

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES**



**ESTABLECIMIENTO IN VITRO DEL BAMBÚ  
GUADUA ANGUSTIFOLIA KUNTH BAJO SEIS  
TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN  
APLICADOS EN SEGMENTOS NODALES  
PROCEDENTES DE RAMAS PRIMARIAS**

Presentado por:

**Daniel Corrales Holguin**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO FORESTAL

---

Lima - Perú  
2017

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos para calificar la sustentación del Trabajo de Tesis, presentado por el ex-alumno de la Facultad de Ciencias Forestales, Bach. DANIEL CORRALES HOLGUIN, intitulado “ESTABLECIMIENTO IN VITRO DEL BAMBÚ GUADUA ANGUSTIFOLIA KUNTH BAJO SEIS TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN APLICADOS EN SEGMENTOS NODALES PROCEDENTES DE RAMAS PRIMARIAS”.

Oídas las respuestas a las observaciones formuladas, lo declaramos:

.....

con el calificativo de .....

En consecuencia queda en condición de ser considerado APTO y recibir el título de INGENIERO FORESTAL.

La Molina, 27 de diciembre de 2016

.....  
Dra. María Isabel Manta Nolasco  
Presidente

.....  
Mg. Sc. María de Lourdes Tapia y  
Figuroa  
Miembro

.....  
Ing. Fernando Bulnes Soriano  
Miembro

Dr. Gilberto Domínguez Torrejón  
Asesor

## *DEDICATORIA*

*A María del Pilar Holguín Gálvez, mi madre.*

*“Guían mis manos, sus manos fuertes,*

*hacia el futuro,*

*hasta la victoria siempre”*

*A Rosaura Watanabe, mi paz,*

*Reina de todos mis torneos.*

*“...esto de ahora no era más que un eco,*

*la ola que regresa, atravesando mares,*

*hasta la antigua orilla.”*

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento*

*Al Dr. Gilberto Domínguez Torrejón, por su paciencia, apoyo y consejos en el desarrollo de esta investigación.*

*A la Dra. Maria de Lourdes Tapia y Figueroa, por su valiosa experiencia en el cultivo de tejidos, por su confianza y apoyo durante el desarrollo de toda esta investigación.*

*A mi hermano Jorge Ernesto “Georgie” Christiansen del Risco, ejemplo de persona, por los años de amistad incondicional, por el auspicio general, y por la confianza que siempre nos tendremos. Gracias, hermano.*

*Al gran Franco Canepa Pareja y a la nube, por la compañía, las risas, consejos y el transporte en todo el tiempo que duró esta tesis. Un tipazo Chupanubes!*

*A Andrea, Milagritos, Olguita, Gaby, Raquel, Rossana, Karina, por las conversas, los almuerzos, el apoyo y paciencia durante mi estadía en el IBT.*

*Al Ph. D Enrique Gonzales Mora, por sus amplios conocimientos y apoyo en el inicio de esta investigación.*

*Al Ing. Ricardo Sumar de Inkas Berries, por su colaboración con el agua de riego para las plantas madre.*

*A mis compañeros de Forestal Bambú.*

*Al Ing. Juan Carlos Domínguez Varas y al Ing. Luis Virgilio Reynaga Arambulo por los consejos, risas y permisos en la trabajo.*

*A la familia Holguín Galvez.*

## *RESUMEN*

Aplicando la técnica del cultivo *in vitro*, se llevó a cabo la etapa I de la micropropagación: Establecimiento de un cultivo aséptico, de la especie *Guadua angustifolia* Kunth. Esta etapa consiste en la selección de un tipo de explante de plantas madre, provenientes de invernadero, y la aplicación de un protocolo de desinfección. El medio de cultivo utilizado fue el MS (Murashige & Skoog) complementado, debido a sus buenos resultados en el cultivo *in vitro* de bambúes. Se desarrolló una metodología, caracterizándose el tipo de explante a utilizar, siendo ideales los segmentos nodales caracterizados como “basal 1”, “medio 1” y “medio 2”, con yema semidiferenciada. Posteriormente, se aplicaron 6 tratamientos de desinfección y se evaluó su efecto en el establecimiento *in vitro* de la especie. Los tratamientos fueron aplicados en siembras realizadas a inicios de junio y setiembre. A inicios de junio, se obtuvieron los mejores resultados en desinfección y establecimiento de los explantes con una tasa de 100 por ciento en cuatro de los seis tratamientos, sin diferencias significativas en el efecto de los tratamientos de desinfección en el crecimiento y desarrollo de las microplantas. Por otro lado, a inicios de setiembre, los explantes tuvieron contaminación severa por hongos y bacterias, la capacidad de respuesta de los explantes frente a los tratamientos de desinfección fue menor. La tasa de mortandad fue aumentando con el paso de las semanas por efecto de la oxidación fenólica. Los tratamientos de desinfección que presentaron mejores resultados para ambos meses fueron T4 y T5, que incluían el uso de Plant Preservative Mixture (PPM) en una concentración de  $2\text{mL.L}^{-1}$  en el medio de cultivo. El tratamiento T2 muestra evidencia para ser considerado un tratamiento alternativo al uso del PPM. La metodología utilizada permitirá continuar con la investigación de las siguientes fases del cultivo *in vitro*.

Palabras clave: Micropropagación, In vitro, *Guadua angustifolia*, Ramas, Desinfección, Vitroplantas

# ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Revisión de Literatura .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Generalidades de la Especie.....</b>	<b>3</b>
1.1. Especie: <i>Guadua angustifolia</i> Kunth – Bambú .....	3
1.2. Distribución de la <i>Guadua angustifolia</i> .....	4
1.3. Ecología .....	4
1.4. Clima .....	4
1.5. Suelo .....	4
1.6. Crecimiento y desarrollo de la <i>Guadua Angustifolia</i> .....	4
<b>2. Micropropagación .....</b>	<b>5</b>
2.1. Organogénesis a partir de segmentos nodales.....	6
2.1.1. Factores que controlan la organogénesis.....	6
2.2. Ventajas de la propagación <i>in vitro</i> .....	8
2.3. Oxidación Fenólica.....	9
2.4. Efecto de la época de siembra en el establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> .....	11
<b>3. Experiencias generales sobre el establecimiento <i>in vitro</i> de especies de bambú.....</b>	<b>12</b>
<b>III. Materiales y Métodos .....</b>	<b>16</b>
<b>1. Lugar de ejecución .....</b>	<b>16</b>
<b>2. Materiales.....</b>	<b>16</b>
2.1. Disponibilidad de Material Vegetal.....	16
2.2. Insumos del medio de cultivo.....	16
2.3. Insumos para la desinfección .....	17
2.4. Material de Vidrio y Plástico .....	18
2.5. Equipos e Instrumentos .....	18
2.6. Otros Materiales.....	19
<b>3. Esquema descriptivo de la investigación .....</b>	<b>20</b>
<b>4. Pruebas preliminares.....</b>	<b>21</b>
4.1. Selección del explante .....	21
4.2. Pruebas preliminares de desinfección .....	26
4.2.1. Biclورو de Mercurio .....	27
4.2.2. Hipoclorito de sodio .....	27
4.2.3. Benlate y Phyton .....	27
4.2.4. Benlate y Phyton – Alcohol 96° – Hipoclorito de Sodio .....	28
4.2.5. Plant Preservative Mixture (PPM) .....	28
<b>5. Métodos .....</b>	<b>29</b>
5.1. Procedimiento.....	29
5.1.1. Selección y acondicionamiento de explantes .....	29
5.1.2. Preparación del medio de cultivo.....	30
5.1.3. Desinfección del material vegetal.....	33
5.1.4. Tratamientos de desinfección seleccionados.....	35
5.1.5. Parámetros de evaluación.....	37
5.2. Análisis Estadístico .....	39
<b>IV. Resultados y discusión .....</b>	<b>41</b>
<b>1. Desinfección de explantes .....</b>	<b>41</b>
1.1. Desinfección - Siembra a inicios de Junio .....	41
1.2. Desinfección - Siembra a inicios de Setiembre.....	44

<b>2.</b>	<b>Evaluación de Brotes y Mortandad de explantes .....</b>	<b>46</b>
2.1.	Evaluación de Brote y Mortandad – Siembra a inicios de junio .....	46
2.2.	Evaluación de Brote y Mortandad - Siembra a inicios de setiembre .....	48
<b>3.</b>	<b>Oxidación fenólica.....</b>	<b>51</b>
3.1.	Oxidación Fenólica - Siembra a inicios de Junio .....	51
3.2.	Oxidación fenólica - Siembra a inicios de Setiembre.....	53
<b>4.</b>	<b>Longitud de brote, número de brotes por explante y promedio de hojas .....</b>	<b>56</b>
4.1.	Longitud de brote, número de brotes por explante y promedio de hojas – Siembra a inicios de Junio .....	56
4.2.	Longitud de brote, número de brotes por explante y promedio de hojas – Siembra a inicios de Setiembre.....	59
<b>V.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>62</b>
<b>VI.</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>63</b>
<b>VII.</b>	<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>64</b>
<b>VIII.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>72</b>

## *Índice de tablas*

	Página
Tabla 1:	Descripción cualitativa de explantes ensayados..... 25
Tabla 2:	Tratamientos de desinfección y parámetros de evaluación..... 38
Tabla 3:	Efecto de seis tratamientos de desinfección - Siembra a inicios de junio. .... 42
Tabla 4:	Efecto de seis tratamientos de desinfección - Siembra a inicios de Setiembre. ... 44
Tabla 5:	Resultados obtenidos en brote y explantes establecidos - Siembra a inicios de Junio..... 47
Tabla 6:	Resultados obtenidos en brote y explantes establecidos – Siembra a inicios de Setiembre. .... 49
Tabla 7:	Resultados obtenidos de oxidación fenólica – Siembra a inicios de Junio ..... 52
Tabla 8:	Resultados obtenidos de oxidación fenólica – Siembra a inicios de Setiembre... 54
Tabla 9:	Resultados obtenidos en longitud de brote, número de brotes y promedio de hojas – Siembra a inicios de Junio.....
Tabla 10:	Resultados obtenidos en longitud de brote, número de brotes, promedio de hojas - Siembra a inicios de Setiembre..... 59

## *Índice de figuras*

	Página
Figura 1: Planta madre de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth de 21 meses de edad. ....	22
Figura 2: Detalle de maduración hoja caulinar en segmento nodal en ramas primarias.....	23
Figura 3: Detalle de hoja caulinar en segmentos nodales de rama primaria. ....	24
Figura 4: Explantes acondicionados con yemas semidiferenciadas. ....	29
Figura 5: Preparación de Macro y Micro nutrientes MS. ....	30
Figura 6: Preparación del Medio de Cultivo MS modificado.....	31
Figura 7: Ajuste del pH del medio de cultivo. ....	31
Figura 8: Uso del microondas para hervir el medio de cultivo.....	32
Figura 9: Medio de cultivo en frascos de vidrio.....	32
Figura 10: Esterilización del medio de cultivo en autoclave. ....	33
Figura 11: Predesinfección con detergente comercial. ....	34
Figura 12: Predesinfección con Benlate y Phyton (T2). ....	34
Figura 13: Insumos de desinfección en cámara de flujo laminar. ....	35
Figura 14: Microplantas establecidas .....	52
Figura 15: Microplantas establecidas .....	53
Figura 16: Microplantas establecidas .....	53
Figura 17: Explantes con brote muerto por oxidación fenólica - Setiembre.....	55
Figura 18: Medición de longitud de vástagos con Image Pro Plus - Junio .....	58
Figura 19: Medición de longitud de vástagos con Image Pro Plus - Junio .....	58
Figura 20: Medición de longitud de vástagos – Setiembre.....	60

## *Índice de anexos*

	Página
ANEXO 1 MINITAB 17. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS – DESINFECCIÓN JUNIO.....	72
ANEXO 2 MINI TAB 17. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS – DESINFECCIÓN SETIEMBRE .....	73
ANEXO 3 MINITAB 17. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS – BROTES ESTABLECIDOS JUNIO.....	74
ANEXO 4 MINITAB 17. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS – BROTES SETIEMBRE .....	75
ANEXO 5 MINITAB 17. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS – BROTES ESTABLECIDOS SETIEMBRE.....	76
ANEXO 6 MINITAB 17. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS – OXIDACIÓN FENÓLICA SETIEMBRE .....	77
ANEXO 7 MINITAB 17. ANÁLISIS DE VARIANZA LONGITUD DE VÁSTAGO .....	78
ANEXO 8 MINITAB 17. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS – CANTIDAD DE HOJAS.....	79
ANEXO 9 PRUEBA PRELIMINAR DE BENLATE Y PHYTON .....	80
ANEXO 10 PRUEBA PRELIMINAR CON BICLORURO DE MERCURIO .....	82
ANEXO 11 PRUEBA PRELIMINAR HIPOCLORITO DE SODIO.....	84
ANEXO 12 PRUEBA PRELIMINAR BENLATE+PHYTON, ALCOHOL E HIPOCLORITO DE SODIO .....	86
ANEXO 13 PRUEBA PRELIMINAR PPM.....	89
ANEXO 14 PRUEBA PARA SELECCIÓN DEL TIPO DE EXPLANTE .....	92
ANEXO 15 FICHA TÉCNICA PLANT PRESERVATIVE MIXTURE.....	94
ANEXO 16 COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE & SKOOG .....	96
ANEXO 17 TEMPERATURA MAXIMA Y MINIMA (MAYO A SETIEMBRE) .....	97
ANEXO 18 CONDICIONES AMBIENTALES DEL INVERNADERO .....	98

## I. INTRODUCCIÓN

El bambú es un importante producto forestal no maderable y sustituto de la madera. Se encuentra en todas las regiones del mundo, como componente de los bosques naturales y, cada vez más, en plantaciones. Se utiliza en construcción, en artesanía y en pasta de papel, paneles, tableros, laminados, suelos, techos, tejidos, aceite, gas y carbón vegetal. La industria del bambú se encuentra en auge en Asia, y se extiende rápidamente a otros continentes como África y América (Lobovikov *et al.* 2007).

La especie *Guadua angustifolia* Kunth es el bambú tropical de mayor importancia económica. Esta especie se extiende en América del Sur hacia el norte, hasta los Andes venezolanos y hacia el sur hasta la frontera entre Ecuador y Perú (Judziewicz *et al.* 1999). De todos los bambúes americanos, la *Guadua angustifolia* es el más usado debido a la superioridad mecánica que posee al bajo peso, la facilidad para su manejo y procesamiento (Londoño 1990).

En nuestro país, su creciente demanda ha beneficiado a asociaciones y comunidades rurales que han incrementado las hectáreas dedicadas a este cultivo forestal. En contraparte, esta demanda ha generado la pérdida de guaduales naturales y a la sobreexplotación de áreas plantadas. Esta situación nos lleva a buscar diferentes alternativas de propagación para la conservación, recuperación de áreas e incremento de superficie plantada de esta especie.

Los métodos convencionales de propagación de bambú en forma sexual y vegetativa presentan problemas en la multiplicación a gran escala. La propagación sexual resulta casi inviable por el tipo de floración que presentan los bambúes, y en Perú no se cuenta con un registro sustentado de producción de semillas de *Guadua angustifolia* Kunth.

Por otro lado, si la propagación se realiza de forma vegetativa, existe la posibilidad de diseminar enfermedades, el tiempo de recuperación de la planta para su crecimiento es alto y el desarrollo es lento, aspectos que no permiten una efectiva propagación (Mendoza *et al.* 2010), lo que ha llevado a evaluar nuevas alternativas de multiplicación, entre las cuales destaca la micropropagación (Cruz, citado por López 2012)

La micropropagación se realiza en laboratorio bajo condiciones asépticas y mediante el uso de embriones de semilla o yemas axilares colocados en un medio de cultivo. Tiene ventaja sobre los demás métodos debido a la múltiple obtención de material que se consigue a partir de una yema meristemática, ya que la multiplicación es logarítmica, además se facilita el intercambio de germoplasma a nivel internacional por el tamaño de la muestra (Londoño 2002).

En las fases de micropropagación vegetal, la contaminación por hongos y bacterias es un problema grave que presenta dificultades para su manejo. La pérdida de material causada por contaminación, se convierte en limitante para el éxito del cultivo *in vitro*, haciendo necesarias las prácticas de desinfección superficial de los explantes. Por tanto, es imprescindible el estudio de métodos que conduzcan a la eliminación de los contaminantes microbianos presentes en el cultivo de tejidos vegetales (López 2012).

Los principales problemas que se han presentado en la micropropagación de *Guadua angustifolia*, derivan de varios factores como: la presencia de contaminantes microbianos endógenos, la necrosis apical, la hiperhidricidad, la oxidación fenólica, el enraizamiento, la disponibilidad y respuesta estacional de los explantes, y la supervivencia *ex vitro*. (Fajardo, citado por Borges *et al.* 2004).

La presente investigación tuvo como finalidad contribuir al desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* del bambú *Guadua angustifolia* Kunth en Perú, para lo cual se realizaron ensayos de desinfección aplicando diferentes tratamientos, considerando un trabajo previo de evaluación del tipo de explante en función de sus características de cambio morfológico observadas en el proceso de desarrollo de los segmentos nodales. La evaluación de los tratamientos tuvo por enfoque determinar el mejor tratamiento en cada proceso de la introducción *in vitro* en función de la respuesta del explante al proceso de desinfección, la presencia de oxidación fenólica y parámetros de crecimiento o desarrollo del brote.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. GENERALIDADES DE LA ESPECIE

#### 1.1. ESPECIE: *GUADUA ANGUSTIFOLIA* KUNTH – BAMBÚ

La ficha nomenclatural de la especie en estudio, *Guadua angustifolia* Kunth, se detalla a continuación:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Sub Familia: Bambusoideae

Género: *Guadua*

Especie: *Guadua angustifolia* Kunth

La *Guadua angustifolia* Kunth es un bambú gigante, espinoso, con culmos erectos que llega a alcanzar hasta 25 metros de altura y aproximadamente 10 a 25 cm de diámetro; es considerada la tercera especie de bambú más grande del mundo, posee fibras naturales muy fuertes que permiten desarrollar productos como aglomerados, laminados, pisos, paneles, esteras, pulpas y papel (CORPEI-CBI 2003).

Es una planta de hábito perenne y rápido crecimiento, con rizomas generalmente bien desarrollados, en él se almacenan los nutrientes y permite la propagación asexual al separar una de sus ramificaciones; los tallos o culmos son siempre lignificados y fuertes, cilíndricos y rectos, formados por nudos y entrenudos; las hojas son lanceoladas y lisas (Mercedes 2006).

## **1.2. DISTRIBUCIÓN DE LA *GUADUA ANGUSTIFOLIA***

La guadua es un bambú endémico de América y se considera como nativo de Colombia, Venezuela y Ecuador. En Perú se ha encontrado zonas naturales de *Guadua angustifolia* Kunth. al noreste del país, en los límites con Colombia y Ecuador, y se le conoce con el nombre de caña de Guayaquil (Gonzales 2005).

## **1.3. ECOLOGÍA**

La *Guadua angustifolia* Kunth. crece desde el nivel del mar hasta los 2 600 ms.n.m. Su rango óptimo de altitud está entre los 600 ms.n.m. (clima cálido) y los 2 000 ms.n.m. Las zonas de vida donde esta especie puede establecerse son: el Bosque muy húmedo Tropical (bmh-T), Bosque seco Tropical (bs-T), Bosque muy húmedo SubTropical (bmh-ST) y Bosque muy húmedo Montano Bajo (bmh-MB) (Castaño y Moreno 2004).

## **1.4. CLIMA**

La temperatura ideal para el cultivo de la *Guadua angustifolia* Kunth. está entre 20°C a 30°C. A medida que se aleja del rango indicado, los diámetros y alturas se reducen. Temperaturas menores a 18°C afectarían significativamente su desarrollo (CORPEI-CBI 2003).

La guadua se desarrolla en áreas donde la precipitación fluctúa entre 900 mm a 5000 mm. anuales, pero muestran mejor desarrollo en sitios con un rango de precipitación entre 1,800 y 2,500 mm. anuales. La humedad relativa ideal se da entre 72-80 por ciento (Castaño y Moreno 2004).

## **1.5. SUELO**

Los suelos franco arcillosos y con buen drenaje son los más aconsejados para este cultivo, aunque también se encuentran en lechos húmedos de cursos de agua y suelos arenosos (MINAG 2008). Los suelos pesados o arcillosos no favorecen al desarrollo de la planta (CORPEI-CBI 2003).

## **1.6. CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA *GUADUA ANGUSTIFOLIA***

Pueden crecer como plantas aisladas dentro del bosque, entre la diversidad de árboles, o a la orilla de ríos. También formar grandes “manchales” e incluso bosques de bambúes (Olivier 2008).

Durante la maduración, las varas se consolidan, adquiriendo sus características de dureza, flexibilidad y resistencia. En 4 o 5 años, el culmo alcanza su tamaño final, periodo en el cual también termina su maduración y se puede cosechar. Posteriormente, se puede realizar múltiples cosechas cada dos años hasta un máximo de 120 años (Gonzales 2007). Su crecimiento está influenciado por la calidad de sitio en que se desarrollen (Castaño y Moreno 2004).

## **2. MICROPROPAGACIÓN**

La propagación *in vitro*, también llamada micropropagación, se refiere a las técnicas aplicadas en propagación de tejidos a partir de pequeñas partes de la planta que crecen de forma aséptica en tubos o recipientes cerrados. El cultivo de tejidos está basado en principios como totipotencia, regulación hormonal, y el control y manipulación de los procesos (Hartmann *et al.* 1990).

Roca y Mroginski (1993) definen el cultivo de tejidos *in vitro* como un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Todo esto es posible gracias al principio de la totipotencia de Schwann y Schleiden, postulado en 1838, el cual establece que cualquier célula somática, joven o en proceso de diferenciación, puede regenerar una planta completa si se coloca en condiciones adecuadas.

Los distintos métodos de propagación, como el cultivo de yemas terminales, cultivo de meristemas, cultivo de nudos simples, organogénesis directa y embriogénesis somática, ofrecen ventajas en la tasa de propagación y desventajas por la inestabilidad genética que se manifiesta en determinadas metodologías con mayor riesgo (Inguil 2001). Entre ellos, el método de multiplicación por segmentos nodales induce un menor riesgo de irregularidad genética, a consecuencia de que la tasa de multiplicación es generalmente menor que en otros métodos de propagación (Inguil 2001).

Todas estas técnicas requieren de un medio con nutrientes esenciales (sales inorgánicas), una fuente de carbono (sacarosa o glucosa), vitaminas (ácido nicotínico, pirodixina, tiamina, pantoenato o biotina, etc.) y reguladores de crecimiento (CICY 1985)

Se dice que una especie responde a la micropropagación cuando al cultivar un segmento del tejido (explante) éste se mantiene vivo, sus células se dividen organizadamente formando numerosos brotes que crecen y, posteriormente, son capaces de enraizar y aclimatarse en condiciones *ex vitro* (Mejía 1994).

George *et al.* (2008), propusieron cuatro etapas para la micropropagación eficiente de una especie:

- Etapa 0: La selección de la planta madre y su preparación
- Etapa I: Establecimiento de un cultivo aséptico
- Etapa II: Multiplicación
- Etapa III: Elongación y enraizamiento
- Etapa IV: Transferencia al medio natural o aclimatación

## **2.1. ORGANOGÉNESIS A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES**

La micropropagación vía organogénesis es un proceso de dos etapas que implica la proliferación (meristemas axilares) de brotes unipolares en explantes, seguido de una escisión de los brotes y la inducción de meristemas radiculares. Generalmente, se asume que las plantas regeneradas a partir de ápices o yemas nodales son genéticamente estables y libres de variaciones somaclonales (George *et al.* 2008 y Singh *et al.* 2013).

### **2.1.1. FACTORES QUE CONTROLAN LA ORGANOGÉNESIS**

#### **a. Explante:**

El brote de las yemas nodales cultivadas se determina, principalmente, por el genotipo, el estado fisiológico de los tejidos, y el tiempo del año en que se colectan y se cultivan los explantes (Saxena y Dhawan 1994; Singh *et al.* 2011, 2012).

#### **b. Medio de cultivo:**

Los requerimientos nutricionales para el óptimo crecimiento del tejido *in vitro* varían según la especie. En bambúes, el medio MS ha sido el más utilizado para organogénesis directa e indirecta (Singh *et al.* 2013).

**c. Reguladores de Crecimiento:**

La frecuencia de brote en medios de cultivo libres de reguladores de crecimiento es, por lo general, muy baja (Singh *et al.* 2011 y Arya *et al.*, citada por Singh *et al.* 2013). Se sabe que los niveles endógenos de reguladores de crecimiento son variables y son la causa de las respuestas variadas de especies y genotipos al medio suplementado con reguladores de crecimiento. Por lo tanto, la información detallada sobre el requerimiento de los reguladores del crecimiento de plantas (RCP) es necesaria antes de poder explotar el cultivo de tejidos de plantas a escala comercial. El nivel y el tipo de reguladores de crecimiento incluidos en el medio de cultivo, determinará, en gran medida, el éxito del protocolo de cultivo de tejidos. Además de las citoquininas y auxinas, otros aditivos como el sulfato de adenina, carbón activado y aminoácidos, han sido incluidos en el medio de proliferación (Singh *et al.* 2013).

**d. pH del Medio de Cultivo:**

La concentración de iones de hidrógeno en el medio de crecimiento, afecta el crecimiento del tejido alterando el pH de las células. Una mayor concentración de iones “H” induce la precipitación de fosfatos, la gelatinización del agar y la destrucción de vitaminas y reguladores del crecimiento (Singh *et al.* 2013). Aunque la mayoría de los tejidos de la planta tiene un pH óptimo de 5,0 a 5,5 (Butenko *et al.*, citado por Singh *et al.* 2013), el rango de pH es variable para los tejidos de las plantas individuales. En una investigación, Arya *et al.*, citado por Singh *et al.* (2013), encontraron que el crecimiento de brotes fue bueno en el intervalo de pH de 4,5 a 5,8 en *Dendrocalamus giganteus*, cabe resaltar que la mejor tasa de multiplicación de brotes se obtuvo en el medio con un pH de 4,5.

**e. Fuente de Carbono:**

La sacarosa es la fuente de carbono más utilizada en diversos medios de cultivo de tejidos vegetales, su concentración varía de 2 a 6 por ciento. La sustitución de la sacarosa por un tipo de azúcar de menor costo tuvo un efecto insignificante en la tasa de multiplicación de brotes en *D. asper* y *D. hamiltonii*, pero redujo el costo de producción de la planta considerablemente. Sin embargo, el uso de glucosa mostró efectos nocivos sobre la multiplicación de brotes (Singh *et al.* 2011 y 2012).

**f. Enraizamiento de los brotes:**

La inducción de raíces en brotes removidos y posterior supervivencia de plántulas en el suelo son pasos cruciales para el éxito de cualquier protocolo de micropropagación. El papel de las auxinas en el desarrollo de la raíz está bien establecido y ha sido revisado por Scott y

Torrey, citados por Bisht *et al.* (2010). Diferentes auxinas difieren en sus actividades fisiológicas en función a la medida en que se mueven a través de tejidos, permanecen dentro de las células, o son metabolizados. Por lo general, hay suficiente citoquinina residual en los brotes, y se requiere poco o nada para la inducción de raíces.

**g. Aclimatación y establecimiento en campo:**

El traslado de las condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro* sigue siendo el principal cuello de botella en la comercialización de la técnica de cultivo de tejidos. Esto es, principalmente, debido al estrés que experimentan las plántulas *in vitro* cuando son transferidas de un ambiente de cultivo con baja irradiancia y alta humedad a un medio ambiente natural, con alta irradiancia y baja humedad. Las plantas *in vitro* logradas suelen tener hojas con un pobre o ningún desarrollo de la cera cuticular, con el mecanismo de estomas deteriorado, pigmentos fotosintéticos bajos, poca actividad fotosintética, pobre desarrollo vascular y conexiones. Por lo tanto, una técnica de aclimatación eficiente es necesaria para garantizar una mejor supervivencia en campo de plántulas *in vitro*. Una reducción gradual en el suministro de nutrientes y humedad durante estos procedimientos obliga a la planta a fortalecer sus propios mecanismos fotosintéticos y de defensa, y prepararlos para crecer en condiciones *ex vitro* (Singh *et al.* 2013).

## **2.2. VENTAJAS DE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO***

La micropropagación tiene ventajas comparativas respecto a otras técnicas de propagación vegetativa, como la multiplicación de plantas en períodos cortos de tiempo, el uso de espacios reducidos y la producción de nuevos individuos a partir de plantas que no producen semillas viables o que tienen dificultades para multiplicarse por estacas (Kane 1996).

Villalobos y Thorpe (1984) mencionan como las principales ventajas de la micropropagación:

- Plantaciones genéticamente uniformes, conservación de la variedad de plantas que se propaga
- Incremento acelerado del número de plantas derivados del genotipo
- Reducción del tiempo de multiplicación
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en un espacio reducido, a bajos costos y en tiempos económicamente costeables

- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga
- Facilidad para transportar el material *in vitro* a otros lugares, con menos restricciones aduaneras
- Posibilidad de multiplicar rápidamente a una variedad de la cual existen pocos individuos.

### **2.3. OXIDACIÓN FENÓLICA**

La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como la oxidación de compuestos fenólicos catalizada por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot *et al.* y Bray *et al.*, citados por Azofeifa 2009).

La producción de especies reactivas puede ser activada por inductores específicos (como parte del metabolismo normal de la planta) o también por mecanismos no específicos, por ejemplo, en respuesta a un tipo de estrés. Minutos después de la estimulación inicial ocurre, en respuesta, una producción elevada de especies reactivas de oxígeno (Arauz, citado por Azofeifa 2009).

Dalal *et al.*, citado por Singh *et al.* (2013) determinaron que en este proceso intervienen dos factores importantes: las pérdidas por contaminación microbiana y oxidación fenólica. Asimismo, George *et al.* (2008) sostienen que las especies tropicales contienen concentraciones altas de sustancias fenólicas que se oxidan cuando las células son dañadas, la acumulación de sustancias fenólicas liberadas por el tejido vegetal en el medio de cultivo, son con frecuencia inhibidores del crecimiento y llevan al necrosamiento del explante.

Igualmente, Muñoz (2003) menciona que la oxidación fenólica puede, en ocasiones, constituir un serio problema en el establecimiento y supervivencia de meristemas y ápices, las cuales se manifiestan como un ennegrecimiento del medio de cultivo que comienza por la zona cercana al explante y puede extenderse a todo el medio produciendo una seria afectación en el crecimiento del explante, al punto de provocarle la muerte. Este fenómeno es más agudo en especies leñosas, aunque es reportado en un amplio rango de especies,

constituyendo, en múltiples ocasiones, una seria dificultad en el establecimiento de cultivos *in vitro*.

Fajardo, citado por Borges *et al.* (2004) menciona que, durante el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia*, los principales problemas de micropropagación son, la contaminación endógena y la necrosis de los explantes, donde demostró la presencia de polifenoles tanto en yemas axilares muertas establecidas *in vitro* como en el medio de cultivo donde éstas crecieron.

Jiménez, citado por Inguil (2001), sostiene que las prácticas más comunes para contrarrestar el efecto de la oxidación fenólica son:

- Enjuagues en soluciones antioxidantes previas y posteriores a la disección de los explantes.
- Adición de antioxidantes al medio de cultivo (inhibidor de la polifenoloxidasas o adsorbente).
- Cambios frecuentes de medio de cultivo
- Disminución de la intensidad luminosa o cultivo en la oscuridad en las etapas iniciales
- Empleo de medios líquidos en sustitución de medios gelificados o adicionar una capa fina de medio líquido en la superficie del medio sólido para diluir metabolitos tóxicos
- Modificación del pH y del potencial redox del medio (agentes reductores)
- Cambios en el nivel de sacarosa del medio
- Regulación de la temperatura. (Evitar altas temperaturas en la cámara de cultivo y durante la transferencia de los explantes)

#### **2.4. EFECTO DE LA ÉPOCA DE SIEMBRA EN EL ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *IN VITRO***

La época de colecta es uno de los factores críticos en el establecimiento y crecimiento de cultivos *in vitro* (Hu y Wang, Tisserat, citados por Mudoj *et al.* 2014).

Chaturvedi, citado por Mudoj *et al.* (2014), menciona que, en ciertos casos, la época de colecta es más importante que la selección del medio de cultivo. Esta premisa ha sido demostrada en los estudios llevados a cabo por Yadav *et al.* (2011); Yildirim (2011); Anand *et al.* 2013; Kutas *et al.* (2014); Mudoj *et al.* (2014) y Yari *et al.* (2014), quienes reportaron que sí existe una estación del año con mejores condiciones endógenas para el establecimiento y desarrollo *in vitro*.

En la India, Mudoj *et al.* (2014), evaluaron el establecimiento *in vitro* de yemas axilares del bambú *Bambusa nutans* Wall. por estaciones del año. Estos autores reportan que la mejor tasa de brote se dio en otoño (setiembre-diciembre), con un 45 por ciento y los porcentajes de menor brote se dieron en primavera (marzo-abril), verano (mayo- junio) y Monzón (julio-agosto), con un 25, 20 y 15.04 por ciento respectivamente. Además agregan que en primavera y verano, se dio una mayor contaminación por bacterias y oxidación fenólica. Mientras que en la época del Monzón, los explantes presentaron una reducida oxidación fenólica, y los brotes obtenidos se contaminaron incluso después de la tercera o cuarta semana desde la siembra. En invierno, obtuvieron un 35.02 por ciento de brote y mencionan que en esta época se presentó una mayor oxidación fenólica y un lento crecimiento de los brotes.

En la India, en la propagación *in vitro* de *Bambusa bambos* mediante segmentos nodales de ramas provenientes plantas madre de 5 años de edad establecidas en campo, Anand *et al.* (2013), mencionan que, debido a las considerables variaciones de las condiciones medioambientales en las diferentes épocas del año, el estado de madurez del explante varía con la estación, por ende, la respuesta del explante a la iniciación del cultivo es variable. Además, agregan que el mejor periodo para obtener cultivos asépticos es en primavera (marzo-abril) con un 93 por ciento de brotes observados. En la época de lluvia (Julio-Agosto) el porcentaje de brote es similar; sin embargo, la tasa de contaminación es muy elevada. El verano (mayo-junio) e invierno (enero-febrero) son las estaciones menos recomendadas, con porcentajes de brote bajos de 37 y 50 por ciento, respectivamente.

Los mismos autores sostienen que el brote de la yema axilar depende de factores externos como la condición y salud de la planta madre. Asimismo, mencionan que el tamaño del explante también influye. Explantes pequeños de 5 a 7 mm de longitud no responden bien al cultivo, mientras que los explantes de 2.5 cm presentaron brote de yemas en menor tiempo. Probablemente, esto se deba a una mayor concentración de hormonas endógenas.

### **3. EXPERIENCIAS GENERALES SOBRE EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE ESPECIES DE BAMBÚ**

En los últimos años se han desarrollado una serie de investigaciones en las que se documenta los procedimientos de desinfección en diferentes especies de bambú para el establecimiento *in vitro*.

En la India, Mudoi *et al.* (2014), evaluaron el efecto de diferentes pretratamientos de desinfección aplicados a la especie *Bambusa nutans* Wall., probando combinaciones de Tween 20 al 5 por ciento (v/v), Gentamicina 0.1 por ciento, Mancozeb 0.1 por ciento y alcohol al 70 por ciento. En todas las combinaciones realizaron una inmersión de tres horas en Tween 20, seguida de un enjuague en agua corriente, culminando el pretratamiento con una inmersión de cinco minutos en la mezcla de agentes desinfectantes probados. Dentro de la cámara de flujo laminar realizaron la desinfección con la inmersión de explantes en bicloruro de mercurio 0,1 por ciento por un tiempo de 5 a 7 minutos. El mejor resultado se obtuvo con el uso de Tween 20 al 5 por ciento (v/v) + Mancozeb 0.1 por ciento + Gentamicina 0.1 por ciento + Alcohol al 70 por ciento, con una desinfección de 45 por ciento.

En Cuba, Borges *et al.* (2004) utilizaron segmentos nodales de 6 a 8 mm de *Guadua angustifolia* Kunth y evaluaron una doble desinfección con una inmersión en hipoclorito de sodio al dos por ciento por 5, 10 y 15 minutos, culminando con una inmersión más a las 24 horas en los mismos tratamientos. En relación a la desinfección, este método dio resultados sin diferencias significativas para los tres tratamientos, alcanzando una desinfección y supervivencia del 80, 75 y 75 por ciento, respectivamente. En cuanto al número de brotes y crecimiento en longitud en las tres primeras semanas desde la siembra, el tratamiento de doble desinfección de 5 min de inmersión en hipoclorito de sodio dio los mayores valores. Este autor sostiene que este resultado puede ser debido a que bajo estas condiciones los explantes sufren un menor daño fitotóxico en sus tejidos.

En Colombia, Ramírez (2013) evaluó diferentes tratamientos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* mediante segmentos nodales de varas sin ramificar. Las plantas madre se mantuvieron en invernadero con dos riegos semanales con agua destilada y fumigadas con productos bacteriostáticos y fungistáticos. Los tratamientos evaluados consistieron en inmersión de los explantes en etanol por dos minutos, seguida de inmersión en hipoclorito de sodio al 2 por ciento por 5, 10 y 15 minutos e hipoclorito de sodio al 3 por ciento por 5, 10 y 15 minutos. Como resultado, reportó solo la presencia de bacterias como agentes contaminantes. Respecto a la concentración del hipoclorito de sodio y tiempo de exposición, los tratamientos dieron resultados similares en desinfección, con una tasa decreciente conforme aumenta el tiempo de exposición. No obstante, la mayor concentración afectó la capacidad de brote de los explantes y el mejor resultado se dio con el uso de hipoclorito de sodio al 2 por ciento por 15 minutos, con mayor incidencia en la desinfección con un 32 por ciento, así como una mayor tasa de brotes con 15 por ciento.

En Colombia, López (2012), en la propagación *in vitro* de *Guadua angustifolia*, buscó determinar un tratamiento de predesinfección que reduzca la contaminación por hongos. Los explantes que utilizó provinieron de las ramas de chusquines de 3 meses de edad. Cada explante midió 1 cm de longitud y contenía una yema. Las yemas se categorizaron en, indiferenciada, semidiferenciada y diferenciada. Aplicó Oxiclورو de Cobre a una concentración de 100 mg en 100 mL de agua y Agrodyne a una concentración de 1mL en 100 mL de agua, y la mezcla de ambos en las mismas proporciones. Para cada compuesto aplicó un tiempo de inmersión de 30 y 60 minutos. En la cabina de flujo laminar, continuó con la desinfección de los explantes utilizando alcohol 90° por 3 min, seguido de hipoclorito de sodio al 3 por ciento por 10 minutos. Su investigación concluye que los menores índices de contaminación, inferiores al 49 por ciento, están asociados a los segmentos nodales con yema indiferenciada y yema semidiferenciada, mientras que la mayor tasa de contaminación, superior al 72 por ciento, está asociada a las yemas diferenciadas. En cuanto a la eficacia de los compuestos utilizados y tiempo de exposición, el autor propone que se puede utilizar el Agrodyne y el Oxiclورو de Cobre, de forma independiente, en la dosis utilizada por un tiempo de exposición de 60 min.

En Colombia, Marulanda *et al.* (2005), investigó la desinfección de explantes nodales de *Guadua angustifolia* con el uso de bicloruro de mercurio al 0.3 por ciento por un tiempo de exposición de 5 y 10 minutos e hipoclorito de sodio al dos por ciento por un tiempo de

exposición de 10, 15 y 20 minutos. En sus resultados se reporta la presencia de hongos y bacterias. La mayor tasa de desinfección, 74.6 por ciento, se logra con el uso de bicloruro de mercurio 0.3 por ciento por un tiempo 10 minutos. Los tratamientos con hipoclorito de sodio presentan una tasa de desinfección del 20 por ciento, sin diferencias significativas en el tiempo de exposición.

En el mismo estudio, Marulanda *et al.* (2005) investigó la incidencia de la posición de la yema de la rama en el establecimiento *in vitro*. Para esto dividió a la rama en tres secciones, apical, medio y basal. Obtuvo como resultado que la sección apical alcanzó una desinfección del 73.6 por ciento, el tercio medio 43.3 por ciento y el tercio basal 31.9 por ciento. No obstante, la sección apical presentó la menor tasa de brote con 1.8 por ciento.

Adicionalmente, el autor evaluó la tasa de brote adicionando la citoquinina 6-BAP al medio de cultivo en tres diferentes concentraciones (1, 2.5 y 5 mg/L), alcanzando una tasa de 47.6 por ciento de brote con el uso de 2.5 mg/L de 6-BAP.

En México, Larraga (2011), en los meses de febrero a junio, realizó la propagación *in vitro* de la especie *Guadua angustifolia*, empleando el medio de cultivo Woody Plant Medium en estado sólido y líquido. Dentro de sus experimentos, el autor complementó el medio de cultivo con Benomyl (0.6 g.L-1). Los explantes fueron de 3 cm de longitud y de 3 a 4 mm de diámetro, provenientes de plantas madre de 3 años de edad. En la predesinfección utilizó detergente comercial y agua corriente para eliminar las impurezas superficiales, para después emplear hipoclorito de sodio al 2.4 por ciento, 3 por ciento y 3.6 por ciento durante 20 min. En la cámara de flujo laminar realizó tres enjuagues en agua destilada estéril y realizó la siembra. En sus resultados reporta la presencia de hongos del género *Alternaria* y *Fusarium*, este último con dos especies, *Fusarium solani* y *Fusarium roseum*, diferenciándolos por el color de su micelio en blanco, rosado y ocre. Los medios de cultivo líquido y sólido con Benomyl, presentaron una tasa de contaminación de 40 por ciento para el hongo de micelio blanco, 50 por ciento para el hongo de micelio rosado y 10 por ciento para el hongo de micelio ocre.

En Costa Rica, Jiménez *et al.* (2006) realizaron la propagación *in vitro* de la *Guadua angustifolia*. Las plantas madre provenían de invernadero y recibieron tratamiento químico semanalmente durante la época de invierno, y mensualmente en la época de verano. El tratamiento y dosis consistió en una combinación de Agri-mycin 2g L-1 y Benomyl 2g L-1.

Los explantes fueron cortados de las ramas de las plantas madre, y en laboratorio seleccionaron los explantes que presentaron yemas visibles.

Para el establecimiento *in vitro* de los explantes, los autores aplicaron un pretratamiento de desinfección que incluía la inmersión en una solución de Extran MA 01 (0.05 por ciento w/v) durante 10 minutos, seguida de una inmersión en la combinación de Agrimycine  $2\text{g.L}^{-1}$  y Benomyl  $2\text{g.L}^{-1}$ , durante 10 minutos. Después, se procedió en la cámara de flujo laminar con el tratamiento de desinfección que incluía la inmersión en hipoclorito de sodio al 1.5 por ciento suplementado con una gota de Tween 80, culminando con tres enjuagues en agua destilada estéril. Los explantes fueron sembrados en el medio de cultivo MS sin adición de PPM, y otro MS con  $2\text{ mL.L}^{-1}$  de PPM.

Jiménez *et al.* (2006), reportaron una tasa de desinfección de 37 por ciento en el tratamiento sin adición de PPM y una tasa de desinfección de 89 por ciento con la adición de  $2\text{ mL L}^{-1}$  de PPM al medio de cultivo MS .

Por otro lado, los autores evaluaron la tasa de brote con el uso de la hormona BAP al 0, 1, 3 y 5  $\text{mg L}^{-1}$  y reportan que en ausencia de la citoquinina BAP, esta fue de solo 13 por ciento, mientras que con la adición de  $3\text{ mg L}^{-1}$  de BAP al medio de cultivo MS se alcanzó la tasa más alta de brote (37.5 por ciento). No obstante, sostienen que con un aumento en la concentración de BAP se reduce la tasa de brote a un 20 por ciento.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

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

#### **2. MATERIALES**

##### **2.1. DISPONIBILIDAD DE MATERIAL VEGETAL**

El material genético proviene de las plantaciones de *Guadua angustifolia* Kunth del distrito La Florida, Provincia San Miguel, Departamento Cajamarca.

El material vegetal utilizado provino de un stock de 50 plantas madre de *Guadua angustifolia* Kunth de 21 meses de edad, que se encuentran en el invernadero del IBT. El explante a utilizar provino de las yemas nodales de las ramas primarias, aproximadamente cada una de las plantas madre puede tener 2 o 3 ramas primarias con las cualidades de desarrollo ideales para iniciar el cultivo *in vitro*, y cada rama primaria puede tener, como mínimo, un total de 3 o 4 yemas nodales, contando desde la base hasta la sección apical, teniéndose un mínimo de 300 yemas nodales.

Con esta disponibilidad de material biológico, se procedió a realizar pruebas preliminares (ítem 3.4) con el fin de seleccionar la sección adecuada a utilizar de la rama primaria, definir pretratamientos de desinfección y tratamientos de desinfección. Las pruebas preliminares iniciaron en el mes de febrero del año 2015.

##### **2.2. INSUMOS DEL MEDIO DE CULTIVO**

- Medio de cultivo de Murashige & Skoog (MS) 1962.
- Tiamina HCL
- Pirodixina
- Acido Nicotínico

- Glicina
- Myo inositol
- Azúcar
- Agar

### **2.3. INSUMOS PARA LA DESINFECCIÓN**

A continuación, se mencionan los insumos utilizados, la preparación y uso de los mismos en la desinfección de los explantes. Estos insumos fueron empleados en diferentes proporciones, combinaciones y tiempos de inmersión.

- Detergente Comercial:
  - Se utilizó 10 gr. de detergente comercial en 500 mL de agua destilada, en esta solución se sumergieron los explantes acondicionados, por un tiempo de 20 min.
- Benlate y Phyton:
  - Se realizaron pruebas preliminares con diferentes dosis combinadas de benlate y phyton en 500 mL de agua destilada, y se sumergió los explantes acondicionados en diferentes tiempos (Anexo 9).
- Lejía 2 por ciento y 4 por ciento:
  - La lejía comercial tiene una concentración de cuatro por ciento; ésta se diluyó en agua destilada, para alcanzar una concentración de dos por ciento. Las soluciones al dos y cuatro por ciento se esterilizaron en autoclave. En la cámara de flujo laminar, los explantes fueron sumergidos en estas soluciones en diferentes tiempos.
- Alcohol 96°:
  - En la cámara de flujo laminar, de acuerdo al tratamiento, los explantes fueron sumergidos en alcohol por 2 min.
- Bicloruro de Mercurio:

- Este compuesto se pesó en la balanza analítica, y se disolvió en agua destilada hasta alcanzar la concentración de 0.1, 0.2 y 0.3 por ciento,
- PPM (Plant Preservative Mixture): biocida de amplio espectro, formulado para emplearse en el cultivo de tejidos. Actúa sobre las enzimas claves del ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones. Este compuesto fue agregado en la preparación del medio de cultivo a una concentración de dos mL.L<sup>-1</sup> de medio de cultivo.

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

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

#### **2.5. EQUIPOS E INSTRUMENTOS**

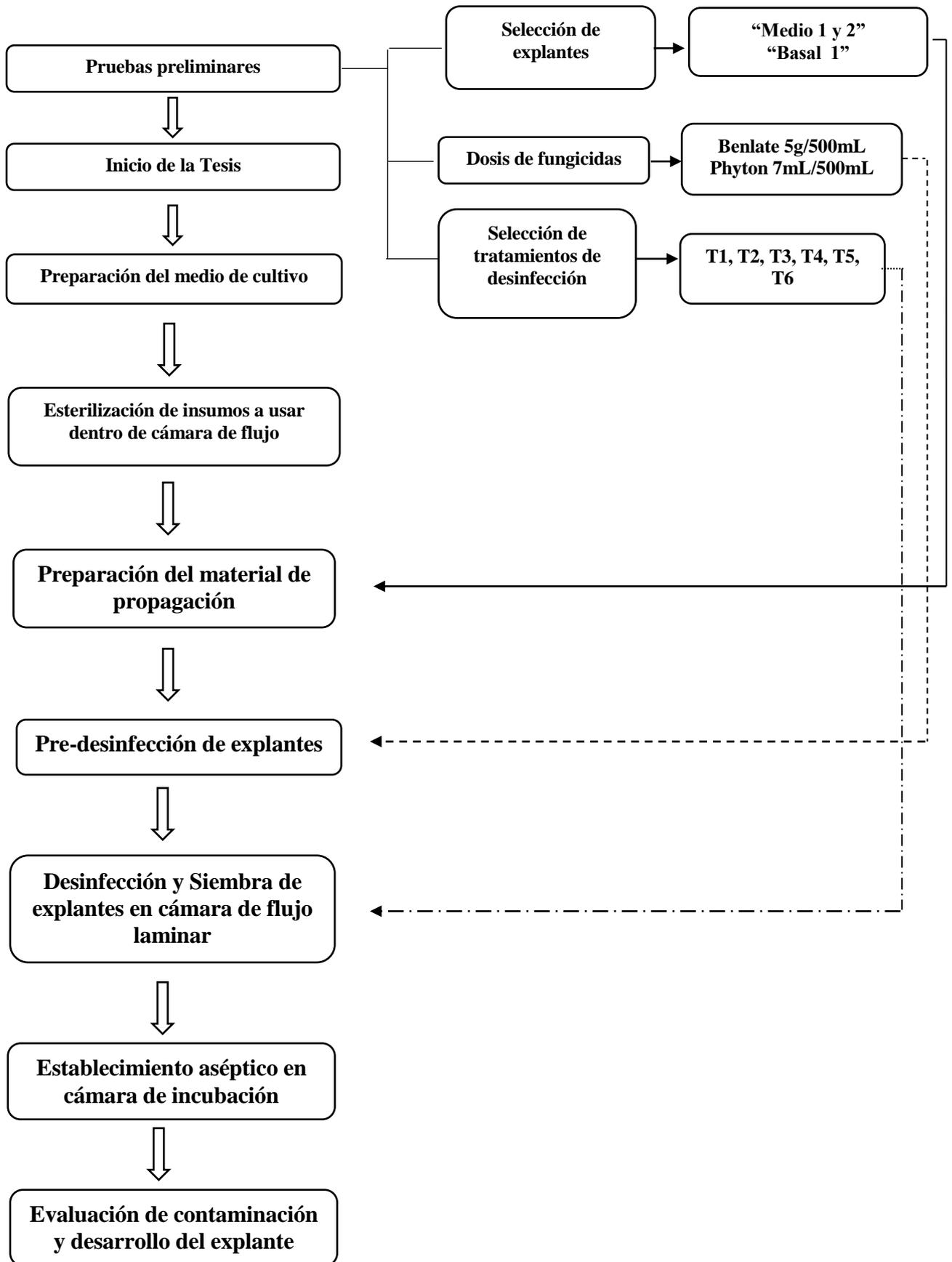
- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Cámara fotográfica
- Termohigrómetro

- Timer (Regulador de fotoperiodo)
- pH-metro

## **2.6. OTROS MATERIALES**

- Agua destilada
- Fluorescentes
- Guantes quirúrgicos
- Hojas Bond
- Guardapolvos
- Mascarillas
- Papel toalla
- Papel Aluminio
- Pinza recta
- Pinza Curva
- Platos metálicos
- Tijera de podar

### 3. ESQUEMA DESCRIPTIVO DE LA INVESTIGACIÓN



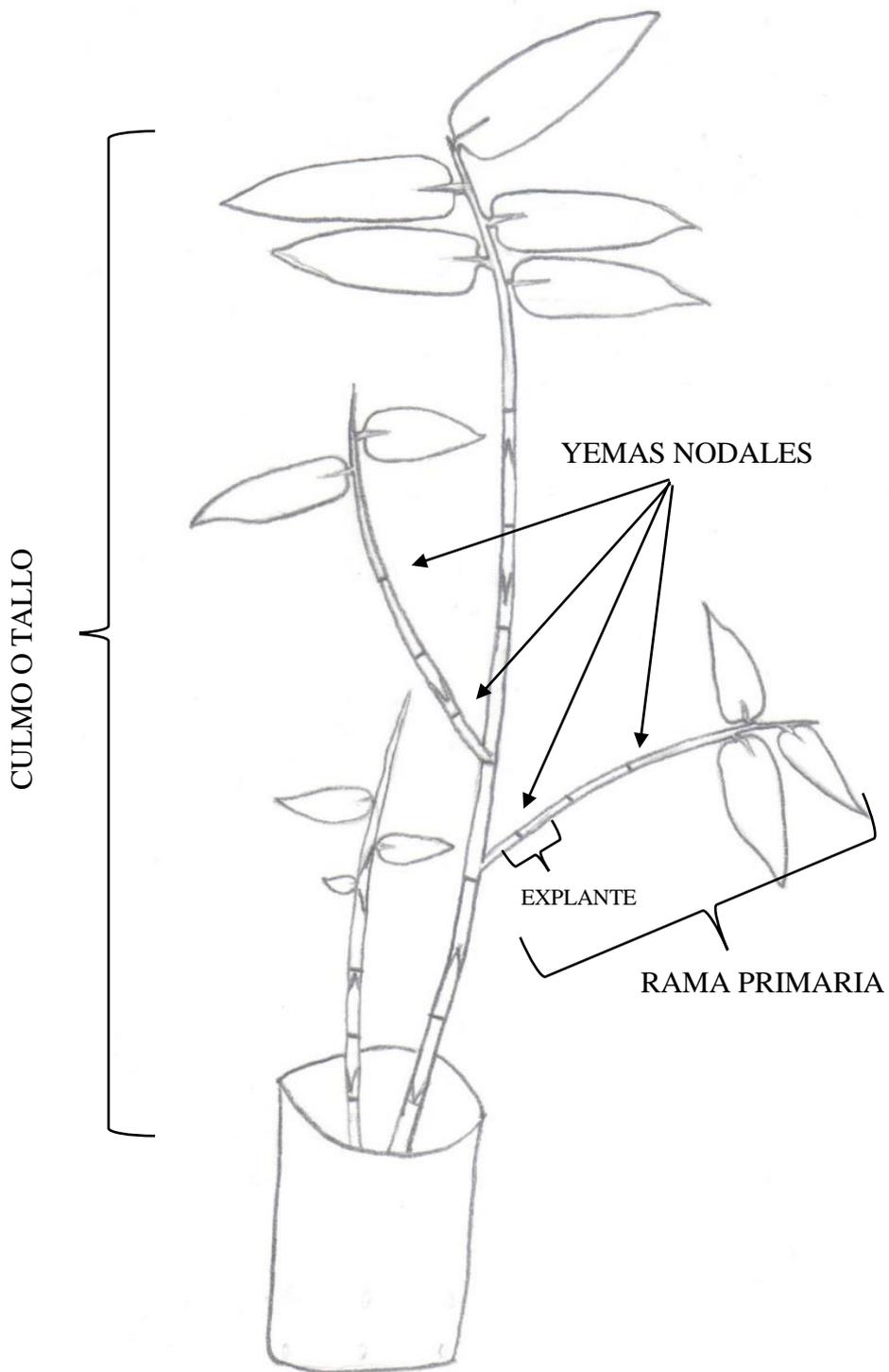
## **4. PRUEBAS PRELIMINARES**

La realización de las pruebas preliminares tuvo la finalidad de conocer el comportamiento en desinfección y desarrollo de brote con explantes de las diferentes secciones nodales que presenta la rama primaria, para después definir qué tipo de explantes se utilizarían en el desarrollo de la investigación. Asimismo, para la desinfección las pruebas preliminares tuvieron la finalidad de conocer el grado de desinfección alcanzado por producto o combinación de productos de forma tal que se definan los protocolos de desinfección a desarrollarse en la investigación.

### **4.1. SELECCIÓN DEL EXPLANTE**

El uso de explantes de ramas primarias, evitó la probable muerte de la planta madre, ya que ésta produce, por lo general, un culmo anual con varias yemas nodales –entiéndase culmo como tallo (Figura 1).

La rama primaria, al igual que el culmo, tiene yemas nodales. La cantidad de yemas nodales en una rama está definida por la longitud final que llega a alcanzar. Considerando que el número de yemas presente en una rama primaria puede variar en función a su longitud, se procedió a clasificar los segmentos nodales de la rama primaria en sección Apical, Medio y Basal, para después realizar un ensayo preliminar y seleccionar la sección adecuada con la cual iniciar el cultivo *in vitro*.



**Figura 1:** Planta madre de *Guadua angustifolia* Kunth de 21 meses de edad.

*FUENTE: Elaboración propia.*

Durante los estudios preliminares de esta investigación, se pudo observar distintos estadios de maduración de los segmentos nodales a partir del cambio en coloración de la pequeña hoja caulinar que recubre la yema (Figura 2), cuya caracterización se presenta en tabla 1.



b) Hoja caulinar de color verde claro u oscuro, fácil de sacar. Explante poco lignificado. c) Hoja caulinar de color verde oscuro o marrón rojizo, fácil de sacar. Explante lignificado. d) Hoja caulinar de color verde oscuro o marrón rojizo, sin desprenderse de la rama, fácil de sacar. Explante lignificado. e) Hoja caulinar de marrón rojizo o marrón claro. Seca. Con abertura desde el extremo superior, fácil de sacar. Explante lignificado.

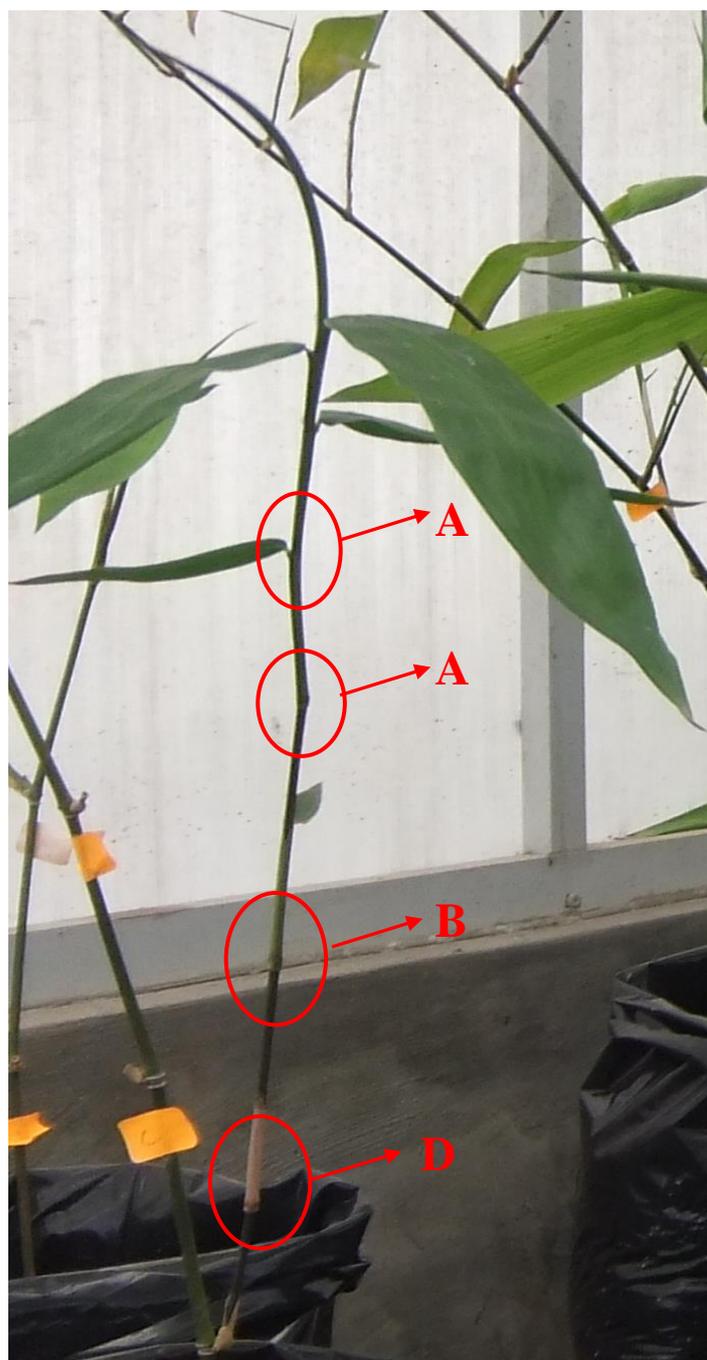
**Figura 2: Detalle de maduración hoja caulinar en segmento nodal en ramas primarias.**

*FUENTE: Elaboración propia.*

La maduración de los segmentos nodales por secciones de una rama, inicia siempre por el segmento basal; sin embargo, puede pasar más de 5 meses hasta que los siguientes segmentos inicien su proceso de maduración o diferenciación, todo esto en función a la necesidad de fotosíntesis de la planta.

En ese sentido, se propuso evaluar las secciones nodales de la rama primaria, caracterizando el color de la hoja caulinar que recubre la yema (Figura 3).

En relación a esta evaluación preliminar, López y Marulanda *et al.*, citados por López (2012), obtuvieron mejores resultados de brote con la sección media y basal, pero con mayores tasas de contaminación.



a) Hoja caulinar de color verde, difícil de sacar. Explante no lignificado, se quiebra con facilidad. b) Hoja caulinar de color verde claro u oscuro, fácil de sacar Explante poco lignificado. d) Hoja caulinar de color verde oscuro o marrón rojizo, sin desprenderse de la rama, fácil de sacar. Explante lignificado.

**Figura 3: Detalle de hoja caulinar en segmentos nodales de rama primaria.**

*FUENTE: Elaboración propia.*

En el tabla 1 se detalla la caracterización realizada de acuerdo a una descripción cualitativa del explante, basada en la maduración de la hoja caulinar que recubre a la yema nodal de la rama primaria.

**Tabla 1: Descripción cualitativa de explantes ensayados.**

<b>Código en Imagen</b>	<b>Sección</b>	<b>Descripción cualitativa de la hoja caulinar</b>
A	Apical	Hoja caulinar de color verde, difícil de sacar. Explante no lignificado, se quiebra con facilidad.
B	Medio 1	Hoja caulinar de color verde claro u oscuro, fácil de sacar. Explante poco lignificado.
C	Medio 2	Hoja caulinar de color verde oscuro o marrón rojizo, fácil de sacar. Explante lignificado.
D	Basal 1	Hoja caulinar de color verde oscuro o marrón rojizo, sin desprenderse de la rama, fácil de sacar. Explante lignificado.
E	Basal 2	Hoja caulinar de marrón rojizo o marrón claro. Seca. Con abertura desde el extremo superior, fácil de sacar. Explante lignificado.

*FUENTE: Elaboración propia.*

La prueba de selección de explante se realizó aplicando, a cada uno de los tipos de explantes descritos en el tabla 1, una concentración de lejía al 2 por ciento por 10 y 15 minutos, partiendo de la hipótesis de que la maduración de la hoja caulinar tiene una relación directa con el grado de contaminación. Este tratamiento de desinfección se empleó a modo de prueba general, para evaluar la efectividad del desinfectante, y la capacidad de reacción del explante, de acuerdo a la sección y nivel de madurez, para el desarrollo del brote.

En la evaluación de la prueba de selección de explante, que se presenta en el Anexo 13, se observó que los explantes provenientes de la sección “basal 2” tuvieron una mayor contaminación, motivo por el cual este tipo de explante fue descartado. En relación a los explantes provenientes de la sección “basal 1”, “medio 1” y “medio 2”, se observó que su tasa de contaminación es menor y que sí se desarrolla la yema nodal. Por último, con los explantes de la sección apical, no se observó contaminación ni desarrollo del brote, por lo que el explante apical también se descartó. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Marulanda *et al.* (2005) y López, citado por López (2012).

En términos generales, estas observaciones permiten inferir que la maduración y apertura de la hoja caulinar que recubre a la yema, permite el ingreso de agentes contaminantes. Además, la hoja madura y seca, es vulnerable al ataque de hongos del ambiente.

Asimismo, considerando que la poca diferencia observada en el grado de desinfección y el posterior brote de la yema de los explantes “medio 1”, “medio 2” y “basal 1” concuerdan con las tasas de desinfección y brote reportados por Marulanda *et al.* 2005, se asumió que estos tres tipos de explantes tienen el mismo comportamiento al ser sometidos a los protocolos de desinfección, lo cual también se evidenció en las distintas pruebas preliminares de desinfección que se detallan en ítem 3.2.8. En ese sentido, en el desarrollo de la tesis no se ha considerado una evaluación independiente para los tipos de explantes mencionados.

Por estos motivos se decidió utilizar como material vegetal para los ensayos de desinfección y establecimiento, los explantes que cumplan las características cualitativas de los segmentos “medio 1”, “medio 2”, y “basal 1”, con yemas semidiferenciadas.

#### **4.2. PRUEBAS PRELIMINARES DE DESINFECCIÓN**

En la última década se ha realizado diversas investigaciones para determinar el protocolo de propagación *in vitro* con *Guadua angustifolia*. Cada una de estas investigaciones plantea un protocolo de desinfección que utiliza diferentes combinaciones y concentraciones de productos desinfectantes de amplio espectro y/o de efecto específico, entre los que se encuentra el Detergente comercial, Desinfectantes de laboratorio, Antibióticos, Alcohol, Bicloruro de Mercurio, Hipoclorito de Sodio, Fungicidas Agrícolas, y Bactericidas agrícolas.

Llevar a cabo evaluaciones de todas las combinaciones posibles con los diferentes insumos de desinfección, resultaría una actividad poco práctica, por motivo de disponibilidad de material vegetal y tiempo. En ese sentido, con el fin de disminuir las alternativas de posibles protocolos de desinfección, se consideró utilizar productos que sean comerciales, de fácil acceso y de costo promedio. Asimismo, se consideró aplicar concentraciones y tiempos de inmersión en los que no se observe un deterioro físico del explante. La elección de los explantes utilizados en estas pruebas preliminares, cumplían las características cualitativas seleccionadas, descritas en el ítem anterior.

Con estos planteamientos, se procedió a realizar las siguientes pruebas preliminares de desinfección:

#### **4.2.1. BICLORURO DE MERCURIO**

Aplicando diferentes concentraciones de bicloruro de mercurio, se observó que tenía efecto desinfectante durante las dos primeras semanas; sin embargo, en la tercera semana, cuando los brotes iniciaban su desarrollo, se observó que proliferó la contaminación por hongos, sin observarse algún efecto de las distintas concentraciones aplicadas (Anexo 10). Esta prueba abrió la hipótesis de que los agentes contaminantes se encuentran entre las capas que recubren a las yemas nodales, y éstas al desarrollarse, permitían la proliferación de los agentes contaminantes en el medio de cultivo. Motivo por el cual, se decidió considerar procedimientos de desinfección que incluyan pretratamientos y tratamientos de desinfección donde se exponga por mayor tiempo al explante. El uso del bicloruro de mercurio se descartó en posteriores pruebas debido a la baja efectividad observada y al alto riesgo de contaminación al medio ambiente que conlleva su uso.

#### **4.2.2. HIPOCLORITO DE SODIO**

En esta prueba preliminar, se ensayó cuatro métodos de desinfección. El primero consistió en probar el efecto individual del detergente comercial como pretratamiento. En los tres restantes, se probó la desinfección dentro de la cámara de flujo laminar con el uso de Hipoclorito de sodio (Lejía) a una concentración del dos por ciento en tres tiempos de inmersión de explantes, a los 5 , 10 y 15 minutos.

Utilizando el pretratamiento con detergente comercial y el hipoclorito de sodio al 2 por ciento a los 10 y 15 minutos de inmersión, no se observó contaminación (Anexo 11). De acuerdo a estas observaciones, se seleccionó ambos métodos para continuar con las pruebas preliminares. Cabe mencionar que, al repetir esta prueba, no se obtuvo observaciones similares, por lo que se decidió adicionar otros insumos de desinfección, que se describen en los siguientes ítems.

#### **4.2.3. BENLATE Y PHYTON**

Utilizando el procedimiento indicado en el ítem anterior, se agregó a la predesinfección, una prueba de diferentes concentraciones de Benlate y Phytón. Las diferentes concentraciones se aplicaron por inmersión de explantes durante una hora. Las observaciones de esta prueba se presentan en el Anexo 9, y muestran que sí hubo un efecto positivo en la desinfección

cuando se aplicó la concentración más alta de la combinación de Benlate y Phyton, eliminándose la contaminación por bacterias y presentándose contaminación por hongos. En posteriores pruebas donde se aplicó nuevamente la mayor concentración probada, se obtuvieron observaciones similares. Por consiguiente, dentro de los tratamientos a aplicar, se consideró seleccionar la dosis de 5 gr. de Benlate y 7.5 mL. de Phyton en 500 mL de agua destilada.

#### **4.2.4. BENLATE Y PHYTON – ALCOHOL 96° – HIPOCLORITO DE SODIO**

En esta prueba preliminar, se ensayó seis métodos de desinfección que se describen en el Anexo 12. Se utilizó como parte del pretratamiento, la combinación de Benlate y Phyton seleccionada en el ítem anterior, y en la desinfección dentro de la cámara de flujo laminar, se adicionó el uso de alcohol de 96° por un tiempo de 2 minutos, previo a la desinfección con Hipoclorito de Sodio. Además, se probó desinfecciones continuas de hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones y tiempos de inmersión.

Las observaciones registradas no muestran una desinfección y brote satisfactorios. La adición de pasos para llevar a cabo la desinfección, podría tener relación con lo observado en esta prueba preliminar. En las siguientes pruebas preliminares, se evitó utilizar estos tres insumos de desinfección en un mismo procedimiento. Además, se consideró no llevar a cabo desinfecciones continuas de hipoclorito de sodio, para evitar una mayor manipulación de explantes, que podrían aumentar el riesgo de contaminación.

#### **4.2.5. PLANT PRESERVATIVE MIXTURE (PPM)**

El insumo de desinfección Plant Preservative Mixture fue adicionado al medio de cultivo Murashige & Skoog complementado, a una concentración de 2 mL por litro de medio de cultivo preparado. Con este medio de cultivo, se ensayó doce diferentes métodos de desinfección, seis de estos métodos utilizaron como pretratamiento la inmersión en detergente comercial, y los otros seis utilizaron detergente comercial, seguido de la combinación determinada de Benlate y Phyton. En los tratamientos de desinfección, se utilizó alcohol e hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones; estos métodos se describen en el Anexo 13. En términos generales, el uso de PPM dio observaciones satisfactorias para todos los procedimientos de desinfección ensayados, ya que la adición de PPM al medio de cultivo, inhibió la proliferación de agentes contaminantes que pudieran encontrarse latentes entre los tejidos de la yema que brotó.

Con las observaciones realizadas en las pruebas preliminares, se seleccionaron 6 tratamientos de desinfección que se detallan en el ítem 5.1.4 del presente título, con los cuales se prosiguió la investigación en busca de determinar un protocolo de desinfección para el establecimiento *in vitro* de la *Guadua angustifolia* Kunth.

## **5. MÉTODOS**

### **5.1. PROCEDIMIENTO**

#### **5.1.1. SELECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE EXPLANTES**

Se utilizó los segmentos nodales de las ramas que cumplían las características cualitativas, ya seleccionadas por el ensayo preliminar descrito en el punto 4.1 Estos segmentos correspondieron a los segmentos “medio 1”, “medio 2” y “basal 1”. La diferenciación de secciones en la rama, se determinó por el número de nudos que presentaba cada una. Cada explante contenía un segmento nodal y cada segmento nodal utilizado contenía una yema semidiferenciada.

Los explantes fueron cortados con una tijera de podar, previamente desinfectada con alcohol de 96°, y fueron dimensionados dejando 0.5 cm hacia el extremo inferior y 2 cm. hacia el extremo superior (Figura 4). Luego se almacenaron en un frasco esterilizado y fueron llevados al laboratorio.



**Figura 4:** Explantes acondicionados con yemas semidiferenciadas.

*FUENTE: Elaboración propia.*

### 5.1.2. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Para la preparación del medio de cultivo, se siguió el protocolo de trabajo empleado por el IBT. Este protocolo consiste en el lavado, enjuague y escurrimiento de los frascos que contendrán el medio de cultivo. Una vez que los frascos están listos, se procedió a preparar el stock de medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) modificado en estado sólido que se utiliza en el laboratorio del IBT; este medio de cultivo dio buenos resultados en las pruebas preliminares y es el más utilizado en el cultivo *in vitro* de bambúes. Se aplicó las concentraciones de las sales que lo componen, en relación a la cantidad en litros a preparar. Estas sales se complementaron con las vitaminas piridoxina, glicina myoinositol, tiamina, ácido nicotínico (en el Anexo 16 se presenta la composición del medio de cultivo). En relación al uso del PPM, este compuesto no sufre alteración química en el proceso de esterilización en autoclave, por lo que se adicionó de la misma forma en que se adicionó las sales. Para ajustar el pH del medio de cultivo, se agregó gotas de ácido clorhídrico e hidróxido de potasio, hasta alcanzar un pH de 5.7. Por último, se adicionó el agar 7.2g.L-1 de medio de cultivo (Figura 5, 6 y 7).

Al finalizar la preparación del medio de cultivo, se hirvió en horno microondas (Figura 8), se vertió en los frascos (Figura 9), y colocó en autoclave por 25 min a 15 psi y 121°C (Figura 10).

Una vez finalizado el proceso esterilización en autoclave, los frascos se sellaron, y se utilizaron después de una semana.



**Figura 5: Preparación de Macro y Micro nutrientes MS.**

*FUENTE: Elaboración propia.*



**Figura 6: Preparación del Medio de Cultivo MS modificado.**

*FUENTE: Elaboración propia.*



**Figura 7: Ajuste del pH del medio de cultivo.**

*FUENTE: Elaboración Propia.*



**Figura 8:** Uso del microondas para hervir el medio de cultivo.

*FUENTE: Elaboración propia.*



**Figura 9:** Medio de cultivo en frascos de vidrio.

*FUENTE: Elaboración propia.*



**Figura 10:** Esterilización del medio de cultivo en autoclave.

*FUENTE: Elaboración propia.*

### **5.1.3. DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

Preliminarmente, como se mencionó en el ítem 4.2, se evaluó el comportamiento de los explantes ante el efecto de desinfección por inmersión en diferentes desinfectantes y a distintos tiempos de aplicación, a fin de diseñar y definir los tipos y concentración de desinfectantes, y su forma de aplicación.

La desinfección de los explantes se realizó en dos fases, la primera (pre-desinfección) se realizó fuera de cámara de flujo laminar (Figura 11 y 12). La segunda fase (desinfección) se realizó dentro de la cámara de flujo laminar (Figura 13). El detalle de ambas fases se encuentra en el siguiente ítem.

Luego de culminados los tratamientos de desinfección, los explantes se sembraron en los frascos con el medio de cultivo MS modificado. Al finalizar la siembra, se procedió a sellar y etiquetar los frascos con el código del tratamiento correspondiente.

Los frascos sellados y etiquetados fueron llevados a la sala de crecimiento, donde la temperatura fue de  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Los frascos de cultivo tuvieron un fotoperiodo de 10 horas. Se mantuvo estas condiciones por 45 días.



**Figura 11: Predesinfección con detergente comercial.**

*FUENTE: Elaboración propia.*



**Figura 12: Predesinfección con Benlate y Phyton (T2).**

*FUENTE: Elaboración propia.*



**Figura 13: Insumos de desinfección en cámara de flujo laminar.**

*FUENTE: Elaboración propia.*

#### **5.1.4. TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN SELECCIONADOS**

Se tuvo previsto realizar 2 ensayos de desinfección aplicando los tratamientos que se describen a continuación.

Tratamiento 1:

- Pretratamiento (fuera de cámara de flujo laminar)
  - Inmersión en detergente comercial a una concentración de 10gr/500mL durante 20 min.
  
- Tratamiento de desinfección (dentro de cámara de flujo laminar)
  - Realizar 3 enjuagues con agua destilada estéril
  - Inmersión en 50 mL. de Hipoclorito de sodio al 2 por ciento con 1 gota de tween 20 durante 10 minutos con agitación suave.
  - 3 enjuagues en agua destilada estéril y siembra

### Tratamiento 2:

- Pretratamiento
  - Inmersión de los explantes en detergente comercial a una concentración de 10gr/500mL durante 20 min.
  - Inmersión de los explantes durante una hora en una solución compuesta por Benlate 5 gr y Phyton 7 mL en 500 mL de agua destilada, agregando 1 gota de Tween 20 por cada 50 mL de solución.
- Tratamiento de desinfección
  - Realizar 3 enjuagues con agua destilada estéril
  - Inmersión en 50 mL. de Hipoclorito de sodio al 4 por ciento con 1 gota de tween 20 durante 10 minutos con agitación suave.
  - 3 enjuagues en agua destilada estéril y siembra

### Tratamiento 3:

- Pretratamiento
  - Inmersión de los explantes en detergente comercial a una concentración de 10gr/500mL durante 20 min.
- Tratamiento de desinfección
  - Realizar 3 enjuagues con agua destilada estéril
  - Inmersión en alcohol 2 min
  - Inmersión en 50 mL. de Hipoclorito de sodio al 4 por ciento con 1 gota de tween 20 durante 5 minutos con agitación suave.
  - 3 enjuagues en agua destilada estéril y siembra

Tratamiento 4:

- Se adicionó 2 mL de PPM al medio de cultivo antes de la esterilización en autoclave y se realizó el mismo procedimiento que en el tratamiento 1.

Tratamiento 5:

- Se adicionó 2 mL de PPM al medio de cultivo antes de la esterilización en autoclave y se realizó el mismo procedimiento que en el tratamiento 2.

Tratamiento 6:

- Se adicionó 2 mL de PPM al medio de cultivo antes de la esterilización en autoclave y se realizó el mismo procedimiento que en el tratamiento 3.

El primer ensayo se realizó a inicios del mes de junio, utilizando 3 repeticiones por tratamiento con la proyección de replicar el ensayo, para corroborar los resultados del primer ensayo, utilizando un mayor número de explantes por tratamiento (16) en otro mes del año (inicios de setiembre), teniendo en cuenta que podría observarse respuestas no necesariamente similares por efecto de posibles cambios fisiológicos en la planta madre.

#### **5.1.5. PARÁMETROS DE EVALUACIÓN**

- Número de explantes contaminados (bacterias y/u hongos).
- Número de explantes con oxidación fenólica.
- Número de explantes con brote
- Número de explantes con brote establecidos.
- Número de brotes por explante.
- Longitud de el/los brote(s).
- Promedio de hojas.

Los cinco primeros puntos se evaluaron semanalmente, hasta el término de los 45 días y los dos últimos puntos fueron evaluados al término de los 45 días.

**Tabla 2: Tratamientos de desinfección y parámetros de evaluación.**

Medio de Cultivo	Tratamiento	Desinfección (Dentro de cámara de flujo laminar)		Parámetros de evaluación						
		Pre-desinfección (Fuera de cámara de flujo laminar)	Descripción	Descripción	# de explantes contaminados	# de explantes con brote	# de explantes establecidos	# de brotes por explante	Longitud de los brotes	Promedio de hojas
MS	T1	20 min Detergente comercial 10 gr/500 mL AD	3 enjuagues en agua destilada esteril 10 min Lejía 2% + 2 gotas de Tween 20 3 enjuagues en ADE y siembra							
	T2	20 min Detergente comercial 10 gr/500 mL AD 60 min Inmersión en Benlate (5gr/500mL) + Phytol (7.5/500mL) + Tween 20 1 gota cada 50 ml	3 enjuagues en ADE 10 min Lejía 4% + 2 gotas de Tween 20 3 enjuagues en ADE y siembra							
	T3	20 min Detergente comercial 10 gr/500 mL AD	3 enjuagues en agua destilada 2 min Alcohol 98 2 enjuagues en ADE 5 min Lejía 4% + 2 gotas de Tween 20 3 enjuagues en ADE y siembra							
	T4	20 min Detergente comercial 10 gr/500 mL AD	3 enjuagues en agua destilada esteril 10 min Lejía 2% + 2 gotas de Tween 20 3 enjuagues en ADE y siembra							
	T5	20 min Detergente comercial 10 gr/500 mL AD 60 min Inmersión en Benlate (5gr/500mL) + Phytol (7.5/500mL) + Tween 20 1 gota cada 50 ml	3 enjuagues en ADE 10 min Lejía 4% + 2 gotas de Tween 20 3 enjuagues en ADE y siembra							
	T6	20 min Detergente comercial 10 gr/500 mL AD	3 enjuagues en agua destilada 2 min Alcohol 98 2 enjuagues en ADE 5 min Lejía 4% + 2 gotas de Tween 20 3 enjuagues en ADE y siembra							
		ADE: Agua destilada esteril								

FUENTE: Elaboración propia.

## 5.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la presente investigación, para evaluar la desinfección, la oxidación fenólica, los explantes con brote y el promedio de hojas, se empleó un diseño completamente al azar. Durante el análisis de la variable respuesta, se comprobó que los datos no siguen una distribución normal; por lo tanto, no cumplen con el supuesto de normalidad para aplicar la prueba paramétrica planteada inicialmente. Bajo esta condición, se aplicó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal Wallis, con el uso del software Minitab 17, para definir si existía alguna diferencia en las variables respuestas con los tratamientos aplicados. Cuando se determinó la existencia de alguna diferencia, se procedió a realizar el test de comparaciones múltiples de Dunn, todo esto con un nivel de significancia de  $\alpha = 5$  por ciento. El uso de pruebas no paramétricas en propagación *in vitro* ha sido reportado por los siguientes autores: Villareal (2008), Menzel (2009), Minchala Patiño *et al.* (2014), Vargas *et al.* (2014), Cherréz *et al.* (2015).

En el caso de desinfección, la variable a evaluar fue la presencia de contaminación del explante o medio de cultivo por hongo o bacteria. Para la oxidación fenólica, se evaluó la presencia de oxidación en el explante y/o medio de cultivo. Respecto a los explantes con brote, se contabilizó el número de explantes que desarrollaron brote durante el tiempo de evaluación. En cuanto a los explantes con brote establecidos, se contabilizó el número de brotes que crecieron y lograron el desarrollo de hojas y/o raíces.

Para longitud del vástago, se empleó un diseño completamente al azar (DCA), usando el software Minitab 17, en seis tratamientos de desinfección en un solo medio de cultivo, con 3 repeticiones por cada tratamiento en el mes de Junio y 16 repeticiones por cada tratamiento en el mes de setiembre, donde se realizó el análisis de varianzas y la posterior comparación de medias con la prueba de Tukey con un nivel de significancia 0.05.

El análisis estadístico se aplicó en los resultados de los dos meses (Junio y Setiembre) de manera independiente ya que el número de repeticiones fue significativamente diferente y además las observaciones realizadas mostraron evidencia de posibles factores estacionales que podrían estar influyendo en la fisiología de la planta madre. La diferencia en el número de muestra se debe a lo mencionado en el ítem 2.1 Disponibilidad de Material Vegetal del presente título.



## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1. DESINFECCIÓN DE EXPLANTES**

Se considera explantes desinfectados al material vegetativo que ha sido sembrado en condiciones *in vitro* y que está libre de hongos y bacterias, independientemente de su estado. La capacidad de respuesta del explante a los tratamientos de desinfección, se verá en el ítem 2 donde se presenta el análisis de los datos de brotes establecidos.

En *Guadua angustifolia* Kunth, no se ha reportado estudios sobre el efecto del mes o estación del año en que se realiza el cultivo *in vitro*. Por otra parte, varios autores han reportado una alta tasa de contaminación por hongos y bacterias, siendo este uno de los mayores problemas para el establecimiento *in vitro* de la especie.

Considerando los tratamientos de desinfección en los meses del año (Junio y Setiembre) en que se desarrolló el cultivo *in vitro*, los mejores resultados en desinfección fueron T4, T5 y T6, con tasas estadísticamente iguales de desinfección del 100 por ciento, para la siembra hecha a inicios de junio; y del 75, 93.75 y 93.75 por ciento, para la siembra hecha a inicios de setiembre.

#### **1.1. DESINFECCIÓN - SIEMBRA A INICIOS DE JUNIO**

El cultivo *in vitro* de explantes de bambú en la estación previa y/o posterior al invierno o época húmeda, reporta una mayor efectividad de los tratamientos de desinfección, reflejada en mejores tasas de desinfección, tal como lo señalan en sus resultados Anand *et al.* (2013) y Mudoj *et al.* (2014).

En la desinfección realizada a inicios de junio, mes previo al inicio del invierno en la ciudad de Lima, los tratamientos aplicados no presentaron diferencias estadísticas significativas, según la prueba de comparaciones múltiples de Kruskal Wallis (Tabla 3). No obstante, el tratamiento T1 aplicado en el medio de cultivo MS, sí presentó una tasa de contaminación del 33.33 por ciento, mientras que los otros tratamientos no presentaron contaminación, es decir alcanzaron una tasa de desinfección del 100 por ciento.

**Tabla 3: Efecto de seis tratamientos de desinfección - Siembra a inicios de junio.**

<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Tratamiento de desinfección</b>	<b>Número de explantes</b>	<b>Porcentaje de Contaminación</b>	<b>Porcentaje de desinfección</b>	<b>Letra</b>
MS	T1	3	33.3	66.7	a
	T2	3	0	100.0	a
	T3	3	0	100.0	a
MS+PPM (2mL/L)	T4	3	0	100.0	a
	T5	3	0	100.0	a
	T6	3	0	100.0	a

NOTA: Letras iguales no difieren estadísticamente, según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn ( $\alpha: 0.05$ ).

Ramírez (2013), en el cultivo *in vitro* de *Guadua angustifolia*, aplicó tratamientos similares a T1 y T3, alcanzando una tasa de desinfección de 32 por ciento, con bacterias como agente contaminante. Asimismo, Borges *et al.* (2004), con la misma especie, aplicó una doble desinfección con tratamientos similares a T1 y T3, alcanzando una tasa de desinfección de 80 y 75 por ciento. Los resultados de estos autores permite plantear la necesidad de un pretratamiento y tratamiento de desinfección más agresivos con el explante, siempre teniendo en consideración la capacidad de respuesta del explante. Esto último, se confirmaría con la diferencia de resultados en desinfección, entre los tratamientos T1 y T3, ya que en T3 se añade alcohol por 2 min y se aumenta la concentración del hipoclorito de sodio al 4 por ciento.

Por otro lado, Jiménez *et al.* (2006) realizaron un pretratamiento que incluía una inmersión combinando Agri-mycin (2 gr.L<sup>-1</sup>) y Benomyl (2 gr.L<sup>-1</sup>), por un tiempo de 10 minutos y tratamiento de desinfección en cámara de flujo laminar, utilizando hipoclorito de sodio al 1.5 por ciento por 10 minutos, luego de los cuales, obtuvieron una tasa de desinfección del 37 por ciento; y López (2010), hace un pretratamiento por inmersión con Oxidocloruro de cobre (1 gr.L<sup>-1</sup>) o Agrodyne (10 mL.L<sup>-1</sup>) por 60 minutos y tratamiento de desinfección, dentro de la cámara de flujo laminar, con inmersión en alcohol 90° por 2 minutos e inmersión en hipoclorito de sodio al 3 por ciento por 10 minutos, logrando con ambos productos, una tasa de desinfección de 57 y 54 por ciento. Ambos procedimientos se pueden comparar con el tratamiento T2, que utiliza productos comerciales de fungicida (Benlate 10 gr.L<sup>-1</sup>) y bactericida (Phyton 14 mL.L<sup>-1</sup>) agrícolas como pretratamiento de desinfección por inmersión de 60 minutos, con la diferencia de que en este estudio, se ha empleado una mayor concentración de estos productos y se consiguió una tasa de desinfección del 100 por

ciento. En ese sentido, se observa una vez más, la necesidad de un pretratamiento agresivo para lograr una adecuada desinfección de los explantes de *Guadua angustifolia*.

Reed *et al.*, citados por Santana *et al.* (2003), en estudios de desinfección con antibióticos en cultivo de tejidos, encontraron que para eliminar a la bacteria internada entre las capas de los tejidos, es necesario aplicar una concentración 3 a 4 veces mayor a la usada en la desinfección de bacterias aisladas. Este aumento de concentración y su efectividad en la desinfección interna del explante, coincide con los resultados obtenidos en esta investigación, al igual que en la prueba preliminar realizada para establecer la dosis adecuada de Phyton y Benlate (Anexo 9).

Respecto a los resultados alcanzados por los tratamientos T2 y T3, ambos con una tasa de desinfección del 100 por ciento, y considerando que a las plantas madre no se les aplicó ningún tratamiento con bactericidas o fungicidas, se podría inferir que los tratamientos son en sí efectivos para la desinfección de los explantes o que hay un periodo del año en que la carga endógena de agentes contaminantes es menor, lo que permite una mayor efectividad de los tratamientos mencionados; este indicio concuerda con lo mencionado por Dominguez (1986), en su investigación realizada en propagación *in vitro* de *Juglans neotropica*, donde sostiene que existe una época del año específica en que se puede realizar el cultivo *in vitro* de yemas con una baja tasa de contaminación.

En relación a los resultados obtenidos por los tratamientos de desinfección T4, T5 y T6, todos presentaron una desinfección del 100 por ciento. Jiménez *et al.* (2006) determinaron un protocolo de desinfección, complementando el medio de cultivo MS con una dosis de PPM igual a la utilizada, alcanzando una tasa de desinfección máxima de 89 por ciento.

López (2015), manifestó que no había tenido éxito en la desinfección con el uso del PPM, y no lo recomendaba por su baja efectividad en la desinfección y su elevado costo<sup>1</sup>.

Las diferencias de opinión relacionadas a la efectividad de este producto en la desinfección de la *Guadua angustifolia*, podrían estar relacionadas a la estación o mes del año en que se haya realizado el cultivo *in vitro*, ya que ninguno de los dos autores menciona el mes o estación del año en que llevaron a cabo su investigación.

---

<sup>1</sup> Lopez, R. 15 jun. 2015. *In vitro Guadua angustifolia* (correo electrónico). Quindío. Colombia. Universidad del Quindío

En ese sentido, la tasa de desinfección de 100 por ciento, alcanzada por los tratamientos T4, T5 y T6, tendría relación con el mes del año en que se hizo la siembra *in vitro* de explantes. Este resultado se confronta en el siguiente ítem con los resultados y observaciones realizadas en el mes de setiembre.

Por último, el efecto del PPM en la proliferación de los agentes contaminantes, se puede observar al comparar los resultados de desinfección de T1 (66.7 por ciento) y T4 (100 por ciento), ya que estos tratamientos solo difieren en el uso del PPM.

## 1.2. DESINFECCIÓN - SIEMBRA A INICIOS DE SETIEMBRE

En el cultivo *in vitro* de explantes, realizado a inicios de setiembre, la desinfección con PPM mantuvo tasas elevadas de desinfección (Tabla 4). La prueba estadística de Kruskal Wallis concluyó que sí existe diferencia estadística en al menos uno de los tratamientos de desinfección, por lo que se procedió a realizar la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

En los tratamientos T1, T2 y T3, que no llevan PPM en el medio de cultivo, de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Dunn, existe diferencia estadística significativa entre T2 con T1 y T3, siendo T2 el que alcanzó una mayor tasa de desinfección con un 75 por ciento. Cabe mencionar que el tratamiento T2 no difiere estadísticamente del tratamiento T4, y tiene un porcentaje de desinfección elevado, por lo que se puede suponer que este tratamiento es una buena alternativa al uso del PPM.

**Tabla 4: Efecto de seis tratamientos de desinfección - Siembra a inicios de Setiembre.**

<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Número de Explantes</b>	<b>Porcentaje de contaminación</b>	<b>Porcentaje de Desinfección</b>	<b>Letra</b>
MS	T1	16	68.75	31.25	b
	T2	16	25	75	a
	T3	16	81.25	18.75	b
MS + PPM (2mL/L)	T4	16	25	75	a
	T5	16	6.25	93.75	a
	T6	16	6.25	93.75	a

NOTA: Letras iguales no difieren estadísticamente, según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn ( $\alpha: 0.05$ ).

Continuando con los tratamientos aplicados al medio MS, el tratamiento T3 tuvo la menor tasa de desinfección, a pesar de ser un tratamiento agresivo. La diferencia porcentual en la tasa de desinfección lograda entre T1 y T3, se debería a que una mayor exposición en una concentración menor, da mejor resultado que una menor exposición a una mayor concentración, más aún cuando la carga endógena de agentes contaminantes podría haber aumentado por la variación en las condiciones de ambiente del invernadero. Para llevar un registro de estas variaciones, se midió la temperatura y humedad relativa con un termohigrómetro. En el Anexo 17 y 18, se presentan estos registros para los meses de mayo a setiembre del año en que se realizó la investigación.

En relación al uso del PPM en el medio de cultivo, se puede observar que el uso de este producto aumenta la tasa de desinfección considerablemente. En los tratamientos de desinfección T5 y T6 se obtuvo la mayor tasa de desinfección de 93.75 por ciento, mientras que el tratamiento T4 alcanzó una tasa de desinfección del 75 por ciento. El uso de este producto en combinación con un buen tratamiento de desinfección en laboratorio, como pueden ser T5, T6 o T4, dependiendo de su respuesta en brote, que se verá en el siguiente ítem, permitiría llevar a cabo el cultivo *in vitro* de la *Guadua Angustifolia* en meses o estaciones donde la carga endógena de hongos y bacterias es mayor.

Se hace mención a una mayor carga endógena de agentes contaminantes, debido a que durante las evaluaciones semanales realizadas, se observó la proliferación de hongos y bacterias incluso después de la tercera semana de realizada la siembra. Esta misma condición ha sido reportada por Mudoj *et al.* (2014), en la propagación *in vitro* de *Bambusa nutans* Wall. ex. Munro, realizada en la época de monzones en la India. Cabe mencionar que en los explantes sembrados en el medio de cultivo MS+PPM ( $2\text{mL.L}^{-1}$ ), que se contaminaron por hongos y bacterias, el desarrollo del agente contaminante se dio en la parte superior del explante, mas no en la parte inmersa en el medio de cultivo. Si se compara con lo observado en la siembra realizada a inicios de Junio, donde no se presentó este tipo de contaminación, se puede inferir que los explantes a inicio de setiembre cuentan con una mayor carga endógena de hongos o bacterias, las cuales podrían estar alojadas en grietas, entre las escamas de las yemas o en otras partes resultando bastante difícil eliminarlos (George y Sherrington, citados por Villareal 2008).

## **2. EVALUACIÓN DE BROTES Y MORTANDAD DE EXPLANTES**

Domínguez (1986), menciona que el nivel de desarrollo del explante tiene una relación directa con el grado de contaminación y la capacidad de reacción al proceso de desinfección. Asimismo, la buena respuesta en brote de los explantes, guarda relación con la época del año de colecta, el tamaño del explante, la madurez del explante, estado fisiológico y salud de la planta madre, lo cual coincide con lo señalado por Mudoí y Borthakur (2009); Anand *et al.* (2013); Hu y Wang, Tisserat, Chaturvedi, citados por Mudoí *et al.* (2014).

En *Guadua angustifolia* Kunth, se ha reportado resultados relacionados a la tasa de brote obtenida de la sección apical, media y basal de la rama, siendo las de mayor tasa, la sección media y basal (Marulanda *et al.* 2005; López 2012). No obstante, no se ha encontrado reportes del efecto en la tasa de brote de la época o estación del año en que se realiza el cultivo *in vitro*. Por otro lado, Marulanda *et al.* (2005), Jiménez *et al.* (2006) y López (2010), incluyen el uso de hormonas en el medio de cultivo para inducir una mayor tasa de brote.

Considerando los resultados de los tratamientos de desinfección en ambos meses del año, se observa mejor respuesta del brote en la siembra realizada a inicios de Junio, aplicando los tratamientos T4, T5 y T6, con una tasa de 100 por ciento de brote y establecimiento. En la réplica de validación de resultados, realizada a inicios de Setiembre, los mejores resultados en brote se obtuvieron con los tratamientos de desinfección T4, seguido de T2 y T5, pero con resultados diferentes en el establecimiento de brotes, siendo T4 y T5 los que dieron porcentajes más elevados de brotes establecidos.

### **2.1. EVALUACIÓN DE BROTE Y MORTANDAD – SIEMBRA A INICIOS DE JUNIO**

La tasa de brotes obtenidos y establecidos a inicios de junio con los tratamientos de desinfección T2 y T3, presentan diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (Tabla 5). El tratamiento T1 no presenta diferencias significativas con los tratamientos T2 y T3.

Con el tratamiento T3, se obtuvo una tasa de brotes establecidos de 100 por ciento, es decir todos los explantes pudieron prosperar con la aplicación de este tratamiento. Contrario a esto, con el tratamiento T2, que tuvo una tasa de desinfección del 100 por ciento, se observa la menor tasa de brote. Se podría inferir que este tratamiento de desinfección tuvo un efecto negativo en la capacidad de reacción del explante, ya que este tratamiento utiliza un

pretratamiento de inmersión en Benlate y Phyton. En contraste, los tratamientos de desinfección T1 y T3 dieron brote en todos sus explantes desinfectados, dando un buen indicio en cuanto a la capacidad de reacción de los explantes post desinfección.

**Tabla 5: Resultados obtenidos en brote y explantes establecidos - Siembra a inicios de Junio.**

<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Número de explantes</b>	<b>Explantes con Brote (%)</b>	<b>Brote establecido (%)</b>	<b>Letra</b>	<b>Mortandad (%)</b>
MS	T1	3	66.7	66.7	ab	0*
	T2	3	33.3	33.3	b	66.7
	T3	3	100	100	a	0
MS + PPM (2mL/L)	T4	3	100	100	a	0
	T5	3	100	100	a	0
	T6	3	100	100	a	0

NOTA: Letras iguales no difieren estadísticamente, según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn ( $\alpha$ : 0.05)

\*Explante contaminado no se considera como mortandad (Porcentaje de Mortandad =  $100 - \text{Porcentaje de B establecidos} - \text{Porcentaje de Contaminación}$ ).

Respecto a los resultados de establecimiento de brotes en los tratamientos T4, T5 y T6, alcanzaron una tasa del cien por ciento, sin presentar diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Además, el uso de  $2\text{mL.L}^{-1}$  de PPM en el medio de cultivo, no tuvo efectos inhibitorios en la formación de brote, esto concuerda con lo reportado por Jiménez *et al.* (2006).

Al realizar la comparación entre los tratamientos que llevan PPM en el medio de cultivo y los que no, resalta la diferencia en brotes establecidos entre los tratamientos T2 y T5, ambos con un cien por ciento de brotes desinfectados, pero con una mayor mortandad en el tratamiento T2. Si se tiene en cuenta que estos tratamientos solo difieren en la incorporación del PPM al medio de cultivo, y que este producto es netamente un insumo desinfectante, no se podría relacionar un efecto negativo en brotamiento de la predesinfección con Benlate y Phyton.

De acuerdo a los resultados de varios autores en diferentes especies leñosas Yildirim *et al.* (2011), Anand *et al.* (2013), Yari *et al.* (2014), la primavera sería la mejor época del año, para iniciar el cultivo *in vitro* con plantas de campo o invernadero. No obstante, en este

estudio los resultados de junio –finales de otoño- han presentado una elevada tasa de brote para esta especie, lo cual concuerda con los resultados reportados por Mudoi *et al.* (2014) con la especie *Bambusa nutans* Wall., siendo otoño la época con mayor tasa de brote.

Marulanda *et al.* (2005), reportaron para *Guadua angustifolia* una mayor tasa de brote al adicionar 2.5 mg.L<sup>-1</sup> de 6-BAP al medio de cultivo, siendo esta tasa de 47.6 por ciento. De igual forma, Jiménez *et al.* (2006) reportaron una tasa de brote de 13 por ciento sin adición de hormonas, y una tasa de 37.5 por ciento al adicionar 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP al medio de cultivo. En ese sentido, y con el resultado de brotes establecidos de 100 por ciento para cuatro tratamientos distintos, se podría considerar que para esta época del año, el estado fisiológico de la planta madre presenta un nivel adecuado de hormonas, que permitirían el desarrollo y posterior establecimiento del explante. Sin embargo, se debe considerar que el número de repeticiones por tratamiento no es muy representativo, debido a la disponibilidad de material vegetal una vez que se terminó con las pruebas preliminares. Es conveniente repetir el ensayo con una mayor muestra con los mismos tratamientos y en la misma época del año.

Con los resultados de la tabla 5, se podría concluir que en el mes de junio, la capacidad de reacción de los explantes, no se vería disminuida por los tratamientos de desinfección utilizados, y la mortandad registrada en el tratamiento T2 podría estar relacionada al estado fisiológico y madurez interna del explante, difícilmente identificable a nivel macroscópico.

Respecto al desarrollo y establecimiento del brote, se observó un leve marchitamiento en la primera hoja desarrollada. Esta condición no afectó el vigor de la microplanta, obteniéndose un 100 por ciento de establecimiento en cuatro tratamientos, con enraizamiento espontáneo. El enraizamiento espontáneo ya ha sido reportado por Jiménez *et al.* (2006).

## **2.2. EVALUACIÓN DE BROTE Y MORTANDAD - SIEMBRA A INICIOS DE SETIEMBRE**

La tasa de brotes obtenidos en la siembra realizada a inicios de setiembre con los tres primeros tratamientos fue mayor con el tratamiento T2. Este tratamiento presenta diferencias estadísticas significativas con el tratamiento T3; el tratamiento T1 no difiere estadísticamente con estos dos tratamientos (Tabla 6).

Este resultado corrobora lo mencionado anteriormente, en relación al efecto del uso de Benlate y Phyton en el pretratamiento, que no presenta un efecto negativo en la capacidad de reacción del explante.

Por otro lado, se observó que los explantes a los que se aplicó el tratamiento T3, estaban con oxidación por efecto de la combinación de alcohol y lejía, lo cual pudo tener consecuencias negativas en la capacidad de brote del explante. Cabe mencionar que esta situación no se observó al aplicarse este tratamiento en la desinfección realizada en junio.

**Tabla 6: Resultados obtenidos en brote y explantes establecidos – Siembra a inicios de Setiembre.**

Medio de Cultivo	Tratamientos	Número de explantes	Porcentaje de Desinfección	Explantes con Brote (%)	Letra	Brote establecido (%)	Letra	Mortandad (%)
MS	T1	16	31.25	25	bcd	0	b	*31.25
	T2	16	75	43.75	ab	6.25	b	*68.75
	T3	16	18.75	6.25	d	6.25	b	*12.5
MS + PPM (2mL/L)	T4	16	75	56.25	a	31.25	a	*43.75
	T5	16	93.75	37.5	abc	12.5	ab	*81.25
	T6	16	93.75	12.5	cd	0	b	*93.75

*NOTA: Letras iguales no difieren estadísticamente, según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn ( $\alpha$ : 0.05)*

*\*Explante contaminado no se considera como mortandad (Porcentaje de Mortandad = 100 - Porcentaje de B establecidos - Porcentaje de Contaminación)*

En cuanto a los tratamientos donde se agregó PPM, la mejor tasa de brote se obtuvo con el tratamiento T4, que presenta diferencia estadística significativa con el tratamiento T6; el tratamiento T5 no difiere estadísticamente con T4 y T6. En estos tratamientos, que tuvieron una mayor cantidad de explantes desinfectados, se puede observar con mayor claridad en qué grado el tratamiento de desinfección aplicado incide en la tasa de brotamiento, siendo los tratamientos T4 y T5 los que permitieron una mejor respuesta de los explantes. Asimismo, los explantes que fueron desinfectados con el tratamiento T6 presentaron oxidación desde la primera semana, esto confirma el efecto negativo, comentado líneas arriba, del uso de alcohol y lejía en esta época del año.

Analizando los resultados de explantes con brote de todos los tratamientos y agrupándolos de manera comparativa entre los que difieren únicamente en el uso de PPM en el medio de cultivo (T1vsT4, T2vsT5 y T3 vs T6), se tiene que solo los tratamientos T1 y T4 difieren

estadísticamente, siendo mayor la tasa de brote del tratamiento T4. Esta diferencia estadística tendría relación con el estado fisiológico o nivel de madurez interno del explante, tal como también se evidenció con el tratamiento T2 en la siembra realizada en el mes de junio.

Comparando la tasa de brote de todos los tratamientos, se tiene que los tratamientos T4, T2 y T5 no presentan diferencias estadísticas significativas, de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. De este grupo de tratamientos, T4 (56.25 por ciento) presenta diferencias estadísticas significativas con T1, T3 y T6

Resulta necesario precisar que, para todos los tratamientos, el desarrollo de los brotes demoró más de 3 semanas desde la siembra, lo cual nos permite inferir que las plantas madre estuvieron en dormancia o saliendo de este estado, y esto, sumado al efecto oxidativo de los desinfectantes, explicaría la diferencia observada en el tiempo requerido para el desarrollo de brote y capacidad de respuesta de los explantes en el mes de Junio y Setiembre. Esta respuesta estacional concuerda con lo mencionado por Saxena y Dhawan (1994); Fajardo, citado por Borges *et al.* (2004) y Singh *et al.* (2011, 2012).

Estos resultados se diferencian de lo reportado por Yildirim *et al.* (2011), Anand *et al.* (2013) y Yari *et al.* (2014), que obtuvieron mejores resultados de brote en la primavera. Esto refuerza la idea de que hay diferentes estadios fisiológicos, lo que llevaría a diferentes niveles de hormonas endógenas en los explantes.

Respecto al resultado obtenido en brotes establecidos (Tabla 6), se observó durante las evaluaciones que los brotes no tenían suficiente vigor para su desarrollo y, en todos los tratamientos, se observó la pérdida de explantes con brote por efecto del necrosamiento dado a partir de la cuarta y quinta semana de realizada la siembra. El efecto del necrosamiento podría tener relación con el bajo vigor de los explantes sembrados en setiembre, que no presentaron la misma capacidad de reacción que se observó en los explantes sembrados en el mes de Junio.

Estadísticamente, de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Dunn, los tratamientos T1, T2 y T3 no presentan diferencias significativas. En cuanto a los demás tratamientos, el tratamiento T4 presenta diferencias estadísticas significativas con el tratamiento T6, y el tratamiento T5 no presenta diferencias estadísticas con T4 y T6. Por

último, comparando todos los tratamientos, se tiene que el tratamiento T4 presenta diferencias estadísticas significativas con los tratamientos T1, T2, T3 y T6.

Con estos resultados se tiene que el tratamiento T4 dio buenos resultados en desinfección y establecimiento de brotes, seguido de los tratamientos T5 y T2.

### **3. OXIDACIÓN FENÓLICA**

El uso de antioxidantes o renovación del medio de cultivo, es recomendado en los protocolos de propagación *in vitro*. Puesto que no se cuentan con registros de micropropagación de *Guadua angustifolia* en Perú, en el planteamiento de esta investigación, se buscó obtener información de la tasa de incidencia y efecto de la oxidación fenólica en el establecimiento de explantes, y así tener un diagnóstico para investigaciones futuras.

En ese sentido, se puede observar que en efecto, la oxidación fenólica ocurre en ambas épocas del año, pero tiene mayor incidencia en mortandad de explantes con brote cuando estos tienen un bajo vigor, que en este caso estaría relacionado a la dormancia de los brotes.

#### **3.1. OXIDACIÓN FENÓLICA - SIEMBRA A INICIOS DE JUNIO**

Durante el tiempo de evaluación, no se observó oxidación fenólica en el medio de cultivo, ni en los explantes de todas las repeticiones que alcanzaron el establecimiento. Por este motivo, no se realizó la prueba estadística. Después del tiempo de evaluación (más de 7 semanas) y conforme se desarrollaba la microplanta, se observó oxidación en el medio de cultivo y en la sección basal del vástago desarrollado. En este caso, la oxidación fenólica no causó la muerte de ningún brote, ya que éstos alcanzaron su crecimiento y desarrollo de hojas en la cuarta y quinta semana, sin verse afectados.

**Tabla 7: Resultados obtenidos de oxidación fenólica – Siembra a inicios de Junio**

<i>Medio de Cultivo</i>	<i>Tratamientos</i>	<i>Número de Explantes</i>	<i>Porcentaje de oxidación fenólica</i>
MS	T1	2	0
	T2	1	0
	T3	3	0
MS + PPM (2 mL/L)	T4	3	0
	T5	3	0
	T6	3	0

Esta situación nos permite inferir que la microplanta de *Guadua angustifolia* con buen vigor, puede superar el proceso de oxidación del medio de cultivo ocasionado por la oxidación fenólica. No obstante, se debe evitar que se desarrolle el proceso de oxidación fenólica, tomando en cuenta un tiempo límite de 2 meses después de realizada la siembra *in vitro*.

En las figuras 14, 15 y 16 se muestra las microplantas establecidas, después de las siete semanas de cultivo, con enraizamiento espontáneo con numerosos brotes y oxidación fenólica en el medio de cultivo.



**Figura 14: Microplantas establecidas**



**Figura 15: Microplantas establecidas**



**Figura 16: Microplantas establecidas**

### **3.2. OXIDACIÓN FENÓLICA - SIEMBRA A INICIOS DE SETIEMBRE**

Los resultados de oxidación fenólica se evaluaron en los cuatro tratamientos que obtuvieron las menores tasas de contaminación (Tabla 8). Durante la evaluación semanal, se pudo observar el oscurecimiento progresivo del tejido a partir de la cuarta semana de evaluación.

Este oscurecimiento tuvo consecuencias negativas con los brotes que estaban en proceso de crecimiento (Figura 17).

De acuerdo a la prueba de Dunn, estadísticamente no existe diferencia significativa en los promedios de oxidación fenólica, este resultado confirma lo hallado por Marulanda *et al.* (2005), que la oxidación fenólica es independiente a los tratamientos utilizados. Esto hace que, al igual que la contaminación, sea uno de los mayores inconvenientes durante el establecimiento de los cultivos *in vitro*. La oxidación fenólica ha sido reportada en el cultivo *in vitro* de *Guadua angustifolia* por Cruz *et al.* (2007) y Mendoza *et al.* (2010).

**Tabla 8: Resultados obtenidos de oxidación fenólica – Siembra a inicios de Setiembre**

<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Número de Explantes</b>	<b>Porcentaje de oxidación fenólica</b>	<b>Promedio de explantes con oxidación fenólica</b>	<b>Letra</b>
MS	T2	16	43.75	0.4375	a
MS + PPM 2ml/L	T4	16	37.5	0.375	a
	T5	16	56.25	0.5625	a
	T6	16	68.75	0.6875	a

NOTA: Letras iguales no difieren estadísticamente, según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn ( $\alpha: 0.05$ )

George, Tabiyeh *et al.*, Van Staden *et al.*, Abdelwahd *et al.*, citados por Azofeifa (2009), mencionan que en el cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo. Considerando que en los meses de junio y setiembre, se aplicó la misma metodología, a estas causas podría agregarse la condición fisiológica estacional de la planta madre, ya que, en los resultados y proceso de oxidación fenólica de junio y setiembre se observa una notable diferencia, siendo en el mes de setiembre donde se presentó una oxidación fenólica más agresiva.



**Figura 17:** Explantes con brote muerto por oxidación fenólica - Setiembre

#### **4. LONGITUD DE BROTE, NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE Y PROMEDIO DE HOJAS**

El desarrollo y crecimiento de las microplantas, está condicionado por la carga endógena de hormonas, su capacidad de reacción al tratamiento de desinfección y al medio de cultivo a utilizar.

Como se ha podido evidenciar en los puntos anteriores, existen diferencias en el establecimiento de las microplantas en los dos meses evaluados, siendo Junio el mes con resultados más promisorios.

Esta diferencia ha imposibilitado obtener suficientes microplantas en el mes de Setiembre, para evaluar las variables de desarrollo y crecimiento. Sin embargo, las pocas microplantas que se han obtenido en este mes, tienen valores de longitud, numero de hojas y brotes similares a los observados en el mes de junio.

##### **4.1. LONGITUD DE BROTE, NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE Y PROMEDIO DE HOJAS – SIEMBRA A INICIOS DE JUNIO**

Las microplantas establecidas para cada tratamiento, no presentaron diferencias estadísticas significativas de acuerdo al análisis de varianzas para las variables evaluadas (Tabla 9) (Anexo 7). En la medición de la longitud del vástago, se utilizó el software Image Pro Plus 4.5, con el fin de no interrumpir el desarrollo de las microplantas (Figura 18 y 19).

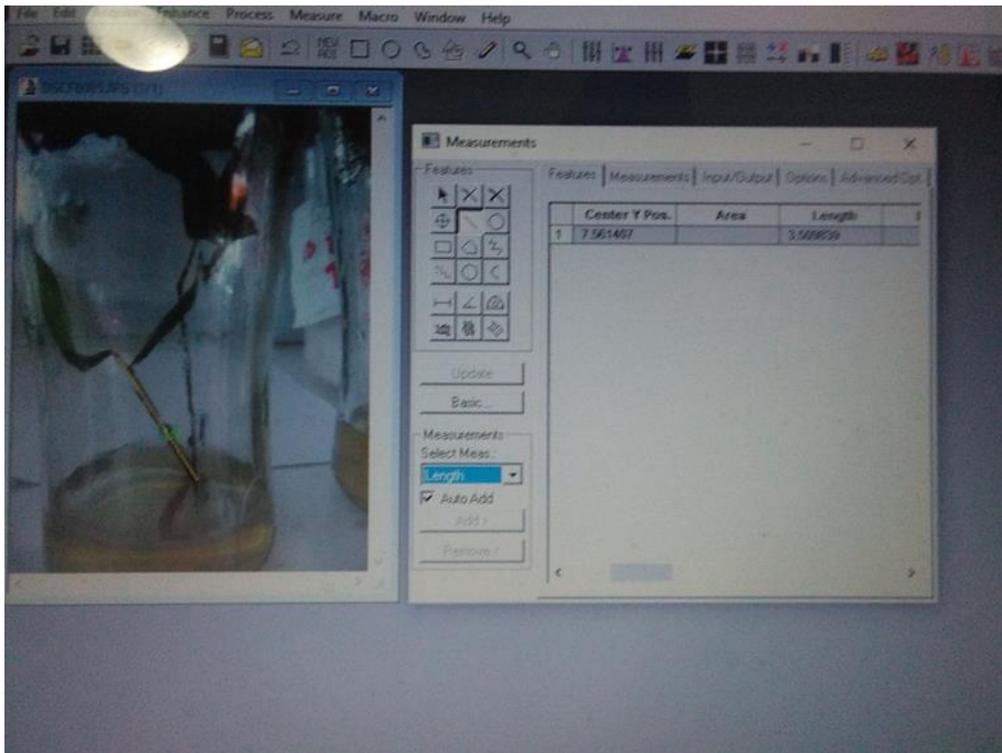
En cuanto al número de brotes, en el transcurso de las 7 semanas, solo se observó el desarrollo de un brote. Después de este periodo y cuando el vástago alcanzó su altura final, se observó que la microplanta empezó a desarrollar brotes laterales desde la base del vástago. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Jiménez *et al.* (2006), quienes muestran que solo un brote en promedio se desarrolla hasta después del día cuarenta de iniciado el cultivo. Asimismo, reportaron que a partir del día 50 empezaron a desarrollarse los brotes laterales y agregan que, a partir del día noventa, observaron un aumento en la formación de brotes laterales, cuando el vástago principal cesó su crecimiento.

**Tabla 9: Resultados obtenidos en longitud de brote, número de brotes y promedio de hojas – Siembra a inicios de Junio**

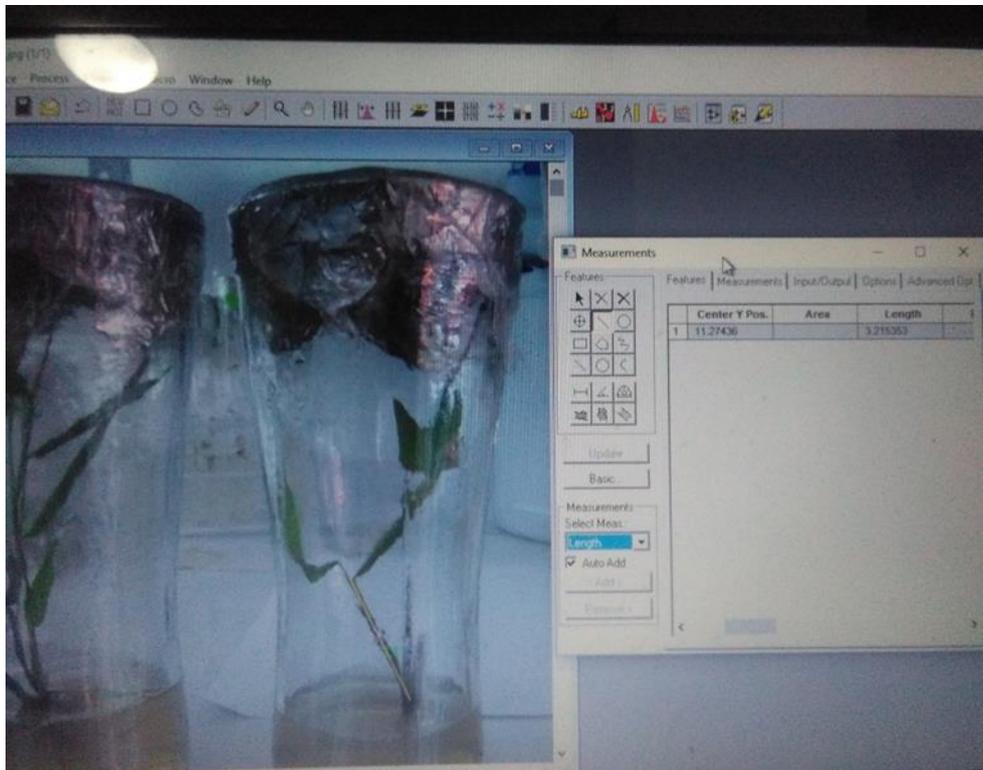
<b>Medio de cultivo</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Número de microplantas</b>	<b>Promedio longitud de vástago</b>	<b>Promedio número de hojas</b>	<b>Promedio número de brotes</b>
Ms	T1	2	3.1 a	1.5 a	1 a
	T2	1	5.6 a	2 a	1 a
	T3	3	3.9 a	2.3 a	1 a
Ms+PPM (2mL/L)	T4	3	3.5 a	1.3 a	1 a
	T5	3	6.6 a	2.3 a	1 a
	T6	3	3 a	1.7 a	1 a

En relación a la longitud, George *et al.* (2008), mencionan que si el primordio de un determinado órgano es cortado y transferido a cultivo *in vitro*, el órgano desarrollado podría ser más pequeño que el que se hubiera desarrollado en la planta madre. En ese sentido, las longitudes promedio obtenidas son de bajo valor. Sin embargo, éstas son un poco mayores a las reportadas por Borges *et al.* (2004), pero menores a la longitud obtenida por Jiménez *et al.* (2006), con vástagos mayores a 5 cm, a los cuarenta días de cultivo y con medio MS suplementado con la hormona BAP.

Con estos resultados, se tendría evidencias de que la siembra de explantes de *Guadua angustifolia* a inicios del mes de Junio, presenta las condiciones endógenas ideales de hormonas que permiten una elevada tasa de establecimiento con vástagos de buen vigor y que continúan su desarrollo incluso con presencia de oxidación fenólica en el medio de cultivo.



**Figura 18: Medición de longitud de vástagos con Image Pro Plus - Junio**



**Figura 19: Medición de longitud de vástagos con Image Pro Plus - Junio**

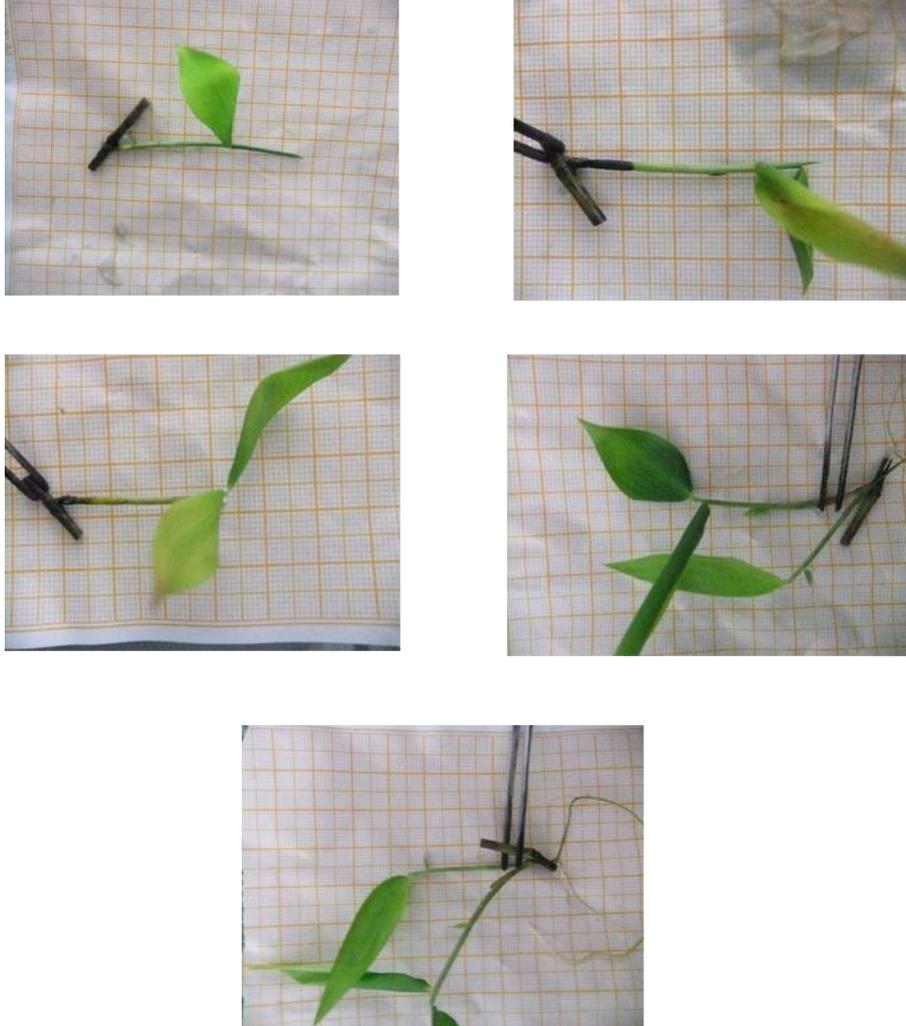
#### 4.2. LONGITUD DE BROTE, NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE Y PROMEDIO DE HOJAS – SIEMBRA A INICIOS DE SETIEMBRE

En la siembra de setiembre, se obtuvo pocas microplantas, motivo por el cual no se realizó el análisis estadístico de estos resultados (Tabla 10). De las pocas microplantas obtenidas, se puede observar, en la siguiente tabla, que los valores de longitud de vástago, promedio de brotes y promedio de hojas son similares a lo obtenido en la siembra de junio. En ese sentido, se podría inferir que para esta época, con los tratamientos T4 y T5 en medio de cultivo MS +PPM 2mL.L<sup>-1</sup>, y con el uso de una dosis correcta de citoquininas para potenciar el brotamiento, las microplantas alcanzarían valores de longitud similares a los resultados de junio o a los valores reportados por Borges *et al.* (2004) o Jiménez *et al.* (2006).

**Tabla 10: Resultados obtenidos en longitud de brote, número de brotes, promedio de hojas - Siembra a inicios de Setiembre**

Medio de Cultivo	Tratamiento	Numero de microplantas	Promedio longitud de vástago	Promedio número de hojas	Promedio número de brotes
Ms	T1	0	-	-	-
	T2	0	-	-	-
	T3	0	-	-	-
Ms+PPM	T4	3	3.9	1.8	1.3
	T5	1	5.6	1	-
	T6	0	-	-	-

A continuación, en la figura 20 se muestran las fotografías de las mediciones de longitud realizadas a las microplantas, con el uso de papel milimetrado.



**Figura 20: Medición de longitud de vástagos – Setiembre**



## V. CONCLUSIONES

La siembra para el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* realizada en la ciudad de Lima a inicios de junio y setiembre, con segmentos nodales caracterizados previamente de 2.5 cm de largo, provenientes de plantas madre de 21 meses de edad, ubicadas en invernadero, ha generado las siguientes conclusiones:

- 1) El protocolo de desinfección para el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. debe considerar el tratamiento “T4” o el tratamiento “T5”.
- 2) Existen evidencias de que en el mes de junio las condiciones de contaminación del explante son menos severas que en el mes de setiembre.
- 3) El explante con yema semidiferenciada de las secciones nodales definidas como media 1, media 2 y basal 1 de *Guadua angustifolia* Kunth, tiene un mejor establecimiento y desarrollo *in vitro* en el mes de junio frente a lo realizado en el mes de setiembre.
- 4) Se tiene evidencia en que la caracterización cualitativa de las secciones nodales de las ramas primarias de *Guadua angustifolia* Kunth desarrollada. es de utilidad como guía para la selección de explantes aptos para el cultivo *in vitro*.
- 5) Existe evidencia de que en el mes de setiembre el proceso de oxidación fenólica se da en un menor periodo de tiempo, frente al proceso de oxidación fenólica de junio.
- 6) La oxidación fenólica tiene una mayor incidencia en la mortandad de explantes cuando estos tienen bajo vigor.

## VI. RECOMENDACIONES

- Identificar a los agentes contaminantes recurrentes en esta especie y proponer alternativas para eliminarlos.
- Realizar pruebas adicionando diferentes dosis de hormonas de crecimiento para mejorar la tasa de brotamiento.
- Realizar ensayos en diferentes momentos del año podría dar resultados sobre el comportamiento fisiológico de la planta madre y su efecto en el explante.
- Evaluar mensualmente la cantidad de fenoles en el interior de las plantas madre.
- Se recomienda buscar el momento del año adecuado para el cultivo *in vitro* con los mismos tratamientos de desinfección.
- En caso no se cuente con disponibilidad de PPM, y considerando su mayor costo, se sugiere utilizar el tratamiento T2 de esta investigación.
- Identificar antioxidantes adecuados para el cultivo *in vitro* de esta especie.
- Determinar un tratamiento químico de desinfección para las plantas madres con el fin de disminuir la carga endógena de agentes contaminantes.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anand, M; Brar, J; Sood, A. 2013. In vitro propagation of an edible bamboo *Bambusa bambos* and assessment of clonal fidelity through molecular markers (en línea). *Journal of Medical and Bioengineering* 2(4):257-261. Consultado 17 abr. 2015. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/266019261\\_In\\_Vitro\\_Propagation\\_of\\_an\\_Edible\\_Bamboo\\_Bambusa\\_Bambos\\_and\\_Assessment\\_of\\_Clonal\\_Fidelity\\_through\\_Molecular\\_Markers](https://www.researchgate.net/publication/266019261_In_Vitro_Propagation_of_an_Edible_Bamboo_Bambusa_Bambos_and_Assessment_of_Clonal_Fidelity_through_Molecular_Markers)
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro (en línea). *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175. 2009. Consultado 29 abr. 2015. Disponible en [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v20n01\\_153.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n01_153.pdf)
- Bisht, P; Pant, M; Kant A. 2010. In vitro propagation of *Gigantochloa atrovioleae* Widjaja through nodal explants (en línea). *Journal of American Science* 6(10):1019–1026. Consultado 3 jun. 2015. Disponible en [http://www.academia.edu/2404255/In\\_vitro\\_propagation\\_of\\_Black\\_Bamboo](http://www.academia.edu/2404255/In_vitro_propagation_of_Black_Bamboo)
- Borges, M; Ros, C; Castellanos, Y; Milanés, S; Velásquez, R. 2004. Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento in vitro de *Guadua angustifolia* Kunth (en línea). *Biotecnología Vegetal* 4(4):237-242. Consultado 1 jun. 2015. Disponible en <http://revista.ibp.co.cu/2004/203-efecto-de-diferentes-metodos-de-desinfeccion-en-el-establecimiento-in-vitro-de-guadua-angustifolia-kunth-.html>
- Castaño, F; Moreno, RD. 2004. *Guadua para todos, cultivo y aprovechamiento*. Proyecto Manejo Sostenible de Bosques de Colombia. Bogotá, Col. 190 p.
- Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), 1985. *El cultivo de tejidos vegetales en México*. Eds M Robert, V Loyola.

Cherréz, J; Jadan, M. 2015. Obtención de brotes del híbrido Babaco (*Vasconcellea x heilbornii*) a partir de explantes de hojas ex vitro, vía organogénesis directa (en línea). Consultado 02 may. 2016. Disponible en [http://www.academia.edu/21410092/OBTENCI%C3%93N\\_D0000E\\_BROTOS\\_DE\\_EL\\_H%C3%84BRIDO\\_BABACO\\_Vasconcellea\\_x\\_heilbornii\\_A\\_PARTIR\\_DE\\_EXPLANTES\\_DE\\_HOJAS\\_EX\\_VITRO\\_V%C3%84DA\\_ORGANOGE%C3%89NESIS\\_DIRECTA](http://www.academia.edu/21410092/OBTENCI%C3%93N_D0000E_BROTOS_DE_EL_H%C3%84BRIDO_BABACO_Vasconcellea_x_heilbornii_A_PARTIR_DE_EXPLANTES_DE_HOJAS_EX_VITRO_V%C3%84DA_ORGANOGE%C3%89NESIS_DIRECTA)

CORPEI (Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones); CBI (Centro Holandés de Promoción de Importaciones de países en Desarrollo), 2003. Bambú (Caña *Guadua angustifolia* “Caña brava”): Proyecto CORPEI – CBI “Expansión de la Oferta Exportable del Ecuador” (en línea). EC. Consultado 02 may. 2016. Disponible en <https://scribd.zxcv.website/doc/56527423/Perfil-de-bambu-en-Ecuador>

Cruz, M; García, Y; Sánchez, C; Alvarado, Y; Acosta, M; Roque, B; Leiva, M; Freire, M. 2007. Identificación y control de *Bacillus sp.* contaminante del establecimiento in vitro de *Guadua angustifolia* Kunth (en línea). Biotecnología Vegetal 7(1):9–13. Consultado 2 jun. 2015. Disponible en [http://revista.ibp.co.cu/component/docman/doc\\_view/1444-v7-n1-2007109-13.html](http://revista.ibp.co.cu/component/docman/doc_view/1444-v7-n1-2007109-13.html)

Dominguez, G. 1986. Etude preliminaire de la micropropagation du genre Juglans (*J. regia* L., *J. nigra* L., *J. cinérea* L., *J. neotropica* D.). Tesis Mag. Sc. Université de Liège. Liege, BE. 109 p.

George, E; Debergh, P. 2008. Micropropagation: Uses and Method. In George, E; Hall, M; Klerk, GJ De. eds. Plant propagation by tissue culture 3<sup>rd</sup> edition: Volume 1. The Background (en línea). NL, Springer. 29-65 p. Consultado: 20 may 2015. Disponible en: <https://thunderbooks.files.wordpress.com/2009/05/plant-propagation-by-tissue-culture-vol-1-the-background-springer-2007.pdf>

- Gonzales, H. 2005. Elaboración de una propuesta para el Aprovechamiento y la Transformación del Bambú en el Ámbito del PRODAPP (Puerto Inca – Oxapampa). (en línea) Consultado 22 may. 2015. Disponible en [http://www.academia.edu/8075838/BAMB%C3%9A\\_APROVECHAMIENTO\\_Y\\_TRANSFORMACI%C3%93N\\_EN\\_%C3%81MBITO\\_DE\\_PRODAPP\\_Puerto\\_Inca-Oxapampa\\_](http://www.academia.edu/8075838/BAMB%C3%9A_APROVECHAMIENTO_Y_TRANSFORMACI%C3%93N_EN_%C3%81MBITO_DE_PRODAPP_Puerto_Inca-Oxapampa_)
- Gonzales, G. 2007. Características y Usos del Bambú (en línea). Lima, PE. 38 p. Consultado 22 may. 2015. Disponible en <https://es.scribd.com/document/52270952/CARACTER-STICAS-Y-USOS-DEL-BAMB>
- Hartmann, H; Kester, D y Davies, F. 1990. Plant propagation: principles and practices. 5 ed. New Jersey, US, Englewood Cliffs. 647 p.
- Inguil, E. 2001. Establecimiento de plántulas de camu camu *Myrciaria dulia* H.B.K Mc Vaugh bajo condiciones *in vitro*. Tesis para optar el Título de Biólogo. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina. 93p.
- Jiménez, V; Castillo, J; Tavares, E; Guevara, E; Montiel, M. 2006. In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation (en línea). Plant Cell Tiss Organ Cult 86:389-395. Consultado 30 may. 2015. Disponible en [http://www.ppm4plant-tc.com/2006\\_guadua.pdf](http://www.ppm4plant-tc.com/2006_guadua.pdf)
- Judziewicz, EJ; Clark, LG; Londoño, X; Stern, M. 1999. American bamboos. Washington D.C., US, Smithsonian Institution Press. 392 p
- Kane, M. 1996. Micropropagation from pre-existing meristemos. In Gray, D; Trigiano, R. eds. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Excercises. US, CRC Press. 75-86 p.
- Kutas, E; Ogorodnyk, L. 2014. The influence of season of selection of explants of introduced species of Rhododendrons (*Rhododendron* L.) on their viability in vitro (en línea). American Journal of Research Communication 2(5):204-212. Consultado en 27 abr. 2016. Disponible en [http://www.usa-journals.com/wp-content/uploads/2014/04/Lyubov\\_Vol25.pdf](http://www.usa-journals.com/wp-content/uploads/2014/04/Lyubov_Vol25.pdf)

- Larraga, N. 2011. Propagación in vitro y convencional de tres especies de bambu (en línea). Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Puebla, MX. Colegio de Postgraduados. 64 p. Consultado 1 jun. 2015. Disponible en: [http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/538/Larraga\\_Sanchez\\_N\\_MC\\_EDAR\\_2011.pdf?sequence=1](http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/538/Larraga_Sanchez_N_MC_EDAR_2011.pdf?sequence=1)
- Lobovikov, M; Paudel, Sh; Piazza, M; Ren, H; Wu, J. 2007. World bamboo resources: A thematic study prepared in the framework of the Global Forest Resources Assessment 2005 (en línea). Roma, Italia, FAO. 80 p. (Non-wood Forest Products no.18.) Consultado 6 jul. 2015. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a1243e.pdf>
- Londoño, X. 1990. Aspectos sobre la distribución y la ecología de los bambúes en Colombia (Poaceae: Bambusoideae). *Caldasia* 16(77):139-153.
- Londoño, X. 2002. Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los bambúes del nuevo mundo (en línea). Santafé de Bogotá, COL. Consultado 18 jun. 2015. Disponible en: <http://www.hof-landlust.de/scb/taller.html>
- López, R. 2010. Evaluación de alternativas de manejo de plantas madre, en condiciones de invernadero, para la micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth. Quindío, COL. Sin publicar.
- López, R. 2012. Efecto pre desinfectante del oxícloruro de cobre sobre hongos contaminantes en segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para su establecimiento in vitro (en línea). *Revista de Investigaciones - Universidad del Quindío* 23(2):120-126. Consultado 3 jun. 2015. Disponible en [http://blade1.uniquindio.edu.co/uniquindio/revistainvestigaciones/adjuntos/pdf/67a3\\_Art%2012%20\[OK\].pdf](http://blade1.uniquindio.edu.co/uniquindio/revistainvestigaciones/adjuntos/pdf/67a3_Art%2012%20[OK].pdf)
- Marulanda, M; Gutierrez, L; Marquez, M. 2005. Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth (en línea). *Actualidades Biológicas* 27(82): 5-15. Consultado 30 may. 2015. Disponible en <http://matematicas.udea.edu.co/~actubiol/actualidadesbiologicas/raba2005v27n82art1.pdf>
- Mejía, R. 1994. Propagación Comercial - 312 especies de plantas por cultivo in vitro. Lima, PE. 364 p.

- Mendoza, M; Tamayo, A; Pacheco, A. 2010. Establecimiento de un protocolo para la multiplicación in vitro de Bambú (*Guadua angustifolia*): FASE 1 (en línea). *Tierra Tropical* 6(2):191-199. Consultado 4 jun. 2015. Disponible en [https://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj4fOd4ubMAhVIRiYKHWfCD6QQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Ftierratropical.org%2Fwp-content%2Fplugins%2Fdownload-monitor%2Fdownload.php%3Fid%3D126&usg=AFQjCNEECsx-XPcN\\_I6w9CHwjcBjOxNiyQ&bvm=bv.122448493,d.eWE](https://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj4fOd4ubMAhVIRiYKHWfCD6QQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Ftierratropical.org%2Fwp-content%2Fplugins%2Fdownload-monitor%2Fdownload.php%3Fid%3D126&usg=AFQjCNEECsx-XPcN_I6w9CHwjcBjOxNiyQ&bvm=bv.122448493,d.eWE)
- Menzel, E. 2009. Evaluación de la capacidad de regeneración in vitro y aclimatación de diferentes variedades híbridas de *Lilium* (en línea). Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Valdivia, CL. Universidad Austral de Chile. 56 p. Consultado 02 may. 2016. Disponible en <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2009/fam551e/doc/fam551e.pdf>
- Mercedes, J. 2006. Guía Técnica Cultivo de Bambú (en línea). Santo Domingo, DO, CEDAF. 38 p. Consultado 04 may. 2015 Disponible en [http://www.academia.edu/9592074/Gu%C3%ADa\\_T%C3%A9cnica\\_Cultivo\\_del\\_Bamb%C3%BA](http://www.academia.edu/9592074/Gu%C3%ADa_T%C3%A9cnica_Cultivo_del_Bamb%C3%BA)
- Minchala-Patiño, J; Poma, R; Muñóz, L; Yaguana, M; González, D; Eras, V; Rojas, C; Delgado, G. 2014. Propagación in vitro de *Prosopis limensis* Benth. in Hook. (Fabaceae - Mimosoideae) (en línea). *Quebracho* 22(1,2):88-99. Consultado 2 may. 2016. Disponible en <http://fcf.unse.edu.ar/archivos/quebracho/v22n2a04.pdf>
- MINAG (Ministerio de Agricultura). 2008. Plan Nacional de Promoción del Bambú 2008 – 2010. Lima, PE.
- Mudoi, K; Borthakur, M. 2009. In vitro micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through nodal explants from field-grown culms and scope for upscaling (en línea). *Current Science* 96(7):962-966. Consultado 2 jun. 2015. Disponible en [http://www.academia.edu/11098393/In\\_vitromicropropagation\\_of\\_Bambusa\\_balcooa\\_Roxb.\\_through\\_nodal\\_explants\\_from\\_field-grown\\_culms\\_and\\_scope\\_for\\_upscaling](http://www.academia.edu/11098393/In_vitromicropropagation_of_Bambusa_balcooa_Roxb._through_nodal_explants_from_field-grown_culms_and_scope_for_upscaling)

- Mudoj, K; Saikia, S; Borthakur, M. 2014. Effect of nodal positions, seasonal variations, shoot clump and growth regulators on micropropagation of commercially important bamboo, *Bambusa nutans* Wall. ex. Munro (en línea). African Journal of Biotechnology 13(19):1961-1972. Consultado 2 jun 2015. Disponible en <http://www.academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text-pdf/433820D44520>
- Muñoz, S. 2003. Embriogénesis somática en Cedro (*Cedrela odorata* Linnaeus) a partir de cotiledones. Tesis para optar el título de Biólogo. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina. 120 p.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum no.15: 473-497.
- Olivier, J. 2008. Gramíneas (Poaceae) Bambusiformes del Río de Los Amigos, Madre de Dios, Perú. Revista Peruana de Biología no.15:121–126.
- Ramirez, L. 2013. Evaluación de tratamientos de desinfección en segmentos nodales de *Guadua angustifolia* para el establecimiento del cultivo in vitro (en línea). Trabajo de grado para optar al título de Especialista en Biotecnología Agraria. Bogotá, COL. Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD. 49 p. Consultado 30 may. 2015. Disponible en <http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/1069/2/Tesis%20Final%20mayo%202013.pdf>
- Roca, W; Mroginski, L. 1993. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. In Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, COL, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1-17 p. Consultado 29 may. 2015. Disponible en: [http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/cultivo\\_de\\_tejidos.htm](http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/cultivo_de_tejidos.htm)
- Santana, J.R.F. de; Paiva, R.; Aloufa, M.A.I. and Lemos, E.E.P. de 2003. Efficiency of ampicillin and benomyl at controlling contamination of Annonaceae leaf segments cultured in vitro (en línea). Fruits 58(6):357-361. Consultado 06 may. 2016. Disponible en <http://www.fruits-journal.org/articles/fruits/pdf/2003/06/I3604.pdf>
- Saxena, S; Dhawan, V. 1994. Micropropagation research in south Asia. In Constraints to production of bamboo and rattan. INBAR Technical Report 5:101–113.

- Singh, S; Dalal, S; Singh, R; Dhawan, A; Kalia, R. 2011. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F. Backer ex K Heyne): an exotic edible bamboo (en línea). Journal of Plant Biochemical and Biotechnology 21(2):220–228. Consultado 30 jun. 2015. Disponible en [http://www.researchgate.net/publication/257804861\\_Micropropagation\\_of\\_Dendrocalamus\\_asper\\_Schult.\\_Schult.\\_F.\\_Backer\\_ex\\_k.\\_Heyne\)\\_an\\_exotic\\_edible\\_bamboo](http://www.researchgate.net/publication/257804861_Micropropagation_of_Dendrocalamus_asper_Schult._Schult._F._Backer_ex_k._Heyne)_an_exotic_edible_bamboo)
- Singh, S; Dalal, S; Singh, R; Dhawan, A; Kalia, R. 2012. Seasonal influences on in vitro bud break in *Dendrocalamus hamiltonii* Arn. ex Munro nodal explants and effect of culture microenvironment on large scale shoot multiplication and plantlet regeneration (en línea). Indian Journal Plant Physiology 17(1):9–21. Consultado 7 jun. 2015. Disponible en [http://www.researchgate.net/publication/270280906\\_SEASONAL\\_INFLUENCES\\_ON\\_IN\\_VITRO\\_BUD\\_BREAK\\_IN\\_DENDROCALAMUS\\_HAMILTONII\\_ARN\\_EX\\_MUNRO\\_NODAL\\_EXPLANTS\\_AND\\_EFFECT\\_OF\\_CULTURE\\_MICROENVIRONMENT\\_ON\\_LARGE\\_SCALE\\_SHOOT\\_MULTIPLICATION\\_AND\\_PLANTLET\\_REGENERATION](http://www.researchgate.net/publication/270280906_SEASONAL_INFLUENCES_ON_IN_VITRO_BUD_BREAK_IN_DENDROCALAMUS_HAMILTONII_ARN_EX_MUNRO_NODAL_EXPLANTS_AND_EFFECT_OF_CULTURE_MICROENVIRONMENT_ON_LARGE_SCALE_SHOOT_MULTIPLICATION_AND_PLANTLET_REGENERATION)
- Singh, S; Singh, R; Kalia, S; Dalal, S; Dhawan, A; Kalia, R. 2013. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo—a plant with extraordinary qualities (en línea). Physiology and Molecular Biology of Plants 19(1):21–41. Consultado 4 jun. 2015. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3550689/>
- Vargas, I; Droste, A. 2014. In vitro propagation of *Cyathea atrovirens* (Cyatheaceae): spore storage and sterilization conditions (en línea). Revista de Biología Tropical 62(1):359-368. Consultado 2 may. 2016. Disponible en [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77442014000200027&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442014000200027&lng=en&tlng=en).

- Villalobos, V; Thorpe, T. 1984. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In Roca, W. y Mroginski, L. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, COL, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 127-141 p. Consultado 2 jun. 2015. Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo6.pdf>
- Villareal, E. 2008. Estudio preliminar del establecimiento del cultivo *in vitro* de Palto (*Persea americana* Mill.). Tesis para optar el título de Ing. Agrónomo. Lima, PE. Universidad Nacional Agraria La Molina. 71 p.
- Yadav, K; Lal, D; Singh, N. 2011. Influence of explanting season on *in vitro* multiplication of *Celastrus paniculatus* Willd. An endangered medicinal herb (en línea). Journal of Agricultural Technology 7(5):1355-1361. Consultado 27 abr. 2016. Disponible en [http://www.ijat-aatsea.com/pdf/September\\_v7\\_n5\\_11/19\\_IJAT2011\\_7\\_5\\_\\_Kuldeep\\_Yadav\\_F.pdf](http://www.ijat-aatsea.com/pdf/September_v7_n5_11/19_IJAT2011_7_5__Kuldeep_Yadav_F.pdf)
- Yari, M; Gholami, M; Esna-Ashari, M; Kheradmand, H. 2014. Effect of season and explant type on *in vitro* propagation of *Juglans regia* L. genotypes Z60 and Z63 (en línea). International Journal of Agriculture and Crop Sciences 7(9):624-629. Consultado 2 may. 2016. Disponible en <http://ijagcs.com/wp-content/uploads/2014/06/624-629.pdf>
- Yildirim, H; Onay, A; Tilkat, E; Akturk, Z. 2011. Micropropagation of the apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. Hacihaliloglu by means of single node culture (en línea). Turkish Journal of Agriculture and Forestry 35(1):55-64. Consultado 2 may. 2016. Disponible en <http://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/issues/tar-11-35-1/tar-35-1-6-0904-2.pdf>

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1

#### MINITAB 17. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS – DESINFECCIÓN JUNIO

<i>Group</i>	<i>N</i>	<i>Median</i>	<i>Ave Rank</i>
1	3	0	12
2	3	0	9
3	3	0	9
4	3	0	9
5	3	0	9
6	3	0	9
Overall	18		9.5

H = 0.79	DF = 5	P = 0.978	
H = 5.00	DF = 5	P = 0.416	(adjusted for ties)

*FUENTE: Elaboración Propia.*

H<sub>0</sub>: Todos los tratamientos de desinfección son iguales

H<sub>1</sub>: Existe un tratamiento de desinfección distinto al resto

Valor de P > que  $\alpha$ : 0.05, por lo tanto no se rechaza H<sub>0</sub>

## ANEXO 2

### MINITAB 17. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS – DESINFECCIÓN SETIEMBRE

Group	N	Median	Ave Rank	Z
1	16	1	64.5	2.52
2	16	0	43.5	-0.79
3	16	1	70.5	3.46
4	16	0	43.5	-0.79
5	16	0	34.5	-2.2
6	16	0	34.5	-2.2
Overall	96		48.5	

H = 24.37	DF = 5	P = 0.000	
H = 35.51	DF = 5	P = 0.000	(adjusted for ties)

*FUENTE: Elaboración Propia.*

H<sub>0</sub>: Todos los tratamientos de desinfección son iguales

H<sub>1</sub>: Existe un tratamiento de desinfección distinto al resto

Valor de P < que  $\alpha$ : 0.05, por lo tanto se rechaza H<sub>0</sub>; se procede a realizar las comparaciones múltiples.

#### Kruskal-Wallis: All Pairwise Comparisons

-----

Comparisons: 15  
 Ties: 94  
 Family Alpha: 0.05  
 Bonferroni Individual Alpha: 0.003  
 Bonferroni Z-value (2-sided): 2.935

-----

Adjusted for Ties in the Data

##### 1. Table of Z-values

1	0.00000	*	*	*	*	*
2	2.57386	0.00000	*	*	*	*
3	0.73539	3.30925	0.00000	*	*	*
4	2.57386	0.00000	3.30925	0.00000	*	*
5	3.67694	1.10308	4.41233	1.10308	0	*
6	3.67694	1.10308	4.41233	1.10308	0	0

##### 2. Table of P-values

1	1.00000	*	*	*	*	*
2	0.01006	1.00000	*	*	*	*
3	0.46210	0.00094	1.00000	*	*	*
4	0.01006	1.00000	0.00094	1.00000	*	*
5	0.00024	0.26999	0.00001	0.26999	1	*
6	0.00024	0.26999	0.00001	0.26999	1	1

### ANEXO 3

#### MINITAB 17. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS – BROTES ESTABLECIDOS JUNIO

Group	N	Median	Ave Rank	Z
1	3	1	8	-0.53
2	3	0	5	-1.6
3	3	1	11	0.53
4	3	1	11	0.53
5	3	1	11	0.53
6	3	1	11	0.53
Overall	18		9.5	

H = 3.32	DF = 5	P = 0.651	
H = 7.93	DF = 5	P = 0.160	(adjusted for ties)

*FUENTE: Elaboración propia.*

H<sub>0</sub>: Los brotes son iguales en todos los tratamientos

H<sub>1</sub>: Existe un tratamiento con brotes distinto al resto

Valor de P > que  $\alpha$ : 0.05, por lo tanto no se rechaza H<sub>0</sub>

Al hacerse la comparación múltiple se identificó que debe rechazarse la H<sub>0</sub>.

#### **Kruskal-Wallis: All Pairwise Comparisons**

```

Comparisons:          15
Ties:                 16
Family Alpha:         0.05
Bonferroni Individual Alpha: 0.003
Bonferroni Z-value (2-sided): 2.935
    
```

Adjusted for Ties in the Data

1. Table of Z-values

```

1  0.00000      * * * * *
2  1.06458  0.00000 * * * * *
3  1.06458  2.12916 0 * * * *
4  1.06458  2.12916 0 0 * * *
5  1.06458  2.12916 0 0 0 * *
6  1.06458  2.12916 0 0 0 0 0
    
```

2. Table of P-values

```

1  1.00000      * * * * *
2  0.28707  1.00000 * * * * *
3  0.28707  0.03324 1 * * * *
4  0.28707  0.03324 1 1 * * *
5  0.28707  0.03324 1 1 1 * *
6  0.28707  0.03324 1 1 1 1 1
    
```

## ANEXO 4

### MINITAB 17. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS – BROTES SETIEMBRE

Group	N	Median	Ave Rank	Z
1	16	0	46	-0.39
2	16	0	55	1.02
3	16	0	37	-1.81
4	16	1	61	1.97
5	16	0	52	0.55
6	16	0	40	-1.34
Overall	96		48.5	

H = 8.69	DF = 5	P = 0.122	
H = 13.74	DF = 5	P = 0.017	(adjusted for ties)

FUENTE: Elaboración propia.

H<sub>0</sub>: Los brotes son iguales en todos los tratamientos

H<sub>1</sub>: Existe un tratamiento con brotes distinto al resto

Valor de P < que  $\alpha$ : 0.05, por lo tanto se rechaza H<sub>0</sub>; se procede a realizar las comparaciones múltiples.

#### Kruskal-Wallis: All Pairwise Comparisons – Brotes setiembre

```
-----
Comparisons:                15
Ties:                       94
Family Alpha:               0.05
Bonferroni Individual Alpha: 0.003
Bonferroni Z-value (2-sided): 2.935
-----
```

Adjusted for Ties in the Data

##### 1. Table of Z-values

```
1  0.00000      *      *      *      *      *
2  1.14897  0.00000      *      *      *      *
3  1.14897  2.29793  0.00000      *      *      *
4  1.91494  0.76598  3.06391  0.00000      *      *
5  0.76598  0.38299  1.91494  1.14897  0.00000      *
6  0.76598  1.91494  0.38299  2.68092  1.53196  0
```

##### 2. Table of P-values

```
1  1.00000      *      *      *      *      *
2  0.25057  1.00000      *      *      *      *
3  0.25057  0.02157  1.00000      *      *      *
4  0.05000  0.44369  0.00218  1.00000      *      *
5  0.44369  0.70173  0.05000  0.25057  1.00000      *
6  0.44369  0.05000  0.70173  0.00734  0.12553  1
```

## ANEXO 5

### MINITAB 17. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS – BROTES ESTABLECIDOS SETIEMBRE

<i>Group</i>	<i>N</i>	<i>Median</i>	<i>Ave Rank</i>
1	16	0	44
2	16	0	47
3	16	0	47
4	16	0	59
5	16	0	50
6	16	0	44
Overall	96		48.5

H = 3.25	DF = 5	P = 0.662	
H = 12.74	DF = 5	P = 0.026	(adjusted for ties)

*FUENTE: Elaboración propia.*

H<sub>0</sub>: Los brotes establecidos son iguales en todos los tratamientos

H<sub>1</sub>: Existe un tratamiento con brotes establecidos distinto al resto

Valor de P < que  $\alpha$ : 0.05, por lo tanto se rechaza H<sub>0</sub>; se procede a realizar las comparaciones múltiples.

#### Kruskal-Wallis: All Pairwise Comparisons

```

-----
Comparisons:                15
Ties:                       94
Family Alpha:               0.05
Bonferroni Individual Alpha: 0.003
Bonferroni Z-value (2-sided): 2.935
  
```

-----  
Adjusted for Ties in the Data

##### 1. Table of Z-values

```

1  0.00000      *      *      *      *
2  0.60331  0.00000      *      *      *
3  0.60331  0.00000  0.00000      *      *
4  3.01656  2.41325  2.41325  0.00000      *
5  1.20662  0.60331  0.60331  1.80993  0.00000  *
6  0.00000  0.60331  0.60331  3.01656  1.20662  0
  
```

##### 2. Table of P-values

```

1  1.00000      *      *      *      *
2  0.54630  1.00000      *      *      *
3  0.54630  1.00000  1.00000      *      *
4  0.00256  0.01581  0.01581  1.00000      *
5  0.22758  0.54630  0.54630  0.07031  1.00000  *
6  1.00000  0.54630  0.54630  0.00256  0.22758  1
  
```

## ANEXO 6

### MINITAB 17. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS – OXIDACIÓN FENÓLICA SETIEMBRE

<i>Group</i>	<i>N</i>	<i>Median</i>	<i>Ave Rank</i>	<i>Z</i>
1	16	0	30	-0.62
2	16	0	28	-1.12
3	16	1	34	0.37
4	16	1	38	1.36
Overall	64		32.5	

H = 2.72	DF = 3	P = 0.436	
H = 3.63	DF = 3	P = 0.304	(adjusted for ties)

*FUENTE: Elaboración propia.*

H<sub>0</sub>: La oxidación fenólica es igual en todos los tratamientos

H<sub>1</sub>: Existe un tratamiento con oxidación fenolica distinto al resto

Valor de P > que  $\alpha$ : 0.05, por lo tanto no se rechaza H<sub>0</sub>

## ANEXO 7

### MINITAB 17. ANÁLISIS DE VARIANZA LONGITUD DE VÁSTAGO

<i>Analysis of Variance</i>					
<i>Source</i>	<i>DF</i>	<i>Adj SS</i>	<i>Adj MS</i>	<i>F-Value</i>	<i>P-Value</i>
Trat	5	44.12	8.824	2.7	0.074
Error	12	39.24	3.27		
Total	17	83.36			

*FUENTE: Elaboración propia.*

H<sub>0</sub>: La longitud del vástago es igual en todos los tratamientos

H<sub>1</sub>: Existe un tratamiento con longitud de vástago distinto al resto

Valor de P > que  $\alpha$ : 0.05, por lo tanto no se rechaza H<sub>0</sub>

## ANEXO 8

### MINITAB 17. PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS – CANTIDAD DE HOJAS

<i>Tratamiento</i>	<i>N</i>	<i>Median</i>	<i>Ave Rank</i>	<i>Z</i>
1	3	1	6.5	-1.07
2	3	0	5.3	-1.48
3	3	2	13.8	1.54
4	3	1	7.7	-0.65
5	3	2	13.8	1.54
6	3	2	9.8	0.12
Overall	18		9.5	

H = 7.09	DF = 5	P = 0.214
H = 8.24	DF = 5	P = 0.143 (adjusted for ties)

*FUENTE: Elaboración propia.*

H<sub>0</sub>: La cantidad de hojas es igual en todos los tratamientos

H<sub>1</sub>: Existe un tratamiento donde la cantidad de hojas es distinto al resto

Valor de P > que  $\alpha$ : 0.05, por lo tanto no se rechaza H<sub>0</sub>

## ANEXO 9

### PRUEBA PRELIMINAR DE BENLATE Y PHYTON

Código tratamiento	Descripción de Tratamiento		7 DIAS				14 DIAS				
	Fuera de cámara	Dentro de cámara	# Explantes	Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminar	# Explantes	Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminación	
T1.1	15 min DC (10 gr/ 500 mL) 1 hr Benlate y Bactericida (1 gr + 1 mL/500mL)	3 Enjuague con ADE Lejia 2% + Tween 20 3 Enjuague con ADE	10 min	3	2	1	1	1	0	0	1
T1.2		3 Enjuague con ADE Lejia 2% + Tween 20 3 Enjuague con ADE	15 min	3	2	0	1	1	1	1	0
T2.1	15 min DC (10 gr/ 500 mL) 1 hr Benlate y Bactericida (2 gr + 2.5 mL/500mL)	3 Enjuague con ADE Lejia 2% + Tween 20 3 Enjuague con ADE	10 min	3	2	1	1	1	0	0	1
T2.2		3 Enjuague con ADE Lejia 2% + Tween 20 3 Enjuague con ADE	15 min	3	2	1	1	1	0	0	1

FUENTE: Elaboración propia.

Continuación

Código tratamiento	Descripción de Tratamiento		7 DIAS				14 DIAS				
	Fuera de cámara	Dentro de cámara	# Explantes	Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminar	# Explantes	Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminación	
T3.1	15 min DC (10 gr/ 500 mL)  1 hr Benlate y Bactericida (4 gr + 5 mL/500mL)	3 Enjuague con ADE  Lejia 2% + Tween 20  3 Enjuague con ADE	10 min	3	1	1	2	2	0	0	2
T3.2		3 Enjuague con ADE  Lejia 2% + Tween 20  3 Enjuague con ADE	15 min	3	0	0	1	3	0	0	0
T4.1	15 min DC (10 gr/ 500 mL)  1 hr Benlate y Bactericida (5 gr + 7.5 mL/500mL)	3 Enjuague con ADE  Lejia 2% + Tween 20  3 Enjuague con ADE	10 min	3	0	0	1	3	1	0	2
T4.2		3 Enjuague con ADE  Lejia 2% + Tween 20  3 Enjuague con ADE	15 min	3	0	0	2	3	2	0	0

FUENTE: Elaboración propia.

## ANEXO 10

### PRUEBA PRELIMINAR CON BICLORURO DE MERCURIO

Código	Pretratamiento		Tratamiento	Tiempo de Inmersión	1 era evaluación				
					# Explantes	Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminar	Observaciones
TP1	20 min Detergente Comercial (10 gr/ 500 mL)	3 Enjuague con ADE	BM 0,1%	5 min	3	0	0	1	
TP2			BM 0,1%	10 min	3	0	0	1	
TP3			BM 0,2%	5 min	3	0	0	0	
TP4			BM 0,2%	10 min	3	1	0	2	
TP5			BM 0,3%	5 min	3	0	0	0	
TP6			BM 0,3%	10 min	3	0	0	0	1 explante cortado

Código	Pretratamiento		Tratamiento	Tiempo de Inmersión	2da evaluación				
					# Explantes	Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminar	Observaciones
TP1	20 min Detergente Comercial (10 gr/ 500 mL)	3 Enjuague con ADE	BM 0,1%	5 min	3	0	0	1	
TP2			BM 0,1%	10 min	3	0	0	1	
TP3			BM 0,2%	5 min	3	0	0	0	
TP4			BM 0,2%	10 min	2	0	0	2	
TP5			BM 0,3%	5 min	3	0	0	0	
TP6			BM 0,3%	10 min	2	0	0	1	

FUENTE: Elaboración propia.

Continuación

Código	Pretratamiento		Tratamiento	Tiempo de Inmersión	3era evaluación				
					# Explantes	Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminar	Observaciones
TP1	20 min Detergente Comercial (10 gr/ 500 mL)	3 Enjuague con ADE	BM 0,1%	5 min	3	0	2	1	Contaminación por hongo
TP2			BM 0,1%	10 min	3	1	2	1	Contaminación por hongo
TP3			BM 0,2%	5 min	3	1	1	1	Contaminación por hongo
TP4			BM 0,2%	10 min	2	0	1	1	Contaminación por hongo
TP5			BM 0,3%	5 min	3	0	0	0	
TP6			BM 0,3%	10 min	2	0	1	1	Contaminación por hongo

FUENTE: Elaboración propia.

## ANEXO 11

### PRUEBA PRELIMINAR HIPOCLORITO DE SODIO

Código	Pretratamiento	Tratamiento	Tiempo de inmersión	1 era evaluación				
				# Explantes	Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminar	Observaciones
TP7	20 min DC (10 gr/ 500 mL)	-		3	3	0	-	
TP8	20 min DC (10 gr/ 500 mL)	Lejía 2% + Tween 20	5 min	3	0	0	1	
TP9			10 min	3	0	0	0	
TP10			15 min	3	0	0	1	

Código	Pretratamiento	Tratamiento	Tiempo de inmersión	2 era evaluación				
				# Explantes	Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminar	Observaciones
TP7	20 min DC (10 gr/ 500 mL)	-		0	-	-	-	
TP8	20 min DC (10 gr/ 500 mL)	Lejía 2% + Tween 20	5 min	3	1	0	2	
TP9			10 min	3	0	0	2	
TP10			15 min	3	0	0	3	

FUENTE: Elaboración propia.

Continuación

<b>Código</b>	<b>Pretratamiento</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo de inmersión</b>	<b>3 era evaluación</b>				
				<b># Explantes</b>	<b>Contaminados</b>	<b>Brote contaminado</b>	<b>Brote sin contaminar</b>	<b>Observaciones</b>
TP7	20 min DC (10 gr/ 500 mL)	-		0	-	-	-	
TP8	20 min DC (10 gr/ 500 mL)	Lejía 2% + Tween 20	5 min	2	0	0	2	
TP9			10 min	3	0	0	3	
TP10			15 min	3	0	0	3	

*FUENTE: Elaboración propia.*

## ANEXO 12

### PRUEBA PRELIMINAR BENLATE+PHYTON, ALCOHOL E HIPOCLORITO DE SODIO

Código	Descripción de Tratamiento			1 era evaluación					
	Fuera de cámara	Dentro de cámara			# Explantes	Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminación	Observaciones
TP19	20 min DC 1 hr Benlate 5gr/500mL + Phyton 7.5 gr/500 mL+ Tween 20	Lejía 10 min 2%	Lejía 5 min 4%		3	1	1	1	
TP20		alcohol 2 min	Lejía 10 min 2%	Lejía 5 min 4%	3	0	0	1	
TP21		alcohol 2 min	Lejía 10 min 4%		3	2	1	0	
TP22		Lejía 10 min 4%			3	0	0	0	
TP23		Lejía 10 min 2%			3	0		1	Explantes bien oxidados
TP24		alcohol 2 min	Lejía 10 min 2%		3	0		2	Explantes bien oxidados

FUENTE: Elaboración propia.

Continuación.

Código	Descripción de Tratamiento			2da evaluación					
	Fuera de cámara	Dentro de cámara			# Explantes	Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminación	Observaciones
TP19	20 min DC 1 hr Benlate 5gr/500mL + Phyton 7.5 gr/500 mL+ Tween 20	Lejía 10 min 2%	Lejía 5 min 4%		1	0	0	1	
TP20		alcohol 2 min	Lejía 10 min 2%	Lejía 5 min 4%	3	0	0	2	
TP21		alcohol 2 min	Lejía 10 min 4%		0	0	0	0	
TP22		Lejía 10 min 4%			3	0	0	1	
TP23		Lejía 10 min 2%			3	0	0	1	Explantes bien oxidados
TP24		alcohol 2 min	Lejía 10 min 2%		3	0	0	2	Explantes bien oxidados

FUENTE: Elaboración propia.

Continuación

Código	Descripción de Tratamiento			3era evaluación					
	Fuera de cámara	Dentro de cámara			# Explantes	Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminación	Observaciones
TP19	20 min DC 1 hr Benlate 5gr/500mL + Phyton 7.5 gr/500 mL+ Tween 20	Lejía 10 min 2%	Lejía 5 min 4%		1	0	0	1	
TP20		alcohol 2 min	Lejía 10 min 2%	Lejía 5 min 4%	3	0	0	2	
TP21		alcohol 2 min	Lejía 10 min 4%		0	0	0	0	
TP22		Lejía 10 min 4%			3	0	0	1	
TP23		Lejía 10 min 2%			3	0	0	1	Explantes bien oxidados
TP24		alcohol 2 min	Lejía 10 min 2%		3	0	0	2	Explantes bien oxidados

FUENTE: Elaboración propia.

## ANEXO 13

### PRUEBA PRELIMINAR PPM

	Código	Fuera de cámara	Dentro de cámara			1 era evaluación				
						Nro de explantes	Contaminados	Brotos contaminados	Brotos sin contaminación	Observaciones
MS + 2 ml de ppm	TP25	20 min DC	Lejía 10 min 2%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	Explante oxidado levemente en la parte superior
	TP26		Alcohol 2 min	Lejía 10 min 2%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	3	
	TP27		Lejía 10 min 4%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	
	TP28		Alcohol 2 min	Lejía 10 min 4%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	1	
	TP29		Lejía 5 min 4%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	
	TP30		Alcohol 2 min	Lejía 5 min 4%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	2	
	TP31	20 min DC 1 hr Benlate 5gr/500mL + Phyton 7.5 gr/500 mL+ Tween 20	Lejía 10 min 2%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	
	TP32		Alcohol 2 min	Lejía 10 min 2%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	2	
	TP33		Lejía 10 min 4%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	
	TP34		Alcohol 2 min	Lejía 10 min 4%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	2	
	TP35		Lejía 5 min 4%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	2	
	TP36		Alcohol 2 min	Lejía 5 min 4%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	2	

FUENTE: Elaboración propia.

Continuación

	Código	Fuera de cámara	Dentro de cámara			2da evaluación				
						Nro de explantes	Contaminados	Brotes contaminados	Brotes sin contaminación	Observaciones
MS + 2 ml de ppm	TP25	20 min DC	Lejía 10 min 2%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	Explante oxidado levemente en la parte superior
	TP26		Alcohol 2 min	Lejía 10 min 2%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	3	
	TP27		Lejía 10 min 4%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	
	TP28		Alcohol 2 min	Lejía 10 min 4%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	1	
	TP29		Lejía 5 min 4%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	
	TP30		Alcohol 2 min	Lejía 5 min 4%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	3	
	TP31	20 min DC 1 hr Benlate 5gr/500mL + Phyton 7.5 gr/500 mL+ Tween 20	Lejía 10 min 2%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	
	TP32		Alcohol 2 min	Lejía 10 min 2%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	3	
	TP33		Lejía 10 min 4%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	
	TP34		Alcohol 2 min	Lejía 10 min 4%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	2	
	TP35		Lejía 5 min 4%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	
	TP36		Alcohol 2 min	Lejía 5 min 4%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	3	

FUENTE: Elaboración propia.

Continuación

	Código	Fuera de cámara	Dentro de cámara			3era evaluación				
						Nro de explantes	Contaminados	Brotos contaminados	Brotos sin contaminación	Observaciones
MS + 2 ml de ppm	TP25	20 min DC	Lejía 10 min 2%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	
	TP26		Alcohol 2 min	Lejía 10 min 2%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	3	2 hojas con muy leve marchitamiento
	TP27		Lejía 10 min 4%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	1 hojas con muy leve marchitamiento
	TP28		Alcohol 2 min	Lejía 10 min 4%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	1	
	TP29		Lejía 5 min 4%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	1 hojas con muy leve marchitamiento
	TP30		Alcohol 2 min	Lejía 5 min 4%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	3	1 hojas con muy leve marchitamiento
	TP31		Lejía 10 min 2%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	
	TP32	20 min DC 1 hr	Alcohol 2 min	Lejía 10 min 2%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	3	1 hojas con muy leve marchitamiento
	TP33	Benlate 5gr/500mL	Lejía 10 min 4%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	1 hojas con muy leve marchitamiento
	TP34	+ Phyton 7.5 gr/500 mL+	Alcohol 2 min	Lejía 10 min 4%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	2	1 hojas con muy leve marchitamiento
	TP35	Tween 20	Lejía 5 min 4%	2 gotas de Tween 20		3	0	0	3	
	TP36		Alcohol 2 min	Lejía 5 min 4%	2 gotas de Tween 20	3	0	0	3	1 hojas con muy leve marchitamiento

FUENTE: Elaboración propia.

**ANEXO 14**  
**PRUEBA PARA SELECCIÓN DEL TIPO DE EXPLANTE**

Descripción cualitativa del explante	Tipo de yema	Sección	Tratamiento de desinfección	Semana 1						Semana 2						Semana 3					
				# Explantes	Explantes sin brote y desinfectados	Sin Brote y Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminar	Observaciones	# Explantes	Explantes sin brote y desinfectados	Sin Brote y Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminar	Observaciones	# Explantes	Explantes sin brote y desinfectados	Sin Brote y Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminar	Observaciones
Hoja caulinar de color verde, difícil de sacar Explante no lignificado, se quiebra con facilidad.	Yema sin diferenciar	Apical	Lejía 10	5	5	0	0	0		5	5	0	0	0	No desarrolla brote, explantes con quemaduras por lejía.	5	5	0	0	0	No desarrolla brote, se explantes con quemaduras por lejía.
			Lejía 15	5	5	0	0	0		5	5	0	0	0	No desarrolla brote, explantes con quemaduras por lejía.	5	5	0	0	0	No desarrolla brote, se explantes con quemaduras por lejía.
Hoja caulinar de color verde claro o oscuro, fácil de sacar Explante lignificado.	Yema semidiferenciada	Medio 1	Lejía 10	5	4	1	0	0	Contaminación por bacteria	5	1	0	1	3	Contaminación por bacteria. Explante con leve oxidación	5	1	0	1	3	Contaminación por bacteria. Explante con leve oxidación
			Lejía 15	5	5	0	0	0		5	1	1	0	3	Contaminación por hongo. Explante con oxidación.	5	1	1	0	3	Contaminación por hongo. Explante con oxidación.
Hoja caulinar de color verde oscuro o marrón rojizo, sin desprenderse de la rama, fácil de sacar. Explante lignificado	Yema semidiferenciada	Basal 1	Lejía 10	5	4	1	0	0	Contaminación por hongo	5	0	1	1	3	Contaminación por hongo. Explante con poca oxidación.	5	0	1	1	3	Contaminación por hongo. Explante con poca oxidación.
			Lejía 15	5	4	1	0	0	Contaminación por hongo	5	0	1	2	3	Contaminación por hongo. Explante con oxidación.	5	0	1	2	2	Contaminación por hongo. Explante con oxidación.

FUENTE: Elaboración propia.

Continuación

Descripción cualitativa del explante	Tipo de Yema	Sección	Tratamiento de desinfección	Semana 1						Semana 2						Semana 3					
				# Explantes	Explantes sin brote y desinfectados	Sin Brote y Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminar	Observaciones	# Explantes	Explantes sin brote y desinfectados	Sin Brote y Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminar	Observaciones	# Explantes	Explantes sin brote y desinfectados	Sin Brote y Contaminados	Brote contaminado	Brote sin contaminar	Observaciones
Hoja caulinar de color verde, difícil de sacar Explante no lignificado, se quiebra con facilidad.	Yema sin diferenciar	Apical	Lejía 10	5	5	0	0	0		5	5	0	0	0	No desarrolla brote, explantes con quemaduras por lejía.	5	5	0	0	0	No desarrolla brote, se explantes con quemaduras por lejía.
			Lejía 15	5	5	0	0	0		5	5	0	0	0	No desarrolla brote, explantes con quemaduras por lejía.	5	5	0	0	0	No desarrolla brote, se explantes con quemaduras por lejía.
Hoja caulinar de color verde oscuro o marrón rojizo, fácil de sacar Explante lignificado.	Yema semidiferenciada	Medio 2	Lejía 10	5	4	1	0	0	Contaminación por hongos	5	0	1	1	3	Contaminación por hongos	5	0	1	1	3	Contaminación por hongos
			Lejía 15	5	4	1	0	0	Contaminación por hongos	5	1	2	0	2	Contaminación por hongos	5	1	2	0	2	Contaminación por hongos
Hoja caulinar de marrón rojizo o marrón claro. Como seca. Con abertura desde el extremo superior, fácil de sacar. Explante lignificado.	Yema diferenciada o semidiferenciada	Basal 2	Lejía 10	5	2	3	0	0	Contaminación por bacterias y hongos	5	1	1	3	0	Contaminación por bacterias y hongos	5	1	1	3	0	Contaminación por bacterias y hongos
			Lejía 15	5	3	2	0	0	Contaminación por hongos	5	1	1	2	1	Contaminación por hongos	5	1	1	2	1	Contaminación por hongos

FUENTE: Elaboración propia.

## ANEXO 15

### FICHA TÉCNICA PLANT PRESERVATIVE MIXTURE



Plant Cell Technology

#### PLANT CELL TECHNOLOGY, INC.

1823 Jefferson Place, NW  
Washington, DC 20036  
[www.plantcelltechnology.com](http://www.plantcelltechnology.com)  
1-800-746-8535 / 1-202-778-8522

Patent No. 5,750,402

#### Product Information

##### PPM™- Plant Preservative Mixture

plant culture preservative and biocide

**Product Number** PPM

**Storage Conditions** 39°F / 4° C

#### Product Description

Plant Preservation Mixture (PPM™) is a robust broad-spectrum biocide formulated for use in plant tissue culture. PPM™ targets bacteria and fungi in plant tissue culture growth media as well as contaminated tissue. It affects key enzymes in the Krebs cycle and in the Electron Transport Chain. Depending on the dose and the level of contamination, PPM is a biocidal component in plant culture medium. In addition, it may also function as a biostatic compound as a preventative measure. **When diluted with plant growth media it is effective as a microbiocide (i.e. bactericide and fungicide) against non-human health pathogenic organisms component of liquid or semi-solid plant culture media.**

PPM™ is effective for most seed bearing plants - angiosperm, as well as gymnosperm,- however, it is not recommended for use in ferns, mosses, algae and aquatic plants. Optimization may be required to maximize potency. While PPM is an excellent tool in the prevention and elimination of culture contamination it is not a substitute for aseptic laboratory techniques and appropriate air handling systems are recommended.

#### Usage

The instructions listed below are for general use. Optimization may be required.

PPM Quick Reference	Maintenance	Sterilization	Agrobacterium
Concentration (v/v)	0.05 – 0.2%	5.0% (see note)	0.05
Duration	Continuous	4 – 12 hours	Continuous
Note	Plant tissue types vary, optimization is required. For freshly isolated protoplast or callus use 0.05% Higher concentrations may result in toxicity or uptake	In 3X MS salts (use dry powder formulation from commercial companies) Do not use in combination with other sterilization techniques. Do not adjust pH. Treated tissues should be placed directly into culture medium of choice containing 0.05% PPM.	May be added to antibiotic cocktail.

**Composition** Proprietary(See MSDS for list of active ingredients)

#### Physical Properties

Physical form: Solution  
Appearance: Clear, colorless to amber  
pH: 3.8

#### Stability

Store vial at 4 C.  
See label for expiration date  
PPM may be added to media prior to sterilization or directly to sterile media prior to dispensation.  
Autoclavable at 1.05 kg/cm<sup>2</sup> (15 psi) and 121°C for 20 minutes.  
PPM should be added **post-autoclave** to media containing **proteins**, prior to dispensing to culture vessels.  
PPM at final concentration (diluted in medium) is stable at ambient temperatures for up to 1 month.

#### Precautions

It is a violation of Federal Law to use this product in a manner inconsistent with its labeling. See MSDS for safety, handling, and disposal instructions.

**PATENT NO. 5,750,402** - The formulation of PPM in tissue culture media at certain concentrations and the use of PPM in tissue culture at certain concentrations to prevent or eliminate microbial contamination is protected by US patent No. 5,750,402. Patents have been issued in Canada, New Zealand, Australia, the European Community, Israel and other countries. It is also patent pending in many other countries of the world.

### References

- Miyazaki J, Tan BH, Errington SG. Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPM™). PCTOC. 2010;102(3):365-372.
- Miyazaki J, Tan BH, Errington SG, Kuo JS. Bacterial endophyte in *Macropidia fuliginosa*: its localisation and eradication from in vitro cultured basal-stem callus. Aust J Bot. 2011;59(4):363-368.
- Lata H, Chandra S, Khan IA, ElSohly MA. Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. — an important medicinal plant. Phys and Mol Biol of Plants. 2009;15(1):79-86.
- Greer SP, Rinehart TA. Dormancy and Germination In Vitro Response of *Hydrangea macrophylla* and *Hydrangea paniculata* Seed to Light, Cold-Treatment and Gibberellic Acid. J. Environ. Hort. 2010;28(1):41-47.
- Moghaddam S, et al. Optimization of an Efficient Semi-Solid Culture Protocol for Sterilization and Plant Regeneration of *Centella asiatica* (L.) as a Medicinal Herb. Molecules. 2011;16(11): 8981-8991
- Çolgecen H, Koca U, Toker G. Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. Turk J Biol. 2011; 35:513-520
- Pouvreau J, et al. A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. Plant Methods 2013;9:32
- Marecik R, Bialas W, Cyplik P, Lawniczak L, Chrzanowski L. Phytoremediation Potential of Three Wetland Plant Species Toward Atrazine in Environmentally Relevant Concentrations. Pol. J. Environ. Stud. 2012;21(3):697-702
- Pérez Flores J, Aguilar Vega ME, Roca Tripepi R. Assays for the in vitro establishment of *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata*. Rev. Colomb. Biotecnol. 2012;14(1)
- Nesterenko-Malkovskaya A, Kirzhner F, Zimmels Y, Armon R. *Eichhornia crassipes* capability to remove naphthalene from wastewater in the absence of bacteria. Chemosphere. 2012;87(10):1186-1191.
- Kieffer M, Fuller MP. In Vitro Propagation of Cauliflower Using Curd Microexplants. Meth Mol Biol. 2013;994:329-339.
- Kodym A, Tensch E, Bunn E, Delpratt J. Ploidy stability of somatic embryo-derived plants in two ecological keystone sedge species (*Lepidosperma laterale* and *L. concavum*, Cyperaceae). Aust J Bot. 2012;60(5):396-404.
- Peña-Ramírez YJ, et al. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in the tropical timber tree Spanish red cedar [*Cedrela odorata* L. (Meliaceae)]. PCTOC. 2011;105(2):203-209.
- Haddadi F, Adb Aziz M, Saleh G, Abd Rashid A, Kamaladini H. Micropropagation of Strawberry cv. Camarosa: Prolific Shoot Regeneration from In Vitro Shoot Tips Using Thidiazuron with N6-benzylamino-purine. HortScience. 2010;45(3):453-456.
- Jimenez VM, Castillo J, Tavares E, Guevara E, Montiel M. In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. PCTOC. 2006;86:389-395.
- Compton ME, Koch JM. Influence of Plant Preservative Mixture (PPM) on adventitious organogenesis in Melon, *Petunia*, and Tobacco. In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant. 2001;37:259-261

## ANEXO 16

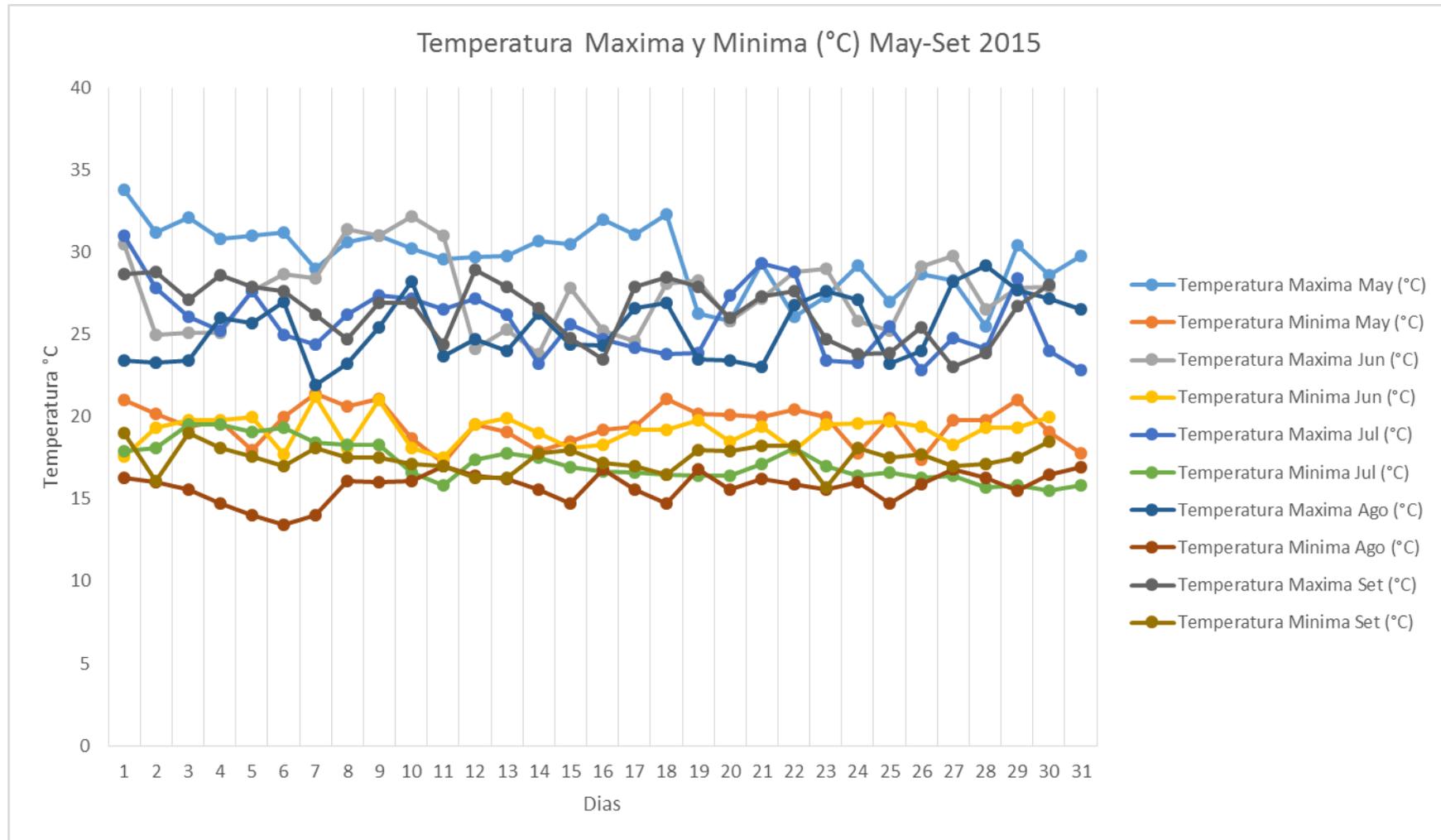
### COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE & SKOOG

<i>Medio de cultivo</i>	<i>Macroelementos</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Unidad</i>
Murashige & Skoog 1962	KNO <sub>3</sub>	1900	mg/L
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	mg/L
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	mg/L
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	mg/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	mg/L
	<b>Microelementos</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Unidad</b>
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	mg/L
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	15.6	mg/L
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	mg/L
	KI	0.83	mg/L
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	mg/L
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	mg/L
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	mg/L
	Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	mg/L
	Na <sub>2</sub> FeEDTA·2H <sub>2</sub> O	37.3	mg/L
	<b>Vitaminas</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Unidad</b>
	Tiamina	0.1	mg/L
	Piridoxina	0.5	mg/L
	Acido nicotínico	0.5	mg/L
	Glicina	2	mg/L
	Myoinositol	100	mg/L
	<b>Sacarosa</b>	30	g/L
	<b>Ph</b>	5.7	
<b>Agar</b>	7.2	g/L	

FUENTE: *Elaboración propia.*

## ANEXO 17

### TEMPERATURA MAXIMA Y MINIMA (MAYO A SETIEMBRE)



FUENTE: Elaboración propia.

## ANEXO 18

### CONDICIONES AMBIENTALES DEL INVERNADERO

Condiciones Ambientales del Invernadero - Mayo 2015

<b>DIA</b>	<b>Temperatura Máxima May (°C)</b>	<b>Temperatura Mínima May (°C)</b>	<b>Humedad Relativa Max (%)</b>	<b>Humedad Relativa Mínima (%)</b>
1	33.8	21	94	47
2	31.2	20.2	96	56
3	32.1	19.4	96	55
4	30.8	19.7	95	56
5	31	18	98	48
6	31.2	20	97	54
7	29	21.4	98	53
8	30.6	20.6	97	52
9	31	21.1	91	57
10	30.2	18.7	92	55
11	29.6	17.2	98	49
12	29.7	19.5	93	47
13	29.8	19.1	86	49
14	30.7	17.9	97	53
15	30.5	18.5	97	49
16	32	19.2	98	55
17	31.1	19.4	97	52
18	32.3	21.1	89	53
19	26.3	20.2	96	63
20	25.8	20.1	97	68
21	29.3	20	97	55
22	26.1	20.4	97	66
23	27.3	20	98	60
24	29.2	17.8	99	53
25	27	19.9	95	55
26	28.7	17.4	96	57
27	28.3	19.8	98	65
28	25.5	19.8	98	71
29	30.4	21	97	65
30	28.6	19.1	94	59
31	29.8	17.8	98	55

FUENTE: *Elaboración propia.*

Condiciones Ambientales del Invernadero - Junio 2015

<b>DIA</b>	<b>Temperatura Máxima Jun (°C)</b>	<b>Temperatura Mínima Jun (°C)</b>	<b>Humedad Relativa Max (%)</b>	<b>Humedad Relativa Mínima (%)</b>
1	30.5	17.6	95	55
2	25	19.3	94	70
3	25.1	19.8	96	70
4	25.1	19.8	89	66
5	27.6	20	92	58
6	28.7	17.7	93	53
7	28.4	21.2	94	59
8	31.4	18.1	96	54
9	31	21	94	50
10	32.2	18.1	94	46
11	31	17.5	98	57
12	24.1	19.5	97	78
13	25.3	19.9	89	67
14	23.8	19	91	69
15	27.8	18.1	93	58
16	25.2	18.3	96	69
17	24.6	19.2	91	68
18	28.1	19.2	89	63
19	28.3	19.8	91	51
20	25.8	18.5	90	71
21	27.2	19.4	90	56
22	28.8	18	89	52
23	29	19.5	86	57
24	25.8	19.6	87	57
25	25.2	19.7	90	68
26	29.1	19.4	95	56
27	29.8	18.3	86	55
28	26.5	19.3	90	67
29	27.8	19.3	93	65
30	27.9	20	93	63

FUENTE: Elaboración propia.

Condiciones Ambientales del Invernadero - Julio 2015

<b>DIA</b>	<b>Temperatura Máxima Jul (°C)</b>	<b>Temperatura Mínima Jul (°C)</b>	<b>Humedad Relativa Max (%)</b>	<b>Humedad Relativa Mínima (%)</b>
1	31	17.9	94	55
2	27.8	18.1	93	65
3	26.1	19.5	93	71
4	25.2	19.5	95	72
5	27.6	19.1	93	63
6	25	19.3	97	77
7	24.4	18.4	96	80
8	26.2	18.3	90	63
9	27.4	18.3	89	56
10	27.2	16.6	87	55
11	26.5	15.8	90	63
12	27.2	17.4	89	60
13	26.2	17.8	96	56
14	23.2	17.5	97	80
15	25.6	16.9	94	67
16	24.7	16.7	97	75
17	24.2	16.6	97	76
18	23.8	16.5	94	71
19	23.9	16.4	93	69
20	27.4	16.4	93	57
21	29.3	17.1	91	72
22	28.8	18.1	94	58
23	23.4	17	97	81
24	23.3	16.4	98	76
25	25.5	16.6	93	70
26	22.8	16.3	96	72
27	24.8	16.4	91	77
28	24.1	15.7	95	76
29	28.4	15.8	91	71
30	24	15.5	90	80
31	22.8	15.8	94	83

FUENTE: Elaboración propia.

Condiciones Ambientales del Invernadero - Agosto 2015

<b>DIA</b>	<b>Temperatura Máxima Ago (°C)</b>	<b>Temperatura Mínima Ago (°C)</b>	<b>Humedad Relativa Max (%)</b>	<b>Humedad Relativa Mínima (%)</b>
1	23.4	16.3	94	76
2	23.3	16	92	69
3	23.4	15.6	95	68
4	26	14.7	94	56
5	25.7	14	90	64
6	27	13.4	89	54
7	21.9	14	93	71
8	23.2	16.1	93	70
9	25.4	16	90	68
10	28.2	16.1	89	55
11	23.7	17	92	71
12	24.7	16.4	88	65
13	24	16.2	96	67
14	26.3	15.6	93	54
15	24.4	14.7	95	65
16	24.3	16.8	91	61
17	26.6	15.6	93	53
18	26.9	14.7	96	58
19	23.5	16.8	93	71
20	23.4	15.6	95	71
21	23	16.2	96	68
22	26.8	15.9	93	56
23	27.6	15.6	92	58
24	27.1	16	93	51
25	23.2	14.7	88	69
26	24	15.9	94	69
27	28.2	16.8	90	56
28	29.2	16.3	93	53
29	27.7	15.5	89	54
30	27.2	16.5	96	49
31	26.5	16.9	94	66

FUENTE: Elaboración propia.

Condiciones Ambientales del Invernadero - Setiembre 2015

<b>DIA</b>	<b>Temperatura Máxima Set (°C)</b>	<b>Temperatura Mínima Set (°C)</b>	<b>Humedad Relativa Max (%)</b>	<b>Humedad Relativa Mínima (%)</b>
1	28.7	19	93	51
2	28.8	16.1	97	59
3	27.1	19	95	61
4	28.6	18.1	93	53
5	27.9	17.6	96	63
6	27.6	17	89	58
7	26.2	18.1	94	66
8	24.7	17.5	96	58
9	26.9	17.5	93	53
10	26.9	17.1	97	60
11	24.4	17	96	58
12	28.9	16.3	92	52
13	27.9	16.3	97	56
14	26.6	17.8	96	64
15	24.8	18	97	71
16	23.5	17.2	96	68
17	27.9	17	96	52
18	28.5	16.5	93	53
19	27.9	18	93	57
20	26	17.9	97	69
21	27.3	18.2	93	54
22	27.6	18.2	94	58
23	24.7	15.7	98	57
24	23.8	18.1	91	70
25	23.9	17.5	95	66
26	25.4	17.7	93	63
27	23	17	97	74
28	23.9	17.1	95	73
29	26.7	17.5	97	59
30	28	18.5	93	55

FUENTE: Elaboración propia.