

INGRESE LOS DATOS EN LOS CASILLEROS DE FONDO BLANCO:

Active para iniciar; desactive al finalizar →

[Doble\\_clic](#)

Nombre del/de la tesista:	Jessica Milagros Martínez Torres	
Sexo:	Femenino	
Nombre de la tesis:	"Propagación in vitro de Guadua angustifolia (Bambú), a partir de microestacas de plantas desarrolladas en invernadero"	
Fecha de sustentación:	19/09/2019	
Calificativo:	Sobresaliente	
Presidente del Jurado:	Ignacio Lombardi Indacochea	Ing.
Miembro del Jurado:	Carlos Reynel Rodríguez	PhD.
Miembro del Jurado:	Roxana Guillen Quispe	Mg. Sc.
Asesor:	Gilberto Dominguez Torrejón	Dr.
Co-Asesor:	Rosa María Cabrera Pintado	Blgo.
Resumen breve (máx. 1000 caracteres):	<p>En el proceso de selección de explantes se comprobó que el material vegetal para la propagación in vitro de Guadua angustifolia es la microestaca, con un porcentaje de aproximadamente 95% de éxito de explantes libres de patógenos y 80% de prendimiento para el T3 (MS + 6 mg/L). El protocolo para la "Propagación in vitro de Guadua angustifolia (Bambú) a partir de microestacas de plantas desarrolladas en invernadero" consiste en una desinfección con benomilo y sulfato de estreptomicina e hipoclorito de sodio al 1,1% y PPM (2ml/L); seguido de 3 semanas de la fase de iniciación con adición de PPM y BA 6mg/L, luego 5 subcultivos sin división cada 4 semanas (MS 4,43 g/L + BA 6mg/L) y 4 subcultivos con división cada 6 semanas todo ellos con la adición de la citoquinina BA 6mg/L para la fase de multiplicación los explantes en cámara de crecimiento vegetal y para la aclimatación 8 semanas en sustrato PREMIX #8 en cámara climática.</p>	
Palabras claves (máx. 6)	Micropropagación, <i>Guadua angustifolia</i> , citoquininas, auxinas, aclimatación	

[Ir a página de carátula](#)

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA  
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES**



"PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Guadua angustifolia* (BAMBÚ), A  
PARTIR DE MICROESTACAS DE PLANTAS  
DESARROLLADAS EN INVERNADERO"

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO FORESTAL**

Jessica Milagros Martínez Torres

**LIMA – PERÚ**

**2020**

---

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES**

**“PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Guadua angustifolia*  
(BAMBU) A PARTIR DE MICROESTACAS DE PLANTAS  
DESARROLLADAS EN INVERNADERO”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO FORESTAL  
JESSICA MILAGROS MARTÍNEZ TORRES**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

---

Ing. Ignacio Lombardi Indacochea  
**PRESIDENTE**

---

Mg. Sc. Roxana Guillen Quispe  
**MIEMBRO**

---

Phd. Carlos Reynel Rodríguez  
**MIEMBRO**

---

Dr. Gilberto Domínguez  
Torrejón  
**ASESOR**

---

Blga. Rosa María Cabrera  
Pintado  
**CO-ASESORA**

## *DEDICATORIA*

*Ángela y Mario (+), mis viejitos, las personas más nobles y consentidoras.*

*Jessica Torres, mi madre, luchadora y gran ejemplo.*

*Mis hermanos, Ivonne, Pedro, Brenda y Mario.*

*Todos ustedes motores e impulsores de mis logros, gracias por estar siempre para mí.*

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Dios por permitirme culminar con mis estudios de pre-grado.*

*Al Instituto Nacional de Innovación Agraria por el financiamiento de la presente investigación con el programa presupuestal 130 (Competitividad y aprovechamiento sostenible de los recursos forestales y de la fauna silvestre).*

*A la bióloga Rosa Cabrera, mi coasesora, gran ejemplo de profesional y persona, su perseverancia, amor por la investigación y sobre todo su entrega de conocimientos me han inspirado a ser mejor persona, gracias a usted y su paciencia es que hemos logrado esta investigación.*

*Al profesor Gilberto Domínguez, su paciencia y apoyo en esta investigación han sido importantes para su cúlmimo.*

*A la bióloga Elizabeth Núñez del SENASA, su pasión por la ciencia y enseñanzas fueron mi primer acercamiento e inspiración en biotecnología.*

*A la Sra. Luz, su paciencia, dedicación y consejos ayudó a culminar esta investigación y su presentación.*

# ÍNDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. GENERALIDADES DE LA ESPECIE .....	3
2.1.1. Clasificación botánica y taxonómica .....	3
2.1.2. Distribución .....	3
2.1.3. Clima .....	6
2.1.4. Suelos .....	6
2.1.5. Descripción botánica de la <i>Guadua angustifolia</i> .....	6
2.1.6. Raíces .....	6
2.1.7. Tallo o culmo .....	7
2.1.8. Ramas .....	8
2.1.9. Hojas.....	8
2.1.10. Inflorescencia y semilla .....	9
2.2. PROPAGACIÓN.....	10
2.2.1. Reproducción sexual .....	10
2.2.2. Propagación asexual.....	10
2.3. IMPORTANCIA ECOLÓGICA.....	12
2.4. IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	13
2.5. USOS DEL BAMBÚ .....	14
2.6. MICROPROPAGACIÓN.....	15
2.7. ORGANOGÉNESIS .....	16
2.7.1. Formación de yemas axilares .....	17
2.7.2. Explante.....	17
2.7.3. Medio de cultivo.....	17
2.7.4. Reguladores de crecimiento.....	19
2.7.5. Agentes gelificantes .....	19
2.7.6. Factores que afectan el desarrollo del explante.....	20
2.8. FASES DE LA MICROPROPAGACIÓN.....	21
2.8.1. Fase 0: Preparación o acondicionamiento de la planta madre .....	21
2.8.2. Fase I: Establecimiento o iniciación de los cultivos .....	21
2.8.3. Fase II: Multiplicación o proliferación .....	22
2.8.4. Fase III: Enraizamiento .....	23
2.8.5. Fase IV: Aclimatación .....	24
2.9. TRABAJOS SOBRE CULTIVOS <i>in vitro</i> EN BAMBÚ .....	24
2.10. EXPERIENCIAS DE PROPAGACIÓN CONVENCIONAL EN BAMBÚ .....	27
III. METODOLOGÍA .....	29
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN .....	29
3.2. MATERIALES.....	29
3.2.1. Material vegetal .....	29
3.2.2. Insumos .....	29

a.	Reguladores de crecimiento .....	29
b.	Reactivos .....	29
c.	Agroquímicos.....	30
d.	Otros insumos .....	30
3.2.3.	Instrumentos .....	30
3.2.4.	Materiales de vidrio.....	31
3.2.5.	Materiales de invernadero.....	31
3.2.6.	Otros materiales.....	31
3.2.7.	Equipos.....	32
3.2.8.	Gabinete .....	32
3.2.9.	Condiciones de incubación .....	33
3.3.	MÉTODOS .....	33
3.3.1.	Esquema del proceso de la investigación .....	33
3.3.2.	Acondicionamiento de la planta madre .....	33
3.3.3.	Colecta de explantes en invernadero.....	34
3.3.4.	Desinfección superficial de explantes.....	35
A.	Desinfección superficial de yemas axilares .....	36
B.	Desinfección superficial de microestacas .....	37
3.3.5.	Fase de establecimiento o iniciación.....	37
3.3.6.	Fase de multiplicación .....	47
3.3.7.	Diseño experimental .....	53
3.3.8.	Fase de aclimatación .....	54
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	57
V.	CONCLUSIONES .....	81
VI.	RECOMENDACIONES.....	83
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	84
VIII.	ANEXOS.....	89

## Índice de tablas

	Página
TABLA 1: COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGE Y SKOOG (MS) - 1962. ....	18
TABLA 2: TRATAMIENTOS ENSAYADOS EN YEMAS DE BAMBÚ VARIANDO EL TIPO DE MEDIO DE CULTIVO Y CONCENTRACIÓN DE DOS CITOQUININAS. ....	38
TABLA 3: TRATAMIENTOS ENSAYADOS EN YEMAS CON 4 CONCENTRACIONES DE DOS CITOQUININAS EN MEDIO DE DOBLE FASE. ....	38
TABLA 4: TRATAMIENTOS ENSAYADOS EN MICROESTACAS, CON 3 CONCENTRACIONES DE 2 CITOQUININAS Y UN MEDIO TESTIGO EN MEDIO SÓLIDO. ....	39
TABLA 5: TRATAMIENTOS ENSAYADOS EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN DE BAMBÚ A PARTIR DE MICROESTACAS. ....	48
TABLA 6: CONTAMINACIÓN POR HONGOS DURANTE LA FASE DE INICIACIÓN PARA LOS MEDIOS MS SÓLIDO Y LÍQUIDO ADICIONADOS DE BA Y ZEA ....	58
TABLA 7: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE BROTES PARA EL PRIMER SUBCULTIVO, SIN DIVISIÓN. ....	69
TABLA 8: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE HOJAS PARA EL PRIMER SUBCULTIVO, SIN DIVISIÓN. ....	70
TABLA 9: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE BROTES EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO, SIN DIVISIÓN. ....	70
TABLA 10: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE HOJAS EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO, SIN DIVISIÓN. ....	71
TABLA 11: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE BROTES EN EL TERCER SUBCULTIVO, SIN DIVISIÓN. ....	71
TABLA 12: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE HOJAS EN EL TERCER SUBCULTIVO, SIN DIVISIÓN. ....	71
TABLA 13: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE BROTES EN EL CUARTO SUBCULTIVO, SIN DIVISIÓN. ....	72
TABLA 14: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE HOJAS EN EL CUARTO SUBCULTIVO, SIN DIVISIÓN. ....	72
TABLA 15: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE BROTES EN EL QUINTO SUBCULTIVO, SIN DIVISIÓN. ....	73
TABLA 16: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE HOJAS EN EL QUINTO SUBCULTIVO, SIN DIVISIÓN. ....	73
TABLA 17: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE BROTES EN EL PRIMER SUBCULTIVO DIVIDIDO. ....	74
TABLA 18: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE MICROMACOLLOS EN EL PRIMER SUBCULTIVO DIVIDIDO. ....	74
TABLA 19: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE BROTES EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO DIVIDIDO. ....	75
TABLA 20: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE MICROMACOLLOS EN EL SEGUNDO SUBCULTIVO DIVIDIDO. ....	75

TABLA 21: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE BROTES EN EL TERCER SUBCULTIVO DIVIDIDO. ....	76
TABLA 22: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE MICROMACOLLOS EN EL TERCER SUBCULTIVO DIVIDIDO. ....	76
TABLA 23: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE BROTES EN EL CUARTO SUBCULTIVO DIVIDIDO. ....	76
TABLA 24: COMPARACIÓN DE MEDIAS DE NÚMERO DE MICROMACOLLOS EN EL CUARTO SUBCULTIVO DIVIDIDO. ....	76
TABLA 25: TASA PROMEDIO DE MULTIPLICACIÓN POR TRATAMIENTO Y SUBCULTIVO, RESPECTO AL NÚMERO DE BROTES/EXPLANTE. ....	77
TABLA 26: TASA PROMEDIO DE MULTIPLICACIÓN POR TRATAMIENTO Y SUBCULTIVO, RESPECTO AL NÚMERO DE MICROMACOLLOS/EXPLANTE. ....	77

## Índice de figuras

	Página
FIGURA 1: DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DEL BAMBÚ. ....	4
FIGURA 2: DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES NATIVAS Y EXÓTICAS DE BAMBÚ EN EL PERÚ. ....	5
FIGURA 3: RIZOMA DE <i>GUADUA ANGUSTIFOLIA</i> . ....	7
FIGURA 4: ESTRUCTURA AÉREA DE <i>GUADUA ANGUSTIFOLIA</i> . ....	9
FIGURA 5: USOS DE LAS DIFERENTES PARTES DEL BAMBÚ. ....	15
FIGURA 6: EXPLANTE CON YEMA SEMIDIFERENCIADA. ....	35
FIGURA 7: FRASCO CONTENIENDO ESTACAS EN SOLUCIÓN DE DETERGENTE COMERCIAL. ....	36
FIGURA 8: MUESTRAS EN PLACA PETRI CON SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO Y TWEEN 20 .....	36
FIGURA 9: FRASCO PARA SIEMBRA EN MEDIO SÓLIDO (IZQUIERDA) Y TUBOS PARA MEDIO LÍQUIDO CON EL PAPEL FILTRO EN FORMA DE “PUENTE” (DERECHA). ....	40
FIGURA 10: DISECCIÓN DE YEMAS AXILARES CON AYUDA DE PINZAS Y BISTURÍ (IZQUIERDA) Y SIEMBRA EN TUBO DE ENSAYO CON MEDIO LÍQUIDO (DERECHA). ....	41
FIGURA 11: ESCALA DE NECROSIS PARA YEMAS DE BAMBÚ. ....	42
FIGURA 12: AUTOCLAVE: EQUIPO DE ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO. ....	43
FIGURA 13: CÁMARA DE FLUJO LAMINAR CON MATERIALES PARA SIEMBRA. ....	44
FIGURA 14: SIEMBRA DE YEMAS EN MEDIO DE DOBLE FASE, VISTA DESDE ARRIBA (IZQUIERDA) Y VISTA DE LADO (DERECHA). ....	44
FIGURA 15: MATRACES CON EXPLANTES EN CONDICIONES DE INCUBACIÓN EN SHAKER AUTOMÁTICO (IZQUIERDA) Y EN PENUMBRA (DERECHA). ....	45
FIGURA 16: MICROESTACA SEMBRADA EN MEDIO SÓLIDO CONTENIDO EN TUBO DE ENSAYO EN T7 (IZQUIERDA) Y TUBO DE ENSAYO CON EXPLANTES SEMBRADOS Y SELLADOS CON PARAFILM EN T7 (DERECHA). ....	46
FIGURA 17: ESCALA DE NECROSIS PARA MICROESTACAS DE BAMBÚ. ....	47
FIGURA 18: BROTES DESARROLLADOS A PARTIR DE MICROESTACAS EN EL TRATAMIENTO TRES (T3). ....	48
FIGURA 19: VERTIDO DE MEDIOS DE CULTIVO PARA MULTIPLICACIÓN, EN FRASCOS DE 200 ML. .....	49
FIGURA 20: PLÁNTULA DE BAMBÚ SUBCULTIVADO DE TUBO DE ENSAYO A FRASCO DE 200 ML. .....	50
FIGURA 21: SECUENCIA DEL REPIQUE DE VITRO-PLANTAS DE BAMBÚ. MICROMACOLLO ANTES DE LA SUBDIVISIÓN (IZQUIERDA). MICROMACOLLO LISTO PARA SER DIVIDIDAS (SUPERIOR DERECHA) Y SUBDIVISIÓN DE PLÁNTULAS (INFERIOR DERECHA). ....	51
FIGURA 22: DIVISIÓN DEL MICROMACOLLO EN SUB-GRUPOS PARA SUBCULTIVO. ....	51
FIGURA 23: FLAMEADO DE BOQUILLA DEL FRASCO GRANDE PREVIO A LA SIEMBRA. ....	52
FIGURA 24: SIEMBRA DE LOS NUEVOS MICROMACOLLOS OBTENIDOS DE LA DIVISIÓN DEL MICROMACOLLO INICIAL. ....	52
FIGURA 25: LOS NUEVOS MICROMACOLLOS EN CONDICIONES DE INCUBACIÓN. ....	53

FIGURA 26: FRASCO CONTENIENDO MICROMACOLLOS A LAS 6 SEMANAS LISTAS PARA ACLIMATAR.....	54
FIGURA 27: LAVADO DE MICROMACOLLOS CON AGUA POTABLE (IZQUIERDA) Y MICROMACOLLOS EN SOLUCIÓN DE BENOMILO (DERECHA). ....	55
FIGURA 28: MICROMACOLLOS DE <i>GUADUA ANGUSTIFOLIA</i> EN PROCESO DE ACLIMATACIÓN. ....	56
FIGURA 29: PORCENTAJE DE PRENDIMIENTO A LA 4TA SEMANA DE SIEMBRA, SEGÚN TRATAMIENTO. ....	59
FIGURA 30: GRADO Y PORCENTAJE DE NECROSIS A LA 4TA SEMANA DE SIEMBRA EN MEDIO MS ADICIONADO DE ZEA Y BA. ....	60
FIGURA 31: CONTAMINACIÓN POR HONGOS DURANTE LA FASE DE INICIACIÓN PARA MEDIO DE DOBLE FASE, A LA CUARTA SEMANA DE SIEMBRA.....	61
FIGURA 32: PORCENTAJE DE PRENDIMIENTO A LA 4TA SEMANA DE SIEMBRA DE YEMAS EN MEDIO DE DOBLE FASE. ....	62
FIGURA 33: PORCENTAJES Y GRADOS DE NECROSIS EN LA 4TA SEMANA DE EVALUACIÓN EN MEDIO DE DOBLE FASE. ....	63
FIGURA 34: BROTAÇÃO Y NECROSIS EN GRADO 3 A LAS CUATRO SEMANAS DE LA SIEMBRA EN MEDIO DE DOBLE FASE DEL TRATAMIENTO MS+2MG/L ZEA (T4). ....	64
FIGURA 35: CONTAMINACIÓN POR HONGOS Y BACTERIAS DURANTE LAS TRES SEMANAS DE EVALUACIÓN CON LOS TRATAMIENTOS ENSAYADOS EN MICROESTACAS. ....	65
FIGURA 36: PORCENTAJE DE BROTAÇÃO DURANTE LAS 3 SEMANAS LUEGO DE LA SIEMBRA DE MICROESTACAS.....	67
FIGURA 37: GRADOS DE NECROSIS A LA TERCERA SEMANA DE SIEMBRA DE LAS MICROESTACAS. ....	68
FIGURA 38: VITROPLANTAS DE <i>GUADUA ANGUSTIFOLIA</i> EN PASTILLAS PENSADAS (IZQUIERDA) Y PREMIX N°8 (DERECHA). ....	79
FIGURA 39: VITROPLANTAS A LOS 15 DÍAS DE INICIAR LA ACLIMATACIÓN EN DOS TIPOS DE SUSTRATO. ....	80

## Índice de anexos

	Página
ANEXO 1: FICHA TECNICA DEL SUSTRATO JIFFY F50.....	89
ANEXO 2: FICHA TECNICA DEL SUSTRATO PREMIX #8.....	90
ANEXO 3: DATOS DE CONTAMINACIÓN DURANTE LA FASE DE INICIACIÓN PARA MEDIO LÍQUIDO Y SÓLIDO EN YEMAS AXILARES.....	91
ANEXO 4: DATOS DE PRENDIMIENTO DURANTE LA FASE DE INICIACIÓN PARA MEDIO LÍQUIDO Y SÓLIDO EN YEMAS AXILARES.....	93
ANEXO 5: DATOS DE NECROSIS DURANTE LA FASE DE INICIACIÓN PARA MEDIO LÍQUIDO Y SÓLIDO EN YEMAS AXILARES.....	94
ANEXO 6: DATOS DE CONTAMINACION EN MEDIO DOBLE FASE EN YEMAS AXILARES.....	96
ANEXO 7: DATOS DE PRENDIMIENTO EN MEDIO DOBLE FASE EN YEMAS AXILARES.....	98
ANEXO 8: DATOS DE NECROSIS EN MEDIO DOBLE FASE EN YEMAS AXILARES.....	99
ANEXO 9: DATOS DE CONTAMINACION EN MEDIO SÓLIDO CON MICROESTACAS.....	101
ANEXO 10: DATOS DE PRENDIMIENTOS EN MEDIO SÓLIDO CON MICROESTACAS.....	102
ANEXO 11: DATOS DE NECROSIS EN MEDIO SÓLIDO CON MICROESTACAS.....	103
ANEXO 12: RESULTADOS ESTADÍSTICOS DEL NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE EN SUBCULTIVOS SIN DIVISIÓN.....	104
ANEXO 13: RESULTADOS ESTADÍSTICOS DEL NÚMERO DE HOJAS POR EXPLANTE EN SUBCULTIVOS SIN DIVISIÓN.....	107
ANEXO 14: RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LA TASA DE MULTIPLICACION.....	110
ANEXO 15: MICROMACOLLOS PROYECTADOS EN 101 SEMANAS CON PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>GUADUA ANGUSTIFOLIA</i> .....	112

## RESUMEN

Debido a que actualmente la tasa de multiplicación de *Guadua* es muy baja mediante métodos convencionales, es que en esta investigación se planteó desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* para la producción masiva de esta especie forestal. En el proceso de selección de explantes se comprobó que el material vegetal para la propagación *in vitro* de *Guadua angustifolia* es la micro estaca, con un porcentaje de aproximadamente 95% de éxito de explantes libres de patógenos y 80% de prendimiento para el T3 (MS + 6 mg/L BA) en la fase de establecimiento. El protocolo que se obtuvo para la “Propagación *in vitro* de *Guadua angustifolia* (Bambú) a partir de microestacas de plantas desarrolladas en invernadero” consiste en la obtención de microestacas conteniendo un nudo con una yema activa; seguido de la desinfección con benomilo 0,2% sulfato de estreptomicina 0,1% y 02 gotas de tween 20, hipoclorito de sodio al 1,1% y PPM (2ml/L), seguido de 3 semanas de la fase de iniciación, las dos primeras en oscuridad y la última en penumbra con la misma adición de PPM y BA 6mg/L, luego 5 subcultivos sin división cada 4 semanas (MS 4,43 g/L + BA 6mg/L) y 4 subcultivos con división cada 6 semanas, todo ellos con la adición de la citoquinina BA 6mg/L con el mismo MS (1962). En la fase de multiplicación las vitroplantas fueron incubadas en cámara de crecimiento vegetal a una temperatura de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 70% de humedad relativa, fotoperiodo de 16 horas luz e intensidad lumínica de 5440 lux. La aclimatación duró 8 semanas en sustrato PREMIX #8 en cámara climática. Con este protocolo se logró una tasa de multiplicación de 2,97 micromacollos/6 semanas.

Palabras claves: Micropropagación, *Guadua angustifolia*, citoquininas, auxinas, aclimatación.

## ABSTRACT

Due to the fact that the multiplication rate of *Guadua* is currently very low through conventional methods, is that in this research it was proposed to develop an *in vitro* propagation protocol for the mass production of this forest species. In the explant selection process, it was found that the plant material for the *in vitro* propagation of *Guadua angustifolia* is the micro stake, with a success rate of approximately 95% of pathogen-free explants and 80% of seizure for T3 (MS + 6 mg/L BA) in the establishment phase. The protocol that was obtained for the "*In vitro* propagation of *Guadua angustifolia* (Bamboo) from micro stakes of plants developed in greenhouses" consists of obtaining micro stakes containing a knot with an active bud; followed by disinfection with benomyl 0.2% streptomycin sulphate 0.1% and 02 drops of tween 20, sodium hypochlorite 1.1% and PPM (2ml/L), followed by 3 weeks of initiation phase, the first two in darkness and the last in darkness with the same addition of PPM and BA 6mg/L, then 5 subcultures without division every 4 weeks (MS 4.43 g/L + BA 6mg/L) and 4 subcultures with division every 6 weeks, all of them with the addition of cytokinin BA 6mg/L with the same MS (1962). In the multiplication phase of vitroplants, were incubated in a plant growth chamber at a temperature of 26 + - 2°C, 70% relative humidity, 16 light-hour photoperiod and 5440 lux luminous intensity. The acclimatization lasted 8 weeks in PREMIX substrate #8 in climatic chamber. With this protocol, a multiplication rate of 2.97 micromaccollos / 6 weeks was achieved.

Keywords: Micropropagation, *Guadua angustifolia*, cytokinins, auxins, acclimatization.

## ABREVIATURAS

BA: Bencilaminopurina

AIA: Ácido indolacético

ANA: Ácido 1-naftalenacético

AIB: Ácido indolbutírico

DCA: Diseño completamente al azar

HCl: Ácido clorhídrico

INIA: Instituto Nacional de Innovación Agraria

MINAGRI: Ministerio de Agricultura y Riego

MS: Medio de cultivo de Murashigey Skoog (1962)

m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar

NaOH: Hidróxido de sodio

PPM: Mezcla Preservativa de Plantas

R<sub>1...3</sub>: Repetición 1 hasta la repetición 3

T<sub>1...16</sub>: Tratamiento 1 hasta el tratamiento 16

ZEA: Zeatina

2-ip : 2isopentenil-adenina

## I. INTRODUCCIÓN

Los bambúes son el único grupo de gramíneas enteramente adaptado y diversificado a partir de los bosques (Londoño, 2005). Esta planta en su totalidad [...] puede ser utilizada para diversos fines, desde épocas prehistóricas, hasta el presente y con la tecnología que proyecta hacia el futuro, su uso no tiene límites salvo la imaginación del hombre (Morán, como se citó en Añazco, 2013).

Londoño (2005) refiere que los bambúes dentro de la familia Poaceae forman la subfamilia Bambusidae de los cuales tenemos dos tribus, los leñosos y los herbáceos. Entre los bambúes leñosos que predominan en América sobresale la especie *Guadua angustifolia*, “seleccionada como una de las 20 mejores del mundo por sus excelentes propiedades físico – mecánicas, su gran tamaño (20 – 30 m) y por su comprobada utilización en la industria de la construcción, pisos, paneles y aglomerados” (Añazco 2013). Sin embargo, la propagación sexual de esta especie tiene problemas para la multiplicación a gran escala, pues se requiere de semillas y la producción de semillas se presenta de los 30 a 60 años de su ciclo de vida (Mishra, Patel, Tadav, Shirin y Ansari como se citó en Mendoza, Tamayo y Pacheco, 2010). Además, “la viabilidad de la semilla es muy baja y su tiempo de germinación es prolongado” (Mendoza *et al.* 2010).

La micropropagación vegetal “es la técnica que mayor aporte práctico ha brindado dentro del campo de la biotecnología” (Ramírez, 2013). Sus posibles usos van desde los estudios teóricos de fisiología y bioquímica vegetal, obtención de plantas libres de patógenos, propagación masiva, conservación de germoplasma, mejoramiento genético mediante inducción de mutaciones y selección *in vitro*, entre otros (Pérez, como se citó en Ramírez, 2013); y “la ingeniería genética” (Herrera, como se citó en Ramírez, 2013).

Debido a que actualmente la tasa de multiplicación de *Guadua* es muy baja mediante métodos convencionales, es que se requiere desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* para la propagación masiva de esta especie forestal.

En esta investigación se plantean los objetivos 1) determinar el método de desinfección y el medio de cultivo adecuado para el establecimiento *in vitro* de microestacas de *Guadua angustifolia*; 2) comprobar que la composición del medio de cultivo permite superar la tasa de multiplicación de *Guadua angustifolia* reportada por métodos convencionales y 3) determinar el mejor sustrato en la etapa de aclimatación en función de la menor tasa de mortandad de las vitroplántulas de *Guadua angustifolia*.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. GENERALIDADES DE LA ESPECIE

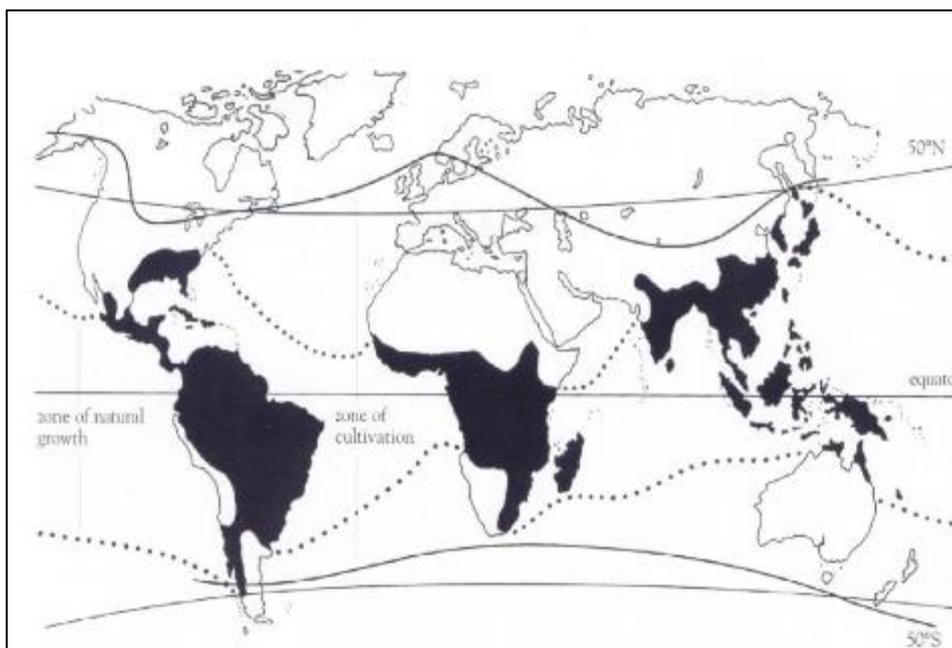
#### 2.1.1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA Y TAXONÓMICA

El bambú es una planta gramínea, la cual se clasifica de la siguiente manera según Londoño (2002):

- Reino : Plantae
- Clase : Liliopsida
- Orden : Poales
- Familia : Poaceae
- Subfamilia : Bambusoideae
- Tribu : Bambusodae
- Género : *Guadua*
- Especie : *angustifolia*

#### 2.1.2. DISTRIBUCIÓN

Debido a su adaptabilidad, los bambúes son una categoría paraguas que contiene muchas especies diferentes tales como la *Guadua angustifolia*, *Bambusa vulgaris*, *Chusquea spp.* entre otras, tienen una amplia distribución geográfica y son constituyentes importantes de la flora natural de muchas partes de las regiones tropicales, subtropicales y templado-medio del mundo. Se encuentran en mayor abundancia en el sur y sureste de Asia, desde la India a través de China, Japón y Corea. La isla de Madagascar es rica en géneros y especies endémicas, teniendo más clases conocidas en toda el África. En Australia también se han identificado especies endémicas (Figura 1). En el Hemisferio occidental, la distribución natural conocida se extiende desde los 39°25'N en los Estados Unidos hasta los 47°S en Argentina (Añazco, 2013).



**Figura 1: Distribución mundial del bambú.**

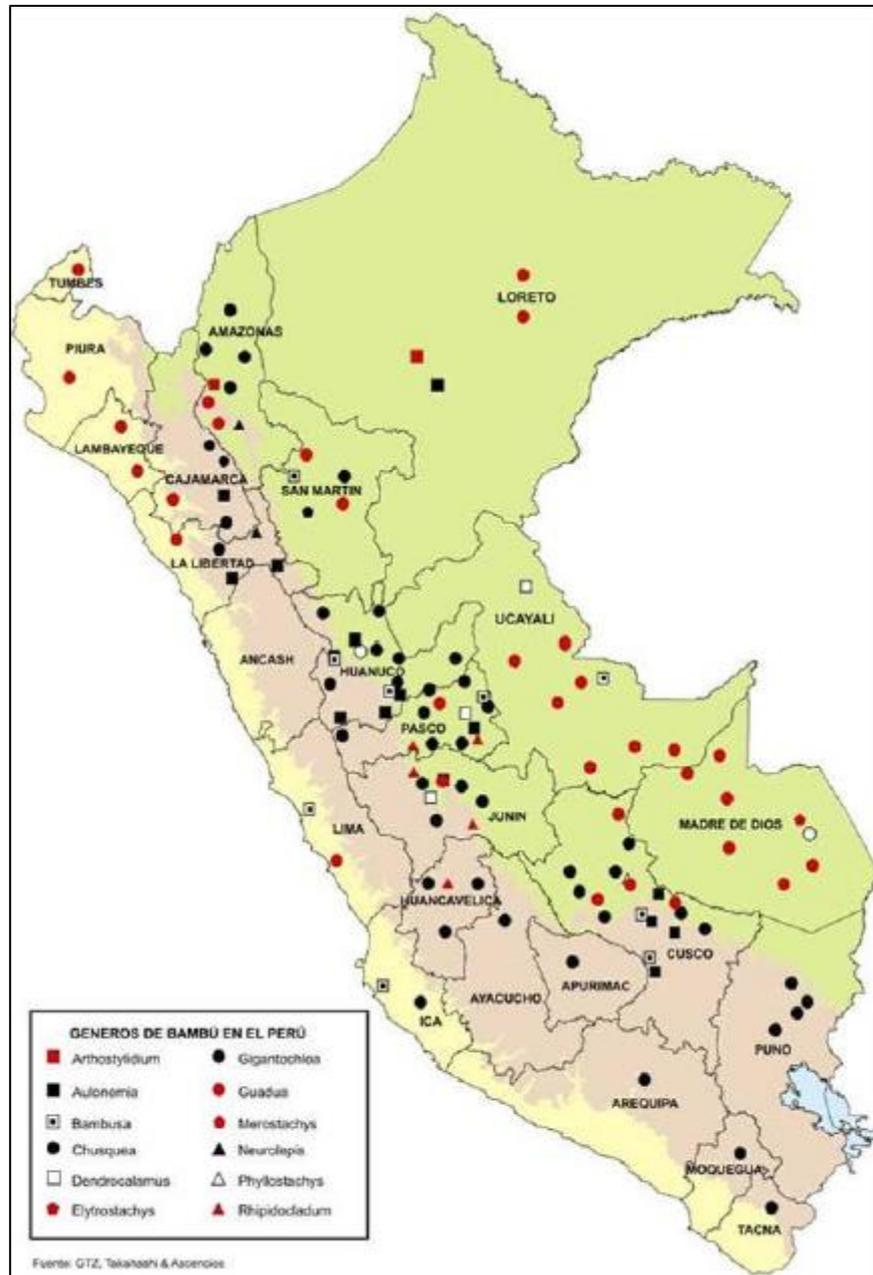
Fuente: Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC) y Corporación Aldea Global, 2005.

En América Latina se encuentran 20 géneros y 429 especies de bambúes leñosos, las cuales se distribuyen desde los 27°N (*Otate acuminata* se encuentra en la parte oeste-norte de México) a 47°S (*Chusquea culeou* en Chile). Del total de 1,100 especies y 65 géneros de bambúes leñosos (Londoño, como se citó en Añazco, 2013).

Londoño (2005) indica que “América Latina tiene 39% de los géneros. Brasil tiene la mayor diversidad de especies de bambú (137), seguido por Colombia (70), Venezuela (60), Ecuador (42), Costa Rica (39), México (37) y Perú (37)”. En el Perú, los bambúes se encuentran distribuidos prácticamente en todo el territorio nacional (Figura 2).

En el sureste de la Amazonía, en los departamentos de Ucayali, Madre de Dios, Cusco y Junín, existen grandes extensiones de bosques naturales con bambú, que de acuerdo a la información oficial del Instituto Nacional de Recursos Naturales, corresponden a aproximadamente 39,978 km<sup>2</sup> de bosques con bambú, siendo las especies dominantes *Guadua angustifolia*, *G. sarcocarpa*, *G. superba*, *G. chacoensis* y *G. paniculata* (Londoño, como se citó en Ministerio de Agricultura, luego Ministerio de Agricultura y Riego [MINAGRI], 2010); de manera similar, en los departamentos del noroeste del país, especialmente en Amazonas, San Martín, Cajamarca y en menor proporción en Tumbes y Piura, se encuentran bosques naturales de bambú, mayormente del género *Guadua angustifolia* o *G. affín*

*angustifolia*, además de diversas especies del género *Chusquea spp.* En el valle de Cañete, en ambos márgenes del río del mismo nombre, existen plantaciones de *Guadua angustifolia* que son aprovechadas por la población local para sus construcciones rústicas (MINAGRI, 2010).



**Figura 2: Distribución de especies nativas y exóticas de bambú en el Perú.**

Fuente: MINAGRI 2010.

### **2.1.3. CLIMA**

Los bambúes en general prefieren climas tropicales o subtropicales con una temperatura media anual entre 20° y 30°C, las temperaturas altas favorecen el crecimiento. Algunas especies como *Oxythenanthera abyssinica* toleran temperaturas entre 40° y 50°C, mientras que otras (*Phyllostachys mitis*) pueden soportar la nieve o temperaturas invernales tan bajas como -8°C. En cuanto a la precipitación tanto el clima tropical como el clima subtropical son apropiados. Algunas especies crecen en sabanas de bosque semidecíduos con una época seca muy marcada (Liese, 1985).

La precipitación requerida del bambú varía desde los “1000 mm hasta 4050 mm anuales” y “en particular, *Guadua angustifolia* se desarrolla muy bien desde el nivel del mar hasta los 1600 m.s.n.m, pero también crece en buenas condiciones hasta los 2000 m.s.n.m., sin embargo, los rendimientos son más bajos” (Pérez como se citó en Añazco, 2013).

La *Guadua* tiene un óptimo de temperaturas entre los 20°C y 26°C. Requiere precipitaciones entre los 1300 y 4000 mm, con buena distribución a lo largo de todos los meses del año y humedad relativa del 80%. La luminosidad para el excelente desarrollo de la *Guadua* debe estar comprendida entre las 1800 y 2000 horas luz/día, equivalente entre 5 a 6 horas luz/día (Añazco, 2013).

### **2.1.4. SUELOS**

El MINAGRI (2008) indica que “la mayor parte de los bambúes se desarrollan en suelos franco arenosos y franco arcillosos y con buen drenaje. Cada especie tiene un hábitat definido, siendo por esta razón en muchos casos indicadores de distintos tipos de bosque”, “el bambú no resiste suelos alcalinos o salinos y que tienen un óptimo desarrollo en un rango de pH entre 5.0 y 6.5” (Liese, 1985 y Widmer como se citó en Montalván, 1992).

### **2.1.5. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA *Guadua angustifolia***

Para el caso de la *Guadua angustifolia* que es un bambú leñoso la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC) y la Corporación Aldea Global (2005) indican que “los estados de desarrollo de la *Guadua* le permiten tener diferentes matices de verde”, además describen las partes de la planta de la siguiente manera:

### **2.1.6. RAÍCES**

En el tallo de *Guadua* el sistema subterráneo lo conforman tallos modificados que se denominan rizomas, los cuales crecen en forma horizontal y cumplen la función de

anclaje, absorción, conducción y almacenamiento de nutrientes. Están conformados por tres partes: el rizoma, raíces y raicillas adventicias o alimentadoras.

En la Guadua las raíces están especializadas en la obtención de agua y nutrientes, dejando las funciones de reserva nutricional y soporte en un altísimo porcentaje al rizoma. De la parte ventral del rizoma se generan aproximadamente el 40% de las raíces, el 60% restante de las raíces brotan de las ramificaciones del rizoma.

De las raíces emergen raicillas laterales de diámetros mucho menores, estas raicillas poseen pelos absorbentes que facilitan la absorción de agua y minerales por la planta, a estas se les llama raicillas alimentadoras y están ubicadas en los primeros 30 cm. del suelo.

El sistema de rizomas de la Guadua es de tipo “Paquimorfo” (Figura 3) el cual es común en los bambúes tropicales, en donde el rizoma es fusiforme, grueso, sólido macizo, y promueven el crecimiento de los culmos en grupos o cepas aglutinadas (macollas). Su cuello puede ser corto o largo; sus yemas laterales solo producen más rizomas y las yemas axilares solo culmos. Los entrenudos son más anchos que largos.



**Figura 3: Rizoma de Guadua angustifolia.**

Fuente: MINAGRI 2010.

### **2.1.7. TALLO O CULMO**

Son ejes cilíndricos leñosos y huecos que se originan en la punta (ápice) del rizoma, el cual al modificarse toma una dirección ascendente o vertical. Está conformado por nudos y entrenudos que presentan diámetros y longitudes diferentes, según la parte donde se ubiquen.

## CARACTERISTICAS

- Su diámetro y altura dependen del tamaño del rizoma que los genera.
- El tallo una vez que brota del suelo lo hace con un diámetro definido (no presenta crecimiento diamétrico), el cual disminuye proporcional y gradualmente con la altura.
- Un tallo de Guadua en condiciones ambientales normales presenta entre 70 y 80 entrenudos con longitudes de 26 centímetros y diámetros entre los 6 y 12 centímetros, alcanzando una altura total promedio de 18 a 20 metros.
- El primer tercio del culmo está provisto de ramas basales (riendas), el tercio medio no presenta ramas y el tercio final es más delgado y está provisto por ramas con hojas.
- Durante sus primeros seis (06) meses de vida se denomina renuevo y está cubierto en su totalidad por hojas caulinares.

### 2.1.8. RAMAS

En la Guadua se observan dos tipos de ramas, cada una con funciones específicas, siendo estas:

- Ramas Basales (Riendas). - Estructuras protectoras del tallo que se ubican en los primeros 8 o 9 metros y tienen una longitud promedio de 3 a 5 metros. Poseen nudos y entrenudos y en cada nudo se originan entre 2 y 4 espinas. Pueden ser empleadas de acuerdo a su edad y posición para propagación de material vegetal
- Ramas Apicales o Superiores. - Se localizan en el tallo a partir de los 12 metros de altura, en estas ramas se encuentran las hojas y se realizan casi todas las actividades fotosintéticas de la planta. Su longitud disminuye de manera gradual hacia la punta de la Guadua dando forma de triángulo. Conforman lo que se denomina el copo de la planta.

### 2.1.9. HOJAS

La Guadua presenta la modificación de estos órganos para que desarrollen funciones específicas.

- Hojas Típicas o Láminas Foliareas. Estas hojas son las que elaboran las sustancias nutritivas de la planta. Su coloración es verde oscuro. En una planta adulta se encuentran entre 14.000 y 22.000 hojas.
- Hojas Caulinares. Cumplen funciones de protección se encuentran en el tallo durante los primeros estados de crecimiento.

En la Figura 4 se presenta la estructura aérea de la *Guadua angustifolia*.



Figura 4: Estructura aérea de *Guadua angustifolia*.

a) Entrenudo b) Nudo c) Yema d) Hoja caulinar

#### 2.1.10. INFLORESCENCIA Y SEMILLA

En la *Guadua angustifolia* se presenta una floración de tipo esporádico (algunos individuos en el guadual) observándose en los meses de abril y noviembre, en Colombia. La inflorescencia se manifiesta por la aparición de espiguillas, el follaje de la planta cambia su color verde por un tono amarillo y pierde parte de sus hojas, es el signo precursor de una nueva etapa en la vida de la planta.

La semilla de la *Guadua* se asemeja a un grano de arroz en su forma, tamaño y cubierta. Tiene una coloración blanca en su interior y café claro en su exterior; tiene entre 5 y

8 mm de largo por 2 a 3 mm de grosor. Está contenida en una espiga. La obtención de semillas de *Guadua angustifolia* es difícil debido al alto porcentaje de espigas vacías y semillas no fértiles.

## **2.2. PROPAGACIÓN**

### **2.2.1. REPRODUCCIÓN SEXUAL**

Es el método convencional de reproducción de la gran mayoría de las especies vegetales y es aquel que se desprende de la germinación de su semilla. Para el caso de la *Guadua* se presenta una limitación en el sentido de ser una especie de floración esporádica, es decir, solo algunos individuos del mismo “manchal” (grupo de varias *guaduas*) florecen en periodos irregulares que generalmente coinciden con las épocas de lluvia. Además de esto, las semillas tienen un periodo de viabilidad muy corto y las plantas producidas por este método tienen un crecimiento demasiado lento. Por lo anterior este método de reproducción no es viable para la *Guadua angustifolia* (Botero, 2003).

### **2.2.2. PROPAGACIÓN ASEXUAL**

Es el proceso mediante el cual se utilizan partes de la planta para generar o regenerar nuevas plantas. Actualmente los métodos más usados son la siembra de rizomas o raíces, secciones de tallo y el cultivo de “chusquines” o brotes pequeños del rizoma.

El primer método es la siembra de rizomas, lo que genera brotes gruesos y vigorosos en corto tiempo, pero es antieconómico pues la extracción de las raíces (caimanes) de la *Guadua* es muy complicada además de no considerarse método de multiplicación sino de trasplante. El rizoma del bambú es una prolongación del tallo que cumple la función de almacén de nutrientes, a los que se les cortan en fracciones de 40 – 50 cm, cuidando de no dañar las yemas, para ser plantados individualmente (Catasús, como se citó en Lárraga et al., 2011). Este método requiere mucha mano de obra que lo hace costoso, además de tener baja tasa de multiplicación (Gielis, Peeters, Gillis, Oprins y Debergh, 2001).

La siembra de secciones de tallo se puede realizar horizontal o verticalmente; el agregar agua a los entrenudos mejora los prendimientos y se pueden utilizar tallos de dimensiones variables, teniendo en cuenta que siempre deben contener un nudo con yema activa para que desarrolle la nueva planta. A pesar de haberse obtenido prendimientos cercanos al 70% se consideran que para la mayoría de los casos no se justifica la cosecha de tallos verdes para establecer nuevas plantaciones (Botero, 2003).

El método por estacas utiliza ramas laterales de una planta adulta y chusquines en crecimiento. En *Guadua angustifolia* no es muy usado por los bajos porcentajes de brotación y prendimiento sumado a la experiencia que se requiere para la manipulación de los mismos (Gallardo et al., como se citó en Lárraga et al., 2011).

La principal vía de propagación es por chusquines, estos se encuentran en la base de las plantaciones, y se originan de yemas adventicias en los rizomas. Estas emergen una vez que el culmo ha sido cortado. Este método de propagación es muy recomendable por alto prendimiento y desarrollo en el género *Guadua*, cada brote llega a producir de dos a doce plántulas a los cuatro meses. Sin embargo, esta vía presenta limitaciones como la poca disponibilidad de material vegetal (Gallardo et al., como se citó en Lárraga et al., 2011).

El MINAGRI (2010) indica que la *Guadua angustifolia* es una especie muy bondadosa para propagar. Los chusquines que generan los rizomas de las plantas adultas vienen a representar la mejor opción, pero requieren de experiencia en el manejo. La extracción de los hijuelos se debe realizar durante el invierno, periodo en donde las plantas se encuentran en reposo vegetativo, extrayendo las plantitas con mucho cuidado sin afectar a la planta madre ni al hijuelo. Una vez extraída las plantitas, estas se acondicionan en las camas previamente acondicionadas en ambientes de invernadero conteniendo materia orgánica las cuales se mantendrán húmedas para facilitar el enraizamiento; periodo promedio de 60 a 90 días, para luego proceder al deshije y repicado. El deshije consiste en dividir las plántulas madres previamente establecidas en los bancos de propagación, las cuales producen entre siete y quince nuevas plántulas. Esta fase se efectuará cada 60 a 90 días, dependiendo el desarrollo de las plántulas, que generalmente presentaron en promedio 30 cm – 40 cm de altura. Las plantas repicadas serán acondicionadas en ambientes con sombra al 50% de filtración, acondicionadas con materiales disponibles en el lugar como hojas, o en su defecto con malla raschel, durante 10 – 15 días; las mismas que serán administradas con riegos frecuentes y ligeros, tratando de mantener los húmedos. Luego acondicionar en condiciones normales de vivero por un periodo de 2 -3 meses. Las plántulas o chusquines serán trasplantadas, cuando han adquirido en promedio 30 cm de altura, presenten numerosos brotes, y estén vigorosos. Para la apertura de los hoyos se recomienda efectuarlas 30 días antes de la plantación, para facilitar la actividad microbiana en las paredes; y un mejor desarrollo de la planta.

Otra forma de propagación asexual es “el trasplante directo, el cual requiere plantas jóvenes de dos a tres años de desarrollo”, las cuales se colectan del campo y se llevan al nuevo lugar a desarrollar la plantación (Catasús, como se citó en Lárraga et al., 2006).

Una alternativa de la propagación vegetativa es la regeneración y multiplicación de plantas *in vitro* (Roca y Mroginsky, como se citó en Hernández y Gatica 2001), mediante esta técnica se pueden obtener copias idénticas de una especie en un tiempo corto, generando un gran número de plántulas para su cultivo (Abdelnour y Escalant, como se citó en Hernández et al., 2001). Ya que la Guadua es una planta de propagación asexual, esta técnica (*in vitro*) es una alternativa para su propagación masiva.

### **2.3. IMPORTANCIA ECOLÓGICA**

Salas (2006) indicó que la Guadua es una planta que aporta múltiples beneficios para el medio ambiente y el hombre, sus productos cuando son empleados como elementos integrales de la construcción de viviendas funcionan como reguladores térmicos y de acústica, el rápido crecimiento de la Guadua, según Giraldo y Sabogal (1999), permite según el “Estudio aportes de biomasa aérea” realizado en el Centro Nacional para el Estudio del Bambú-Guadua, producir y aportar al suelo entre 2 y 4 ton/ha/año de biomasa, volumen que varía según el grado de intervención del guadual; esta biomasa constituye entre el 10 y el 14% de la totalidad de material vegetal que se genera en un guadual. La biomasa es importante, ya que contribuye a enriquecer y mejorar la textura y estructura del suelo. El aporte anual de biomasa general de un guadual en pleno desarrollo oscila entre 30 y 35 ton/ha/año. Los rizomas y hojas en descomposición conforman en el suelo estructuras similares de esponjas, evitando que el agua fluya de manera rápida y continua, con lo cual se propicia la regulación de los caudales y la protección del suelo a la erosión. El sistema entretejido de rizomas y raicillas origina una malla, que les permite comportarse como eficientes muros biológicos de contención que controlan la socavación lateral y amarran fuertemente el suelo, previniendo la erosión y haciendo de la Guadua una especie con función protectora, especial para ser usada en suelos de ladera de cuencas hidrográficas. El agua proveniente de la lluvia que cae sobre el guadual, permanece mucho tiempo en él, toma diversos caminos y tarda más tiempo en caer al suelo, dando como resultado la “regulación de caudales,” ya que si la misma cantidad de agua se precipitara sin obstáculos ocasionaría crecidas súbitas y no se formarían reservas que son empleadas dentro del sistema cuando se requiere, especialmente en épocas de verano. Adicionalmente el dosel o bóveda que se conforma por el follaje en riveras de fuentes de agua impiden las pérdidas por altas y rápidas tasas de evaporación (súbita) contribuyendo así a la

mencionada regulación. Entre los aportes más valiosos de la especie se debe mencionar su comportamiento como una bomba de almacenamiento de agua, cuyo funcionamiento es el principio de “vasos comunicantes” donde en épocas húmedas absorbe importantes volúmenes de agua que almacena tanto en su sistema rizomático como en el tallo. Se ha determinado, según estudios realizados en la hacienda Nápoles, Municipio de Montenegro (Sabogal, como se citó en Salas, 2006) y en el Centro Nacional para el Estudio del Bambú-guadua (Giraldo, como se citó en Salas, 2006) que una hectárea de Guadua puede almacenar 30,375 litros de agua, es decir, el agua para 150 personas por día (se asume un consumo promedio de 200 litros/día/persona). En época de verano cuando se percibe la necesidad de agua en el suelo, la que se encuentra almacenada en la planta es aportada de manera paulatina al suelo (esponja que suelta líquido).

#### **2.4. IMPORTANCIA ECONÓMICA**

El MINAGRI (2010) al referirse a la importancia del cultivo e industria del bambú en el mercado externo, indica que más de la mitad de la humanidad lo viene utilizando a diario; pues representa una alternativa viable ante materiales más costosos. También refieren que a corto y mediano plazo esperan que su uso sea masivo como fuente de energía en reemplazo de los combustibles fósiles ya que es un recurso renovable y de rápido crecimiento. El mercado mundial del bambú supera los diez mil millones de dólares anuales, con un potencial de crecimiento de 20 mil millones al año 2015.

El bambú es utilizado en el Perú desde épocas ancestrales; actualmente su uso está limitado a la industria de la construcción de viviendas, albergues turísticos, mueblería fina, cercos perimétricos, defensas ribereñas, arborización urbana, artesanía, como tutores en cultivos agroindustriales, forraje, y algunas comunidades campesinas utilizan los brotes para consumo humano, etc.

El MINAGRI (2010) también menciona que las especies de bambú nativas y exóticas existentes en nuestro territorio, presentan una gran capacidad adaptativa a los diferentes ecosistemas, que una vez establecidas, resisten desde lluvias prolongadas a grandes periodos de sequía, suelos ácidos a un poco alcalinos, por lo que debe ser considerado como uno de los cultivos más importantes para el desarrollo económico de la sociedad, por las siguientes características:

- Su elevada productividad de brotes en determinadas especies permite establecer paquetes tecnológicos para la industria alimentaria.
- Su complejo sistema radicular se adhiere al suelo presentando un excelente retenedor de suelos y, asociado a su rápido crecimiento representa una alternativa para evitar la degradación de suelos y oportunidad de inversión en el sector forestal
- La propagación asexual permite la difusión masiva del cultivo, permitiendo que la población rural ejecute libremente los programas de reforestación.
- Grandes posibilidades de sembrar bambú para la industria de pulpa para papel, y tableros aglomerados, debido a que en el país existen más de diez millones de hectáreas degradadas; y que su incorporación al sector productivo representaría fuente de riqueza y empleo masivo en la población rural.

## **2.5. USOS DEL BAMBÚ**

Según José Mercedes (2006), la diversificación del uso del Bambú se obtiene según su edad y la parte de la planta. Por ejemplo, a los 30 días se puede utilizar como alimento humano y a los 3 años como estructura para construcción.

Takahashi, s/f, en el Plan Nacional de Promoción del Bambú del MINAGRI (2010) presenta (Figura 5) el uso integral del bambú (*Guadua angustifolia*) según las partes de la planta, lo que da una idea general de la utilidad que tiene como producto, coincidiendo con Mercedes (2006).

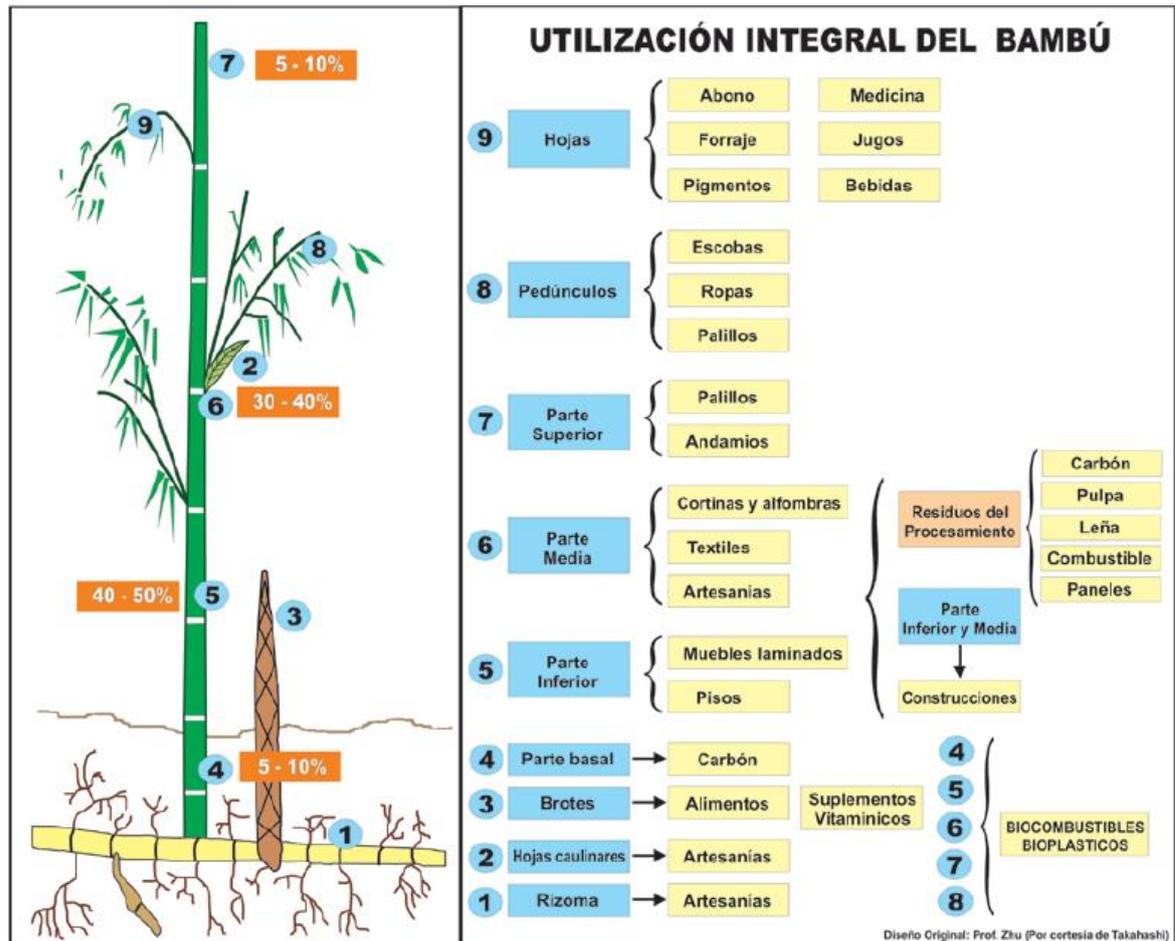


Figura 5: Usos de las diferentes partes del bambú

Fuente: MINAGRI, 2010.

## 2.6. MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación es un sistema de propagación asexual, a partir de un segmento de una planta madre, que da como resultado la propagación masiva de plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. Con esta biotécnica se incrementa de forma exponencial el número de plantas en microexplantes menores a 1 cm de longitud o de diámetro, en los que se forman minúsculos brotes que se desarrollan hasta la formación de plántulas, mediante el fenómeno de la regeneración vegetal. Lo anterior se explica debido a que las células vegetales son capaces de generar una planta a partir de una simple célula, proceso conocido como “totipotencialidad” (Salgado, 2015).

La formación de plantas en tejidos vegetativos como los tallos y las hojas, puede llevarse a cabo por dos diferentes maneras, en tejidos sin diferenciación celular (callos) y de forma directa en los explantes cultivados, regenerando plantas mediante la formación de brotes (organogénesis) o de embriones somáticos (embriogénesis somática). Actualmente, la

micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas (Murashige, como se citó en Villalobos y Thorpe 1991), ornamentales (Hughes, como se citó en Villalobos et al., 1991) y, más recientemente en especies leñosas (Thorpe como se citó en Villalobos et al., 1991). En algunas especies, esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación; las más importantes son:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en un espacio reducido, a bajos costos y en tiempos cortos (respecto a los métodos convencionales de propagación).
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material vegetal de un país a otro.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos.

## **2.7. ORGANOGÉNESIS**

Jiménez (1998) indica que la organogénesis se refiere a la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsiguiente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el enraizamiento. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (organogénesis indirecta). En contraste con la embriogénesis somática, en la vía organogénica para lograr la formación de una planta completa, ya sea por vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que se favorece así la formación de brotes e inhiben la formación de raíces y viceversa.

La organogénesis ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa, en donde podemos diferenciar dos vías: la formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias.

### **2.7.1. FORMACIÓN DE YEMAS AXILARES**

Hu y Wang como se citó en Jiménez (1998) refieren que esta técnica se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas o primordios de hojas, los cuales son divididos y subcultivados repetidamente. A pesar que este método no es el más rápido, ha sido el más utilizado para la propagación comercial debido a su estabilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies y a la estabilidad genética de las plantas regeneradas, siendo este el sistema de regeneración en el cual se reportan los menores índices de variación genética.

### **2.7.2. EXPLANTE**

Litz y Jarret (2004) refieren que el explante “es un tejido u órgano que es aislado de una planta para iniciar los trabajos de micropropagación”. La selección de un explante con características adecuadas es esencial para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, la elección se hace en base al objetivo a estudiar y la especie vegetal involucrada (Cardoza, 2005).

Si la elección del explante no limita la propagación masiva, entonces la selección se hace en base a la disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad y la rápida respuesta *in vitro*. Los explantes pueden ser tomados de plantas que son germinadas en invernadero, en campo o en condiciones asépticas, *in vitro* (Roca y Mroginski, 1993).

Se ha observado que el uso de material vegetal adulto ha dificultado el cultivo de tejidos *in vitro* más que cuando se trabaja con material juvenil (material revigorizado, semillas, embriones o explantes de árboles jóvenes) ya que estos tienen mayor grado de actividad meristemática, por lo tanto, tienden a tener mayor plasticidad *in vitro* (Yildiz como se citó en Gamarra, 2014). Son muy pocas las plantas que se han podido regenerar a partir de explantes de árboles maduros (Yepes, como se citó en Gamarra 2014)

El tamaño del explante puede determinar la respuesta *in vitro* (Yildiz, como se citó en Gamarra, 2014). Los explantes grandes son más difíciles de esterilizar en comparación con los pequeños. Sin embargo, la viabilidad y la capacidad regenerativa de explantes muy pequeños tiende a ser baja además de que son dañados fácilmente (Litz et al., 2004).

### **2.7.3. MEDIO DE CULTIVO**

El medio de cultivo más utilizado es la formulación del medio basal de Murashige y Skoog (1962) y se emplea como medio de cultivo basal para un grupo importantes de plantas de interés para la alimentación y con fines ornamentales.

**Tabla 1: Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) - 1962**

COMPUESTO	COMPONENTES	mg/L
<b>Inorgánicos</b>	Nitrato de amonio	1650,000
	Ácido bórico	6,200
	Cloruro de calcio anhidro	332,200
	Cloruro de cobalto hexahidratado	0,025
	Sulfato cúprico pentahidratado	0,025
	EDTA disódicodihidratado	37,260
	Sulfato ferroso heptahidratado	27,800
	Sulfato de magnesio anhidro	180,700
	Sulfato de manganeso monohidratado	16,900
	Ioduro de potasio	0,830
	Nitrato de potasio	1900,000
	Fosfato de potasio monobásico	170,000
	Molibdato de sodio dihidratado	0,250
	Sulfato de Zinc heptahidratado	8,600
	<b>Orgánicos</b>	Mio-inositol
Tiamina.HCl		0,100
Piridoxina.HCl		0,500
Ácido nicotínico		0,500
Glicina		2,000

Fuente: Murashige y Skoog (1962).

El pH del medio basal es importante, ya que este influye en el consumo de varios componentes del medio, así como un amplio rango de las regulaciones de las reacciones bioquímicas que ocurren en el cultivo de tejidos (Owen et al., como se citó en Gamarra, 2014). La mayoría de los medios son ajustados a un pH de 5,2 a 5.8. Los pH ácidos parecen no afectar los tejidos vegetales, pero retrasa el crecimiento de contaminantes potenciales. Sin embargo, pH altos son requeridos para ciertos cultivos (Cardoza, 2005).

Como parte importante y fuente de carbono y energía del medio basal, Sharry, Ademsy y Abedini (2015) afirman que se pueden utilizar sustancias puras o mezclas de sustancias orgánicas, como sustancias puras más comunes se encuentran los azúcares. entre ellos, es común el empleo de monosacáridos como la glucosa, disacáridos como la lactosa y polisacáridos como el almidón. La sacarosa y la glucosa se utilizan en el cultivo de tejidos de muchas especies. La fructuosa, maltosa, celabiosa, rafinosa y otras, se les usa como fuente de carbono para algunas variedades de tejidos. La mejor fuente de carbohidratos (2-5% p/v), y la más utilizada en cultivos *in vitro* es la sacarosa.

#### **2.7.4. REGULADORES DE CRECIMIENTO**

A los compuestos orgánicos sintetizados por las plantas que influyen sobre el crecimiento y desarrollo se les llama fitohormonas. Aparte de estos productos naturales, se han desarrollado también otros de tipo sintético, que pueden tener una actividad similar a la de los primeros. Al conjunto de todos estos productos se denominan reguladores de crecimiento (fitorreguladores) y son los responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza (Luna, 2002).

Los fitorreguladores juegan un papel muy importante en las vías de desarrollo de las células y tejidos en medios de cultivo. Las auxinas, las citoquininas y las giberelinas son de gran importancia en cultivo *in vitro*; sin embargo, el tipo y la concentración de los fitorreguladores dependen principalmente de la especie, el tejido u órgano y el objetivo del experimento (Adobkar et al. como se citó en Gamarra, 2014). En procesos de regeneración las auxinas y las citoquininas son los fitorreguladores más usadas, ya que altas concentraciones de auxinas generalmente favorecen la formación de raíces. Altas concentraciones de citoquininas favorecen la regeneración de brotes, pero cuando se aplica una adecuada concentración de auxinas y citoquininas pueden inducir la regeneración de brotes y raíces a partir de callos o brotes directos (Smith, 2013).

#### **2.7.5. AGENTES GELIFICANTES**

Los medios de cultivo usados pueden ser líquidos, semisólidos o sólidos, esto depende del tipo de cultivo. Para cualquier tipo de tejido se requiere que las células o los tejidos vegetales crezcan en la superficie del medio (Roca y Mroginski como se citó en Gamarra 2014), los cuales en su gran mayoría son utilizados en estado semisólido, lo cual se logra con el empleo de distintos agentes gelificantes como el agar, gelrite o phytigel (Orellana, 1998).

Orellana (1998), refiere que existen diferencias en el crecimiento y multiplicación de los explantes en dependencia del tipo de agente gelificante que se utilice. En general existen varios tipos de gelificantes con diferencias marcadas entre ellos en cuanto a transparencia y fuerza del gel, temperatura de gelificación, contenido de sales y pureza. La utilización de medios semisólidos tiene una serie de inconvenientes como son lo engorroso del proceso de preparación, dosificación, manipulación y el aumento del costo por unidad. Además, algunos cultivos responden negativamente a la adición del gelificante. Es por eso que en muchos casos se ha recurrido al empleo de medios en estado líquido, los cuales tienen las siguientes ventajas:

- Mayor facilidad en la preparación, esterilización y manipulación.
- Mayor rapidez en la absorción de nutrientes y la difusión de sustancias tóxicas producidas por el propio metabolismo de las plantas.
- Incremento en el número de plantas que se obtienen, ya que se ha observado una disminución en el tiempo entre subcultivo, lo cual permite producir una mayor cantidad de brotes por unidad de tiempo y disminución en los plazos de propagación,
- Aumento de la productividad de los operarios de cabina de flujo laminar, debido a que los explantes solo deben ser colocados en contacto con el medio, sin necesidad de manipularlos en forma individual.
- Disminución en los costos del medio de cultivo.
- El cambio en la composición del medio de cultivo puede efectuarse por simple transferencia.
- Facilidad de automatización.

Sin embargo, este medio tiene la limitante de que no todas las especies responden igual al crecimiento y desarrollo. Adicionalmente se ha observado una tendencia a la reducción del coeficiente de multiplicación a medida que se dan subcultivos continuos en este medio.

#### **2.7.6. FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DEL EXPLANTE**

Cardoza (2005) afirma que “la luz, temperatura, pH y humedad son factores que influyen el crecimiento adecuado de los cultivos *in vitro*”. “La temperatura controla la incubación y se dan entre 22 – 25°C” (Litz et al., 2004), la luz es esencial para la morfogénesis involucrando factores como la intensidad, fotoperiodo y calidad. Es de gran importancia no colocar los explantes directamente a la luz, ya que estos pueden causar condensación en los recipientes, dando como resultado un bajo rango de crecimiento y desarrollo (Mathury Koncsz, como se citó en Gamarra, 2014). Por lo general, el fotoperiodo es de 16 horas luz y 8 horas oscuridad y la humedad relativa varía entre el 50-70% (Litz et al., 2004).

## **2.8. FASES DE LA MICROPROPAGACIÓN**

Orellana (1998) indica que Murashige (1974) propuso 03 fases para la micropropagación de plantas. Sin embargo, con la información basada en la experiencia de muchos investigadores y micropropagadores se pueden diferenciar 05 fases críticas para lograr una exitosa multiplicación.

### **2.8.1. FASE 0: PREPARACIÓN O ACONDICIONAMIENTO DE LA PLANTA MADRE**

Inicialmente esta fase fue concebida para tratar de reducir los problemas de contaminación que se presentaban comúnmente en la fase I (Debergh y Maene, como se citó en Jiménez 1998). Actualmente es una etapa importante e imprescindible para el desarrollo de un esquema de micropropagación eficiente y repetible, tiene importancia desde el punto de vista fitosanitario, fisiológico y genético.

Para la mayoría de las plantas propagadas *in vitro*, el material inicial es una planta élite seleccionada por características fenotípicas especiales que corresponden con el clon o variedad a propagar, motivo por el cual se establecen bancos de germoplasmas para el proceso de micropropagación (Jiménez, 1998).

La selección y crecimiento de la planta madre bajo condiciones asépticas, reduce notablemente los contaminantes, principalmente fungos (Debergh y Maene, citado por Jiménez 1998).

El impacto de la fase 0 no solo está limitado al aspecto fitosanitario de los explantes, sino también a la supervivencia de los mismos. La importancia de las condiciones ambientales en que se desarrolla la fase 0 para la calidad del proceso posterior de establecimiento ha sido demostrada en muchos cultivos.

### **2.8.2. FASE I: ESTABLECIMIENTO O INICIACIÓN DE LOS CULTIVOS**

Una vez seleccionado y recolectado el explante se requiere desinfectarlo superficialmente; ya que en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante. Para la desinfección se han empleado diferentes compuestos, siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata, cloro comercial, alcohol a diferentes porcentajes, entre otros. La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan en gran medida por las características del explante. En la práctica se establecen experimentalmente por ensayo y el explante debe responder

eficientemente bajo las condiciones *in vitro*. Es importante considerar el hecho de que el aislamiento de un tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de estrés que altera su metabolismo celular y, en forma importante, su balance hormonal. Un buen explante es aquel cuyas células sobreviven, en una alta proporción, a la descomposición antes señalada, y que luego responde eficientemente a las condiciones *in vitro* (Villalobos et al., 1991).

El tamaño del explante es un factor importante, pues mientras más pequeño el explante menor es el riesgo de contaminación. Este principio ha sido utilizado para la obtención de plantas libres de enfermedades. Generalmente se cortan los explantes de un tamaño algo superior y son sometidos a la acción de los desinfectantes y luego en condiciones estériles son reducidos a su tamaño final (Hu y Wang, como se citó en Jiménez, 1998).

Para el medio de cultivo de meristemos y ápices no existe un medio universal, sin embargo, el medio basal propuesto por Murashige y Skoog (1962) con algunas modificaciones en sus ingredientes ha sido el más utilizado (Kantha, como se citó en Jiménez, 1998).

Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas a partir de meristemos, ápices o yemas, este está determinado por las concentraciones endógenas de estas hormonas las cuales dependen de la especie y tipo de explante. Usualmente la citoquinina en estos explantes es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de establecimiento es generalizada. Se tiene reportes que entre las citoquininas más utilizadas se encuentra la 6 benzil-aminopurina (BA) en un 68%, la kinetina 23% y el 2isopentenil-adenina (2-ip) y Zeatina (ZEA) en 9% (Hu y Wang, como se citó Jiménez, 1998).

### **2.8.3. FASE II: MULTIPLICACIÓN O PROLIFERACIÓN**

Orellana (1998) refiere que el objetivo de esta fase es la producción masiva y del mayor número posible de propágulos (plantas, microtubérculos, microbulbillos, etc) a partir de explantes (meristemos apicales o axilares, yemas axilares o adventicias) ya establecidos *in vitro*.

En estado de crecimiento, el explante se multiplica con o sin formación de callos, según las condiciones de cultivo. La fase intermedia de formación de callos se evita cuando se tienen fines de micropropagación, ya que las plantas provenientes de estos presentan diferentes grados de variación, estas pueden ser de tipo epigenético (factores no propios del

gen, pero que modifican su comportamiento) o corresponder a mutaciones verdaderas (Lankin et al., como se citó en Villalobos et al., 1991).

Generalmente el proceso se inicia desde las plantas donantes seleccionadas sin afectar las características y estabilidad genética de la variedad o clon. Los explantes, al ser divididos en condiciones estériles y cultivados nuevamente en medio fresco inducen nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr el número de propágulos deseados para pasar al enraizamiento. Entre los métodos para lograr la multiplicación, el que mayor estabilidad genética y mejores respuestas ha tenido en las especies propagadas es la proliferación de yemas axilares.

En cuanto al número de subcultivos Deberg y Maene, Rancillac y Col. (como se citó en Orellana, 1998) aseveran que generalmente se tiende a pensar que en esta fase los brotes deben multiplicarse durante un número infinito de veces manteniendo un coeficiente de propagación estable a través del tiempo; sin embargo, la realidad es distinta, ya que con la edad *in vitro* o el número de subcultivos, cambia la respuesta de los explantes. A medida que aumenta en número de subcultivos existe la tendencia al incremento del número de brotes por explante y la formación de yemas adventicias.

Lorz y Scowcroft y Vasil (como se citó en Orellana, 1998) refiere que el principal problema de multiplicar los explantes durante muchos ciclos de propagación se relaciona con el aumento de la frecuencia de aparición de variantes somaclonales. La principal causa de esta variación se asocia a la formación de yemas adventicias que ocurre en algunas especies, cuya presencia aumenta a medida que se dan más subcultivos. El límite está relacionado a la especie y al clon o variedad.

#### **2.8.4. FASE III: ENRAIZAMIENTO**

En esta fase cada brote, esqueje o yema de forma individual que se ha formado en la fase de multiplicación, debe ser manipulada y cultivada *in vitro* para que además de crecer y desarrollar un seudotallo o tallo con las primeras hojas, forme y desarrolle varias raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes, siendo esta la fase más voluminosa. Existen 3 estadios de desarrollo involucrados en la rizogénesis: a) inducción, b) iniciación y c) elongación. Ya que es difícil separar los estados a y b, generalmente estos se combinan en el estado de iniciación (Hu y Wang, como se citó en Orellana, 1998).

Normalmente para la inducción de enraizamiento no es necesaria la adición de citoquininas al medio de cultivo, siendo necesarias algunas auxinas. Entre las auxinas más

usadas tenemos al ácido naftalenacético (ANA) (53%), ácido indolbutírico (AIB) (29%) y ácido idolacético (AIA) (11%) (Hu y Wang, como se citó en Orellana, 1998).

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. El medio de Murashige y Skoog (1962), por ejemplo, diluido al 50% ha resultado positivo en diferentes especies. (Thorpe, como se citó en Villalobos et al., 1991).

Sauvaire y Galzy (como se citó en Orellana, 1998) afirma que debido al efecto residual de las citoquininas adicionadas al medio de cultivo durante la multiplicación, en algunas especies se presenta un efecto inhibitorio en la formación de raíces (no permite el crecimiento de raíces), a veces este efecto es tan grande que es necesario transferir los brotes durante dos subcultivos continuados en medios de enraizamiento, lográndose en el primer subcultivo, una elongación de las vitroplantas y el desarrollo de nuevos brotes.

#### **2.8.5. FASE IV: ACLIMATACIÓN**

Agramonte, Jiménez y Dita (1998) aseveran que el fenotipo de las plantas que crecen en recipientes no ventilados, respecto a aquellas desarrolladas en ambientes ventilados, tienen tallos más delgados, menor cantidad de ceras cuticulares y epiculares, reducción de los tejidos mecánicos de soporte, incremento del contenido de agua en las células, escasa capacidad fotosintética, estomas con baja funcionalidad y crecimiento heterótrofo. Todo esto indica que los cambios fenotípicos son inducidos por las condiciones ambientales del recipiente de cultivo, es decir, como respuesta a la ausencia de las condiciones estresantes que se presentan en los invernaderos y en el campo (estrés hídrico, nutricional, etc.). Por lo anteriormente explicado es necesario aplicar técnicas de aclimatación *in vitro* o *ex vitro*, para que las características morfológicas normales regresen a las plantas micropropagadas. Entre las técnicas más eficaces en la aclimatación son las que van encaminadas a lograr gradualmente menos humedad relativa, más luz, crecimiento autotrófico y un medio séptico.

Para esta fase se utilizan mezcla de diferentes sustratos como la turba, compost, vermiculita y otros.

#### **2.9. TRABAJOS SOBRE CULTIVOS *in vitro* EN BAMBÚ**

Hernández et al. (2001) en su trabajo “Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris*” ensayaron con tres diferentes explantes: meristemo de tallo, meristemo de rizoma y entrenudos, aplicaron múltiples tratamientos de desinfección con cloro, alcohol, antibióticos, fungicidas y bactericidas en medio de cultivo MS (1962), sin antioxidante, con PVP o carbón

activado, en estado sólido o líquido y 20% de sacarosa. Los meristemos de rizomas respondieron mejor a la desinfección y condiciones *in vitro*, presentando una oxidación controlable al utilizar medio líquido complementado con carbón activado (1 g/L). Los meristemos apicales se oxidaron en su totalidad. Los entrenudos presentaron una contaminación total por hongos, pero no oxidación. El tratamiento que resultó efectivo para la desinfección y control de la oxidación fue aquel en el cual se empleó durante 1 hora una solución de Amoxicilina (100 mg/L), ampicilina (100 mg/L) y Kilol y Kasumin 1:1 (2 ml/L), luego fueron sumergidos por 10 minutos en alcohol al 70%, seguido de 3 lavados y sembró en medio líquido MS a media fuerza, adicionándose carbón activado.

Ramírez (2013) indica que evaluó seis tratamientos para la desinfección de los explantes de *Guadua* con hipoclorito de sodio (NaClO) en concentraciones del 2% y 3%, cada uno en tiempos de inmersión de 5, 10 y 15 minutos, posteriormente los explantes fueron sembrados en el medio de cultivo de MS (1962), suplementado con 3 mg/L de BA. También se evaluó el porcentaje de brotación. El mejor resultado de desinfección y brotación fue con NaClO al 2% durante 15 minutos.

Mendoza et al. (2010) investigaron sobre *Guadua angustifolia* para establecer un protocolo de propagación *in vitro* fase I que facilite la obtención de plantas sin contaminación. Utilizó metodologías de desinfección ya establecidas, haciendo modificaciones para favorecer la obtención de plantas sanas. El material vegetativo fueron yemas apicales con carácter embriogénico, con distancias de 1 cm entre el nudo y el corte. Durante el proceso evaluaron 17 tratamientos que en su mayoría generaron resultados con alta contaminación. Obtuvieron un tratamiento positivo donde los explantes se sometieron a un producto agroquímico a base de benomilo 2 g/L y sulfato de estreptomina 2 g/L por 30 minutos, hipoclorito de sodio al 2% por 30 min, 24 h en agua destilada estéril y otra desinfección con hipoclorito de sodio al 2% por 30 min. Además, evaluaron 4 diferentes medios de cultivo donde se suplementó con BA a concentraciones de 0, 1, 3 y 5 mg/L, los cuales no generaron brotación en los explantes de bambú. Al no tener resultados positivos procedieron a realizar un ensayo no registrado con la concentración de 6 mg/L BA, la cual resultó la concentración inductora.

Daquinta, Pacheco, Lezcano y Sagarra (2010) desarrollaron una investigación con el objetivo de establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de Bambú chino

(*Dracaena sanderiana* L.), en la cual evaluaron diferentes tiempos de desinfección de las yemas con cloruro de mercurio (HgCl).

Jiménez, Castillo, Tavares, Guevara y Montiel (2006) investigaron sobre “La propagación *in vitro* del Bambú gigante neotropical, *Guadua angustifolia* Kunth, a través de la proliferación de brotes axilares”, los mejores resultados obtenidos a nivel de brotación, multiplicación, enraizamiento y aclimatación, lo obtuvieron usando explantes de plantas madres mantenidas en invernadero. El procedimiento de desinfección comprendía el uso secuencial de un detergente alcalino, mezcla del fungicida Benomyl y bactericida Agrimicym, seguido de inmersión en hipoclorito de sodio (1,5% p/v) durante 10 minutos y cultivado en medio Murashige y Skoog (1962) conteniendo 2 ml/L de mezcla preservativa de plantas® (PPM). La mayor brotación se dio cuando se usó 3 mg/L BA en el medio de cultivo. La formación de brotes laterales en las vitro-plantas se observó en concentración de hasta 5 mg/L de BA. Después de seis subcultivos, se obtuvieron grupos de 8-12 ejes, y su división en grupos de 3-5 ejes permitió la multiplicación de las plantas. El enraizamiento ocurrió espontáneamente *in vitro* en 100% de los explantes que produjeron brotes laterales. La aclimatación exitosa de grupos de 5-6 ejes bien enraizados se logró en el invernadero bajo nebulización, usando mezcla de tierra, arena y cáscaras de arroz en proporciones iguales.

Aureoles, Rodríguez, Legaria, Sahagún y Peña (2008) llevaron a cabo una investigación sobre propagación *in vitro* del “Maguey bruto” (*Agave inaequidens* Koch), es una especie silvestre poco estudiada que se encuentra amenazada y utiliza en la elaboración de la bebida alcohólica "Raicilla". Con la finalidad de propagar *in vitro* la especie, evaluaron diferentes tipos de explantes, tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento y concentraciones de sales inorgánicas Murashige y Skoog (1962); así como diferentes tamaños de planta y cantidades de raíz. Las secciones de tallo formaron hasta 72 brotes en ocho semanas; la concentración de 3.0 mg/L BA produjo una mayor longitud y número de brotes con 6.39 y 2.02 mm, respectivamente; las concentraciones de BA, Kinetina y 2-ip produjeron una amplia variedad de respuestas; el tamaño grande de plantas en un medio con sales MS al 100% de su concentración sin reguladores, produjo mayor número y longitud de raíces en menor tiempo, y las plantas de longitud mayor a 4.0 cm con más de dos raíces presentaron una sobrevivencia del 100%.

## **2.10. EXPERIENCIAS DE PROPAGACIÓN CONVENCIONAL EN BAMBÚ**

En el estudio “Promoción de la rehabilitación, manejo y uso sostenible de los bosques tropicales de bambú en la región noroccidental del Perú” presentado por el Gobierno del Perú (2013) se indica que el macollamiento de las plántulas (producción de 10 a 15 plántulas hijas a partir de una plántula madre) se produce en 2 a 3 meses, cuando las condiciones ambientales y del sustrato son adecuados, con lo cual a los dos años obtuvieron 200000 plántulas, no se especifica cuál es el número inicial de yemas o varas a reproducir, el cuál es un dato importante para calcular la tasa de multiplicación.

En todos los estudios de reproducción asexual por chusquines u otro método tradicional se menciona que el mejor o mayor número de brotes se obtiene a condiciones controladas de la humedad, la ausencia con plantas indeseables y en suelos franco arenosos y fértiles. De no darse las condiciones requeridas no se obtendrá el material vegetal requerido para la plantación.

Como parte de esta investigación se realizó un viaje, a inicios de noviembre de 2017, al departamento de Amazonas, siendo Imaza uno de los distritos visitados, de donde se obtuvo la siguiente información primaria, encontrándose lo siguiente:

- En el caserío de Almendro, del distrito de Imaza, nos entrevistamos con el Sr. Damián Azañero, dueño de un vivero de bambú y su respectiva plantación, quien nos indicó que para la obtención del material vegetal a propagar se traslada al Monte y corta cañas con nudos visibles, los lleva a vivero, los entierra en el suelo y adiciona cáscara de arroz con aserrín, riega por la mañana y por la noche, entre los 18 a 20 días ya se pueden ver los rebrotes, los cuales después de un mes se cortan y trasladan a bolsas, después de 2 a 3 meses en condiciones controladas de luz y humedad en vivero, los aclimatan un mes en luz directa y los llevan a campo. A partir de un nudo con yema se puede lograr entre 5 a 7 plantas para campo, teniendo una tasa de propagación de 24 plantas en dos años.
- En el caserío de Durand, del mismo Distrito, nos entrevistamos con el Sr. Darío Goicochea, dueño también de un vivero y su plantación, quien sigue el mismo proceso de propagación con cañas relativamente maduras, pero que tenga

nudos con yemas frescas. Su promedio de propagación es similar al anterior caserío.

Estas cifras de los caseríos del distrito de Imaza son menores a los referidos por Botero (2003) en cuanto al promedio de plántulas que obtuvieron.

## **III. METODOLOGÍA**

### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales e Innovación de la Subdirección de Biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en el departamento de Lima, provincia de Lima, distrito de La Molina, latitud Sur 12°04'36'', latitud Oeste 76°56'43'' a una altura de 241 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), presentando temperatura entre 14,6 °C – 28,7 °C, precipitación de 60 mm al año, zona agro-ecológica Costa sub-tropical, grupo ecológico desierto y cuenca hidrográfica El Rímac, según la web del INIA.

### **3.2. MATERIALES**

#### **3.2.1. MATERIAL VEGETAL**

Las plantas madres estaban ubicadas en el invernadero dirigido por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Subdirección de Biotecnología del INIA, en el distrito de La Molina. Las plantas procedían del FUNDO BIOSELVA, Anexo Rafael Gastelva, Distrito de Río Negro, Provincia de Satipo, Coordenadas Universal Transverse Mercator (UTM) N8758556 E0541811, zona 18L y altura 605 m.s.n.m. de altitud.

#### **3.2.2. INSUMOS**

##### **A. REGULADORES DE CRECIMIENTO**

- Bencilaminopurina
- Zeatina

##### **B. REACTIVOS**

- Agar 7g/l (SIGMA – A4550)
- Alcohol de 70°
- Alcohol de 96°
- HCl al 5%

- Hipoclorito de sodio 4,5 % (p/v), marca Clorox
- Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) 4,43 g/l (Sigma – M5519)
- Mezcla preservativa de plantas (PPM)
- NaOH al 5%
- Sacarosa (SIGMA – S5391)
- Sulfato de estreptomicina
- Tween 20

### **C. AGROQUÍMICOS**

- Benomilo (Benomyl)
- Cicatrizante(SANIX)
- Sulfato laurico de sodio (SLAM)

### **D. OTROS INSUMOS**

- Agua destilada
- Algodón
- Detergente comercial (Ace)

### **3.2.3. INSTRUMENTOS**

- Espátulas
- Gradilla
- Hoja de bisturí N° 10
- Mangos de bisturí N° 7
- Microespátula
- Pinzas punta roma 12, 15 y 26 cm

#### **3.2.4. MATERIALES DE VIDRIO**

- Frasco de vidrio con tapa de 200 ml
- Frascos tipo GERBER
- Frascos de vidrio para colecta de residuales
- Frascos de 200 ml.
- Frascos de 1,5 Lts.
- Matraz Erlenmeyer de 125 ml
- Mechero de alcohol
- Pipetas
- Placas Petri de 100 y 150 mm de diámetro
- Probeta de 50 ml
- Tubos de ensayo de 15 x 150 mm
- Tubos de ensayo de 25 x 150 mm

#### **3.2.5. MATERIALES DE INVERNADERO**

- Bateas rectangulares de 12,1 lt. (Reyplast - Batea dual #6)
- Bolsas negras para almácigo de 20 x 9,5cm x 2µm
- Sustrato en pastilla prensada (Jiffy F50 –Anexo 1)
- Sustrato (Sunshine Premix # 8 Anexo 2)

#### **3.2.6. OTROS MATERIALES**

- Magnetos
- Papel aluminio
- Papel estéril

- Papel filtro N° 2
- Papel tissue
- Parafilm

### **3.2.7. EQUIPOS**

- Agitador magnético
- Agitador orbital (Thermo Fisher Scientific – MaxQ™ 4000)
- Autoclave (Systec DB-45)
- Balanza analítica
- Cabina de bioseguridad unipersonal (Labconco - Class II, Type A2)
- Cámara climática –Fitotrón (Biotronette Mark III)
- Cámara de flujo laminar horizontal unipersonal (Esco IEC61010 - 1)
- Desionizador (Elga)
- Estufa
- Horno microondas
- Microscopio estereoscopio binocular
- pH-metro (HANNA HI2020)
- Refrigeradora

### **3.2.8. GABINETE**

- Útiles de escritorio
- Formatos de registro
- Computadora
- Cuaderno de apuntes

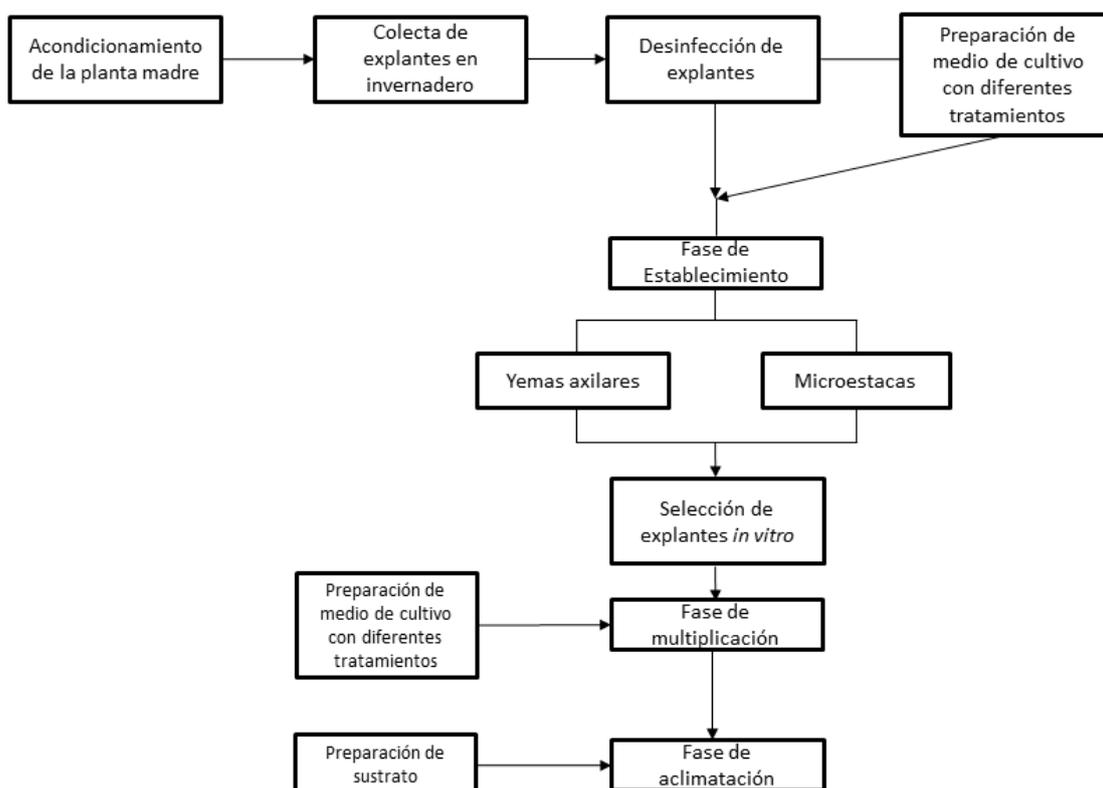
### 3.2.9. CONDICIONES DE INCUBACIÓN

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Subdirección de Biotecnología las condiciones de incubación fueron:

- Temperatura  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Humedad Relativa 70%.
- Fotoperiodo 16 horas luz.
- Intensidad lumínica: 5440 lux.

### 3.3. MÉTODOS

#### 3.3.1. ESQUEMA DEL PROCESO DE LA INVESTIGACIÓN



#### 3.3.2. ACONDICIONAMIENTO DE LA PLANTA MADRE

Las plantas madres tenían una edad de 22 meses y fueron regadas con más frecuencia en verano que en invierno; teniendo también en cuenta su requerimiento hídrico. Estaban instaladas en macetas de 25 cm de diámetro conteniendo sustrato arena de río, humus

y musgo en una proporción de 3:1:1. Fueron fertilizados una vez al mes con micronutrientes quelatizados (GROW COMBI).

Un mes antes del inicio de la extracción de explantes, la planta madre fue tratada con benomilo y sulfato laurico de sodio (etapa de acondicionamiento), con aplicaciones 1 vez por mes, la dosis aplicada fue de acuerdo a etiqueta.

Los explantes usados fueron yemas axilares y microestacas, provenientes de las plantas madres.

### **3.3.3. COLECTA DE EXPLANTES EN INVERNADERO**

- De la planta madre se extrajeron pequeñas estacas de aproximadamente 0,2 cm de diámetro y 2 cm de longitud, con una yema cada una, las cuales se colectaron en frascos con agua destilada.
- Las pequeñas estacas que contenían las yemas a coleccionar (Figura 6) cumplieron con las siguientes características:
  - ✓ La hoja caulinar que los protegía presentaba un color beige o marrón.
  - ✓ Las yemas que se encontraban en los nudos seleccionados, presentaban color verde – mostaza.



**Figura 6: Explante con yema semidiferenciada**

#### **3.3.4. DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE EXPLANTES**

El protocolo de desinfección del material de propagación aplicado en la presente investigación, tuvo como base el desarrollado por Cabrera en el año 2015 (Cabrera comunicación personal, 2016) el cuál se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Subdirección de biotecnología del INIA. Este consistía en lavar las muestras con detergente comercial (Figura 7), enjuagarlas 03 veces con agua potable y finalmente con agua destilada. Luego vertir una solución al 0,2% (p/v) de benomilo al frasco con muestras dejando actuar por 60 min (en constante agitación). Transcurrido ese periodo de tiempo, enjuagar 4 veces con agua destilada llevándose a la cámara de flujo laminar. En dicha cámara las muestras debían vertirse en una placa Petri estéril, adicionando alcohol 70° a las muestras contenidas en dicha placa, actuando durante un minuto. Seguidamente se debía adicionar hipoclorito de sodio al 1,1% incluyendo 2 gotas de tween 20 (Figura 8), remojándose por 20 minutos y enjuagando 4 veces con agua destilada estéril.

## **A. DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE YEMAS AXILARES**

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, las muestras fueron desinfectadas de acuerdo al procedimiento propuesto por Cabrera (2015).



**Figura 7: Frasco conteniendo estacas en solución de detergente comercial**



**Figura 8: Muestras en placa petri con solución de hipoclorito de sodio y tween 20**

## **B. DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE MICROESTACAS**

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del INIA, las muestras se lavaron con detergente comercial, enjuagándose 03 veces con agua potable, luego (03 veces) con agua destilada.

Seguidamente se adicionó una solución al 0,2% (p/v) de Benomilo; 0,1% (p/v) de Sulfato de estreptomicina y 2 gotas de tween 20 al frasco con las muestras de microestacas, actuando por 60 min (en constante agitación). Transcurrido ese periodo de tiempo, se enjuagó con agua destilada 4 veces y fue llevado a la cámara de flujo laminar, vertiéndose las muestras en una placa petri estéril.

Sobre las muestras contenidas en la placa petri estéril se adicionó alcohol 70° por un minuto. Luego se incorporó hipoclorito de sodio al 1,1% incluyendo 2 gotas de tween 20, dejándose remojar por 20 minutos y siendo finalmente enjuagadas 4 veces con agua destilada estéril.

### **3.3.5. FASE DE ESTABLECIMIENTO O INICIACIÓN**

#### **A. MEDIO DE CULTIVO**

El Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) de la marca comercial SIGMA-ALDRICH fue usado como base para los ensayos.

Fueron planteados los tratamientos para la selección de explantes (yemas y microestacas) a usar para la micropropagación de *Guadua angustifolia*.

Para el caso de yemas fueron evaluados 14 tratamientos en medios sólido y líquido (Tabla 2) y 7 tratamientos en medio de doble fase (Tabla 3).

**Tabla 2: Tratamientos ensayados en yemas de bambú variando el tipo de medio de cultivo y concentración de dos citoquininas**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>TIPO DE MEDIO</b>	<b>TIPO DE CITOQUININA</b>	<b>CONCENTRACION (mg/l)</b>
1	SOLIDO	BA	0
2	SOLIDO	BA	1,5
3	SOLIDO	BA	3
4	SOLIDO	BA	4,5
5	SOLIDO	ZEA	1,5
6	SOLIDO	ZEA	3
7	SOLIDO	ZEA	4,5
8	LIQUIDO	BA	0
9	LIQUIDO	BA	1,5
10	LIQUIDO	BA	3
11	LIQUIDO	BA	4,5
12	LIQUIDO	ZEA	1,5
13	LIQUIDO	ZEA	3
14	LIQUIDO	ZEA	4,5

Se tuvo 3 repeticiones con 10 unidades cada una, teniendo en total 420 unidades experimentales.

**Tabla 3: Tratamientos ensayados en yemas con 4 concentraciones de dos citoquininas en medio de doble fase**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>TIPO DE CITOQUININA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (mg/l)</b>
1	BA	2
2	BA	4
3	BA	6
4	ZEA	2
5	ZEA	4
6	ZEA	6
7	NINGUNA	0

Se tuvo 3 repeticiones con 10 unidades cada una, teniendo en total 210 unidades experimentales.

En el caso de microestacas fueron evaluados 7 tratamientos (Tabla 4).

**Tabla 4: Tratamientos ensayados en microestacas, con 3 concentraciones de 2 citoquininas y un medio testigo en medio sólido**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>CITOQUININA</b>	<b>CONCENTRACIÓN (mg/l)</b>
<b>1</b>	BA	2
<b>2</b>	BA	4
<b>3</b>	BA	6
<b>4</b>	ZEA	2
<b>5</b>	ZEA	4
<b>6</b>	ZEA	6
<b>7</b>	NINGUNA	0

Se tuvo 3 repeticiones con 10 unidades cada una, teniendo en total 210 unidades experimentales.

Una vez establecidos los tratamientos para cada tipo de explante se continuó con la fase de iniciación.

## **B. ESTABLECIMIENTO A PARTIR DE YEMAS AXILARES**

El medio de cultivo empleado fue el MS (1962) para lo cual se empleó la dosis del fabricante (4,43 g/L) adicionado de 30 g/L de sacarosa y regulado el pH a  $5,7 \pm 0,01$  empleando NaOH y/o HCl.

Para el medio sólido se agregó 7 g/L de agar.

### **B.1. Establecimiento en dos tipos de medio de cultivo: sólido y líquido.**

Debido a los diferentes tratamientos (medio de cultivo más las diferentes concentraciones de las citoquininas) se usaron 42 frascos tipo GERBER (para el medio sólido se usó 20 ml de medio por frasco) y 210 tubos de ensayo (para medio líquido se usó 10 ml de medio por tubo). Los tratamientos se presentan en la Tabla 2.

En el caso del medio líquido, dentro de cada tubo de ensayo se colocó una tira de papel filtro (1 cm de ancho aprox.) en forma de “puente” de 5 cm de altura aproximadamente.

Se distribuyó los tratamientos en frascos (medio sólido) o tubos de ensayo (medio líquido) y se tapó con papel aluminio (Figura 9). Luego se rotuló y autoclavó.

El proceso de autoclavado fue a  $121^{\circ}\text{C}$  y 15 libras de presión durante 15 minutos.



**Figura 9: Frasco para siembra en medio sólido (izquierda) y tubos para medio líquido con el papel filtro en forma de “puente” (derecha)**

Bajo condiciones asépticas, en la cámara de flujo laminar, se sembraron las yemas envueltas con 3 hojas de revestimiento, previamente desinfectadas.

En el medio líquido se colocó una yema en la “endadura” formada en el papel filtro de los tubos de ensayo y para medio sólido fueron cinco yemas por frasco (Figura 10).

Con ayuda del mechero de alcohol se flameó todas las pinzas y el bisturí con sus respectivos mangos dejándose enfriar dentro del papel estéril, previo a este paso se autoclavaron todas las pinzas, bisturíes, papeles y placas petri.

Bajo un microscopio estereoscopico se colocó la placa petri estéril y con la ayuda de pinzas y bisturí fríos se extrajeron las yemas con las 3 hojas de revestimiento de los explantes previamente desinfectados.



**Figura 10: Disección de yemas axilares con ayuda de pinzas y bisturí (izquierda) y siembra en tubo de ensayo con medio líquido (derecha)**

Antes de cada siembra de yemas, en cualquiera de los medios antes mencionados, la boquilla del frasco o tubo fue flameada (según tratamiento) e inmediatamente cerrada con tapa de aluminio, para luego sellarlo con parafilm y rotularlo.

Las yemas sembradas fueron incubadas a  $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Estuvieron en penumbra por 10 días aproximadamente y el resto de tiempo de esta fase permanecieron a luz directa.

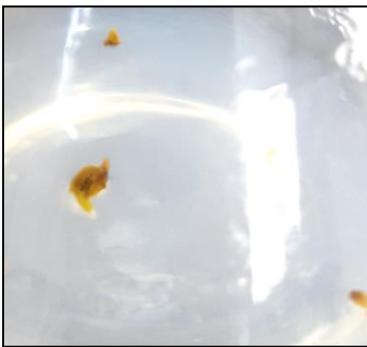
Durante este periodo (1 mes) se evaluó:

- Porcentaje de contaminación: Número de yemas que muestran presencia de hongos o bacterias respecto del total de yemas sembradas, expresado en porcentaje.
- Porcentaje de prendimiento (supervivencia): Número de yemas que brotaron del total de yemas sembradas, expresado en porcentaje.

- Porcentaje de necrosis: Número de yemas con necrosis respecto al total, expresado en porcentaje.

Se planteó una escala de necrosis (Figura 11), según:

- ✓ Grado 1: 0 al 25% del explante necrosado, color verde.
- ✓ Grado 2: 25 al 50% del explante necrosado, color amarillo pálido.
- ✓ Grado 3: 50 al 100% del explante necrosado, color marrón.

		
<b>GRADO 1</b> (0 al 25% del explante con necrosis)	<b>GRADO 2</b> (26 al 50% del explante con necrosis)	<b>GRADO 3</b> (51 al 100% del explante con necrosis)

**Figura 11: Escala de necrosis para yemas de bambú**

## **B.2. Establecimiento en medio de doble fase**

En este ensayo fueron usados 42 matraces de 125 ml de capacidad.

Fue vertido 30 ml de medio sólido y 6 ml de medio líquido por matraz, con sus respectivas adiciones de citoquininas, según los tratamientos (Tabla 3).

Una vez distribuidos los medios (sólido y líquido) en sus respectivos matraces según los tratamientos, fueron tapados con papel aluminio, rotulados y autoclavados (Figura 12).



**Figura 12: Autoclave: equipo de esterilización por calor húmedo**

Bajo condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar (Figura 13), se colocó la placa petri y con la ayuda de pinzas y bisturí fríos se disectaron las yemas con las 3 hojas de revestimiento de las microestacas ya desinfectadas. Estas yemas fueron sembradas en medio sólido (Figura 14) y luego de sembrar cinco de estas por matraz se agregó cuidadosamente el medio líquido, en las cantidades ya antes indicadas.



**Figura 13: Cámara de flujo laminar con materiales para siembra**



**Figura 14: Siembra de yemas en medio de doble fase, vista desde arriba (izquierda) y vista de lado (derecha)**

Los matraces con las yemas ya sembradas fueron flameados cubriéndose con papel aluminio y sellándose con parafilm para su rotulación. Una vez sellados fueron colocados en un shaker automático de laboratorio a 60 rpm, en la sala de incubación y penumbra durante 10 días, el resto de tiempo de esta fase los matraces permanecieron a luz directa en el mismo shaker (Figura 15).



**Figura 15: Matraces con explantes en condiciones de incubación en Shaker automático (izquierda) y en penumbra (derecha)**

Durante este periodo (1 mes) se evaluó:

- Porcentaje contaminación
- Porcentaje de prendimiento (supervivencia)
- Porcentaje de necrosis

### **C. ESTABLECIMIENTO A PARTIR DE MICROESTACAS**

Se usó 210 tubos de ensayo (15 x 150 mm), conteniendo 10 ml de medio de cultivo con la respectiva citoquinina (Tabla 4) por tubo.

El medio de cultivo empleado fue el MS (1962) para lo cual se empleó la dosis del fabricante (4,43 g/L) adicionado de 30 g/L de sacarosa, 2 mg/L de PPM y 7g/L de agar, regulado el pH a  $5,7 \pm 0,01$  empleando NaOH y/o HCl.

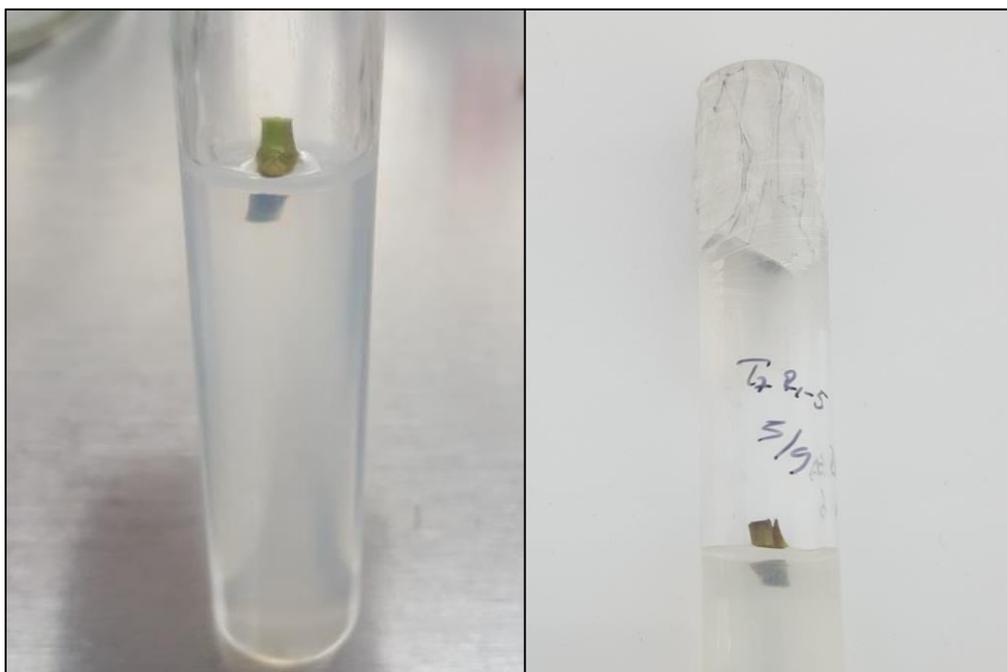
En el ensayo no registrado sin adición de PPM a los 14 explantes, estos presentaron contaminación por hongos y bacterias propias de la planta en un 80% aproximadamente, por lo que se decidió realizar la investigación con la adición de PPM.

Una vez preparado el medio de cultivo fue vertido en sus respectivos tubos de ensayo según los tratamientos, se tapó con papel aluminio, rotuló y autoclavó. Este material enfrió en un lugar aséptico.

En condiciones de cámara de bioseguridad se colocó la placa petri y con la ayuda de pinzas y bisturíes previamente flameados y fríos se seccionaron los extremos de las microestacas con el fin de obtener el explante.

El tamaño aproximado del material sembrado fue de 1 cm, teniendo como punto medio la yema axilar (Figura 16, izquierda).

Las boquillas de los tubos fueron flameadas antes de la siembra del explante. Inmediatamente se cerró con su tapa de aluminio, selló con parafilm y rotuló (ver Figura 16, derecha).



**Figura 16: Microestaca sembrada en medio sólido contenido en tubo de ensayo en T7 (izquierda) y tubo de ensayo con explantes sembrados y sellados con parafilm en T7 (derecha)**

Los tubos con las yemas sembradas fueron colocados en la sala de incubación a 70% de humedad relativa,  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad total durante 3 semanas, luego se subcultivaron a tubos de ensayo de 25 x 150 mm conteniendo medio fresco con la mitad de concentración de PPM y fueron llevadas a la habitación con las mismas condiciones de incubación y expuestos a penumbra.

Durante esta fase (3 semanas) se evaluó:

- Porcentaje contaminación
- Porcentaje de prendimiento (supervivencia)
- Porcentaje de necrosis (Figura 17), esto evaluado según los grados presentados para la necrosis de yemas

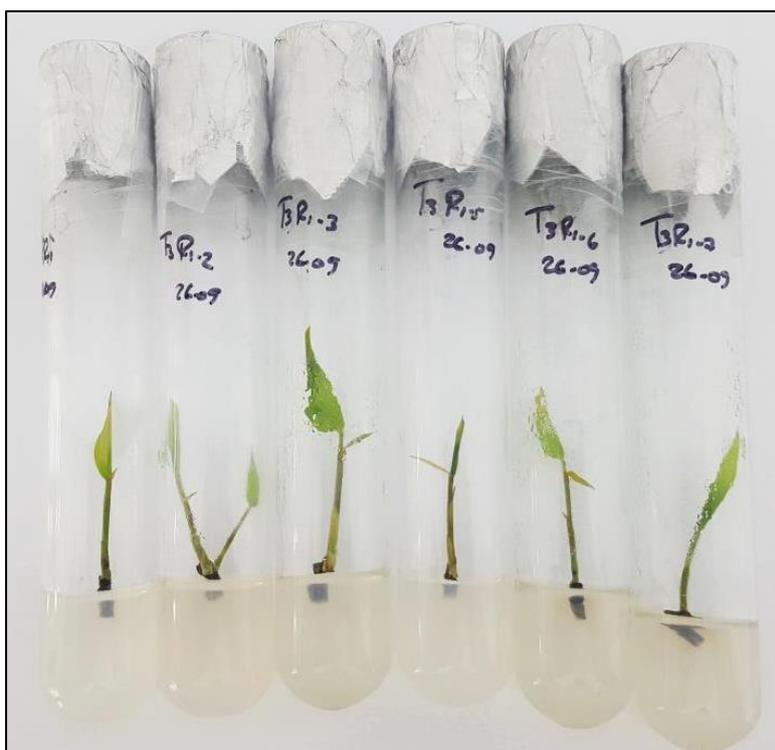
		
<b>GRADO 1</b> (0 al 25% del explante con necrosis)	<b>GRADO 2</b> (26 al 50% del explante con necrosis)	<b>GRADO 3</b> (51 al 100% del explante con necrosis)

**Figura 17: Escala de necrosis para microestacas de bambú**

En esta fase se determinó el explante que mejor reaccionó a los tratamientos ensayados

### 3.3.6. FASE DE MULTIPLICACIÓN

Los explantes no necrosados (prendidos) fueron seleccionados para esta fase. Inicia con el primer subcultivo del material vegetal a tubos de 25 x 150 mm (Figura 18).



**Figura 18: Brotes desarrollados a partir de microestacas en el tratamiento tres (T3)**

Los tratamientos (Tabla 5) ensayados consistieron en el medio MS sólido con 1 ml/L de PPM. El material que se propagó estuvo en estos tratamientos durante toda la fase.

El medio de cultivo empleado fue el MS (1962) para lo cual se empleó la dosis del fabricante (4,43 g/L) adicionado de 30 g/L de sacarosa, 7 g/L de agar y regulado el pH a  $5,7 \pm 0,01$  empleando NaOH y/o HCl, la citoquinina usada es según tratamiento (Tabla 5).

**Tabla 5: Tratamientos ensayados en la fase de multiplicación de bambú a partir de microestacas**

Nº DE TRATAMIENTOS	TIPO DE CITOQUININA	CONCENTRACIÓN (mg/l)
1	BA	2
2	BA	4
3	BA	6
4	ZEA	2
5	ZEA	4
6	ZEA	6

Se hizo 3 repeticiones con 10 unidades cada una, teniendo en total 180 unidades experimentales.

Al término de la segunda semana de esta fase (1 semana en penumbra y 1 semana a luz directa), se realizó el segundo subcultivo, en otro frasco con los mismos tratamientos (Tabla 5) y con el mismo procedimiento que el aplicado al inicio de esta fase, la única diferencia fue la concentración de PPM, la cual fue reducida a 0,5 mg/L. Se utilizaron frascos de 10 cm de alto x 5,5 cm de ancho y capacidad de 250 ml (frascos pequeños, Figura 19), con 30 ml de medio de cultivo por frasco.



**Figura 19: Vertido de medios de cultivo para multiplicación, en frascos de 200 ml**

Estos frascos conteniendo el material vegetal subcultivado se sellaron con parafilm, rotularon y llevaron al ambiente de incubación.

En este medio el material vegetal (Figura 20) se mantuvo durante 4 semanas y este procedimiento (subcultivo y cambio de frasco) se repitió 4 veces más. Es decir, se subcultivó durante 22 semanas sin separar el micromacollo (grupo de brotes en crecimiento).

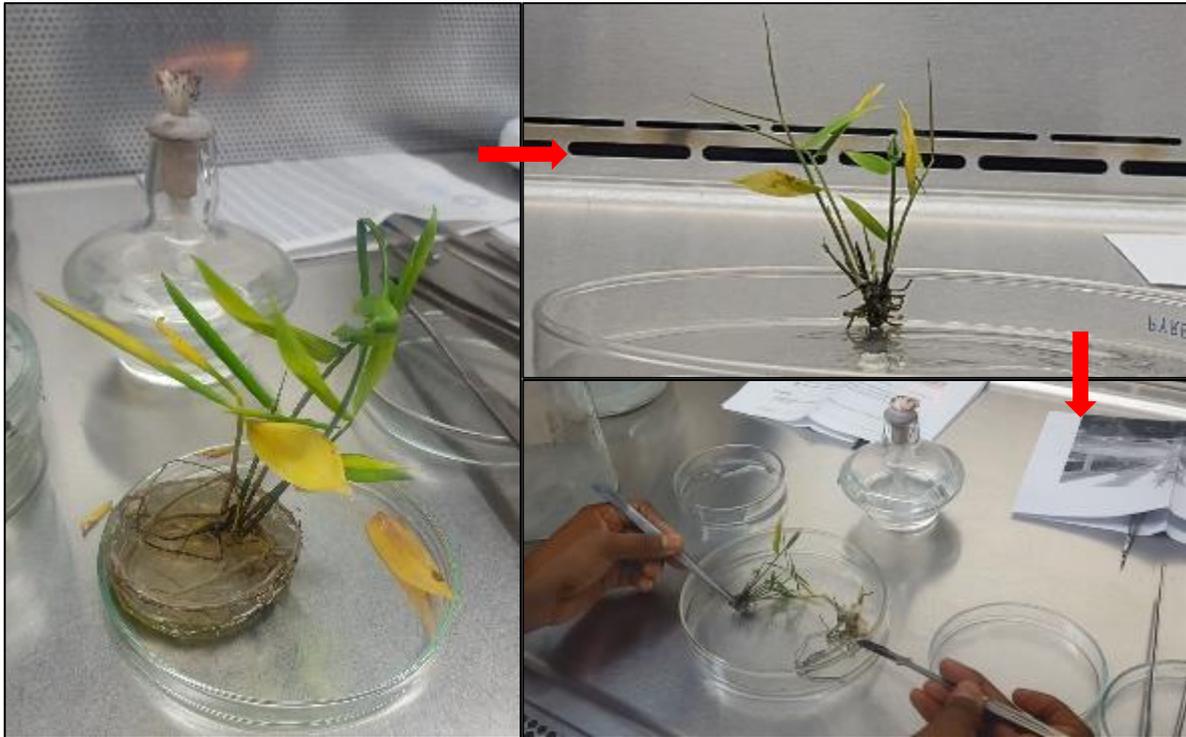


**Figura 20: Plántula de bambú subcultivado de tubo de ensayo a frasco de 200 ml**

A inicios de la semana 23 (tomando en cuenta el inicio de esta fase) se subcultivaron las vitro-plantas a frascos grandes de aproximadamente 1 litro de capacidad. Se usó 200 ml de medio de cultivo por frasco grande.

Se inició la división de brotes del micromacollo inicial, los cuales se dividieron en grupos de 2 a 5 brotes (Figura 21 y 22). Esta división fue realizada cada 6 semanas, por 4 veces consecutivas para posteriormente determinar la tasa de multiplicación.

Se realizó un ensayo preliminar, no registrado, el cual permitió determinar el número idóneo de brotes por micromacollo, teniendo en cuenta el mejor desarrollo de los mismos.



**Figura 21:** Secuencia del repique de vitro-plantas de bambú. Micromacollo antes de la subdivisión (izquierda). Micromacollo listo para ser divididas (superior derecha) y subdivisión de plántulas (inferior derecha)

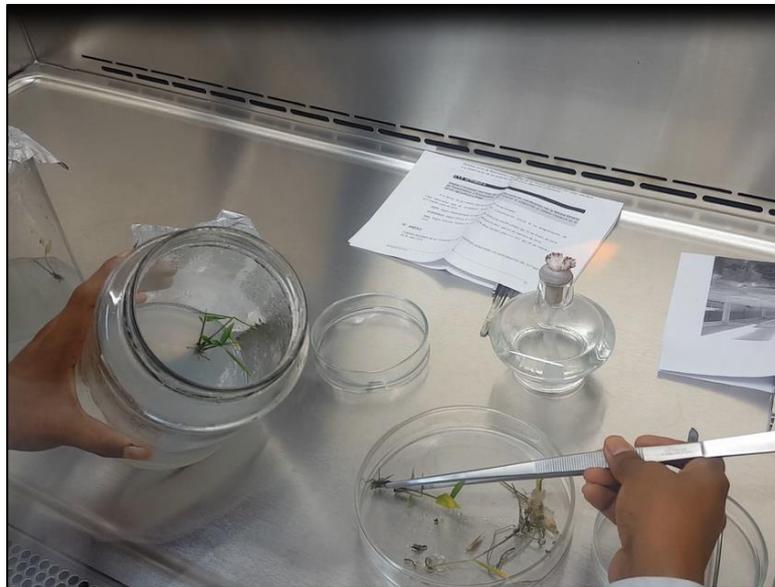


**Figura 22:** División del micromacollo en sub-grupos para subcultivo

- ✓ Los nuevos grupos de brote (nuevos micromacollos) del mismo micromacollo, ya divididos, se siembran en un solo frasco (Figura 23 y 24).
- ✓ Terminada la siembra de cada tratamiento con sus respectivas repeticiones, estos se incubaron a 26° (Figura 25).



**Figura 23: Flameado de boquilla del frasco grande previo a la siembra**



**Figura 24: Siembra de los nuevos micromacollos obtenidos de la división del micromacollo inicial**



**Figura 25: Los nuevos micromacollos en condiciones de incubación**

En esta fase se evaluó:

- Presencia de callos: Número de grupos (macollos con brotes) con presencia de callos respecto al total de grupos, expresado en porcentaje.
- N° de brotes y hojas por explante: N° de brotes desarrollados por explante sembrado (sin división), en promedio.
- Tasa de multiplicación: Promedio de grupos formados y brotes totales por tratamiento luego del cuarto subcultivo con división.

### **3.3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL**

En esta fase se aplicó el diseño completamente al azar (D.C.A) con 3 repeticiones y 10 subunidades por repetición (Tabla 3; 4 y 5). Se utilizó el programa estadístico InfoStat (versión estudiantil) en donde se compararon las medias del número de brotes y número de grupos formados por explante, mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis al 95% de confianza.

### 3.3.8. FASE DE ACLIMATACIÓN

En la fase de multiplicación los micromacollos ya tenían raíces, por lo que no fue necesario desarrollar ensayos para el enraizamiento. Después de la cuarta semana del último subcultivo en medio de multiplicación se procedió a aclimatar los micromacollos.

Se realizó un ensayo preliminar, no registrado, para determinar el sustrato a emplear en esta fase, siendo los siguientes:

- Sustrato Premix # 8 (anexo 2)
- Sustrato en pastilla prensada Jiffy F50 (anexo 1)

A partir de esto se determinó el sustrato a usar.

En esta fase se realizó el siguiente procedimiento:

- Se retiraron los micromacollos de los frascos en los que se habían dividido por 4ta vez (Figura 26) y lavaron con abundante agua potable, hasta retirar todo el medio sólido adherido (Figura 27, izquierda).



**Figura 26: Frasco conteniendo micromacollos a las 6 semanas listas para aclimatar**

- Se procedió a dividir los micromacollos por última vez, teniendo cuidado de no romper las raíces.

- Ya divididos los micromacollos, se sumergieron en una solución de benomilo al 0,1% (Figura 27, derecha), se dejó reposar hasta el momento de la siembra en sustrato, previamente definido.



**Figura 27: Lavado de micromacollos con agua potable (izquierda) y micromacollos en solución de benomilo (derecha)**

- El sustrato, previamente humedecido, se colocó en bolsas de almácigo de 9,5 cm de diámetro y 25 cm de altura.
- Siembra de los micromacollos en el sustrato embolsado.
- Las bolsas conteniendo los micromacollos, se colocaron en bateas rectangulares y colocaron en la cámara climática a 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  y mantenidos durante 8 semanas (Figura 28).
- Para mantener la humedad los micromacollos fueron regados interdiario con agua desionizada.



**Figura 28: Micromaccollos de *Guadua angustifolia* en proceso de aclimatación**

En total se sometieron a aclimatación 94 plántulas (micromaccollos) durante 8 semanas, evaluándose al término de ese tiempo:

- Porcentaje de aclimatación: Número de plantas que sobrevivieron del total de plantas sembradas, expresado en porcentaje.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1.FASE DE ESTABLECIMIENTO O INICIACIÓN**

#### **4.1.1. ESTABLECIMIENTO A PARTIR DE YEMAS AXILARES**

##### **a. Establecimiento en dos tipos de medio de cultivo: sólido y líquido**

###### **a.1. Porcentaje de contaminación**

Se evaluaron 420 yemas axilares, correspondientes a los 14 tratamientos de la fase de iniciación, teniendo en cuenta que por tratamiento se hizo 3 repeticiones con 10 subunidades cada una por cada tratamiento.

El protocolo de desinfección para *Guadua angustifolia*, usando hipoclorito de sodio al 1,1% durante 20 min, dió los resultados presentados en la tabla 6, donde vemos que en la primera semana no se tuvo contaminación.

A la segunda semana de la siembra los tratamientos en medio líquidos presentaron explantes contaminados con hongos.

A las cuatro semanas todos los tratamientos presentaban contaminación por hongos.

También se observó que el medio sólido es el que presentó mayores porcentajes de contaminación por hongos en comparación con el medio líquido (ver tabla 6).

**Tabla 6: Contaminación por hongos durante la fase de iniciación para los medios MS sólido y líquido adicionados de BA y ZEA**

TRATAMIENTO	TIPO DE MEDIO	NUMERO DE SEMANA				
		1	2	3	4	
T1	0 mg/L BA	SOLIDO	0.00%	0.00%	0.00%	25.00%
T2	1,5 mg/L BA	SOLIDO	0.00%	0.00%	0.00%	16.67%
T3	3 mg/L BA	SOLIDO	0.00%	0.00%	0.00%	50.00%
T4	4,5 mg/L BA	SOLIDO	0.00%	0.00%	0.00%	16.67%
T5	1,5 mg/L ZEA	SOLIDO	0.00%	0.00%	33.33%	33.33%
T6	3 mg/L ZEA	SOLIDO	0.00%	0.00%	33.33%	33.33%
T7	4,5 mg/L ZEA	SOLIDO	0.00%	16.67%	83.33%	83.33%
T8	0 mg/L BA	LIQUIDO	0.00%	3.34%	5.00%	6.67%
T9	1,5 mg/L BA	LIQUIDO	0.00%	0.00%	3.33%	6.67%
T10	3 mg/L BA	LIQUIDO	0.00%	0.00%	10.00%	16.67%
T11	4,5 mg/L BA	LIQUIDO	0.00%	0.00%	0.00%	3.33%
T12	1,5 mg/L ZEA	LIQUIDO	0.00%	3.33%	10.00%	13.33%
T13	3 mg/L ZEA	LIQUIDO	0.00%	6.67%	16.67%	16.67%
T14	4,5 mg/L ZEA	LIQUIDO	0.00%	6.67%	13.33%	16.67%

No se tuvo contaminación por bacterias en esta fase y en estos medios.

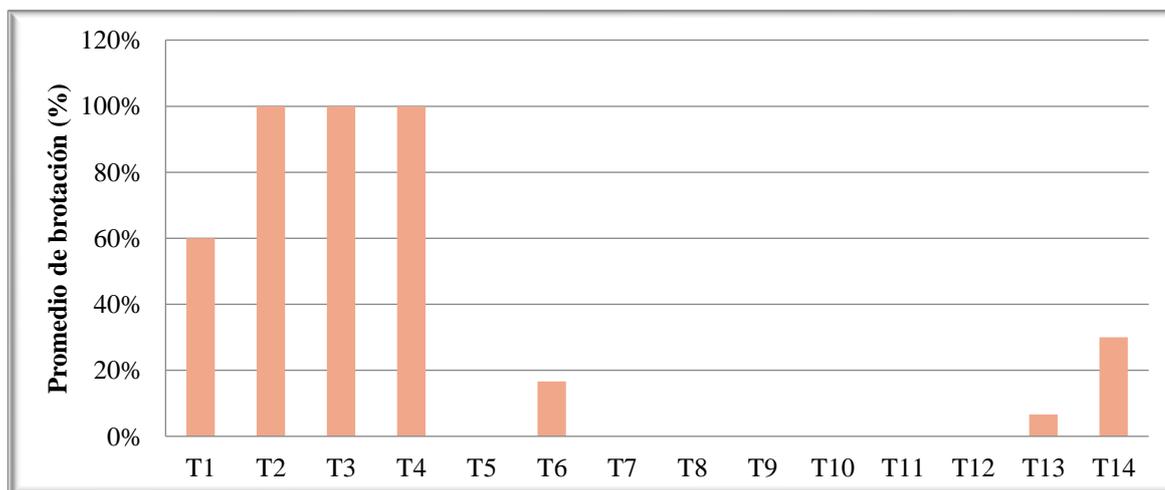
Para los tratamientos en medio sólido, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>, Daquinta et al. (2010) obtuvieron resultados similares aplicando 3 tiempos de inmersión (3; 5 y 7 minutos, respectivamente) en bicloruro de mercurio (0,25%) a las yemas de bambú chino, *Dracaena sanderiana* L., en condiciones de incubación en oscuridad por 21 días, esta condición se planteó para disminuir el riesgo la oxidación de los explantes.

### **a.2. Porcentaje de prendimiento**

Se evaluó 420 yemas axilares correspondientes a los 14 tratamientos ensayados, de los cuales los mejores resultados de prendimiento se obtuvieron con los tratamientos T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>, con un 100% de brotación a la cuarta semana después de haber sido sembrados (Figura 29).

Según los porcentajes de no prendimiento y prendimiento podemos indicar que los tratamientos ensayados en medio sólido y con adición de BA obtuvieron mayores porcentajes de prendimiento en comparación con los tratamientos ensayados en el medio líquido, sin embargo, el tratamiento T<sub>14</sub> (MS + 4,5 mg/L ZEA) obtuvo un 30% de prendimiento siendo este ejecutado en medio líquido además de ser el del mejores resultados para los

tratamientos con adición de zeatina (Anexo 4). Estos resultados son opuestos a los obtenidos por Daquinta et al. (2010), quienes obtuvieron 100% de brotación en oscuridad durante 45 días y su mayor número de brotes de los explantes los alcanzaron en el medio líquido en agitación y en sistema de inmersión permanente con ventilación forzada. En esta investigación las yemas se oxidaron más rápido en medio líquido.



**Figura 29: Porcentaje de prendimiento a la 4ta semana de siembra, según tratamiento**

### **a.3. Porcentaje de necrosis**

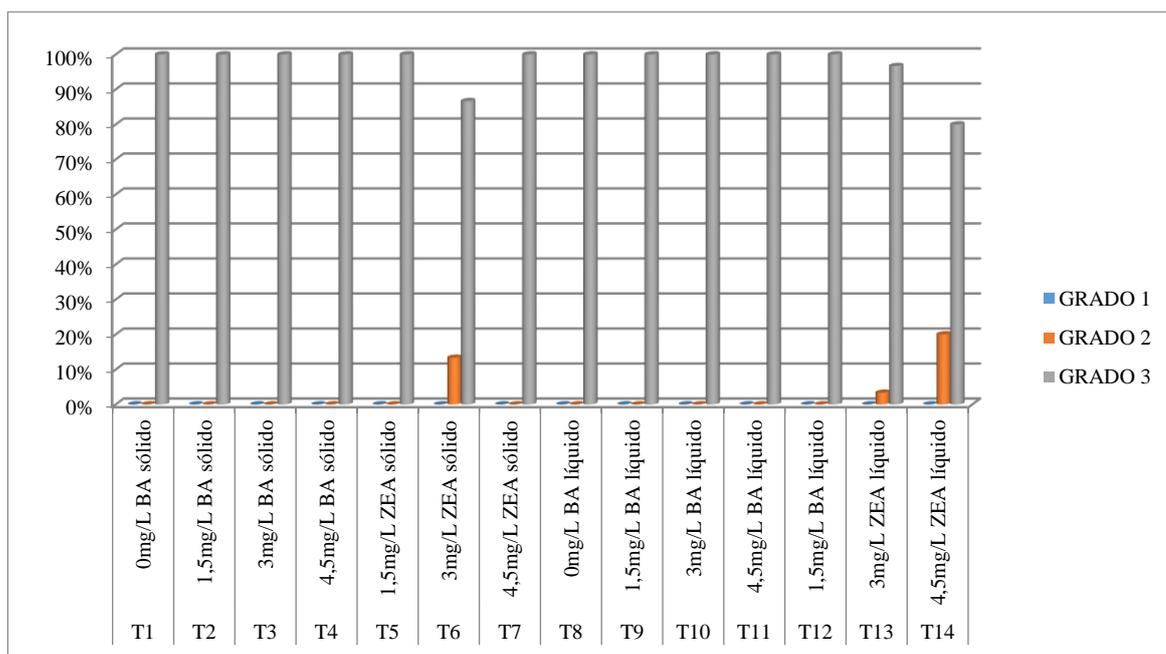
Para la evaluación de las 420 yemas en los diferentes tratamientos se observó que a la segunda semana de la siembra las yemas desarrolladas en tratamientos con adición de la citoquinina ZEA fueron los más afectados. Los tratamientos en medio sólido se afectaron en menor porcentaje, siendo el tratamiento T<sub>1</sub> el único que afectó a los explantes, el cual no contaba con adición de citoquinina.

A la tercera semana los tratamientos en medio líquido y sólido presentaron variados porcentajes de necrosis en grado 3. Sin embargo, el T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> fueron los únicos que no afectaron con este grado de necrosis.

En la cuarta semana, 11 tratamientos de los 14 que se realizaron ocasionaron necrosis por completo, los 3 tratamientos restantes, T<sub>6</sub> (MS + 3 mg/L ZEA, medio sólido), T<sub>13</sub> (MS + 3 mg/L ZEA, medio líquido) y T<sub>14</sub> (MS + 4,5 mg/L ZEA, medio líquido) no observó la necrosis total, pero su nivel de afectación superaba el 80% (Figura 30).

Los bajos niveles de prendimiento, sobre todo en el medio líquido, estuvieron directamente relacionados a los altos niveles de necrosis en grado 3, ya que el avance del tejido muerto no permitió la brotación.

La necrosis en grado 3 indica que el tejido necrosado o muerto ha cubierto casi en la totalidad o totalmente la yema sembrada, impidiendo que siga con el proceso de desarrollo o crecimiento.



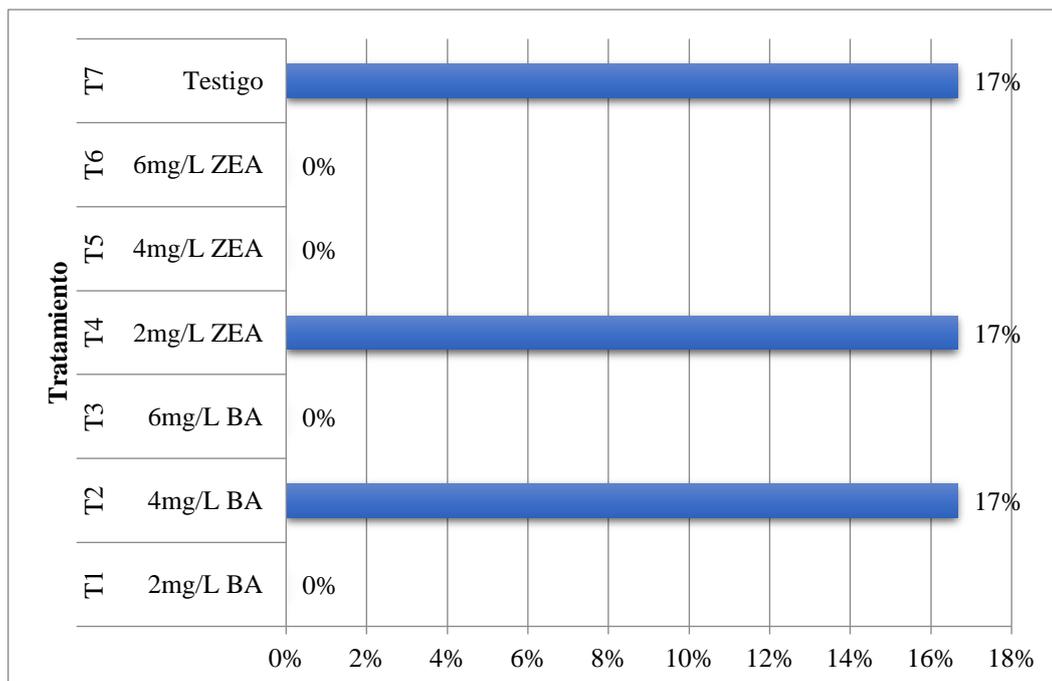
**Figura 30: Grado y porcentaje de necrosis a la 4ta semana de siembra en medio MS adicionado de ZEA y BA.**

## **b. Establecimiento en medio de doble fase**

### **b.1. Porcentaje de contaminación**

El protocolo de desinfección aplicado fue el mismo que para medio sólido y líquido, el cual dio como resultado lo siguiente:

En la primera, segunda y tercera semana no se observó contaminación por hongos ni bacterias, sin embargo, en la 4ta semana se presentó 17% de contaminación por hongos en los tratamientos T<sub>2</sub>, T<sub>4</sub> y T<sub>7</sub> (Figura 31).

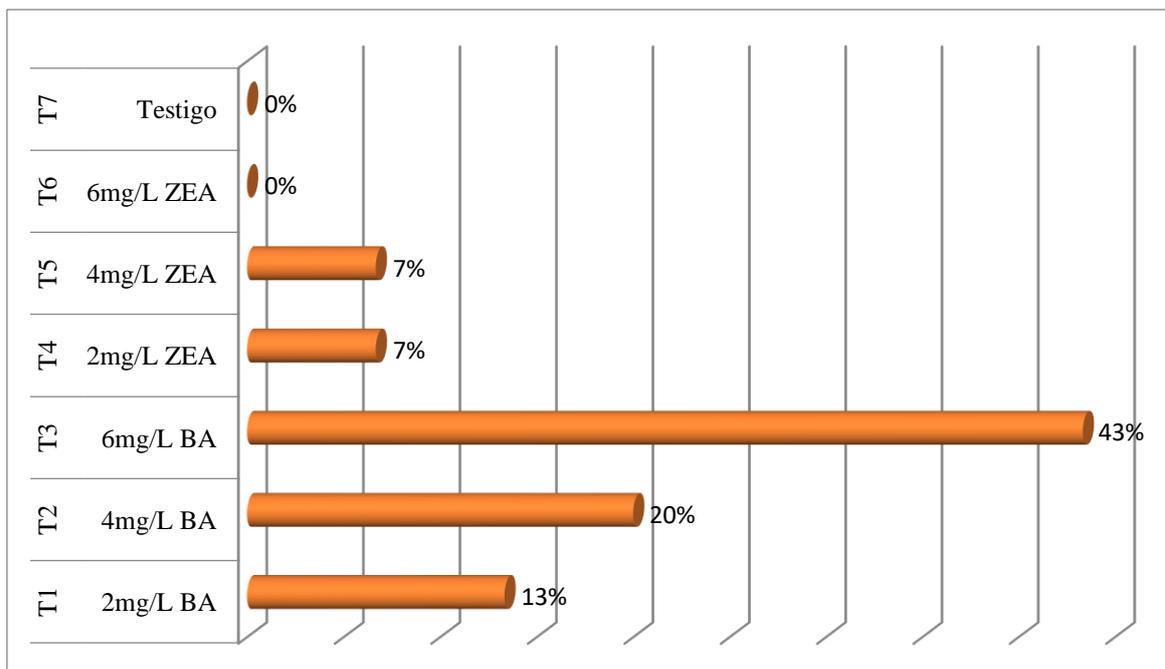


**Figura 31: Contaminación por hongos durante la fase de iniciación para medio de doble fase, a la cuarta semana de siembra**

En estos tratamientos no se presentó contaminación por bacterias.

### **b.2. Porcentaje de prendimiento**

De las 210 yemas evaluadas correspondientes a los 7 tratamientos, se observó prendimiento a la 4ta semana, con un máximo de 43% en el tratamiento T<sub>3</sub> (Figura 32).



**Figura 32: Porcentaje de prendimiento a la 4ta semana de siembra de yemas en medio de doble fase**

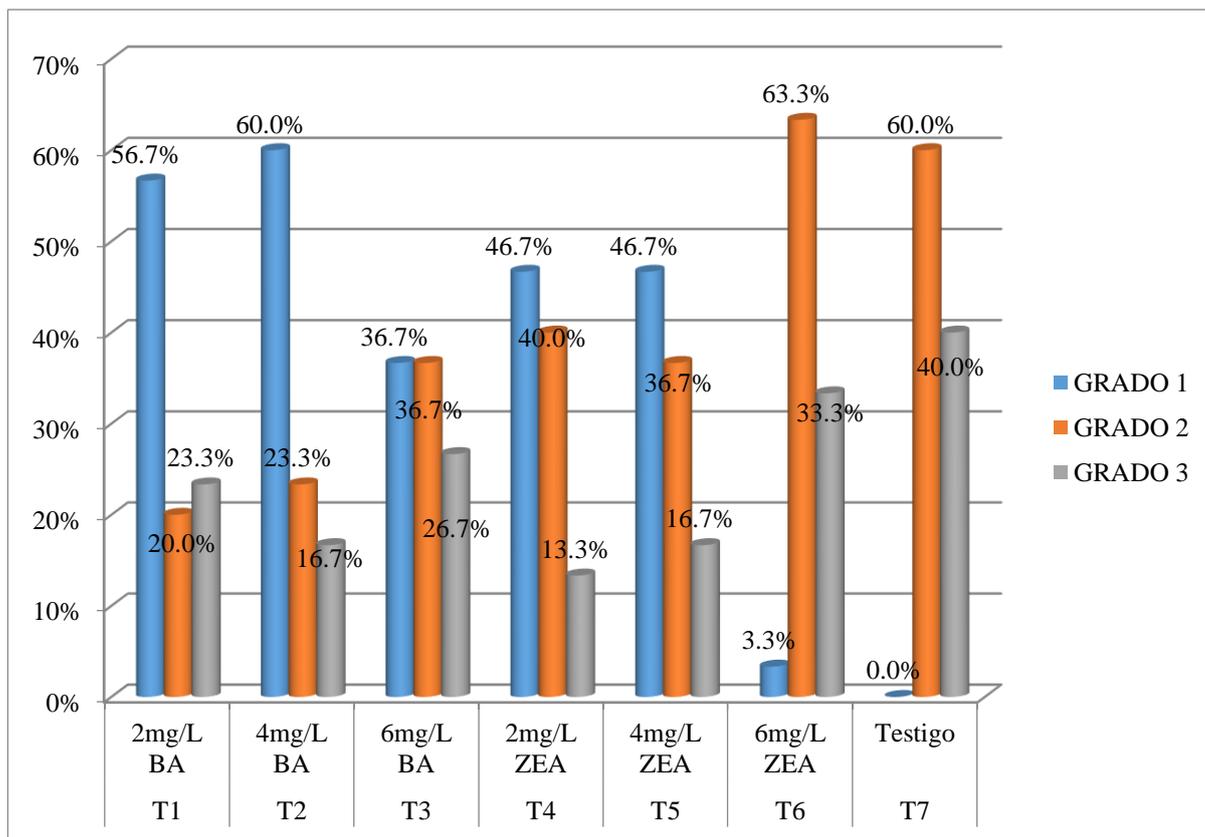
Los tratamientos evaluados conteniendo BA son los que mejores resultados presentan en esta fase, lo cual se asemeja a los resultados obtenidos en el ensayo de los medios sólidos y líquidos.

### **b.3. Porcentaje de necrosis**

Para el medio de doble fase se observó que durante las dos primeras semanas no hubo necrosis en ninguno de los tratamientos.

A la tercera semana se observó necrosis de grado 2, las yemas sembradas que fueron afectadas fueron menores al 50%, sin embargo, no hubo necrosis de grado 3.

En la cuarta semana se observó necrosis en grado 3 en todos los tratamientos (Figura 33), siendo el más afectado el tratamiento T<sub>7</sub> con un 40%, el cual no tenía adición de citoquinina.



**Figura 33: Porcentajes y grados de necrosis en la 4ta semana de evaluación en medio de doble fase**

Así mismo la necrosis en grado 1 en los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>, los cuales contienen BA, alcanzó porcentajes de 56,7 % y 60% respectivamente, lo cual no impide la brotación.

Según la figura 31, los tratamientos que presentaron contaminación por hongos a la cuarta semana de evaluación en este mismo medio fueron T<sub>2</sub>, T<sub>4</sub> y T<sub>7</sub> siendo este porcentaje de 17, lo cual no fue significativo en cuanto al número de yemas afectadas (5 de 30 yemas axilares sembradas), por lo que el proceso de prendimiento o brotación no fue impedido. En la figura 32 se observó que los mejores resultados para prendimiento se obtuvieron de los tratamientos con adición de la citoquinina BA, siendo el T<sub>3</sub> el de mayor prendimiento (43%) seguidos por el T<sub>2</sub> y T<sub>1</sub>. Cuando esto se compara con la figura 33 vemos que el porcentaje de necrosis en grado 3 es baja en los tratamientos con adición de BA, sin embargo, no se supera el 50% de brotación.

Se continuó con la observación de estas yemas hasta la 6ta semana después de su siembra, con la finalidad de observar que las yemas brotadas desarrollen y las otras inicien

este proceso (se encontraban hinchadas listas para brotar); sin embargo, al término de esta semana sólo se observó el nivel de necrosis de grado 3 en todas las yemas.

Las tasas de prendimiento con la citoquinina ZEA son muy bajas, el porcentaje de necrosis de grado 2 y grado 3 (Figura 34) son altas pero el costo de este reactivo es caro en comparación con el reactivo BA.

El tratamiento con mayores niveles de necrosis en grado 3 fue el que no contaba con adición de citoquinina y también fue el que no presentó brotación hasta su cuarta semana de evaluación.



**Figura 34: Brotación y necrosis en grado 3 a las cuatro semanas de la siembra en medio de doble fase del tratamiento MS+2mg/L ZEA (T4)**

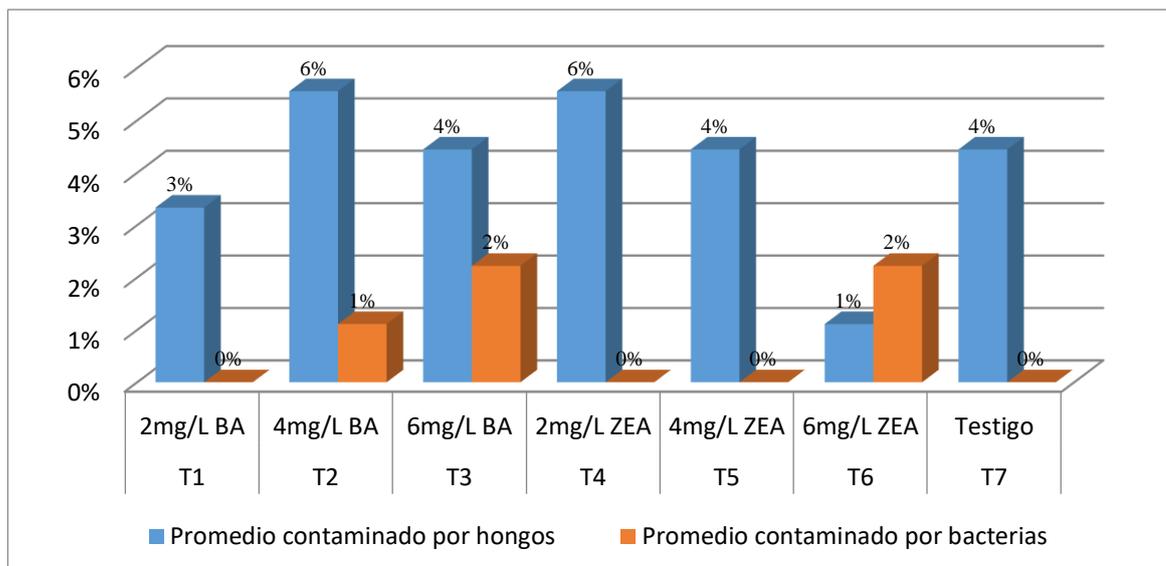
#### **4.1.2. ESTABLECIMIENTO A PARTIR DE MICROESTACAS**

##### **a. Porcentaje de contaminación**

El protocolo de desinfección para *Guadua angustifolia* aplicado a la presente investigación, usando hipoclorito de sodio al 1,1% durante 20 min dió los resultados presentados en la figura 35, donde vemos que en promedio el porcentaje de explantes contaminados por bacterias u hongos es bajo (menor de 5%).

A la primera semana de la siembra se observó que hubo contaminación por hongos en niveles inferiores al 5% y no se evidenció contaminación por bacterias.

A la segunda y tercera semana se observó la contaminación por bacterias, sin embargo, la contaminación por hongos fue mayor.



**Figura 35: Contaminación por hongos y bacterias durante las tres semanas de evaluación con los tratamientos ensayados en microestacas**

Mendoza et al. (2010) utilizaron once tratamientos de desinfección simple en donde sólo dos tuvieron éxito, evaluaron a las dos semanas de siembra y continuaron hasta las 4 semanas, el primer tratamiento lo realizaron con estreptomicina 2 g/L y benomilo 2 g/L por 10 minutos, alcohol al 70% por 10 min, hipoclorito de sodio al 3% por 15 min e hipoclorito de sodio al 1% por 10 min y obtuvieron el 10% de explantes libre de contaminantes; y el segundo tratamiento lo realizaron con benomilo y estreptomicina 2 g/L de cada uno y 30 min en hipoclorito de sodio al 2% logrando que menos del 5% de los explantes no fueron contaminados. A partir de estos resultados ensayaron una doble desinfección la cual consistió en sometimiento de los explantes a producto agroquímico (estreptomicina 2 g/L y benomilo 2 g/L), hipoclorito de sodio al 2% por 30 min, 24 horas en agua destilada y una nueva desinfección con hipoclorito de sodio al 2% por 30 min, con lo cual lograron un 40% de explantes sin contaminantes. Por otro lado, Casanova (2017) obtuvo un 67% de explantes libres de hongos y bacterias empleando un tratamiento de desinfección, incluyendo una pre-desinfección y consistió en la inmersión de los explantes en 70% de alcohol por 1 segundo, luego NaOCl al 2,5% con tween 20 por 10 min, enjuagar 3 veces con agua destilada estéril y la segunda desinfección con NaOCl al 1,5% con tween 20 por 3 min y enjuague tres veces con agua destilada estéril)

Mejores resultados a los de Mendoza et al. (2010) y Casanova (2017) obtuvieron Marulanda et al. (2005), quienes aplicaron HgCl<sub>2</sub> (0,3%) durante 10 min y obtuvieron 18,8% de yemas contaminadas por bacterias y 6,5% contaminadas por hongos,

resultados parecidos a los obtenidos en esta investigación en cuanto a contaminación por hongos. Así mismo, Ramírez (2013) reporta que evaluó 6 tratamientos de desinfección, con previo proceso de pre-desinfección logrando mejores resultados de donde el tratamiento 3 (2 min en etanol y 15 min en NaOCl al 2%) tuvo los mejores resultados con un 14% de contaminación por hongos al día 7 después de la siembra.

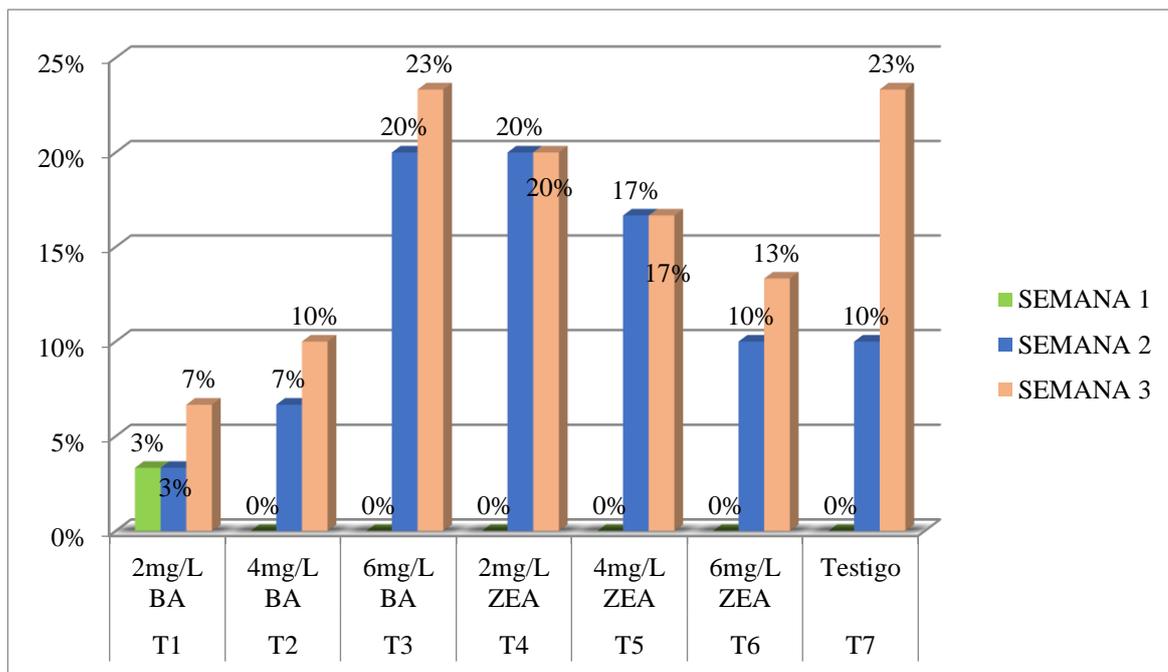
Jiménez et al. (2006) obtuvieron como tasa mínima de contaminación un 11%, 8 semanas después de la siembra, esto con un proceso de pre-desinfección con Extran + Agri-mycin + Benomyl y un proceso de desinfección de NaOCl (1,5%) con adición en el medio de cultivo de PPM (2 ml/L), siendo esta tasa la más baja en comparación a las antes mencionadas. El uso de estreptomicina en varias de las investigaciones revisadas se debe a que es eficaz contra un amplio espectro de bacterias gramnegativas y diferentes micobacterias, ya que es un aminoglucósido, por lo tanto, consta de azúcares y aminoácidos, y actúa a nivel ribosomal inhibiendo la síntesis proteica en la subunidad pequeña del ribosoma (subunidad 30S) de forma que impide que se forme el complejo de iniciación de la síntesis proteica (Renneberg, 2014).

Los resultados de la presente investigación son superiores a los obtenidos por autores mencionados anteriormente.

### **b. Porcentaje de prendimiento**

Se pudo observar que el único tratamiento que presentó brotación en la primera semana de siembra fue el T<sub>1</sub> (2 mg/L BA).

En la segunda semana de evaluación los tratamientos T<sub>3</sub> (6 mg/L BA) y T<sub>4</sub> (2 mg/L ZEA) presentaron los mayores niveles de brotación y en la tercera semana (Figura 36) todos los tratamientos presentan prendimiento (en diferentes porcentajes) pero el T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> siguen siendo los de mayores niveles. En esta semana se suma a estos el tratamiento T<sub>7</sub> (testigo o MS sin adición de citoquinas).



**Figura 36: Porcentaje de brotación durante las 3 semanas luego de la siembra de microestacas**

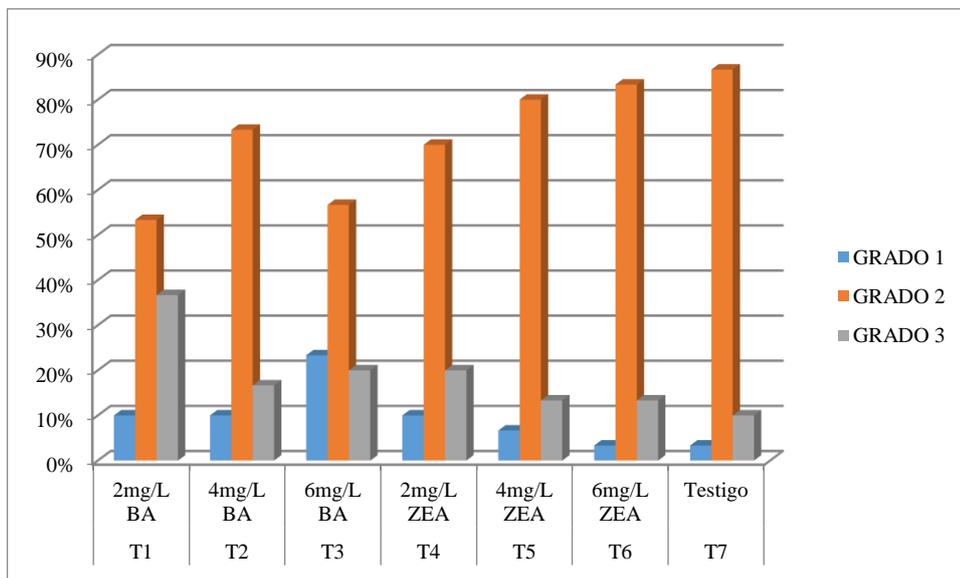
A la cuarta semana después de la instalación del material vegetal, la brotación fue del total restante (casi el 80% en algunos tratamientos), considerando como bajas o material muerto el porcentaje de contaminación y necrosis de esta fase. Cabe resaltar que la cuarta semana fue considerada como parte de la fase de multiplicación.

Ramírez (2013) indica que en su tercera semana de la siembra con el tratamiento con NaOCl 2% por 15 min logró mayor porcentaje de brotación con 15% en un medio de MS sin adición de citoquininas, y este comportamiento lo atribuye a que una exposición a una concentración media de NaOCl en un mayor tiempo podría activar la diferenciación celular de las yemas nodales y lograr una desinfección adecuada. Indica también que bajo esas condiciones los explantes sufren un menor daño fitotóxico en sus tejidos, evitando así su oxidación y facilitando una regeneración *in vitro* más rápida y eficiente, esto concuerda con nuestro protocolo de desinfección donde los resultados de brotación con un MS sin adición de citoquininas son mayores (23%).

### c. Porcentaje de necrosis

Según los tratamientos aplicados, en la primera semana de evaluación el único que afectó con algún porcentaje de necrosis en grado 3 fue el tratamiento T<sub>6</sub>, sin embargo, en los demás tratamientos estos porcentajes en dicho grado fueron bajos (menos del 8%), siendo el de más alto nivel el tratamiento con adición de citoquinina ZEA (T<sub>4</sub>) y el testigo (T<sub>7</sub>).

A la tercera semana de evaluación (Figura 37), se observó que los niveles de necrosis en grado 2 eran mayores al 50% y el tratamiento que más afectó con el grado 3 fue el T<sub>1</sub>, sin embargo, no superaba el 50%.



**Figura 37: Grados de necrosis a la tercera semana de siembra de las microestacas**

En el caso del prendimiento relacionado con la necrosis, se observó que en los tratamientos con ZEA a mayor grado de necrosis menor es el prendimiento, sin embargo, con la citoquinina BA no se cumple esta relación, ya que al término de la tercera semana el tratamiento T<sub>1</sub> tuvo un alto porcentaje de necrosis en grado 3 ocasionando que el porcentaje de prendimiento fuera bajo, entonces se esperaba que el T<sub>3</sub> al presentar mayor porcentaje de necrosis que el T<sub>2</sub> presentara menor prendimiento que este tratamiento, sin embargo, presentó mayor porcentaje de prendimiento con esta citoquinina. Se pudo observar que la brotación de microestacas de bambú se logra con grado 2 de necrosis.

El establecimiento de la microestaca tuvo mejores resultados que la yema revestida con tres hojas, debido a que los nudos contienen las sustancias de reserva que necesita la yema activa para la brotación y desarrollo.

## 4.2. FASE DE MULTIPLICACIÓN

### 4.2.1. PORCENTAJE DE PRESENCIA DE CALLOS

No se observó presencia de callos en esta fase.

### 4.2.2. EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO

La primera evaluación en esta fase se realizó al término de la segunda semana del subcultivo a medio de multiplicación, luego se evaluó cada 4 semanas.

La evaluación comprende el número de brotes y hojas y se realizó a nivel de subcultivo. Debido a que el número de brotes y hojas obtenidos son variables cuantitativas discretas se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, empleando para esto al programa estadístico InfoStat versión libre estudiantil.

#### a. Evaluación de crecimiento Primer subcultivo

Los resultados obtenidos para el primer subcultivo sin división, muestran que existen diferencias significativas para el número de brotes y hojas a un nivel de confianza de 95%, tal como se ve en las tablas 7 y 8 respectivamente.

**Tabla 7: Comparación de medias de número de brotes para el primer subcultivo, sin división**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>			
5	4 mg/L ZEA	1,00	A		
6	6 mg/L ZEA	1,13	A		
4	2 mg/L ZEA	1,13	A	B	
1	2 mg/L BA	1,53		B	C
2	4 mg/L BA	1,70			C
3	6 mg/L BA	2,57			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Como se puede observar en la tabla 7, los tratamientos con adición de la citoquinina BA son los que mayor media en cuanto a número de brotes obtenidos, el tratamiento 3 (MS + 6 mg/L BA) se diferencia por el mayor valor de su media.

**Tabla 8: Comparación de medias de número de hojas para el primer subcultivo, sin división**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>			
4	2 mg/L ZEA	2,80	A		
5	4 mg/L ZEA	2,90	A		
6	6 mg/L ZEA	2,97	A	B	
1	2 mg/L BA	3,67		B	C
2	4 mg/L BA	4,03			C
3	6 mg/L BA	4,67			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Al igual que en la tabla 7, en la tabla 8 los tratamientos con adición de la citoquinina BA son los que mayor media en cuanto a número de hojas obtenidos, sin embargo, no hay marcada diferencia significativa entre estos tratamientos.

### **b. Evaluación de crecimiento Segundo subcultivo**

Los resultados obtenidos para el segundo subcultivo sin división, muestran que existen diferencias significativas para el número de brotes y hojas a un nivel de confianza de 95%, tal como se presentan en las tablas 9 y 10 respectivamente.

**Tabla 9: Comparación de medias de número de brotes en el segundo subcultivo, sin división**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>			
5	4 mg/L ZEA	1,57	A		
6	6 mg/L ZEA	1,67	A		
4	2 mg/L ZEA	2,07	A		
1	2 mg/L BA	2,03	A	B	
2	4 mg/L BA	2,53		B	C
3	6 mg/L BA	4,03			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

La comparación de medias del número de brotes nos indica que los mejores resultados son para los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, sin embargo, el tratamiento T<sub>3</sub> (MS + 6 mg/L BA) es el que muestra mayor número de brotes, siendo su media la que presenta mayor diferencia del resto con 4,03 brotes por explante.

**Tabla 10: Comparación de medias de número de hojas en el segundo subcultivo, sin división**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>			
4	2 mg/L ZEA	5,47	A		
5	4 mg/L ZEA	5,67	A		
6	6 mg/L ZEA	6,00	A		
1	2 mg/L BA	7,60	A	B	
2	4 mg/L BA	8,43		B	C
3	6 mg/L BA	10,13			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

La comparación de medias del número de hojas nos indica que los mejores resultados son para los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, siendo estos similares a los resultados obtenidos en la tabla 9 y diferenciándose el tratamiento T<sub>3</sub> del resto de los ensayados.

### c. Evaluación de crecimiento Tercer subcultivo

La prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis aplicada al número de brotes y hojas en el tercer subcultivo sin dividir, nos indica que existen diferencias significativas para el número de brotes y hojas a un nivel de confianza de 95%.

**Tabla 11: Comparación de medias de número de brotes en el tercer subcultivo, sin división**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>			
6	6 mg/L ZEA	2,37	A		
5	4 mg/L ZEA	2,53	A		
4	2 mg/L ZEA	2,67	A		
1	2 mg/L BA	3,03	A		
3	6 mg/L BA	4,57			B
2	4 mg/L BA	4,20			B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

La comparación de medias del número de brotes nos indica que los mejores resultados son para los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, siendo estos similares a los resultados obtenidos en la tabla 9 y diferenciándose el tratamiento T<sub>3</sub> del resto de los tratamientos ensayados.

**Tabla 12: Comparación de medias de número de hojas en el tercer subcultivo, sin división**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>			
6	6 mg/L ZEA	8,67	A		
5	4 mg/L ZEA	8,87	A		
1	2 mg/L BA	9,50	A		
4	2 mg/L ZEA	9,83	A		
2	4 mg/L BA	13,20			B
3	6 mg/L BA	13,77			B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

La comparación de medias del número de hojas nos indica que los mejores resultados son para los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, no habiendo diferencia significativa entre ambos tratamientos.

#### d. Evaluación de crecimiento Cuarto subcultivo

Los resultados obtenidos para el cuarto subcultivo sin división, muestran que existen diferencias significativas para el número de brotes y hojas a un nivel de confianza de 95%, tal como se ve en las tablas 13 y 14, respectivamente.

**Tabla 13: Comparación de medias de número de brotes en el cuarto subcultivo, sin división**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>				
6	6 mg/L ZEA	2,57	A			
5	4 mg/L ZEA	3,23	A	B		
4	2 mg/L ZEA	3,20	A	B		
1	2 mg/L BA	3,57		B	C	
2	4 mg/L BA	4,87			C	D
3	6 mg/L BA	5,40				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Como se observa en la tabla 13, las medias más altas, que se diferencian significativamente del resto de los tratamientos ensayados, son del T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub>, no encontrándose diferencia significativa entre ellos. A pesar de esto, se observa que el tratamiento T<sub>3</sub> muestra una media mayor en comparación de los otros tratamientos, equivalente a 5,40 brotes por explante.

**Tabla 14: Comparación de medias de número de hojas en el cuarto subcultivo, sin división**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>				
6	6 mg/L ZEA	9,20	A			
5	4 mg/L ZEA	10,60	A	B		
4	2 mg/L ZEA	12,13		B	C	
1	2 mg/L BA	12,47		B	C	
2	4 mg/L BA	13,83		B	C	
3	6 mg/L BA	15,33				C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

La comparación de medias del número de hojas nos indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>, siendo esta la primera comparación de medias que incluye un tratamiento con la adición de ZEA, sin embargo, como en las tablas anteriores el tratamiento T<sub>3</sub> sigue teniendo mayor media.

### e. Evaluación de crecimiento Quinto subcultivo

Los resultados obtenidos para el quinto subcultivo sin división, muestran que existen diferencias significativas para el número de brotes y hojas a un nivel de confianza de 95%, tal como se presenta en las tablas 15 y 16, respectivamente.

Como se observa en la comparación de medias del número de brotes en este subcultivo, los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> son los que tienen mayor media en comparación a los otros tratamientos ensayados (Tabla 15).

**Tabla 15: Comparación de medias de número de brotes en el quinto subcultivo, sin división**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>			
6	6 mg/L ZEA	4,00	A		
4	2 mg/L ZEA	4,63	A	B	
5	4 mg/L ZEA	4,80	A	B	
1	2 mg/L BA	5,53		B	
2	4 mg/L BA	6,40		B	C
3	6 mg/L BA	7,77			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

En la tabla 16 se puede observar que existen diferencias significativas en los tratamientos ensayados, siendo todos los tratamientos con adición de la citoquinina de BA y el tratamiento T<sub>4</sub> los de mejores resultados en cuanto a medias del número de hojas.

**Tabla 16: Comparación de medias de número de hojas en el quinto subcultivo, sin división**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>			
6	6 mg/L ZEA	11,57	A		
5	4 mg/L ZEA	14,70		B	
4	2 mg/L ZEA	16,57		B	C
2	4 mg/L BA	17,53		B	C
1	2 mg/L BA	18,37			C
3	6 mg/L BA	21,17			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Como se ve en los cinco subcultivos sin división, los tratamientos con adición de citoquinina BA son los que mejores resultados en comparación de medias de brotes y hojas ha obtenido. De estos tratamientos, el ensayo con MS + 6 mg/L de BA (T<sub>3</sub>) es el que mayor número de brotes y hojas presentó, obteniéndose 7,77 brotes/explante y 21,17 hojas/explante.

También se observa que los tratamientos con adición de la citoquinina ZEA son los que presentaron menor número de brotes, siendo el tratamiento T<sub>6</sub> (6 mg/L ZEA) el que menor número promedio de brotes obtuvo.

#### 4.2.3. TASA DE MULTIPLICACIÓN

Se consideró conveniente no continuar evaluando el medio de cultivo adicionado de ZEA, ya que su número de brotes es bajo en relación a los adicionados con BA, además de ser elevado el costo.

##### a. Tasa de multiplicación Primer subcultivo.

Como se muestran en los resultados, para el primer subcultivo con división, los tratamientos ensayados muestran que existen diferencias significativas en el número de brotes y micromacollos a un nivel de confianza de 95%.

**Tabla 17: Comparación de medias de número de brotes en el primer subcultivo dividido**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>		
6	6 mg/L ZEA	3,70	A	
5	4 mg/L ZEA	4,50	A	
4	2 mg/L ZEA	4,87	A	
2	4 mg/L BA	7,23		B
1	2 mg/L BA	8,63		B
3	6 mg/L BA	8,80		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

De la tabla 17 se desprende que entre los tratamientos T<sub>2</sub>, T<sub>1</sub> y T<sub>3</sub> no existen diferencias significativas y son los que mayor número promedio de brotes tienen; sin embargo, como en los casos anteriores el tratamiento T<sub>3</sub> es el que mayor número promedio de brotes ofrece.

**Tabla 18: Comparación de medias de número de micromacollos en el primer subcultivo dividido**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>			
6	6 mg/L ZEA	1,57	A		
4	2 mg/L ZEA	1,93	A	B	
5	4 mg/L ZEA	1,93	A	B	
1	2 mg/L BA	2,30		B	C
2	4 mg/L BA	2,63			C D
3	6 mg/L BA	2,97			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

En la comparación de medias respecto al número de micromacollos se ha obtenido que en los tratamientos T<sub>2</sub> y T<sub>3</sub> no se tienen diferencias significativas. El mayor número promedio de micromacollos se obtuvo con el T<sub>3</sub>, el cual reporta 2,97 micromacollos formados por explante.

Como se ha observado en los diferentes subcultivos sin división y en las tablas 17 y 18, los tratamientos con adición de la citoquinina ZEA siempre obtienen los promedios más bajos en cuanto a número de brotes y número de micromacollos, por lo que, al ser una fitohormona de alto costo, en comparación a la citoquinina BA y no tener los mejores resultados, la descartamos para los siguientes subcultivos.

#### **b. Tasa de multiplicación Segundo subcultivo.**

A partir de este subcultivo con división, sólo se ensayaron tratamientos con adición de la citoquinina BA.

**Tabla 19: Comparación de medias de número de brotes en el segundo subcultivo dividido**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>	<b>D.E</b>	<b>H</b>	<b>p-value</b>
1	2 mg/L BA	6,53	2,06	0,81	0,6611
2	4 mg/L BA	6,73	1,70		
3	6 mg/L BA	7,33	3,27		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**Tabla 20: Comparación de medias de número de micromacollos en el segundo subcultivo dividido**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>	<b>D.E</b>	<b>H</b>	<b>p-value</b>
1	2 mg/L BA	2,10	0,66	0,45	0,7571
2	4 mg/L BA	2,23	0,77		
3	6 mg/L BA	2,27	0,78		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Los resultados que presentan la tabla 19 y 20 nos indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ensayados. El tratamiento con mayor media de número de brotes y número de micromacollos es el T<sub>3</sub>, donde se obtuvo medias de 7,33 brotes/explante y 2,27 micromacollos/explante.

#### **c. Tasa de multiplicación Tercer subcultivo.**

Los resultados muestran que no existe diferencia significativa entre los tratamientos ensayados para número de brotes y número de micromacollos.

**Tabla 21: Comparación de medias de número de brotes en el tercer subcultivo dividido**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>	<b>D.E</b>	<b>H</b>	<b>p-value</b>
1	2 mg/L BA	8,33	3,07	4,28	0,1112
2	4 mg/L BA	7,43	1,50		
3	6 mg/L BA	8,60	2,24		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Las tablas 21 y 22 nos muestran que aplicar cualquiera de los 3 tratamientos, nos da un número de brotes y grupos similares, puesto que no hay diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el tratamiento T<sub>3</sub> para ambos casos es el que mayor promedio obtuvo.

**Tabla 22: Comparación de medias de número de micromacollos en el tercer subcultivo dividido**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>	<b>D.E</b>	<b>H</b>	<b>p-value</b>
1	2 mg/L BA	2,33	0,76	0,17	0,8778
2	4 mg/L BA	2,27	0,52		
3	6 mg/L BA	2,33	0,55		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### **d. Tasa de multiplicación Cuarto subcultivo.**

Los resultados obtenidos para este subcultivo con división, muestran que existen diferencias significativas para el número de brotes y micromacollos a un nivel de confianza de 95%.

**Tabla 23: Comparación de medias de número de brotes en el cuarto subcultivo dividido**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>	
1	2 mg/L BA	7,67	A
2	4 mg/L BA	8,43	A
3	6 mg/L BA	11,57	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Como se observa en la tabla 23, existen diferencias significativas entre los tratamientos ensayados, el tratamiento T<sub>3</sub>, según esta tabla, se diferencia significativamente de los demás, teniendo un promedio de brotes de 11,57 brotes/explante.

**Tabla 24: Comparación de medias de número de micromacollos en el cuarto subcultivo dividido**

	<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>	
1	2 mg/L BA	2,27	A
2	4 mg/L BA	2,43	A
3	6 mg/L BA	3,27	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

La tabla 24, nos confirma que el tratamiento T<sub>3</sub> tiene los mejores resultados, teniendo 3,27 micromacollos/explante, por la diferencia estadísticamente significativa a un 95% de confianza.

**Tabla 25: Tasa promedio de multiplicación por tratamiento y subcultivo, respecto al número de brotes/explante**

	Tratamiento	Número de subcultivo				Tasa promedio
		1	2	3	4	
<b>T1</b>	2 mg/L	8,63	6,53	8,33	7,67	7,79
<b>T2</b>	4 mg/L	7,23	6,73	7,43	8,43	7,46
<b>T3</b>	6 mg/L	8,80	7,33	8,60	11,57	9,08

En la tabla 25, se resumen las tasas promedios de multiplicación por tratamiento teniendo como resultado que el tratamiento adicionado con 6 mg/L BA es el que obtuvo mayor número promedio de brotes por explante. Se puede observar que después de la primera división el valor promedio bajó. Sin embargo, en los siguientes subcultivos este número fue en ascenso, notándose una marcada diferencia en comparación a los anteriores.

Para el caso de brotes por explantes con la adición de 2 mg/L BA obtuvimos mayores resultados a los obtenidos por Casanova (2017) con 2,33 brotes nuevos por explante usando medio MS modificado (Mathur et al. 1995) + 2 mg/L de BA. Esto se puede deber al tiempo empleado para llegar hasta este punto o que en esta investigación se dividió a los explantes en grupos y no individualmente.

**Tabla 26: Tasa promedio de multiplicación por tratamiento y subcultivo, respecto al número de micromacollos/explante**

	Tratamiento	Número de subcultivo				Tasa promedio
		1	2	3	4	
<b>T1</b>	2 mg/L	2,30	2,10	2,33	2,27	2,25
<b>T2</b>	4 mg/L	2,63	2,23	2,27	2,43	2,39
<b>T3</b>	6 mg/L	2,97	2,27	2,33	3,27	2,71

Para la fase de multiplicación de *Guadua angustifolia* se usan micromacollos (los cuáles se generan de una microestaca).

En la división continua de micromacollos, estos deben ser divididos en grupos de 2 a 5 brotes y ser sembrados de esa forma, pues si se divide en brotes individuales es poco probable que se desarrolle. La tasa de multiplicación de micromacollos, nos indica cuántos micromacollos nuevos vamos a obtener a partir de un explante.

En la tabla 26, en la que se presenta la tasa promedio de multiplicación, se observa que el tratamiento T<sub>3</sub> con 2,71 micromacollos/explante es el que mejores resultados ha dado. Como en la tabla anterior el número de micromacollos desciende después de la primera división, sin embargo, asciende en los siguientes subcultivos, siendo el cuarto subcultivo el que tiene una marcada diferencia respecto a los demás.

Estos resultados son ligeramente mayores a los obtenidos por Jiménez et al. (2006), ya que ellos obtuvieron una tasa de multiplicación de 2,5 micromacollos con la adición de 5 mg/L BA con similar número de semanas a los trabajados en esta investigación para esta fase.

Con los resultados obtenidos se comprueba la correlación positiva del BA en el medio de cultivo con la tasa de multiplicación, es decir, a mayor cantidad de BA mayor es la tasa de multiplicación.

Marulanda et al. (2005) obtuvieron una tasa de multiplicación de 2 con 2,5 mg/L BA realizando los subcultivos cada 4 semanas, además usó como enraizante AIA. Al inicio de esta investigación se tomó en cuenta este tiempo, sin embargo, se observó que los brotes aún eran pequeños y no tenían un aspecto vigoroso ni de brotes endurecidos por lo que se optó por dejarlo hasta las 6 semanas, tiempo que permitió que desarrollen mayor número de raíces vigorosas.

Según la información primaria mencionada en el marco teórico, en dos años por métodos convencionales se obtendrían 1296 plantas (en macollos) para llevar a campo, en la presente investigación y con la tasa de multiplicación obtenida, en el mismo tiempo se obtendrían 425713 plantas madres para aclimatar.

Desde el inicio de esta fase se observó la aparición de raíces en el 30% de las unidades experimentales, para el término de los subcultivos sin división el total de micromacollos presentaban raíces vigorosas y turgentes al 100%.

Después de la última división se esperó 4 semanas para proceder a la aclimatación, esto debido a que en cada división se retiró todo el medio sólido y recortó gran parte de las raíces. Luego de este tiempo los micromacollos presentaron al menos 50% de raíces turgentes y vigorosas.

### 4.3. FASE DE ACLIMATACIÓN

#### a. Porcentaje de aclimatación

En el ensayo preliminar no registrado, se utilizó como sustratos:

- Premix N° 8 (anexo 2)
- Pastilla prensada – Jiffys 50F (anexo 1)

Se observó que las vitroplantas crecieron y tuvieron mayor vigorosidad en el sustrato premix N°8 (Figuras 38 y 39).



**Figura 38: Vitroplantas de *Guadua angustifolia* en pastillas prensadas (izquierda) y Premix N°8 (derecha)**



**Figura 39: Vitroplantas a los 15 días de iniciar la aclimatación en dos tipos de sustrato**

Como se aprecia en la figura 39, el jiffy tiene menor espacio, en comparación con el sustrato premix para desarrollo de raíces, además la instalación en este sustrato se hizo difícil pues las raíces son turgentes y rígidas. En el premix N° 8, a los 15 días, se observó que las plántulas tenían mayor tamaño y nuevos brotes en comparación con las plántulas en jiffys.

Durante 8 semanas se sometieron a aclimatación un total de 94 plántulas (macollos), de las cuáles 87 plantas se aclimataron, correspondiendo a un 92,5% de aclimatación.

Jiménez et al. (2006) y Marulanda et al. (2005) obtuvieron porcentajes de aclimatación mayor a 95, ambos coinciden en que fertilizaron la planta a las 6 semanas y 1 semana respectivamente después de haber iniciado esta fase. El sustrato que usaron no fue inerte. Esto pudo haber hecho la diferencia con nuestra investigación, puesto que no se ha utilizado fertilizante alguno y el sustrato usado es inerte.

## V. CONCLUSIONES

1. Se corroboró que el método de desinfección propuesto por Cabrera (2015) es eficaz ya que en la fase de iniciación o establecimiento se obtuvo aproximadamente 95% de éxito (explantes libres de patógenos).
2. En el proceso de selección de explantes se comprobó que el material vegetal para la propagación *in vitro* de *Guadua angustifolia* es la microestaca, con un porcentaje de prendimiento del 80% para el T<sub>3</sub> (MS + 6 mg/L BA). Las yemas revestidas reaccionaron bien al proceso de desinfección, pero no lograron prosperar en el prendimiento.
3. En la fase de establecimiento *in vitro* de microestacas, el tratamiento 3 (MS + 6 mg/L BA) fue el que mejor resultado logró, al igual que el medio sin adición de citoquinina. Sin embargo, se observó mayor vigorosidad y tamaño de los brotes con la adición de la citoquinina.
4. En la fase de multiplicación el número de brotes y hojas en los tratamientos con BA fueron mayores a los obtenidos con la adición de ZEA.
5. La tasa de multiplicación en el primer subcultivo fue 2,97 micromacollos/6 semanas con el T<sub>3</sub> (MS + 6 mg/L BA). Sin embargo, en el segundo subcultivo con división la tasa de multiplicación se redujo considerablemente y a partir de la tercera división la tasa de multiplicación aumentó, lo que demuestra una relación directamente proporcional de la adición de BA con la tasa de multiplicación a partir de la segunda división.
6. La tasa de multiplicación promedio es 2,71 micromacollos/6 semanas por explante, lo cual nos dió 104 plantas para aclimatar en el primer año y 425713 en el segundo año plantas madres por aclimatar. La tasa inicial se debe a que en el comienzo de este tipo de propagación se consideró el tiempo para llegar hasta la fase de multiplicación con división (fase de iniciación y multiplicación sin división), sin embargo, si se dispone del material vegetal *in vitro* listo para multiplicar ese tiempo se elimina.

7. De acuerdo a la información contenida en el marco teórico, en esta investigación se ha logrado una mayor tasa de multiplicación que en las referidas experiencias en viveros.
8. Se requieren 47 semanas desde el establecimiento *in vitro* de las microestacas hasta el inicio de la aclimatación.
9. No hubo formación de callos durante el desarrollo *in vitro* de *Guadua angustifolia*.
10. Debido a que durante la fase de multiplicación se observó presencia de raíces, no fue necesario el uso de sustancias inductoras del enraizamiento.
11. Se logró aclimatar el 92,5% de plántulas con el sustrato Premix N° 8.
12. El protocolo que se estableció para la “Propagación *in vitro* de *Guadua angustifolia* (Bambú) a partir de microestacas de plantas desarrolladas en invernadero” consiste en utilizar como explantes microestacas conteniendo un nudo con una yema; luego proceder a la desinfección con benomilo 2 g/L, seguido de hipoclorito de sodio al 1,1% y PPM 2ml/L, mantenidos en incubación durante 3 semanas (las dos primeras semanas en oscuridad y la última en penumbra) en medio de iniciación MS con PPM 2 mg/L y BA 6mg/L. Luego 5 subcultivos sin división cada 4 semanas, seguido de 4 subcultivos con división cada 6 semanas. La incubación fue en cámara de crecimiento vegetal  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 70% de humedad relativa, fotoperiodo de 16 horas luz, y 5440 lux de intensidad luminosa. La aclimatación se logra en 8 semanas usando sustrato PREMIX #8 en condiciones de cámara climática.

## VI. RECOMENDACIONES

Desarrollar otras investigaciones evaluando un mayor número de subcultivos con división, ello con el fin de determinar si varía la tasa de multiplicación y la vigorosidad de los brotes de la especie.

Comprobar la estabilidad de la tasa de multiplicación y la vigorosidad de los brotes en función del número de subcultivos

Ensayar la aclimatación de vitroplantas de *Guadua angustifolia* usando sustratos orgánicos para evaluar el crecimiento de éstas.

Aplicar el protocolo de propagación establecido a otras especies de *Guadua*, para verificar su eficacia en otras especies del mismo género.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Agramonte, D., Jiménez, F., y Dita, M. (1998). Capítulo 11, Aclimatación. En Pérez J. (Ed), Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las plantas.
- Añazco, M. (2013). Estudio de Vulnerabilidad del Bambú (*Guadua angustifolia*) al Cambio Climático en la costa del Ecuador y norte Perú. Quito, Ecuador: Comisión Europea.
- Aureoles, F., Rodríguez, J., Legaria, J., Sahagún, J., y Peña, M. (2008). Propagación *in vitro* del Maguey bruto (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. Revista Chapingo, serie Horticultura, 4(3). Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2008000300006](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000300006)
- Botero, L. (2003). Reproducción de la *Guadua angustifolia* por el método de chusquines. INTERNATIONAL NETWORK FOR BAMBOO AND RATTAN (INBAR). Guayaquil, Ecuador. Recuperado de [https://www.doc-developpement-durable.org/file/Arbres-Bois-de-Rapport-Reforestation/FICHES\\_ARBRES/bambou/Propagation-of-Guadua-Angustifolia-using-the-Chusquines-method.pdf](https://www.doc-developpement-durable.org/file/Arbres-Bois-de-Rapport-Reforestation/FICHES_ARBRES/bambou/Propagation-of-Guadua-Angustifolia-using-the-Chusquines-method.pdf)
- Cardoza, V. (2005). Capítulo 5, Tissue culture: the manipulation of plant development. En C. Stewart (Ed.) Book Plant biotechnology and genetics. Principles, techniques and applications (2° ed.). Pondicherry, India: SPi Global
- Corporación autónoma regional del valle del Cauca (CVC) y Corporación Aldea Global. (2005). Silvicultura y manejo sostenible de la Guadua (diapositivas). Antioquía, Colombia. Recuperado de <https://docplayer.es/23089377-Silvicultura-y-manejo-sostenible-de-la-guadua.html>

- Daquinta, M., Pacheco, D., Lezcano, Y., y Sagarra, F. (2010). Propagación *in vitro* de bambú chino (*Dracenia sanderiana* L.). Ciencia y Tecnología 3(1): 7-13 2010. Recuperado de [http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C1\\_2n12010.pdf](http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C1_2n12010.pdf)
- Gamarra, L. (2014). Regeneración *in vitro* vía organogénesis y aislamientos de protoplastos de *Gmelina arborea* a partir de plantas *in vitro* (tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Gielis, J., Peeters, K., Oprins, J., y Debergh, P. (2001). Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. Revista Acta Hort. 552: 195–203. Recuperado de [https://www.actahort.org/books/552/552\\_22.htm](https://www.actahort.org/books/552/552_22.htm)
- Giraldo, E., y Sabogal, A. (1999). La Guadua, una alternativa sostenible. Quindío, Colombia: Corporación autónoma regional de Quindío.
- Hernández, A., y Gatica, A. (2001). Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* (Bambú amarillo). Centro de Investigación en Biotecnología. Cartago, Costa Rica. Recuperado de <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/34/BJFIB200330.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). (2017). Centro E. La Molina, Lima, Perú. Recuperado de <http://www.inia.gob.pe/ubicanos/lima-region/la-molina/eea/centro-experimental-la-molina/>
- Jiménez, E. (1998). Capítulo 3, Cultivo de ápices y meristemas. En Pérez J. (Ed), Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las plantas.
- Jiménez, V., Castillo, J., Tavares, E., Guevara, E., y Montiel, M. (2006). *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. Plant Cell Tiss Organ Cult 86: 389–395. doi: 10.1007/s11240-006-9120-4
- Lárraga, N., Gutiérrez, N., López, H., Pedraza, M., Vargas, J., Santos, G., y Santos, U. (2011). Propagación vegetativa de tres especies de bambú. Revista Ra Ximhai 7(2): 205 – 218. Recuperado de [dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4471505.pdf](http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4471505.pdf)
- Liese, W. 1985. Bamboos – biology, silvics, properties, utilization. Eschborn, Germany: GTZ.

- Litz, R., y Jarret, R. (2004). Capítulo 7, Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En Roca, W., y Mroginski, L. (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Florida, Estados Unidos: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Londoño, X. (2002). Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los bambúes del nuevo mundo (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia. Disponible en: <http://www.hof-landlust.de/scb/taller.html>
- Londoño, X. (diciembre, 2005). Aspectos generales de los bambúes americanos. En Herrera, F. (Presidencia). Conferencia Magistral llevada a cabo en el I Congreso Mexicano del Bambú. Veracruz de Ignacio de la llave, México.
- Luna, R. (2002). Micropropagación de algodón (*Gossypium barbadense*) var. Tanguis (tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.
- Marulanda, M., Gutiérrez, L., y Márquez, M. (2005). Micropropagación de *Guadua angustifolia*. Revista Actual Biol, 27 (82), 5-15.
- Maruplast. (2018). Tecnologías en invernadero, sunshine Premix #8 y jiffys F50. Lima, PE. Recuperado de <https://maruplast.com/>
- Mendoza, M., Tamayo, A., y Pacheco, A. (2010). Establecimiento de un protocolo para la multiplicación *in vitro* de bambú (*Guadua angustifolia*): Fase 1. Revista Tierra Tropical 6(2), 191 – 199. Recuperado de <http://tierratropical.org/es/editions/edition-6-2-2010/establishment-of-a-protocol-for-phase-i-in-vitro-multiplication-of-bamboo-guadua-angustifolia/>
- Mercedes, J. (2006). Guía Técnica Cultivo del Bambú. Santo Domingo, República Dominicana: CEDAF.
- Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). (2008). Plan Nacional de Promoción del Bambú 2008 – 2020.
- Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). (2010). BAMBU: Biología, cultivo, Manejo y usos en el Perú.
- Montalván, P. (1992). Propagación vegetativa *in vitro* del Bambú (Tesis de pregrado). Escuela Agrícola Panamericana. Honduras.

- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Revista Physiologia plantarum* 15: 473–497. Recuperado de [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)
- Orellana, P. (1998). Capítulo 9, Propagación vía organogénesis. En Pérez J. (Ed), *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las plantas.
- Ramírez, L. (2013). Evaluación de tratamientos de desinfección en segmentos nodales de *Guadua angustifolia* para el establecimiento del cultivo in vitro (tesis de pregrado). Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Bogotá, Colombia.
- Reyplast. (2018). Batea dual #6. Lima, Perú Recuperado de <https://www.reyplast.pe/>
- Roca, W., y Mroginski, L (Eds.). (1993). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical
- Salas, E. (2006). Actualidad y futuro de la Arquitectura de Bambú en Colombia (tesis de Doctorado). Universidad Politécnica de Cataluña, España. Recuperado de [http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6130/06\\_ESD\\_Cos\\_pp\\_35\\_81.pdf?sequence=6](http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6130/06_ESD_Cos_pp_35_81.pdf?sequence=6)
- Salgado, R. (2015). La propagación de plantas *in vitro*, un éxito biotecnológico. *Revista Saber Más* 10(3). Recuperado de <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/75-numero-10/153-la-propagacion-de-pantas-in-vitro-un-exito-biotecnologico.html>
- Sharry, S., Adema, M., y Abedini. (Coord.). (2015). *Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. La Plata, Argentina: Universidad Nacional de la Plata.
- Smith, R. (2013). *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments* (3° ed.). Texas, EE.UU.: Academic Press. Recuperado de <https://biot202.files.wordpress.com/2015/09/plant-tissue-culture-third-edition-techniques-and-experiments-by-roberta-h-smith.pdf>
- Takahashi, J. (s/f). *El Bambú y su Potencial para el Desarrollo Sostenible en el Perú*. Universidad Científica del Sur (diapositivas). Lima, Perú. Recuperado de [http://www.agrobanco.com.pe/pdf\\_cpc/Bambu\\_JosefinaTakahashi.pdf](http://www.agrobanco.com.pe/pdf_cpc/Bambu_JosefinaTakahashi.pdf)

Villalobos, V., y Thorpe, T. (1991). Capítulo 6, Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En Roca, W., y Mroginski, L. (Eds). Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Florida, Estados Unidos: Centro Internacional de Agricultura Tropical.



**ANEXO 2:**  
**FICHA TECNICA DEL SUSTRATO PREMIX #8**

<b>1.0 NOMBRE COMERCIAL DEL PRODUCTO:</b>																																													
Producto final: <b>SUSTRATO PREMIX #8</b>																																													
1.1. Identificación del fabricante:																																													
Nombre:	<b>SUNGRO HORTICULTURE INC.</b>																																												
Dirección:	15831 N.E. 8TH Street, Bellevue, WA 98008																																												
1.2. Identificación de la empresa importadora:																																													
Nombre:	<b>MARUPLAST INTERNACIONAL EIRL</b>																																												
Dirección:	Av. Primavera 120 Of. B -404 Surco, Lima - Perú																																												
<b>2.0 INFORMACIÓN SOBRE EL PRINCIPAL COMPONENTE DEL PRODUCTO</b>																																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2" style="background-color: #e1f5fe;">Ingredients:</th> </tr> <tr> <td colspan="2">Fine Canadian Sphagnum peat moss</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Fine Vermiculite and Perlite</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Dolomite</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Gypsum</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Proprietary starter nutrient charge with major and minor nutrients</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Proprietary wetting agent</td> </tr> </table>	Ingredients:		Fine Canadian Sphagnum peat moss		Fine Vermiculite and Perlite		Dolomite		Gypsum		Proprietary starter nutrient charge with major and minor nutrients		Proprietary wetting agent		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2" style="background-color: #e1f5fe;">Uses:</th> </tr> <tr> <td colspan="2">Bedding Plants</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Vegetables</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Tobacco</td> </tr> </table>	Uses:		Bedding Plants		Vegetables		Tobacco																							
Ingredients:																																													
Fine Canadian Sphagnum peat moss																																													
Fine Vermiculite and Perlite																																													
Dolomite																																													
Gypsum																																													
Proprietary starter nutrient charge with major and minor nutrients																																													
Proprietary wetting agent																																													
Uses:																																													
Bedding Plants																																													
Vegetables																																													
Tobacco																																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2" style="background-color: #e1f5fe;">Typical Extractable Nutrient Range *</th> </tr> <tr> <td>pH</td> <td>5.0 - 5.5</td> </tr> <tr> <td>Ec (mmhos)/cm</td> <td>0.3 - .75</td> </tr> <tr> <td>Nitrate Nitrogen, N03-N (ppm)</td> <td>5 - 40</td> </tr> <tr> <td>Ammonium Nitrogen, NH4 - N (ppm)</td> <td>2 - 20</td> </tr> <tr> <td>Phosphorus, P (ppm)</td> <td>5 - 25</td> </tr> <tr> <td>Potassium, K (ppm)</td> <td>25 - 100</td> </tr> <tr> <td>Calcium, Ca (ppm)</td> <td>50 - 190</td> </tr> <tr> <td>Magnesium, Mg (ppm)</td> <td>30 - 100</td> </tr> <tr> <td>Sulfur, S (ppm)</td> <td>40 - 180</td> </tr> <tr> <td>Manganese, Mn (ppm)</td> <td>.3 - 1.5</td> </tr> <tr> <td>Iron, Fe (ppm)</td> <td>0.1 - 1.0</td> </tr> <tr> <td>Copper, Cu (ppm)</td> <td>.005 - .15</td> </tr> <tr> <td>Boron, B (ppm)</td> <td>.05 - 0.3</td> </tr> <tr> <td>Zinc, Zn (ppm)</td> <td>.03 - .5</td> </tr> <tr> <td>Molybdenum, Mo (ppm)</td> <td>.005 - .15</td> </tr> <tr> <td colspan="2">* Saturated extract procedure (two weeks after production)</td> </tr> </table>	Typical Extractable Nutrient Range *		pH	5.0 - 5.5	Ec (mmhos)/cm	0.3 - .75	Nitrate Nitrogen, N03-N (ppm)	5 - 40	Ammonium Nitrogen, NH4 - N (ppm)	2 - 20	Phosphorus, P (ppm)	5 - 25	Potassium, K (ppm)	25 - 100	Calcium, Ca (ppm)	50 - 190	Magnesium, Mg (ppm)	30 - 100	Sulfur, S (ppm)	40 - 180	Manganese, Mn (ppm)	.3 - 1.5	Iron, Fe (ppm)	0.1 - 1.0	Copper, Cu (ppm)	.005 - .15	Boron, B (ppm)	.05 - 0.3	Zinc, Zn (ppm)	.03 - .5	Molybdenum, Mo (ppm)	.005 - .15	* Saturated extract procedure (two weeks after production)		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2" style="background-color: #e1f5fe;">Available:</th> </tr> <tr> <td colspan="2">Loose Fill - 2.8 cu ft. bags, 51/pallet</td> </tr> <tr> <td colspan="2">60 cu ft. totes and bulk</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Compressed - 3.8 cu.ft. bales. 30/ pallet</td> </tr> <tr> <td colspan="2">55.5 cu ft. bales, 2 per pallet</td> </tr> </table>	Available:		Loose Fill - 2.8 cu ft. bags, 51/pallet		60 cu ft. totes and bulk		Compressed - 3.8 cu.ft. bales. 30/ pallet		55.5 cu ft. bales, 2 per pallet	
Typical Extractable Nutrient Range *																																													
pH	5.0 - 5.5																																												
Ec (mmhos)/cm	0.3 - .75																																												
Nitrate Nitrogen, N03-N (ppm)	5 - 40																																												
Ammonium Nitrogen, NH4 - N (ppm)	2 - 20																																												
Phosphorus, P (ppm)	5 - 25																																												
Potassium, K (ppm)	25 - 100																																												
Calcium, Ca (ppm)	50 - 190																																												
Magnesium, Mg (ppm)	30 - 100																																												
Sulfur, S (ppm)	40 - 180																																												
Manganese, Mn (ppm)	.3 - 1.5																																												
Iron, Fe (ppm)	0.1 - 1.0																																												
Copper, Cu (ppm)	.005 - .15																																												
Boron, B (ppm)	.05 - 0.3																																												
Zinc, Zn (ppm)	.03 - .5																																												
Molybdenum, Mo (ppm)	.005 - .15																																												
* Saturated extract procedure (two weeks after production)																																													
Available:																																													
Loose Fill - 2.8 cu ft. bags, 51/pallet																																													
60 cu ft. totes and bulk																																													
Compressed - 3.8 cu.ft. bales. 30/ pallet																																													
55.5 cu ft. bales, 2 per pallet																																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2" style="background-color: #e1f5fe;">Physical Properties</th> </tr> <tr> <th style="background-color: #e1f5fe;">Tests</th> <th style="background-color: #e1f5fe;">Standard</th> </tr> <tr> <td>Bulk Density</td> <td>7 - 10 lbs./ft3</td> </tr> <tr> <td>Moisture Percentage</td> <td>45 - 55 %</td> </tr> <tr> <td>Water-holding capacity</td> <td>50 - 70% by volume</td> </tr> <tr> <td>Air Capacity</td> <td>8 - 20% by volume</td> </tr> </table>	Physical Properties		Tests	Standard	Bulk Density	7 - 10 lbs./ft3	Moisture Percentage	45 - 55 %	Water-holding capacity	50 - 70% by volume	Air Capacity	8 - 20% by volume	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2" style="background-color: #e1f5fe;">Average Yield:</th> </tr> <tr> <td colspan="2">Loose fill - 2.8 cu ft. and 60 cu ft. respectively</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Compressed - 7.1 cu ft. and 110 cu ft. respectively</td> </tr> </table>	Average Yield:		Loose fill - 2.8 cu ft. and 60 cu ft. respectively		Compressed - 7.1 cu ft. and 110 cu ft. respectively																											
Physical Properties																																													
Tests	Standard																																												
Bulk Density	7 - 10 lbs./ft3																																												
Moisture Percentage	45 - 55 %																																												
Water-holding capacity	50 - 70% by volume																																												
Air Capacity	8 - 20% by volume																																												
Average Yield:																																													
Loose fill - 2.8 cu ft. and 60 cu ft. respectively																																													
Compressed - 7.1 cu ft. and 110 cu ft. respectively																																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2" style="background-color: #e1f5fe;">Average Shipping Weight</th> </tr> <tr> <td colspan="2">3.8 cu ft. - 48-80 lbs.</td> </tr> <tr> <td colspan="2">55.5 cu. Ft. = 800-1200 lbs</td> </tr> <tr> <td colspan="2">2.8 cu ft. = 25-40 lbs</td> </tr> <tr> <td colspan="2">60 cu ft. = 500-600 lbs</td> </tr> </table>	Average Shipping Weight		3.8 cu ft. - 48-80 lbs.		55.5 cu. Ft. = 800-1200 lbs		2.8 cu ft. = 25-40 lbs		60 cu ft. = 500-600 lbs		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2" style="background-color: #e1f5fe;">Testing Method</th> </tr> <tr> <td colspan="2">A.S.T.M.D 2978-90</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Percent based on weight to weight basis</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Values at container (6 1/2" azalea pot) capacity of media</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Values at container (6 1/2" azalea pot) capacity of media</td> </tr> </table>	Testing Method		A.S.T.M.D 2978-90		Percent based on weight to weight basis		Values at container (6 1/2" azalea pot) capacity of media		Values at container (6 1/2" azalea pot) capacity of media																									
Average Shipping Weight																																													
3.8 cu ft. - 48-80 lbs.																																													
55.5 cu. Ft. = 800-1200 lbs																																													
2.8 cu ft. = 25-40 lbs																																													
60 cu ft. = 500-600 lbs																																													
Testing Method																																													
A.S.T.M.D 2978-90																																													
Percent based on weight to weight basis																																													
Values at container (6 1/2" azalea pot) capacity of media																																													
Values at container (6 1/2" azalea pot) capacity of media																																													
<p style="font-size: small;">ATENCIÓN: Esta información se suministra de buena fe, es precisa y confiable según nuestro mejor conocimiento, pero debe considerarse sólo como una guía en la selección del producto y no como garantía de funcionalidad. <b>MARUPLAST INTERNACIONAL E.I.R.L.</b> declina toda responsabilidad por resultados obtenidos mediante el uso de ésta información.</p>																																													

Fuente: Maruplast Internacional E.I.R.L.

**ANEXO 3:**

**DATOS DE CONTAMINACIÓN DURANTE LA FASE DE INICIACIÓN PARA MEDIO LÍQUIDO Y SÓLIDO EN YEMAS AXILARES**

- 0: Sin contaminación
- 1: Contaminado por Hongos
- 2: Contaminación por bacterias

**A LA SEMANA DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																													
	R1									R2									R3											
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**A LAS DOS SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																													
	R1									R2									R3											
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T13	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<b>T14</b>	0 0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T15</b>	0 0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 1 0 0 0 0 0 0 0
<b>T16</b>	0 0 0 1 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 1 0 0 0 0 0 0 0

**A LAS 3 SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES		
	R1	R2	R3
<b>T1</b>	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T2</b>	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T3</b>	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T4</b>	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T5</b>	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T6</b>	0 0 0 0 0 1 1 1 1 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 0 0 0 0 0
<b>T7</b>	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 0 0 0 0 0
<b>T8</b>	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
<b>T9</b>	0 0 1 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T10</b>	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T11</b>	0 0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T12</b>	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T13</b>	0 1 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0 0
<b>T14</b>	0 0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 0 0 0 0 0 0 0 0 1
<b>T15</b>	1 1 0 0 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 0 1 0 0 0 0 0 0 0
<b>T16</b>	0 0 0 1 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 1 0 0 1 0 0 0 1

**A LAS 4 SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES		
	R1	R2	R3
<b>T1</b>	1 1 1 1 1 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T2</b>	1 1 1 1 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T3</b>	1 1 1 1 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
<b>T4</b>	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 1 1 1 1 1
<b>T5</b>	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T6</b>	0 0 0 0 0 1 1 1 1 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 0 0 0 0 0
<b>T7</b>	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 0 0 0 0 0
<b>T8</b>	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 1 0 0 0 0 0	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
<b>T9</b>	1 0 1 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T10</b>	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 0 0 0 0 0 1
<b>T11</b>	0 0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 1 0 0 1 0 0
<b>T12</b>	1 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
<b>T13</b>	0 1 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0 0
<b>T14</b>	0 0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0 1
<b>T15</b>	1 1 0 0 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 0 1 0 0 0 0 0 0 0
<b>T16</b>	0 0 0 1 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	1 0 1 0 0 1 0 0 0 1

**ANEXO 4:**

**DATOS DE PRENDIMIENTO DURANTE LA FASE DE INICIACIÓN PARA MEDIO LÍQUIDO Y SÓLIDO EN YEMAS AXILARES**

1: No prendimiento

2: Prendimiento

A LAS TRES SEMANAS DE SIEMBRA												
TRATAMIENTOS	REPETICIONES											
	R1			R2				R3				
T1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
T4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T7	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
T8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1
T16	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2

A LAS CUATRO SEMANAS DE SIEMBRA												
TRATAMIENTOS	REPETICIONES											
	R1			R2				R3				
T1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
T2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
T3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
T4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
T5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
T6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T7	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
T8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1
T16	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2

**ANEXO 5:**

**DATOS DE NECROSIS DURANTE LA FASE DE INICIACIÓN PARA MEDIO LÍQUIDO Y SÓLIDO EN YEMAS AXILARES**

- 1: Grado 1, 0 al 25% del cuerpo del explante necrosado, color verde.  
 2: Grado 2, 25 al 50% del cuerpo del explante necrosado, color amarillo pálido.  
 3: Grado 3, 50 al 100% del cuerpo del explante necrosado, color marrón.

**A LA SEMANA DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																																		
	R1									R2									R3																
T1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2						
T2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2	1
T3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1
T4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T6	2	2	1	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T8	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T9	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
T10	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1
T11	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
T12	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T13	3	2	2	2	3	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
T14	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T15	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T16	2	1	2	1	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**A LAS DOS SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																																		
	R1									R2									R3																
T1	3	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3		
T2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	
T3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	
T4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1	1	
T5	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	
T6	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
T7	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
T8	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	
T9	2	3	2	2	3	3	2	2	2	3	3	3	3	1	2	2	3	3	2	3	3	3	2	3	3	3	2	2	2	3	3	2	2	3	
T10	1	1	3	2	2	2	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	3	2	
T11	2	2	3	3	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
T12	3	1	2	2	2	2	2	2	3	3	1	2	1	2	2	2	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	2	2	1	2	2	2	1	

<b>T13</b>	3 3 3 2 3 3 3 3 3 2	2 2 2 3 3 2 2 2 2 2	2 2 2 3 2 2 1 2 2 3
<b>T14</b>	2 2 2 2 2 3 2 2 2 2	2 2 2 2 2 2 3 2 2 2	2 2 1 1 2 2 3 2 2 2
<b>T15</b>	3 3 2 2 2 2 2 2 2 2	2 2 2 2 2 2 3 2 2 2	2 2 2 3 2 2 2 2 2 2
<b>T16</b>	2 1 2 1 2 1 2 1 2 1	2 2 2 2 2 1 2 2 1 2	2 1 1 2 2 1 2 2 2 2

**A LAS 3 SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATA MIENT OS	REPETICIONES		
	R1	R2	R3
<b>T1</b>	3 3 2 2 2 2 2 3 3 3	3 3 3 3 3 3 2 2 3	2 3 3 3 3 2 3 3 2 3
<b>T2</b>	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	2 2 2 2 2 2 2 2 2	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
<b>T3</b>	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	2 2 2 2 2 2 2 2 2	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
<b>T4</b>	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	2 2 2 2 2 2 2 2 2	2 2 2 2 2 2 2 3 2 2
<b>T5</b>	3 2 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 2 2 3 3 3 3
<b>T6</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 2 2 2 2 3 3
<b>T7</b>	2 3 3 2 3 3 3 3 3 2	3 3 2 2 2 2 2 2 2	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
<b>T8</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 2 2 2 2 2	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T9</b>	3 3 2 2 3 3 2 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 2 2 2 3 2 3 3
<b>T10</b>	2 1 3 3 2 3 3 2 2 2	2 2 2 2 2 2 3 2 2	2 2 2 2 2 2 2 2 3 2
<b>T11</b>	3 2 3 3 3 2 3 2 2 1	1 2 2 2 3 2 2 2 2	2 2 1 2 2 2 2 2 2 2
<b>T12</b>	2 2 3 3 3 2 2 3 3 3	2 2 2 2 2 2 2 2 2	3 3 2 2 2 2 2 2 2 1
<b>T13</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T14</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	2 3 2 2 3 2 3 3 3 3
<b>T15</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	2 3 2 2 3 2 3 3 3 3
<b>T16</b>	3 2 3 3 3 3 3 2 3 3	3 2 2 3 3 2 3 3 3	3 3 2 3 2 3 2 3 3 3

**A LAS 4 SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATA MIENT OS	REPETICIONES		
	R1	R2	R3
<b>T1</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T2</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T3</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T4</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T5</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T6</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T7</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 2 2 3 3	3 3 3 3 2 3 3 2 3 3
<b>T8</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T9</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T10</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T11</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T12</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T13</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T14</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
<b>T15</b>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 3	3 3 3 3 3 3 3 3 2
<b>T16</b>	3 2 3 3 3 3 3 3 3 3	3 2 2 3 3 3 3 3 3	2 3 3 3 2 3 3 2 3 3

**ANEXO 6:**

**DATOS DE CONTAMINACION EN MEDIO DOBLE FASE EN YEMAS AXILARES**

- 0: Sin contaminación
- 1: Contaminado por Hongos
- 2: Contaminación por bacterias

**A LA SEMANA DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																												
	R1									R2									R3										
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**A LAS DOS SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																												
	R1									R2									R3										
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**A LAS 3 SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																												
	R1									R2									R3										
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**A LAS 4 SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																														
	R1									R2									R3												
<b>T1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>T2</b>	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>T3</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>T4</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
<b>T5</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>T6</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>T7</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0

**ANEXO 7:**

**DATOS DE PRENDIMIENTO EN MEDIO DOBLE FASE EN YEMAS AXILARES**

1: No prendimiento

2: Prendimiento

**A LAS TRES SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATA MIENT OS	REPETICIONES																													
	R1									R2									R3											
<b>T1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>T2</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>T3</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>T4</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>T5</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>T6</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>T7</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**A LAS CUATRO SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATA MIENT OS	REPETICIONES																													
	R1									R2									R3											
<b>T1</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
<b>T2</b>	1	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
<b>T3</b>	1	1	2	2	1	2	2	1	1	2	1	1	2	1	2	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	2	2	3
<b>T4</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>T5</b>	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
<b>T6</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>T7</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**ANEXO 8:**

**DATOS DE NECROSIS EN MEDIO DOBLE FASE EN YEMAS AXILARES**

- 1: Grado 1, 0 al 25% del cuerpo del explante necrosado, color verde.  
 2: Grado 2, 25 al 50% del cuerpo del explante necrosado, color amarillo pálido.  
 3: Grado 3, 50 al 100% del cuerpo del explante necrosado, color marrón.

**A LA SEMANA DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																													
	R1									R2									R3											
T1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
T2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**A LAS DOS SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																													
	R1									R2									R3											
T1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
T2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**A LAS 3 SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																													
	R1									R2									R3											
T1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	
T2	1	1	1	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1
T3	1	2	2	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2
T4	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2
T5	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1
T6	2	1	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1
T7	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1

**A LAS 4 SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																													
	R1									R2									R3											
<b>T1</b>	1	1	2	3	1	1	3	1	2	1	2	2	1	2	1	3	1	1	2	1	1	3	1	3	1	3	1	1	3	1
<b>T2</b>	1	1	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1	2	1	1	3	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	3	2	1	1
<b>T3</b>	2	2	3	1	1	2	2	2	1	2	1	3	1	1	1	1	2	3	1	3	1	2	2	3	1	2	3	3	3	2
<b>T4</b>	1	2	1	2	1	3	2	1	3	2	1	2	1	1	3	1	2	2	2	2	1	1	3	1	2	2	1	1	1	2
<b>T5</b>	1	2	2	1	1	3	1	3	2	2	1	1	3	1	2	2	1	2	1	1	3	1	2	2	2	1	3	1	2	1
<b>T6</b>	3	2	2	2	2	2	1	3	2	3	2	3	2	3	2	3	3	2	3	2	2	2	2	2	3	2	2	3	2	2
<b>T7</b>	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	3	3	3	3	2	3	2	2	2	3	2	3	3	3	2	3	2	2	2

**ANEXO 9:**

**DATOS DE CONTAMINACION EN MEDIO SÓLIDO CON MICROESTACAS**

- 0: Sin contaminación
- 1: Contaminado por Hongos
- 2: Contaminación por bacterias

**A LA SEMANA DE SIEMBRA**

TRATA MIENT OS	REPETICIONES																													
	R1									R2									R3											
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**A LAS DOS SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATA MIENT OS	REPETICIONES																													
	R1									R2									R3											
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**A LAS 3 SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATA MIENT OS	REPETICIONES																													
	R1									R2									R3											
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**ANEXO 10:**

**DATOS DE PRENDIMIENTOIS EN MEDIO SÓLIDO CON MICROESTACAS**

1: No prendimiento

2: Prendimiento

**A LA 1RA SEMANA DE SIEMBRA**

TRATA MIENT OS	REPETICIONES																												
	R1									R2									R3										
T1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**A LAS DOS SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATA MIENT OS	REPETICIONES																												
	R1									R2									R3										
T1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T3	1	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
T4	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	1	1	1
T5	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1
T6	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1
T7	1	2	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

**A LAS TRES SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATA MIENT OS	REPETICIONES																												
	R1									R2									R3										
T1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T3	1	2	2	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
T4	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	1	1	1
T5	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1
T6	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1
T7	2	2	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1

**ANEXO 11:**

**DATOS DE NECROSIS EN MEDIO SÓLIDO CON MICROESTACAS**

- 1: Grado 1, 0 al 25% del cuerpo del explante necrosado, color verde.  
 2: Grado 2, 25 al 50% del cuerpo del explante necrosado, color amarillo pálido.  
 3: Grado 3, 50 al 100% del cuerpo del explante necrosado, color marrón.

**A LA SEMANA DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																																
	R1										R2										R3												
T1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
T2	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	1	1	2	1	2	1	2
T3	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
T4	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
T5	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2
T6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1
T7	1	1	3	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2

**A LAS DOS SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																																
	R1										R2										R3												
T1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	3	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1	2	1	1	1	1	
T2	1	1	3	1	2	1	2	2	1	1	3	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	
T3	1	1	1	3	1	1	1	2	1	3	1	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2	2	1	3	1	2	2	2	2	2	1	1	1
T4	1	1	1	1	1	1	3	2	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2
T5	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2
T6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1
T7	1	2	3	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2

**A LAS 3 SEMANAS DE SIEMBRA**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																																
	R1										R2										R3												
T1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	3	2	3	2	3	2	2	3	3	3	3	3	2	3	3	2	2	2	3	2	2	3	2	3
T2	1	1	3	1	2	2	2	2	2	2	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2
T3	1	1	1	3	1	1	1	2	1	3	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3	2	2	2	2	2
T4	2	2	2	1	1	1	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	3	2	2	2	2	2	3	2	2
T5	3	3	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2
T6	2	2	1	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3
T7	2	2	3	2	1	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

## ANEXO 12:

### RESULTADOS ESTADÍSTICOS DEL NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE EN SUBCULTIVOS SIN DIVISIÓN

#### Primer subcultivo

##### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
N° BROTES 1	1	30	1.53	0.68	98.13	42.38	<0.0001
N° BROTES 2	2	30	1.70	0.84	104.12		
N° BROTES 3	3	30	2.57	1.33	135.82		
N° BROTES 4	4	30	1.13	0.35	72.33		
N° BROTES 5	5	30	1.00	0.00	62.00		
N° BROTES 6	6	30	1.13	0.43	70.60		

Trat.	Medias	Ranks	
5	1.00	62.00	A
6	1.13	70.60	A
4	1.13	72.33	A B
1	1.53	98.13	B C
2	1.70	104.12	C
3	2.57	135.82	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

#### Segundo subcultivo

##### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
N° BROTES 1	1	30	2.03	0.76	88.88	40.17	<0.0001
N° BROTES 2	2	30	2.53	1.14	108.43		
N° BROTES 3	3	30	4.03	2.27	134.67		
N° BROTES 4	4	30	2.07	1.41	79.33		
N° BROTES 5	5	30	1.57	0.68	62.72		
N° BROTES 6	6	30	1.67	0.66	68.97		

Trat.	Medias	Ranks	
5	1.57	62.72	A
6	1.67	68.97	A
4	2.07	79.33	A
1	2.03	88.88	A B
2	2.53	108.43	B C
3	4.03	134.67	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### Tercer subcultivo

#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
N° BROTES 1	1	30	3.03	1.40	90.48	30.43	<0.0001
N° BROTES 2	2	30	4.20	1.94	119.90		
N° BROTES 3	3	30	4.57	2.50	117.88		
N° BROTES 4	4	30	2.67	1.15	76.92		
N° BROTES 5	5	30	2.53	0.82	72.28		
N° BROTES 6	6	30	2.37	1.03	65.53		

#### Trat. Medias Ranks

6	2.37	65.53	A
5	2.53	72.28	A
4	2.67	76.92	A
1	3.03	90.48	A
3	4.57	117.88	B
2	4.20	119.90	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### Cuarto subcultivo sin división

#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
N° BROTES 1	1	30	3.57	1.59	90.15	33.08	<0.0001
N° BROTES 2	2	30	4.87	2.83	112.45		
N° BROTES 3	3	30	5.40	2.63	124.20		
N° BROTES 4	4	30	3.20	1.19	79.93		
N° BROTES 5	5	30	3.23	1.17	79.62		
N° BROTES 6	6	30	2.57	1.36	56.65		

#### Trat. Medias Ranks

6	2.57	56.65	A
5	3.23	79.62	A B
4	3.20	79.93	A B
1	3.57	90.15	B C
2	4.87	112.45	C D
3	5.40	124.20	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## Quinto subcultivo sin división

### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
Nº BROTOS 1		30	5.53	2.18	99.17	29.73	<0.0001
Nº BROTOS 2		30	6.40	4.15	100.15		
Nº BROTOS 3		30	7.77	3.37	126.07		
Nº BROTOS 4		30	4.63	1.61	77.88		
Nº BROTOS 5		30	4.80	1.73	80.97		
Nº BROTOS 6		30	4.00	1.44	58.77		

Trat.	Medias	Ranks		
6	4.00	58.77	A	
4	4.63	77.88	A	B
5	4.80	80.97	A	B
1	5.53	99.17		B
2	6.40	100.15		B C
3	7.77	126.07		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### ANEXO 13:

## RESULTADOS ESTADÍSTICOS DEL NÚMERO DE HOJAS POR EXPLANTE EN SUBCULTIVOS SIN DIVISIÓN

### Primer subcultivo

#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
N° HOJAS	1	30	3.67	1.24	99.63	26.92	<0.0001
N° HOJAS	2	30	4.03	1.75	107.75		
N° HOJAS	3	30	4.67	2.01	121.33		
N° HOJAS	4	30	2.80	0.85	68.57		
N° HOJAS	5	30	2.90	1.18	72.27		
N° HOJAS	6	30	2.97	1.19	73.45		

Trat.	Medias	Ranks	
4	2.80	68.57	A
5	2.90	72.27	A
6	2.97	73.45	A B
1	3.67	99.63	B C
2	4.03	107.75	C
3	4.67	121.33	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### Segundo subcultivo

#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
N° HOJAS	1	30	7.60	1.89	108.47	38.95	<0.0001
N° HOJAS	2	30	8.43	3.45	112.03		
N° HOJAS	3	30	10.13	4.94	122.17		
N° HOJAS	4	30	5.47	1.93	61.33		
N° HOJAS	5	30	5.67	1.69	68.28		
N° HOJAS	6	30	6.00	2.39	70.72		

Trat.	Medias	Ranks	
4	5.47	61.33	A
5	5.67	68.28	A
6	6.00	70.72	A
1	7.60	108.47	B
2	8.43	112.03	B
3	10.13	122.17	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### Tercer subcultivo

#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
N° HOJAS	1	30	9.50	2.75	81.72	25.95	0.0001
N° HOJAS	2	30	13.20	5.62	116.60		
N° HOJAS	3	30	13.77	6.15	117.42		
N° HOJAS	4	30	9.83	2.52	87.37		
N° HOJAS	5	30	8.87	2.94	72.32		
N° HOJAS	6	30	8.67	3.14	67.58		

#### Trat. Medias Ranks

6	8.67	67.58	A
5	8.87	72.32	A
1	9.50	81.72	A
4	9.83	87.37	A
2	13.20	116.60	B
3	13.77	117.42	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### Cuarto subcultivo

#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
N° HOJAS	1	30	12.47	4.26	99.23	23.69	0.0002
N° HOJAS	2	30	13.83	7.36	102.33		
N° HOJAS	3	30	15.33	6.91	114.20		
N° HOJAS	4	30	12.13	3.97	94.32		
N° HOJAS	5	30	10.60	3.12	76.33		
N° HOJAS	6	30	9.20	4.00	56.58		

#### Trat. Medias Ranks

6	9.20	56.58	A
5	10.60	76.33	A B
4	12.13	94.32	B C
1	12.47	99.23	B C
2	13.83	102.33	B C
3	15.33	114.20	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## Quinto subcultivo sin división

### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
N° HOJAS	1	30	18.37	6.21	107.45	37.41	<0.0001
N° HOJAS	2	30	17.53	7.99	97.73		
N° HOJAS	3	30	21.17	8.08	120.00		
N° HOJAS	4	30	16.57	4.95	94.80		
N° HOJAS	5	30	14.70	4.46	76.93		
N° HOJAS	6	30	11.57	3.61	46.08		

#### Trat. Medias Ranks

6	11.57	46.08	A
5	14.70	76.93	B
4	16.57	94.80	B C
2	17.53	97.73	B C
1	18.37	107.45	C
3	21.17	120.00	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

**ANEXO 14:**  
**RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LA TASA DE MULTIPLICACION**

**Primer subcultivo con división**

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
Nº BROTOS TOTAL 1		30	7.23	3.56	106.23	56.14	<0.0001
Nº BROTOS TOTAL 2		30	8.63	4.11	122.98		
Nº BROTOS TOTAL 3		30	8.80	3.92	124.62		
Nº BROTOS TOTAL 4		30	4.87	1.94	74.57		
Nº BROTOS TOTAL 5		30	4.50	1.72	66.13		
Nº BROTOS TOTAL 6		30	3.70	1.70	48.47		

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
Nº MICROMACOLLOS TOTAL 1		30	2.30	1.06	94.13	36.74	<0.0001
Nº MICROMACOLLOS TOTAL 2		30	2.63	0.96	112.40		
Nº MICROMACOLLOS TOTAL 3		30	2.97	1.10	126.02		
Nº MICROMACOLLOS TOTAL 4		30	1.93	0.83	76.87		
Nº MICROMACOLLOS TOTAL 5		30	1.93	0.58	78.20		
Nº MICROMACOLLOS TOTAL 6		30	1.57	0.57	55.38		

**Segundo subcultivo con división**

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
Nº BROTOS TOTAL 1		30	6.53	2.06	42.10	0.81	0.6611
Nº BROTOS TOTAL 2		30	6.73	1.70	46.45		
Nº BROTOS TOTAL 3		30	7.33	3.27	47.95		

**Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
Nº MICROMACOLLOS TOTAL 1		30	2.10	0.66	42.98	0.45	0.7571
Nº MICROMACOLLOS TOTAL 2		30	2.23	0.77	46.15		
Nº MICROMACOLLOS TOTAL 3		30	2.27	0.78	47.37		

### Tercer subcultivo con división

#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
N° BROTES TOTAL	1	30	8.33	3.07	46.65	4.28	0.1112
N° BROTES TOTAL	2	30	7.43	1.50	38.02		
N° BROTES TOTAL	3	30	8.60	2.24	51.83		

#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
N° MICROMACOLLOS TOTAL	1	30	2.33	0.76	45.53	0.17	0.8778
N° MICROMACOLLOS TOTAL	2	30	2.27	0.52	44.10		
N° MICROMACOLLOS TOTAL	3	30	2.33	0.55	46.87		

### Cuarto subcultivo con división

#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
N° BROTES TOTAL	1	30	7.67	1.94	32.97	24.54	<0.0001
N° BROTES TOTAL	2	30	8.43	2.82	39.07		
N° BROTES TOTAL	3	30	11.57	3.57	64.47		

#### Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Promedio rangos	H	p
N° MICROMACOLLOS TOTAL	1	30	2.27	0.45	35.27	19.67	<0.0001
N° MICROMACOLLOS TOTAL	2	30	2.43	0.77	38.57		
N° MICROMACOLLOS TOTAL	3	30	3.27	0.94	62.67		

**ANEXO 15:**

**MICROMACOLLOS PROYECTADOS EN 101 SEMANAS CON PROPAGACIÓN *in vitro* de *Guadua angustifolia***

