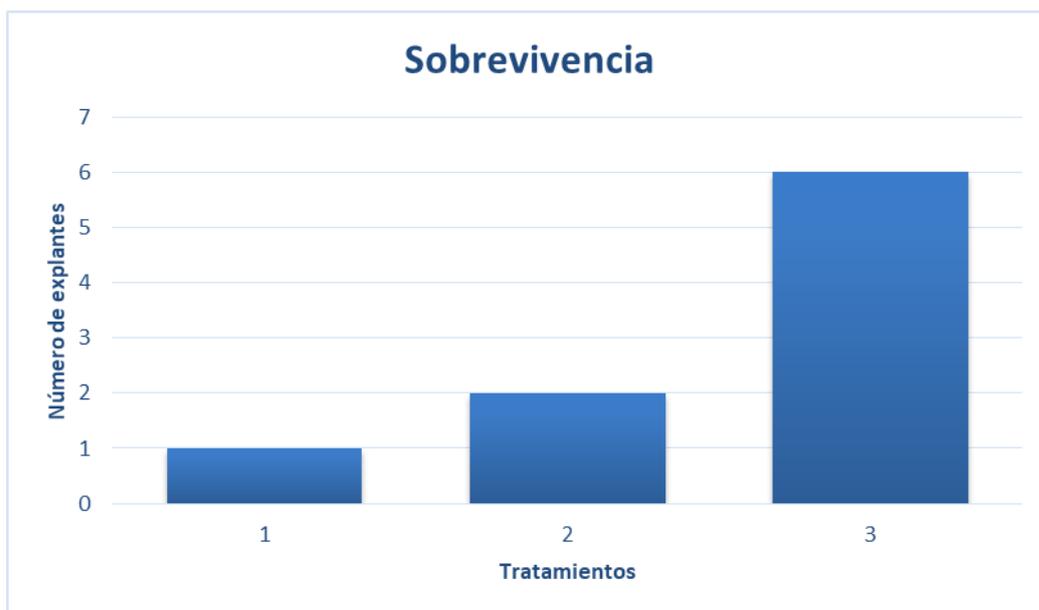
<b>Tratamiento</b>	<b>N° explantes</b>	<b>N° explantes contaminados</b>	<b>N° explantes limpios</b>	<b>N° explantes vivos no contaminados (sobrevivientes)</b>
T1	12	9	3	1
T2	12	10	2	2
T3	12	4	8	6

*FUENTE: Elaboracion propia.*

Como se observa en la tabla 7 y figura 12, el tratamiento 3 fue el que presentó mayor sobrevivencia de explantes. Este tratamiento consistía en la exposición de los explantes a alcohol al 96% durante 1 segundo, seguido de una inmersión en NaOCl al 2,5% durante 10 minutos y una segunda inmersión en NaOCl al 1,5% durante 3 minutos.

Las principales causas de muerte que se observaron durante las evaluaciones y durante todo el desarrollo de la fase experimental de esta investigación fueron la quema de tejidos por el hipoclorito de sodio, la necrosis del explante, y la contaminación de hongos y bacterias.

Como menciona Zevallos (2009), la exposición a NaOCl podría haber afectado el desarrollo del explante, causando la muerte. Esto podría ser debido a la toxicidad causada por el producto desinfectante a nivel celular.



**Figura 12: Número de explantes sobrevivientes por tratamiento**

*FUENTE: Elaboración propia*

También se puede mencionar que la especie *Guadua weberbaueri* ha obtenido un resultado de sobrevivencia aceptable a pesar de que los explantes han estado expuestos más de 10 minutos en dos distintas concentraciones de lejía. Es decir que se podría seguir experimentando con concentraciones de 3% por ejemplo para disminuir la contaminación presentada en este trabajo.

Los resultados obtenidos en sobrevivencia de explantes, difieren a los resultados presentados por Marulanda *et al.* (2005), en donde se usó NaOCl al 2% en distintos tiempos de aplicación (10,15 y 20 minutos), y la cantidad de explantes que logró desarrollar fue menor a la observada en este trabajo con el tratamiento 3.

Otro factor que puede influenciar en la sobrevivencia de explantes es la edad del explante. Marulanda *et al.* (2005) evaluaron la edad fisiológica de las yemas y obtuvieron que las yemas más jóvenes mostraron menos porcentaje de brotación que las yemas del tercio medio y basal. Por esa razón, en este trabajo se usaron yemas de la parte media de ramas primarias de *Guadua weberbaueri*, con la intención de que la sobrevivencia fuera mayor en los tres tratamientos. Sin embargo sólo se logró una sobrevivencia aceptable con el tratamiento 3.

Con el tratamiento 3 se obtuvo una mayor cantidad de explantes limpios y vivos, por eso se escogió este tratamiento como el mejor para introducir los segmentos nodales de *Guadua weberbaueri*.

## **2. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA LA SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE ESTABLECIMIENTO**

Los nutrientes y minerales son los componentes básicos del cultivo de tejidos. Cuán rápido crecerá el tejido utilizado y la respuesta morfológica de este, se verán fuertemente influenciados por la concentración de los nutrientes que se les suministren. (Niedz *et al.*, 2007) Además, la elección de un medio de cultivo depende principalmente de la especie a ser trabajada, del tipo de tejido u órgano a ser cultivado y del propósito del experimento. (Dodds y Roberts, 1995)

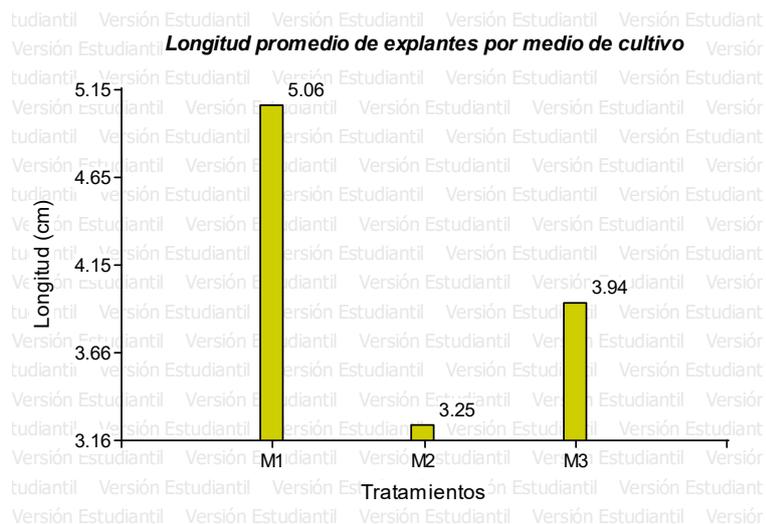
Al no existir estudios anteriores de cultivo *in vitro* en esta especie, es importante probar con medios de cultivo ya existentes para determinar su eficiencia con los explantes de esta especie de bambú.

Durante tres semanas se evaluó el comportamiento de los explantes de segmentos nodales en los tres diferentes tratamientos: M1, M2 y M3. Aplicando el tratamiento de desinfección T3 se prepararon explantes para el ensayo de medio de cultivo, obteniéndose un mejor resultado que en los anteriores ensayos de desinfección

Para cada uno de los análisis estadísticos de las variables evaluadas se utilizaron los datos de la última evaluación realizada. Los resultados para longitud del explante, número de hojas, color de hojas y número de brotes se muestran a continuación.

### **2.1. LONGITUD DEL EXPLANTE**

Como se observa en la figura 13, el medio basal de Murashige & Skoog (1962) (M1), fue el medio de cultivo en el que se obtuvo la mayor altura de explantes. Seguido del tratamiento M3, que consistió en reducir a la mitad las sales del medio MS. Por último, el medio MS modificado (Mathur *et al.* 1992) (M2) presentó el promedio más bajo de elongación de explantes. Los resultados presentados en esta investigación concuerdan con los presentados por Corrales (2017) para la especie *Guadua angustifolia* donde los promedios de longitud de vástagos en medio MS estaban entre 3,5 cm y 6,6 cm.



**Figura 13: Gráfico de barras de longitud promedio (cm) de explantes.**

*FUENTE: Elaboración propia.*

En la tabla 8 se muestra el análisis de varianza realizado para esta variable. Se utilizaron los datos obtenidos a los 21 días de sembrados los explantes. Como el valor de  $p$  fue menor a 0,05; sí hay una diferencia significativa entre los tres tratamientos probados en esta fase de la investigación. Entonces por lo menos uno de los medios de cultivo es diferente a los otros dos.

**Tabla 8: ANOVA para la longitud del explante (SC tipo III)**

<i>F.V.</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p-valor</i>
Modelo	16,69	2	8,34	6,53	0,0049
Tratamiento	16,69	2	8,34	6,53	0,0049
Error	34,49	27	1,28		
Total	51,18	29			

*FUENTE. Elaboración propia*

Para determinar la diferencia de tratamientos se utilizó la prueba de Tukey al 95 % de confianza. La cual arrojó los siguientes resultados:

**Tabla 9: Prueba de Tukey para longitud de explantes.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Medias</b>	<b>N</b>	<b>E.E.</b>
M2	3.25	10	0.36 A
M3	3.94	10	0.36 A B
M1	5.06	10	0.36 B

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.25328. Error: 1.2775  
común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Gl: 27 Medias con una letra

FUENTE: *Elaboración propia*

Los tratamientos M2 y M3 no son diferentes, en cambio el tratamiento M1 sí difiere de los otros tratamientos. Esto sugiere que las proporciones de sales en los medios MS y MS/2 son óptimas para un buen crecimiento de los explantes para esta especie.

Los resultados obtenidos en este trabajo, son diferentes a los obtenidos por Ndiaye *et al.* (2006), quienes al evaluar cuatro diferentes medios basales (MS, MMS, Gamborg B5 y WPM) para la especie *Bambusa vulgaris* no encontraron diferencia significativa para la variable longitud de explantes.

Por otro lado, Galindo (2015) quien trabajó con la especie *Guadua angustifolia* evaluando distintos medios de cultivo basales sí encontró una diferencia estadística entre las alturas promedios de los explantes sembrados con los medios MS, 1/2MS, WPM y Gamborg B5. En sus resultados, los explantes nodales de *Guadua angustifolia*, desarrollaron bien en los primeros tres tratamientos, mientras que con el Gamborg B5, los explantes no elongaron.

La longitud promedio de los explantes obtenida en medio MS, indica que aparentemente esta especie no requiere reguladores de crecimiento para la elongación de los brotes. Asimismo, parece que al aumentar la cantidad de nitrógeno y potasio, como en el caso del M2, o disminuirla, como en el caso del M3, se perjudica la elongación de la yema. En la investigación realizada por Galindo (2015), los explantes sembrados en el medio Gamborg B5, no llegaron a elongar. Este medio basal no presenta nitrógeno ni potasio en sus componentes. Estos resultados complementan la idea de que para el bambú, la modificación de estos componentes en el medio desfavorece el crecimiento de los explantes.

Lee y De Fossard (1977) citados por Ramage y Williams (2002), condujeron experimentos donde se omitían ciertos nutrientes de los medios de inicio para el cultivo *in vitro* de

segmentos nodales de fresa y encontraron que al omitir nitrógeno, potasio, fósforo, hierro y cloro el crecimiento del explante se redujo.

El medio Moorashige & Skoog (M1), presenta una alta proporción de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y la cantidad de nitrógeno total es mucho más alta que en otros medios de cultivo. Para algunos cultivos, la cantidad total de nitrógeno es perjudicial y el balance entre las dos formas de nitrógeno (nitrato y amonio) no es el óptimo. (George *et al.*, 2008) En consecuencia, el aumento de nitrógeno en el medio M2 podría haber inhibido ciertas rutas metabólicas perjudicando la elongación del explante. Por el contrario, la merma de nitrógeno en el medio M3, parece afectar en menor proporción el crecimiento del explante de *Guadua weberbaueri*. Al tener la mitad de nitrógeno total que el medio MS completo, los explantes crecieron en promedio dos centímetros menos en la misma cantidad de tiempo que lo hicieron aquellos que se sembraron en el medio M1, sin embargo esto no indica que el M3 sea un mal medio basal para *Guadua weberbaueri*, simplemente los explantes crecerán más lento que en el medio M1.



**Figura 14: Plantita en medio MMS.**

*FUENTE: Elaboración propia*



**Figura 15: Plantita en medio MS/2**

*FUENTE: elaboración propia*

## 2.2. NÚMERO DE HOJAS

Se hizo la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis para analizar los resultados respectivos al número de hojas por tratamiento probado.

**Tabla 10: Prueba de Kruskal-Wallis para el número de hojas**

<i>Variable</i>	<i>Medios</i>	<i>N</i>	<i>Medias</i>	<i>D.E</i>	<i>Medianas</i>	<i>GI</i>	<i>C</i>	<i>H</i>	<i>P</i>
Número de hojas	M1	10	2,4	0,7	2,5	2	0,86	1,92	0,3299
Número de hojas	M2	10	1,9	0,74	2				
Número de hojas	M3	10	2,2	0,92	2				

*FUENTE: Elaboración propia*

De acuerdo a la tabla 10, los tratamientos no muestran diferencia estadística significativa debido a que el valor de *p* resultó ser mayor que 0,05. Por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula que dice que todos los tratamientos son iguales.

**Tabla 11: Resultados de promedio de hojas por tratamiento**

<i>Tratamiento</i>	<i>Número de microplantas</i>	<i>Promedio número de hojas</i>
T1	10	2,4
T2	10	1,9
T3	10	2,2

*FUENTE: Elaboración propia*

El número de hojas puede haberse visto afectado por la falta de reguladores de crecimiento en los tres medios de cultivo. Como se sabe, las hormonas contribuyen a la formación de nuevas hojas y desarrollo de la planta. Es posible que por no haber complementado los medios de cultivo con hormonas, no se haya encontrado diferencia significativa entre los tratamientos.

Según Lee y De Fossard (1977) citados por Ramage y Williams (2002), el número de hojas producido por el explante se ve afectado por la falta de ciertos minerales. La modificación de los elementos como nitrógeno, fósforo y potasio en la composición de los medios basales reduce el número de hojas.

Se observó también que el desarrollo foliar por explante fue lento. El número de hojas máximo que se observó por explante durante las evaluaciones fue de 4 y fue en el medio MS/2 (M3).

Corrales (2017) obtuvo resultados similares en relación al número de hojas producidas por las plántulas de *Guadua angustifolia* cultivadas *in vitro*. Cabe recalcar que en ese estudio tampoco se utilizaron reguladores de crecimiento en los medios basales.

De acuerdo a la tabla 11, los mejores promedios en cuanto a cantidad de hojas se refiere, se obtuvieron con el medio MS y el MS/2. Se puede decir que ambos medios de cultivo favorecen el desarrollo de hojas en plántulas *in vitro* de *Guadua weberbaueri*.

### 2.3. COLOR DE HOJAS

El color de hojas fue evaluado cada semana de acuerdo a la escala establecida. (Ver figura 8) Con esos datos se hizo el análisis estadístico con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

**Tabla 12: Prueba de Kruskal-Wallis para color de hojas**

<b>Variable</b>	<b>Medios</b>	<b>N</b>	<b>Medias</b>	<b>D.E</b>	<b>Medianas</b>	<b>GI</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>P</b>
Color	M1	10	2,2	0,79	2,00	2	0,92	2,11	0,3166
Color	M2	10	2,2	1,03	2,00				
Color	M3	10	2,8	1,03	3,00				

*FUENTE: Elaboración propia.*

Según los datos de la tabla 12 ninguno de los tres medios de cultivo probados (M1, M2 y M3) difieren estadísticamente al ser el valor de *p* mayor a 0,05. A pesar de no mostrar diferencia estadística, durante las tres evaluaciones se notaron diferencias en el estado y color de las hojas. Como se puede ver en la tabla 13, entre los tres tratamientos, el que presentó hojas más sanas y de colores verde y verde claro hasta la fecha de la última evaluación fue el tratamiento M2, seguido del M1.

**Tabla 13: Número de microplántulas por color y tratamiento.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Número de microplántulas con hojas verdes</b>	<b>Número de microplántulas con hojas verde pálido</b>	<b>Número de microplántulas con hojas amarillas</b>	<b>Número de microplántulas con hojas amarillas amarronadas</b>
M1	2	4	4	0
M2	3	3	3	1
M3	1	3	3	3

*FUENTE: elaboración propia*

El medio M2, el cual es una variación del medio basal de Murashige & Skoog (1962), contiene mayor cantidad de los elementos nitrógeno y potasio. Por ello, podría decirse que favoreció a la nutrición de la planta haciendo que las hojas se mantengan verdes por más tiempo.



**Figura 16: Vástago en medio MMS a los 21 días con 2 hojas.**

*FUENTE: elaboración propia.*

El cambio de color en las hojas durante las tres semanas de evaluación, se puede deber a la falta de nutrientes en el medio. Como durante los 21 días las plántulas tomaron los nutrientes disponibles del medio de cultivo, poco a poco, estos fueron disminuyendo y las plántulas empezaron a mostrar síntomas de deficiencias, como el cambio de color de verde a amarillo de las hojas maduras, y la senescencia de algunas hojas.

Como menciona Castro (2002), la deficiencia de nitrógeno en las plantas *in vivo* causa clorosis en las hojas, en general las plantas se vuelven de un verde ligero y las hojas se van secando hasta un color castaño. Esto mismo puede suceder en plántulas *in vitro*, luego de que hayan consumido todos los nutrientes del medio.

Además a diferencia de las plantas *in vivo*, las plántulas cultivadas en laboratorio no tienen un flujo constante de nutrientes, lo que contribuye a que la planta no pueda desarrollar eficientemente. Por eso se sugiere transplantar las plántulas cuando se observen deficiencias en su desarrollo. Asimismo, se pueden complementar los medios basales con hormonas para retrasar el envejecimiento de las plántulas y favorecer al desarrollo de nuevas hojas.



**Figura 17: Vástago en medio MS a los 14 días con 1 hoja.**

*FUENTE: elaboración propia*

En los resultados encontrados para esta variable y para la variable longitud de explantes es en donde se puede observar mejor la diferencia de concentración de nutrientes que tiene el M3 con el M1. Al estar compuesto el M3 de la mitad de las sales del M1, las plántulas se ven afectadas por la poca cantidad de macro y micronutrientes. Aunque para algunas especies esta merma de nutrientes no les afecta, parece que para *Guadua weberbaueri* es necesaria una concentración más alta, como la composición del M1.

## **2.4. NÚMERO DE BROTES**

Durante las evaluaciones realizadas no se observó el nacimiento de un brote nuevo en algún explante en los tres tratamientos. Probablemente debido a la falta de reguladores de crecimiento en los medios de cultivo.

## **2.5. ELECCIÓN DEL MEDIO BASAL**

Por lo hallado en los resultados de este trabajo, los explantes de *Guadua weberbaueri* se comportaron mejor, para las variables longitud de explantes y número de hojas, en los medios MS y MS/2.

Durante el tiempo de evaluación del crecimiento de explantes, se observó la oxidación fenólica de las microplántulas en los tres medios de cultivo. Pero, fue mucho más evidente en el M1 (medio MS). Por el contrario, en el medio M3, la oxidación fenólica no fue tan evidente. A pesar de ello, el explante nodal desarrolló en el medio M1 hasta llegar a plántulas de 3 a 5 cm de tamaño, con un promedio de 3 hojas por plántula. Por estas razones el medio basal escogido para la fase de establecimiento de explantes nodales de *Guadua weberbaueri* es el medio MS.

## **3. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS PARA ELEGIR EL MEDIO DE CULTIVO DE MULTIPLICACIÓN**

La siguiente fase en la micropropagación luego del establecimiento de los explantes, es la fase de multiplicación. Esta es una de las fases más importantes para la propagación in vitro porque es en esta donde se obtienen los nuevos brotes que formarán las nuevas plántulas.

En esta prueba preliminar de medios de multiplicación para la especie *Guadua weberbaueri*, también se evaluaron el número de brotes, número de hojas y longitud del explante para observar cómo influyen los distintos reguladores de crecimiento en el desarrollo y crecimiento del explante. El parámetro más importante en esta prueba es el número de brotes que crecen por explante.

### **3.1. NÚMERO DE BROTES**

De acuerdo a los resultados obtenidos con la prueba estadística, no existe diferencia significativa entre los tres tratamientos. Sin embargo, en la tabla 13 se puede ver, que el valor de p está próximo al 0,05. Además durante el mes de permanencia de las plantitas en estos medios de cultivo, se pudo observar que el MM2 (MS modificado con BAP 2mg/L)

tuvo un mayor efecto en el rendimiento de nuevos brotes. Generando hasta 3 brotes por explante.

**Tabla 14: Prueba de Kruskal-Wallis para número de brotes**

<b>Variable</b>	<b>Medios de multiplicación</b>	<b>N</b>	<b>Medias</b>	<b>D.E</b>	<b>Medianas</b>	<b>GI</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>P</b>
Número de brotes	MM1	3	0,67	0,58	1	2	0,93	5,6	0,0571
Número de brotes	MM2	3	2,33	0,58	2				
Número de brotes	MM3	3	0,33	0,58	0				

*FUENTE: Elaboración propia*

Jimenez *et al.* (2006), trabajando con la especie *Guadua angustifolia* y con tres distintas concentraciones de BAP (0, 1, 2, 3 mg/L), encontraron que el efecto de la concentración de la citoquinina BAP en la formación de nuevos brotes tiene una correlación positiva. Altas concentraciones de esta hormona inducen al desarrollo de nuevos brotes laterales.

**Tabla 15: Promedio de brotes por explante por tratamiento.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Número de repeticiones</b>	<b>Número de brotes promedio por repetición.</b>
MM1	3	0,67
MM2	3	2,33
MM3	3	0,33

*FUENTE: Elaboración propia*

Como se ve en la tabla 14, el medio MM2 resultó ser el más adecuado para la multiplicación de los explantes de *Guadua weberbaueri*, obteniendo un promedio de 2.33 brotes por repetición. Este medio estaba conformado por sales de Moorashige & Skoog (1962) modificadas por Mathur *et al.* (1992) y 2 mg/l de BAP.

En otro estudio para la especie *Bambusa vulgaris* hecho por Ndiaye *et al.* (2006), se obtuvo que el mejor resultado para el número de brotes fue también con el MS modificado por Mathur *et al.* (1992) llegando a tener 5 brotes por explante.

En el medio MM1 se utilizaron las siguientes concentraciones de hormonas: 5mg/l de BAP y 4mg/l de ANA. A pesar de presentar mayor contenido de BAP, este medio no superó en los resultados obtenidos al MM2 que sólo tenía BAP como regulador de crecimiento. Podría ser que la interacción entre las hormonas BAP, ANA y los nutrientes del medio no fue del todo favorable para el desarrollo del vástago.

Mudoj *et al.* (2013) mencionan que de las citoquininas, 6-benzylaminopurina (BAP), ha sido efectiva para inducir la producción de brotes en varias especies de bambú como *Bambusa vulgaris*, *Bambusa notans*, *Dendrocalamus strictus*, *Dendrocalamus asper*, *Bambusa arundinacea*.

Ramanayake *et al.* (2006), mencionan que la citoquinina TDZ (tidiazurón) no ha sido favorable para el desarrollo rápido y en cantidad de brotes para las especies de bambú *Dendrocalamus giganteous* y *Bambusa vulgaris*. En los resultados presentados en esta investigación se puede ver que tampoco fue muy favorable para esta especie.

### 3.2. LONGITUD DE BROTES

En la tabla 16 se puede ver que para la variable longitud no hay una diferencia significativa entre los tres tratamientos. Probablemente si se usan más repeticiones por tratamiento se podría analizar mejor esta variable.

**Tabla 16: ANOVA para la longitud de brotes en medios de multiplicación.**

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	0,01	2	3,3E-03	0,01	0,9902
Medios de multíp.	0,01	2	3,3E-0	0,01	0,9902
Error	2,03	6	0,34		
Total	2,04	8			

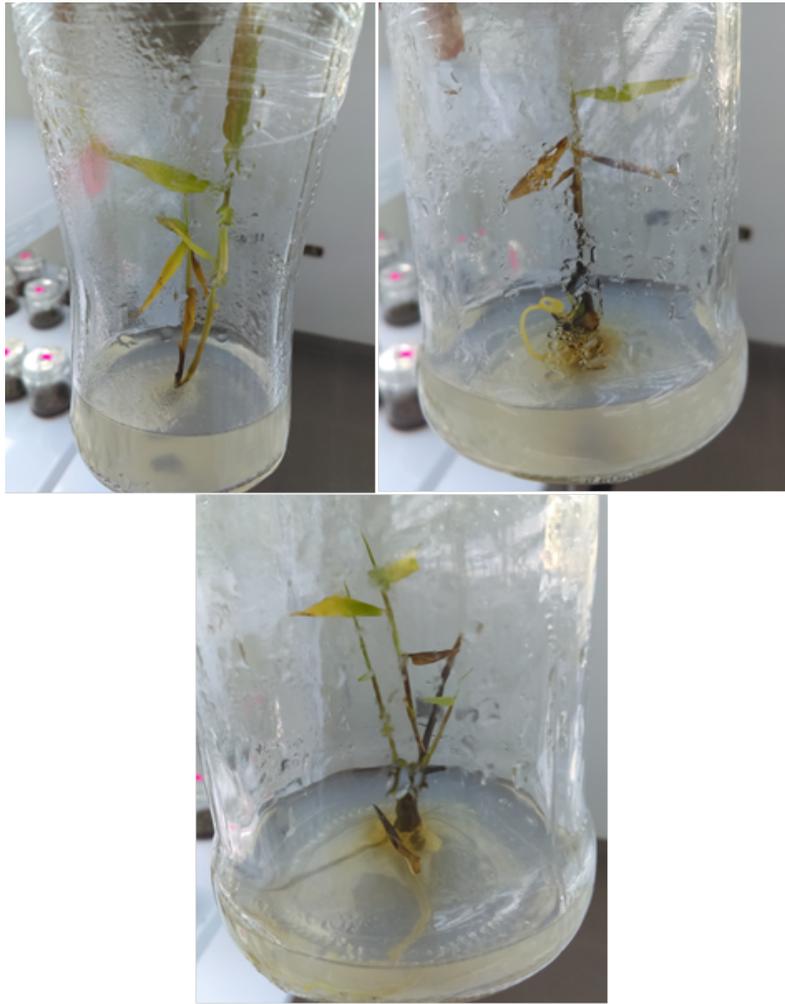
*FUENTE: Elaboración propia*

Para otros estudios realizados en la especie de bambú *Bambusa balcooa.*, los mejores resultados en longitud de especies han sido con sales de Murashige & Skoog, agregándole BAP y Kinetina en un ratio 3:1. Al usar el MS con ANA y BAP, el crecimiento no fue óptimo para los vástagos. (Khan *et al.*, 2014).

Jimenez *et al.* (2006), obtuvieron plantitas de 8-10 cm de altura usando medio MS con 3mg/l de BAP. A los 22 días los vástagos medían 3 cm y a los 50 días del cultivo la altura

que alcanzaron fue de 13 cm. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, a los 30 días de haber sido transferidos los explantes a los tratamientos de multiplicación, la altura promedio que se obtuvo fue 3,77 cm.

Ramanayake, *et al.* (2006) encontraron que utilizando la hormona TDZ la media de la longitud de los brotes obtenidos, no era mayor que la media de longitud obtenida con 4 mg/l de BAP en el medio de cultivo.



**Figura 18:** Vástagos en medios MMS+BAP, MS+TDZ+ANA y MS +ANA+BAP a las 8 semanas de haber sido sembrados.

*FUENTE: elaboración propia.*

## V. CONCLUSIONES

- 1) Esta investigación contribuye al desarrollo del protocolo de micropropagación de *Guadua weberbaueri* considerando que no se ha encontrado antecedentes del cultivo *in vitro* de esta especie.
- 2) La desinfección de los explantes de la especie *Guadua weberbaueri* realizado con el tratamiento 3 (inmersión en alcohol de 70°, limpieza con NaOCl al 2,5% por 10 minutos seguido de una segunda desinfección con NaOCl al 1,5% por 3 minutos), mostró mayor efectividad.
- 3) El medio basal en el que se comportó mejor la especie *Guadua weberbaueri*, fue el medio Moorashige & Skoog (1962) ó MS por lo que se puede tomar como base para futuros estudios de multiplicación.



## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de condiciones fisiológicas estacionales de la especie para determinar en qué momento se obtienen mejores resultados en diferentes partes del protocolo.
- Realizar un estudio in vitro con medios de cultivo líquidos para determinar los nutrientes que la especie *Guadua weberbaueri* necesita.
- Complementar los tratamientos para multiplicación de *Guadua weberbaueri*, realizando las pruebas con más repeticiones y probando otros medios no probados en este trabajo.
- Optimizar los tratamientos para la fase de iniciación del cultivo. Probar con aditivos como carbón activado, cisteína o L-glicina para evitar la constante fenolización, y poder lograr que las plantas no envejezcan tan rápido y mantengan el vigor.
- Realizar las evaluaciones para las pruebas de medios de cultivo de establecimiento cada 15 días y para las pruebas de multiplicación cada 30 días, estos periodos de tiempo son suficientes para observar cambios en cada evaluación.
- Cambiar semanalmente los explantes a nuevos medios de cultivo, o cuando se observe envejecimiento del explante, o fenolización para evitar la muerte de la planta. Al hacer el cambio de frasco, quitar las partes necrosadas de la planta, si es que las hubiera.
- Utilizar PPM (Plant preservative mixture) en los medios de cultivo de introducción e inicio ayuda a disminuir la contaminación de los explantes.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Añazco, M. 2013. Estudio de vulnerabilidad del bambú (*Guadua angustifolia*) al cambio climático en la costa de Ecuador y norte del Perú. (en línea) INBAR. EC. Consultado el 13 mar. 2016. Disponible en [http://www.usmp.edu.pe/centro\\_bambu\\_peru/pdf/Estudio\\_de\\_vulnerabilidad\\_del\\_bambu.pdf](http://www.usmp.edu.pe/centro_bambu_peru/pdf/Estudio_de_vulnerabilidad_del_bambu.pdf)
- Banik, R. 2015. Bamboo silviculture. In Liese, W y Köhl, M. Eds. Bamboo: the plant and its uses. Springer. (en línea). Consultado 23 agos. 2017. Disponible en: <http://www.springer.com/gp/book/9783319141329>
- Barba, A; Luna, B y Romero, J. 2001. Micropropagación de plantas. Distrito Federal de México, MX. Trillas. 107 p.
- Calderón, A, Cabrera, R.; Dolorier, T. y Zolla, G. 1995. Métodos asépticos de propagación in vitro. Lab. de fisiología vegetal. UNALM Lima, Perú. 47 pp.
- Corrales, D. 2017. Establecimiento In vitro de Bambú (*Guadua angustifolia* Kunth) mediante segmentos nodales de ramas primarias. Tesis Lic. Ing. For. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina. 60 p.
- Castaño, F. y Moreno, R. 2004. *Guadua* para todos: cultivo y aprovechamiento. Ministerio de ambiente y vivienda y desarrollo territorial. COL. 188 p.
- Castro, G. 2002. Nutrición mineral marginal en plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) cv. Chandler crecidas hidropónicamente. Tesis Lic. Biología. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Caula, A. 2011. Getting started with tissue culture: media preparation, sterile technique and laboratory equipment. In Trigiano, R. Ed. 2011. Plant tissue culture, development and biotechnology. Boca Raton, E U . CRC Press. 583 p.
- Dodds, J. Roberts. L. 1995. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. Estados Unidos. 248 pp.

- De Lima, J. 2007. As propriedades físicas, mecánicas e meso-estrutural do bambu *Guadua weberbaueri* do Acre. Tesis. Mg. Sc. Río de Janeiro, BRA. Pontificia Universidade Católica do Río de Janeiro. (en línea). Consultado 19 jul. 2017. Disponible en: [http://www.civ.puc-rio.br/wp-content/view/down\\_pdf.php?pdf=../pdf/23.pdf](http://www.civ.puc-rio.br/wp-content/view/down_pdf.php?pdf=../pdf/23.pdf).
- Dorris, M. 2010. What is plant tissue culture. *Journal of the Bromeliad Society*. 60 (4) : 172-179.
- Fernández, J. 2012. SIERRA EXPORTADORA. “Perspectivas para la industrialización de bambú en las regiones de la sierra del Perú”. (en línea) Consultado 15 jul. 2016. Disponible en: [www.sierraexportadora.gob.pe](http://www.sierraexportadora.gob.pe)
- Galindo, D. 2015. Evaluación de medios de cultivo para la propagación in vitro de bambú (*Guadua angustifolia*; Poaceae); La democracia, Escuintla. Tesis (Ing. Agro.) Escuintla, GU. Universidad Rafael Landívar. (en línea) Consultado 24 jul. 2017. Disponible en: [recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjcem/2015/06/17/Galindo-Dilia.pdf](http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjcem/2015/06/17/Galindo-Dilia.pdf)
- García, M; Araluce, C; Rubio Y; Rodríguez, S; Feria, R. 2004. Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento in vitro de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotecnología vegetal* 4 (4) : 237-242 . (en línea ). Consultado 24 jul. 2017. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/434/html>
- George, E; Hall, M; De Klerk, G. Eds. 2008. *Plant propagation by tissue culture. Volume 1 The background*. 3ra ed. Dordrecht, HOL. Springer. 504 p.
- 
- \_\_\_\_\_ 2008. *Plant propagation by tissue culture. Volume 1 The background*. 3ra ed. Dordrecht, HOL. Springer. p. 2. Fuente original: Cassells, A. ed. 1997. *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*. Kluwer, Dordrecht.
- Hidalgo, O. 2003. *Bamboo. The Gift of the Gods*.s. l. Hipertexto Ltda. 556 p.
- Judziewicz, E; Clark, L; Londoño, X; Stern, M. 1999. *American Bamboos*. Washington, US. Smithsonian Institution Press. 392 p.

- Khan, H; Burla,S ; Siri, N y Lavanya, P. 2014. Effect of nutrient media and phytohormones on in vitro establishment of *Bambusa balcooa*. Roxb. (en línea). International Letters of Natural Sciences. 12 (1) 1-11. Consultado 20 jul. 2017. Disponible en: [www.ilns.pl](http://www.ilns.pl)
- Roca, W. Mogrinski, L. 1991. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cultivo de Tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, CO. 970 p.
- Kyte, L. 1987. Plants from test tubes an introduction to micropropagation. Oregon, E U. Tumber press. 160p.
- Londoño, X. s.f. Recurso sostenible de incalculable valor. In Villegas,M. Guadua: Arquitectura y Diseño. Villegas. S.l. 213 p. (en línea) Consultado 20 mar. 2016. Disponible en: [books.google.com.pe](http://books.google.com.pe).
- Londoño, X. 2012. Evaluation of bamboo resources in Latin America. A summary of the final Report of Project N° 96-8300-01-4 (en línea) INBAR. CO. Consultado 13 mar. 2016 Disponible en: [http://www.inbar.int/wpcontent/uploads/downloads/2012/09/inbar\\_working\\_paper\\_no33.pdf](http://www.inbar.int/wpcontent/uploads/downloads/2012/09/inbar_working_paper_no33.pdf)
- Londoño, X. Peterson, P. 1991. *Guadua sarcocarpa* ( Poaceae: Bambuseae), a New Species of Amazonian Bamboo with Fleshy Fruits. (en línea) Systematic Botany. 16 (4) : 630-638. Consultado 23 mar. 2016. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/2418866>
- López, A. 2011. Bambú: Biología, Cultivo, Manejo y Usos en el Perú. Dirección general de Competitividad agraria. MINAGRI. Lima,PE. 68 p.
- Luna, R. 2002. Micropropagación de algodón (*Gossypium barbadense*) var. Tanguis. Tesis Lic. Biol. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina. 87p.
- \_\_\_\_\_ 2002. Micropropagación de algodón (*Gossypium barbadense*) var. Tanguis. Tesis Lic. Biología. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina. p. 23. Fuente original: Calderon, A, Cabrera,R.; Dolorier,T. y Zolla, G. 1995. Métodos asépticos de propagación in vitro. Lab. de fisiología vegetal. UNALM Lima,Perú. 47 pp
- Márgara,J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro Madrid, España. 231 p.

- Marulanda, M. ; Gutiérrez,L; Márquez,M. 2005. Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth. (en línea). *Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal*. 27 (82) Consultado 13 mar. 2016. Disponible en: <http://matematicas.udea.edu.co/~actubiol/Vol27-82Resumen.htm>
- Mathur, N. Ramawat,K. Nandwani,D. 1995. Rapid in vitro multiplication of jujube through mature stem explants. (en línea). *Plant Cell, Tissue and Organ culture*. 43 (1) :75-77 Consultado 25 jul 2016. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007>
- Mejía, R. 1994. *Agrobiotecnología fundamentos y aplicaciones: Propagación comercial de 312 especies de plantas por cultivo in vitro*. Lima, PE.
- Montoya L. 1991. *Cultivo de tejidos vegetales*. Departamento de Agronomía. Medellín colombia.
- Mudoí, K; Saikia, S; Goswami, A; Gogoi, A; Bora, D Y Borthakur,M. 2013. Micropropagation of important bamboos: A review. (en línea) *African Journal of Biotechnology*. 12 (20) : 2770-2785. Consultado 13 mar. 2016. Disponible en: [www.academicjournals.org/AJB](http://www.academicjournals.org/AJB)
- Murashige,T. Skoog, F. 1962. A Revised médium for rapid growth and bio assas with Tobacco tissue cultures. (en línea) . *Physiologia plantarum*. Consultado 1 ago 2016.Disponible en: [http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu\\_audu\\_kulturas\\_MAG/literatura/03\\_Murashige%20Skoog1962.pdf](http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige%20Skoog1962.pdf)
- Ndiaye, A; Diallo, M; Niang, D Y Gassama-dia, Y. 2006. In vitro regeneration of adult tres of *Bambusa vulgaris*. (en línea). *African Journal of Biotechnology*. 5 (13): 1245-1248. Consultado 13 mar. 2016. Disponible en:[www.academicjournals.org/AJB](http://www.academicjournals.org/AJB)
- OIMT (Organización Internacional de las Maderas Tropicales). s.f. Promoción de la rehabilitación, manejo y uso sostenible de los bosques tropicales de bambú en la región noroccidental del Perú. (en línea). S.l. Consultado 23 mar. 2016. Disponible en: [http://www.itto.int/files/itto\\_project\\_db\\_input/2869/Project/PD%20428-06R2%20Spanish%20Document.pdf](http://www.itto.int/files/itto_project_db_input/2869/Project/PD%20428-06R2%20Spanish%20Document.pdf)

- \_\_\_\_\_ (Organización Internacional de las Maderas Tropicales). 1995. Manejo y aprovechamiento de la paca (*Guadua sarcocarpa*). (en línea). S.l. Consultado 23 mar. 2016. Disponible en: [http://www.itto.int/files/itto\\_project\\_db\\_input/2646/Project/S-PPD-4-95-R1-M-Pre-project-Document.pdf](http://www.itto.int/files/itto_project_db_input/2646/Project/S-PPD-4-95-R1-M-Pre-project-Document.pdf)
- Olivier, J; Poncy, O. 2009. A taxonomical revision of *Guadua weberbaueri* Pilg. and *Guadua sarcocarpa* Londoño & Peterson (Poaceae). *Candollea: Journal International de botanique systématique*. 64 : 171-178.
- Ortiz, K. 2017. Caracterización y clave de identificación de los bambúes en la región Nor-Oriental (San Martín, Amazonas y Cajamarca). Tesis Lic. Ing. For. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Pedroza, J. 2008. Aplicaciones de tejidos vegetales en condiciones in vitro. Bogotá, CO. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 348 p.
- Perea, M; Tirado, A. 2011. Cultivo de tejidos vegetales in vitro. Bogotá, CO. Universidad Nacional de Colombia. 160 p.
- Pierik, R. 1988. Cultivo in vitro de plantas superiores. Madrid, ES. Mundi-Prensa. 326 p.
- Quispe, L. 2017. Informe de resultados de ensayos realizados en el Laboratorio de Biotecnología de Cereales. UNALM.
- Ramanayake, S. Meemaduma, V. Weerawardene, T. 2006. In vitro shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* "Striata"). (en línea) . Elsevier. S.l. Consultado 20 jul. 2017. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423806002342>
- Ramírez, L; Milena, S y López, R. 2009. Identificación de bacterias que afectan el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth. *Revista Universidad del Quindío*. 19 : 151-158. ( en línea) . Consultado 20 agos. 2017. Disponible en: [http://blade1.uniquindio.edu.co/uniquindio/revistainvestigaciones/adjuntos/pdf/299d\\_n1917.pdf](http://blade1.uniquindio.edu.co/uniquindio/revistainvestigaciones/adjuntos/pdf/299d_n1917.pdf)

- Ramírez, Y; Freire, M y Hurtado, O. 2011. Propagación in vitro de bambúes. *Biotecnología vegetal*. 11 (3) : 131-142. (en línea) Consultado 15 agos. 2017. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/download/237/213>
- Ramage, C. Williams, R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro cellular and development biology*. 38 (2) 116-124 (en línea). Consultado 13 nov. 2017. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1079/IVP2001269>
- Reátegui, N. 2009. Caracterización y Clave de Identificación de Bambúes en el ámbito Chanchamayo, Departamento de Junín, Perú. Tesis Lic. Ing. For. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Smith, R. 2013. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Waltham, E U. Elsevier. 166 p.
- \_\_\_\_\_. 2013. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Waltham, E U. Elsevier. p. 37. Fuente original: Loewus, F; Loewus, M. 1987. Myo-inositol: its biosynthesis and metabolism. *Annual review of plant physiology*. 34 :137-167.
- Styer, D.J. Y Chin, C.K. 1983. Meristem and shoot tip culture for pathogen elimination, and germplasm conservation. *Horticultural reviews* 5:221-277
- Tovar, O. 1993. Las gramíneas (Poaceae) del Perú. (en línea). *Monografías del Real Jardín Botánico*. Ruizia. 13. Madrid, ES. Consultado 15 abr. 2016. Disponible en: <http://bibdigital.rjb.csic.es/PDF/Ruizia13.pdf>
- Trigiano, R. Ed. 2011. *Plant tissue culture, development and biotechnology*. Boca Raton, E U. CRC Press. 583 p.
- Villegas, M. s.f. *Guadua: Arquitectura y Diseño*. (en línea). Consultado 20 mar. 2016. S.l. Villegas. 213 p. Consultado 20 mar. 2016. Disponible en: [books.google.com.pe](https://books.google.com.pe)
- Zamora, A. 1994. Review of micropropagation research in bamboos. In INBAR (The International Network for Bamboo and Rattan) *Constraints to production of Bamboo and Rattan*. 245 p. (en línea) Consultado 16 ago. 2016. Disponible en: [http://www.inbar.int/sites/default/files/resources/inbar\\_technical\\_report\\_no05.pdf](http://www.inbar.int/sites/default/files/resources/inbar_technical_report_no05.pdf)
- Zevallos, R. 2009. Algunos ensayos relacionados con la micropropagación de marigold (*Tagetes erecta* L). Tesis Lic. Ing. Agr. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina. 102 p.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1

#### EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN MEDIO MS

	EVALUACIÓN 1			EVALUACIÓN 2			EVALUACIÓN 3		
	longitud	número de hojas	color de hoja	longitud	número de hojas	color de hoja	longitud	número de hojas	color de hoja
Explante									
1	5,6	3	2 2 1	6	3	2 2 1	6,1	3	2 3 3
2	6	1	1	6,2	1	2	6,2	1	2
3	4	2	2 3	4,5	3	1 2 5	4,5	3	1 2 5
4	4,8	2	2 2	5,2	2	2 3	5,4	2	2 3
5	5,5	2	1 5	5,5	2	5 3	4,5	2	3 4
6	2,7	2	1 1	3,2	2	1 1	3,2	2	1 1
7	2,6	2		4	2	2 2	4	3	1 3 3
8	8	1	1	6,1	2	1 3	6	3	4 3 3
9	5	1	1	6,5	1	3	6,5	3	1 2 3
10	2,9	1	1	4	1	1	4,2	2	1

FUENTE: Elaboración propia

## ANEXO 2

### EVALUACIÓN DE EXPLANTES EN MEDIO MMS

	EVALUACIÓN 1			EVALUACIÓN 2			EVALUACIÓN 3		
	longitud	número de hojas	color de hoja	longitud	número de hojas	color de hoja	longitud	número de hojas	color de hoja
Explante									
1	4,30	1	2 1	5,5	1	2	5,7	2	3 3
2	4,00	2	1 1 1	4,1	3	1 1 2	4,1	3	2 3 3
3	3,40	1	1	4	1	1	3,5	2	1 1
4	3,30	1	1	3,2	2	1 1	3,2	2	1 1
5	2,00	1	1	2	1	1	2,1	1	1
6	2,40	2	1 1	2,5	2	1 2	3,1	2	2 2
7	1,50	1	3	1,7	1	3	1,5	1	4
8	3,50	2	1 3	3,5	3	1 3 5	5	3	2 3 5
9	1,90	1	1	2	1	1	2,4	1	2
10	2,20	2	1 3	2,2	2	2 3	1,9	2	2 3

FUENTE: Elaboración propia.

### ANEXO 3

#### EVALUACIÓN DE EXPLANTES EN MEDIO MS/2

	EVALUACIÓN 1			EVAUACIÓN 2			EVALUACIÓN 3		
	longitud	número de hojas	color de hoja	longitud	número de hojas	color de hoja	longitud	número de hojas	color de hoja
Explante									
1	3,20	2	1 y 1	3,4	3	1 y 1 y1	4	3	2 3 3
2	3,30	2	2 y 2	3,3	2	2 y 2	3,4	2	2 2
3	4,40	3	1 y 1 y 2	5,1	3	1 2 2	5,2	4	1 1 3
4	4,10	2	1 y 1	4,1	2	1 1	4,2	2	4 4
5	3,60	2	1 y 1	3,7	2	2 2	3,7	2	1 1 3
6	2,00	1	1	2	1	1	2	1	4 4
7	3,70	1	1 y 1	3,7	2	2	3,9	2	2
8	4,00	2	2	4,2	2	3	4,2	3	4
9	4,30	1	2	4,3	1	2	4,5	2	3
10	3,50	1	1	4	1	1	4,3	1	2

FUENTE: Elaboración propia.

