



Determinación de medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de bambú (*Guadua weberbaueri*)

Determination of culture mediums for *in vitro* establishing of bamboo (*Guadua weberbaueri*)

Fabiola Estefania Casanova Alvino^{1*}; Gilberto Domínguez Torrejón¹; María de Lourdes Tapia y Figueroa¹

¹ Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. Email: gdominguez@lamolina.edu.pe; fabicasanova.fc.fc@gmail.com; ltapia@lamolina.edu.pe

Recepción: 24/08/2018; Aceptación: 05/01/2019

Resumen

En la propagación de bambúes, se utilizan generalmente métodos de reproducción asexual debido a que la floración de estas especies solo se presenta a intervalos o ciclos muy largos. La micro propagación es una alternativa para superar los problemas que se presentan en la propagación convencional de estas especies. El objetivo de este trabajo fue contribuir al desarrollo del protocolo para la propagación *in vitro* de *Guadua weberbaueri*, mediante la obtención de explantes libres de patógenos para su desarrollo en un medio de multiplicación. Se aplicaron tres tratamientos de desinfección usando alcohol al 70%, hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones y Tween 20. El mejor tratamiento fue el tratamiento 3, que consistió en una limpieza con hipoclorito de sodio al 2,5% por 10 minutos, y una segunda desinfección con hipoclorito de sodio al 1,5% por 3 minutos. En la fase de iniciación se probaron tres medios basales: MS, MS modificado y 1/2MS. El medio de cultivo más adecuado resultó ser el medio MS. Se hicieron ensayos preliminares de multiplicación con tres medios: MS + bencilaminopurina + ácido naftalenacético; MS modificado + bencilaminopurina y MS + tidiazurón + ácido naftalenacético. El medio de multiplicación que benefició el desarrollo de brotes de *Guadua weberbaueri* fue el medio MS modificado más 2 mg/l de bencilaminopurina.

Palabras clave: micro propagación; bambúes; cultivo *in vitro*; desinfección; cultivo de tejidos.

Abstract

Bamboo species are propagated via asexual reproduction methods because the flowering of these species only occurs at very long intervals or cycles. Micropropagation is an alternative to overcome the problems that arise in the conventional propagation of these species. This research aims to contribute with the protocol for the *in vitro* propagation of *Guadua weberbaueri* by obtaining explants free of pathogens for its application in a multiplication medium. To achieve the micropropagation of *Guadua weberbaueri*, three disinfection

Forma de citar el artículo: Casanova *et al.*, 2019. Determinación de medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de bambú (*Guadua weberbaueri*). Anales Científicos 80 (1): 150-159 (2019).

DOI: <http://dx.doi.org/10.21704/ac.v80i1.1380>

Autor de correspondencia: Gilberto Domínguez Torrejón. Email: gdominguez@lamolina.edu.pe
© Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

treatments were tested using 70% alcohol, sodium hypochlorite at different concentrations and Tween 20. The best treatment was treatment 3, which consisted in cleaning with 2,5% sodium hypochlorite for 10 minutes and then a second disinfection with 1,5% sodium hypochlorite for 3 minutes. For the initiation phase, three basal mediums were tested: MS, modified MS and 1/2MS. The most suitable culture medium for *Guadua weberbaueri* turned out to be the MS medium. In addition, preliminary multiplication trials were carried out with three mediums: MS + benzylaminopurine + naphthaleneacetic acid, modified MS + benzylaminopurine and MS + thidiazuron + naphthaleneacetic acid. The multiplication medium that showed the best behavior for the development of *Guadua weberbaueri* was MS modified plus 2 mg / l of benzylaminopurine.

Keywords: *in vitro* culture; bamboo; micropropagation; tissue culture; nodal explants.

1. Introducción

Las plantas de bambú se encuentran distribuidas en todo el mundo, agrupadas en 75 géneros y 1250 especies. Aunque la mayoría se presenta en los trópicos, se encuentran también en zonas subtropicales y temperadas (Mudoj *et al.*, 2013). En nuestro país, se pueden encontrar 8 géneros y 36 especies de bambú, distribuidos en costa, sierra y selva. Dentro de las 36 especies, existen algunas exóticas y nativas como la *Guadua angustifolia*, *Dendrocalamus asper*, *Guadua weberbaueri* y *Guadua sarcocarpa*, entre otras. Cabe resaltar que, en los departamentos de Pasco y Cusco, se encuentra la mayor diversidad de especies, pero que la mayor área cubierta de bambú se encuentra en Madre de Dios y Amazonas (Londoño, 2012).

Por la presencia que tiene el bambú en el Perú, el amplio rango de usos que presenta y el importante potencial de mercado a nivel mundial, el cultivo de bambú tiene una importancia económica que puede beneficiar al país (López, 2011). Su rápido crecimiento, corto periodo de rotación, la protección que brinda a los suelos y su aptitud como captador de CO₂, hacen que el bambú tenga también una gran importancia social y ambiental. Debido a las características mencionadas, en varias regiones del país el bambú es usado como material de construcción en obras de defensa ribereña y para la elaboración de artesanías.

Actualmente, el conocimiento que se tiene de las especies de bambú nativas del Perú es limitado tanto en taxonomía, como en propagación e industrialización. Por esa razón, la mayoría de especies nativas no son aprovechadas óptimamente, desperdiciando su gran potencial de uso.

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

Actualmente, en el mundo se utiliza la micro propagación como la principal biotécnica aplicada a varias especies de bambú: *Dendrocalamus strictus*, *Dendrocalamus asper* y *Bambusa glaucescens*, por citar algunas (Marulanda *et al.*, 2005). Este tipo de propagación tiene ventaja sobre los demás métodos debido a la múltiple obtención de material que se consigue a partir de una yema meristemática, ya que la multiplicación es logarítmica, además se facilita el intercambio de germoplasma a nivel internacional por el tamaño de la muestra (Londoño, 2012).

Este trabajo tiene como objetivo contribuir al desarrollo del protocolo para la propagación *in vitro* de *Guadua weberbaueri* mediante la obtención de explantes libres de virus o bacterias para su instalación en un medio de multiplicación.

2. Materiales y métodos

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

Las plantas de *Guadua weberbaueri* se mantuvieron en un invernadero de policarbonato durante todo el tiempo que duró la investigación. Se les aplicó un fungicida de amplio espectro (Benlate) a 2 mg/L y Phyton 2 ml/L a nivel foliar, cuatro semanas previas a la introducción de explantes. La frecuencia de aplicación fue interdiaria. Esto se hizo con el fin de disminuir la contaminación de los explantes. El riego se hizo con agua destilada, tres veces por semana.

Selección del explante

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

Desinfección de explantes

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

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

El tratamiento fuera de cámara se basó en el propuesto por Corrales (2017). Este consistió en el lavado de los explantes en detergente comercial, a una concentración de 20 g/l, con un cepillo de dientes, inmersión de los explantes en una solución de Benlate, a una concentración de 5 g/0,5l, por una hora, e inmersión de los segmentos nodales en una solución de Phyton, a una concentración de 7ml/0,5l, durante una hora. Por último, se enjuagaron con abundante agua antes de ser llevados a la cámara de siembra en un frasco

esterilizado. Cada uno de los explantes fue cortado a 1 cm antes de ser desinfectados en la cámara de siembra.

Para la desinfección dentro de la cámara de flujo laminar, se probaron tres tratamientos los cuales se muestran en la [Tabla 1](#). El número de repeticiones por tratamiento fue de 12. Cada explante fue sembrado en un frasco con medio MS (Murashige y Skoog) al cual se le adicionó 2ml/l de Plant Preservative Mixture (PPM).

Tabla 1: Tratamientos de desinfección

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

Ensayo de medios de cultivo

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

Para el desarrollo de esta prueba, se realizó nuevamente la introducción de segmentos nodales de ramas primarias de *Guadua weberbaueri* utilizando el tratamiento 3, el cual, de acuerdo a ensayos preliminares realizados, resultó ser el mejor para la desinfección de explantes. Por cada tratamiento se trabajó con 10 repeticiones y cada explante se consideró como una repetición.

La preparación de los medios de cultivo se hizo según el protocolo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Biotecnología – Unalm. En la [Tabla 2](#) se muestran los componentes de cada tratamiento probado.

De acuerdo con el desarrollo de los explantes observado en la realización de las pruebas de medios de cultivo de establecimiento, se hizo una prueba preliminar de medios de multiplicación. Esta prueba orientó la investigación en el protocolo de propagación *in vitro* de esta especie. Los medios de multiplicación probados se muestran en la [Tabla 3](#).

La prueba con los medios de multiplicación se hizo después de dos meses de introducidos

los explantes de *Guadua weberbaueri*. Se seleccionaron las plántulas más desarrolladas para esta prueba. Es decir, aquellas que medían 3 cm o más, que presentaban 2 o más hojas y que se observaban vigorosas. Se utilizaron 3 repeticiones por tratamiento.

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

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

Tabla 3: Medios de cultivo para multiplicación

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

Parámetros evaluados

Los parámetros evaluados en los ensayos de desinfección fueron el número de explantes contaminados, el número de explantes limpios, el número de explantes muertos y el número de explantes vivos. En el ensayo de medios de cultivo de iniciación, se evaluó la longitud de explantes, el número de hojas, el color de hojas y el número de brotes. Para la evaluación del color de hoja se elaboró la escala que encontramos en la **Tabla 4**, la cual estuvo basada en los colores observados que tomaban las hojas conforme se iban desarrollando *in vitro*. En la prueba de medios de multiplicación, se evaluó el número y longitud de brotes.

Las evaluaciones se realizaron cada semana y durante tres semanas para las pruebas de desinfección y de medios de iniciación. En el caso de la prueba de multiplicación, se hizo una evaluación luego de ocho semanas.

Tabla 4: Escala de colores

Color	Valor
Verde	1
Verde pálido	2
Amarillo	3
Amarillo amarronado	4
Marrón	5



Figura 1: Muestra de la escala de colores de la hoja

Análisis estadístico

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

2. Resultados y discusión

Desinfección de explantes

En la [Tabla 5](#) se muestran los resultados de la desinfección lograda con cada uno de los tratamientos probados. Como se puede observar, el tratamiento 3 obtuvo una mayor tasa de desinfección. De acuerdo con los resultados mostrados en la [Tabla 5](#), el tratamiento que presenta menor porcentaje de contaminación es el 3, que consistió en la desinfección con alcohol de 70° por 1 segundo, luego tres enjuagues y desinfección con NaOCl al 2,5% por 10 minutos. Finalmente, desinfección con NaOCl al 1,5% por 3 minutos.

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

Puede observarse también que los tratamientos 1 y 2 no tuvieron tanto éxito en la limpieza de los explantes nodales de *Guadua weberbaueri*. El primero presentó más de 60% de contaminación y el segundo poco más de 80%. Los agentes patógenos observados durante las evaluaciones fueron hongos y bacterias. Cabe resaltar que los hongos fueron los que contaminaron con mayor frecuencia los explantes.

Como se puede observar en la [Tabla 6](#), el porcentaje de contaminación es relativamente alto (33%). Pero, al ser el primer trabajo de propagación *in vitro* con esta especie, puede considerarse aceptable. Aun así, para contar con un protocolo más efectivo es necesario disminuir significativamente la tasa de desinfección.

Como mencionan [Ramírez et al. \(2011\)](#) la contaminación microbiana constituye una limitante para el establecimiento *in vitro* de bambúes. [Ramírez et al. \(2009\)](#) también mencionan que el cultivo *in vitro* de segmentos nodales (medio y basal), de ramas de chusquines de *Guadua angustifolia* Kunth, presenta un alto grado de contaminación afectando la micro propagación durante la fase de establecimiento.

Los resultados obtenidos en este experimento concuerdan con los obtenidos por [García et al. \(2004\)](#) para el caso de

segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth, quienes también usaron hipoclorito de sodio como agente desinfectante, registrando porcentajes de contaminación de 45% y 50% para los explantes desinfectados solo con NaOCl al 1% y porcentajes de contaminación de 20% y 25% para los explantes desinfectados con detergente y NaOCl al 2% por 20 minutos.

Tabla 5: Porcentaje de desinfección de explantes

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

Sobrevivencia de explantes

Los explantes que han sido considerados como sobrevivientes a los efectos de los tratamientos, son aquellos que han sido desinfectados y mantuvieron intacta su capacidad de poder crecer y desarrollarse. En la [Tabla 6](#) se muestran los resultados de sobrevivencia.

Los resultados obtenidos en sobrevivencia de explantes, difieren de los resultados presentados por [Marulanda et al. \(2005\)](#) para *Guadua angustifolia* Kunth, aplicando NaOCl al 2% en distintos tiempos de aplicación (10,15 y 20 minutos); la cantidad de explantes que logró desarrollar fue menor a la observada en este trabajo con el tratamiento 3.

Otro factor que puede influenciar en la sobrevivencia de explantes es su edad. Generalmente, los tejidos jóvenes responden mejor *in vitro* y, en muchos casos, tejidos viejos no forman callos que sean capaces de regeneración. Además, el tejido joven, como ha sido recién formado, generalmente reacciona mejor a los desinfectantes ([Smith, 2013](#)).

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

Tabla 6: Supervivencia de explantes

Tratamiento	Nº explantes	Nº explantes contaminados	Nº explantes limpios	Nº explantes vivos no contaminados (sobrevivientes)
T1	12	9	3	1
T2	12	10	2	2
T3	12	4	8	6

Longitud de explante en el cultivo de iniciación

Como se observa en la Figura 2, el medio basal de Murashige & Skoog (M1), fue el medio de cultivo con el que se obtuvo la mayor altura de explantes. Seguido del tratamiento M3, que consistió en reducir a la mitad las sales del medio MS. Por último, el medio MS modificado (Mathur et al., 1992) (M2) presentó el promedio más bajo de elongación de explantes.

En el análisis de la varianza (Anova) realizado para esta variable, se determina que sí existe una diferencia significativa entre los tratamientos. Al realizar la prueba de Tukey, se determinó que el medio M2 resultó ser distinto a los otros dos. En el caso del medio MS modificado (Mathur et al., 1992) (M2) se logró el promedio más bajo de elongación de explantes. Los resultados presentados en esta investigación concuerdan con los presentados por Corrales (2017) para la especie *Guadua angustifolia* donde los promedios de longitud de vástagos en medio MS estaban entre 3,5 cm y 6,6 cm.

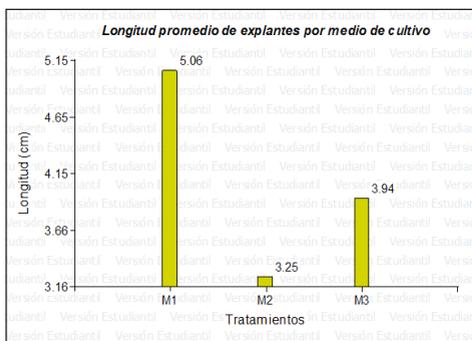


Figura 2: Longitud promedio de explantes por medio de cultivo

La longitud promedio de los explantes obtenida en medio MS, indica que, aparentemente, esta especie no requiere

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

El medio Murashige & Skoog (M1) presenta una alta proporción de amonio (NH_4^+) y la cantidad de nitrógeno total es mucho más alta que en otros medios de cultivo. Para algunos cultivos, la cantidad total de nitrógeno es perjudicial y el balance entre las dos formas de nitrógeno (nitrato y amonio) no es el óptimo (George et al., 2008). En consecuencia, el aumento de nitrógeno en el medio M2 podría haber inhibido ciertas rutas metabólicas perjudicando la elongación del explante. Por el contrario, la merma de nitrógeno en el medio M3, parece afectar en menor proporción el crecimiento del explante de *Guadua weberbaueri*. Al tener la mitad de nitrógeno total que el medio MS completo, los explantes crecieron en promedio dos centímetros menos en la misma cantidad de tiempo que lo hicieron aquellos que se sembraron en el medio M1. Sin embargo, esto no indica que el M3 sea un medio inadecuado para *Guadua weberbaueri*, simplemente los explantes crecerán más lento que en el medio M1.

Número de hojas

En la Tabla 7 se muestran los resultados de la cantidad promedio de hojas observadas por planta en cada uno de los tratamientos. No se encontró diferencia estadística entre los tres medios de cultivo para esta variable.

De acuerdo con la [Tabla 7](#), los mejores promedios en cuanto a cantidad de hojas se refieren, se obtuvieron con el medio MS y el MS/2. Se puede decir que ambos medios de cultivo favorecen el desarrollo de hojas en plántulas *in vitro* de *Guadua weberbaueri*.

Tabla 7: Resultados promedio de hojas por tratamiento

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

Se hizo la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para analizar los resultados respectivos al número de hojas por tratamiento probado. De acuerdo con este análisis, los tratamientos no muestran diferencia estadística significativa debido a que el valor de *p* resultó ser mayor que 0,05. Por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula que dice que todos los tratamientos son iguales. Según Lee y De Fossard (1977), citados por Ramage y Williams (2002), el número de hojas producido por el explante se ve afectado por la falta de ciertos minerales. La modificación de los elementos como nitrógeno, fósforo y potasio en la composición de los medios basales reduce el número de hojas. Se observó también que el desarrollo foliar por explante fue lento. El número de hojas máximo que se observó por explante durante las evaluaciones fue de 4 y fue en el medio MS/2 (M3).

Color de hojas

En la [Tabla 8](#), se muestra entre los tres tratamientos, el que presentó hojas más sanas y de colores verde y verde claro hasta la fecha de la última evaluación, fue el tratamiento

M2, seguido del M1.

De acuerdo con el análisis estadístico, no se encontró diferencia estadística para esta variable. A pesar de no mostrar diferencia estadística, durante las tres evaluaciones se notaron diferencias en el estado y color de las hojas. El medio M2, el cual es una variación del medio basal de Murashige & Skoog (1962), contiene mayor cantidad de nitrógeno y potasio. Por ello, podría decirse que favoreció a la nutrición de la planta haciendo que las hojas se mantengan verdes por más tiempo.

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

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

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

Tabla 8: Número de micro plántulas por color y tratamiento

Tratamiento	Número de micro plántulas con hojas verdes	Número de micro plántulas con hojas verde pálido	Número de micro plántulas con hojas amarillas	Número de micro plántulas con hojas amarillas amarronadas
M1	2	4	4	0
M2	3	3	3	1
M3	1	3	3	3

Número de brotes

Durante las evaluaciones realizadas, no se observó la emisión de brote nuevo en algún explante en los tres tratamientos. La falta de reguladores de crecimiento en los medios de cultivo puede ser una causa, aunque la presencia de brotes no es un indicador de desarrollo radicular que es lo que interesa finalmente.

Ensayo de medios de multiplicación

Número de brotes

De acuerdo a los resultados obtenidos con la prueba estadística, no existe diferencia significativa entre los tres tratamientos. Sin embargo, durante el mes de permanencia de las plantitas en estos medios de cultivo, se pudo observar que el MM2 (MS modificado con BAP 2mg/L) tuvo un mayor efecto en el rendimiento de nuevos brotes, generando promedio 2,33 brotes por repetición, como se ve en la [Tabla 9](#).

Jiménez *et al.*, citado por [Casanova \(2018\)](#), trabajando con la especie *Guadua angustifolia* y con tres distintas concentraciones de BAP (0, 1, 2, 3 mg/L), encontraron que el efecto de la concentración de la citoquinina BAP, en la formación de nuevos brotes tiene una correlación positiva. Altas concentraciones de esta hormona inducen al desarrollo de nuevos brotes laterales. En otro estudio para la especie *Bambusa vulgaris* hecho por [Ndiaye et al. \(2006\)](#), se obtuvo que el mejor resultado para el número de brotes fue también con el MS modificado por [Mathur et al. \(1992\)](#) llegando a tener 5 brotes por explante.

El medio MM1, a pesar de presentar mayor contenido de BAP, no superó en los resultados obtenidos al MM2 que solo tenía BAP como regulador de crecimiento. Podría ser que la interacción entre las hormonas BAP, ANA y los nutrientes del medio no fue del todo favorable para el desarrollo del vástago.

[Mudoi et al. \(2013\)](#) mencionan que, de las citoquininas, 6-benzylaminopurina (BAP) ha sido efectiva para inducir la producción de brotes en varias especies de bambú como *Bambusa vulgaris*, *Bambusa notans*, *Dendrocalamus strictus*, *Dendrocalamus asper*, *Bambusa arundinacea*. [Ramanayake et al. \(2006\)](#) mencionan que la citoquinina

TDZ (tidiazurón) no ha sido favorable para el desarrollo rápido y en cantidad de brotes para las especies de bambú.

[Caula \(2011\)](#) menciona que las citoquininas más usadas comúnmente son zeatina, dihidrozeatina, kinetina, benzyladenina, tidiazurón e isopentil adenina 2iP. En altas concentraciones (1-10uM) este grupo de hormonas induce la aparición de brotes adventicios, pero inhibe el enraizamiento. Sin embargo, ni la kinetina o el tidiazurón fueron favorables para el desarrollo de brotes en bambú.

Tabla 9: Promedio de brotes por explante por tratamiento

Tratamiento	Número de repeticiones	Número de brotes promedio por repetición
MM1	3	0,67
MM2	3	2,33
MM3	3	0,33

Longitud de brotes

Como se observa en la [Figura 3](#), en el medio de multiplicación 2 (MM2) los brotes se elongaron más que en los otros dos medios de multiplicación. El promedio de longitud de brotes en el MM2 fue de 3,7 cm, en el MM1 fue 2,5 cm y en el MM3 1,1 cm. El Anova realizado para esta variable indicó que no existe una diferencia significativa entre los tres tratamientos probados.

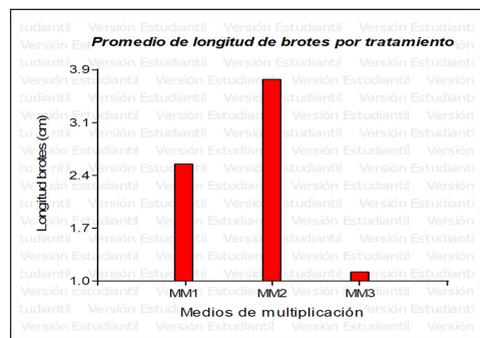


Figura 3: Promedio de longitud de brotes por tratamiento

[Jimenez et al. \(2006\)](#) obtuvieron plantitas de 8-10 cm de altura usando medio MS con 3mg/l de BAP. A los 22 días, los vástagos

medían 3 cm y a los 50 días del cultivo la altura que alcanzaron fue de 13 cm. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, a los 30 días de haber sido transferidos los explantes a los tratamientos de multiplicación, la altura promedio que se obtuvo fue de 3,77 cm.

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

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

4. Conclusiones

Esta investigación contribuye al desarrollo del protocolo de micro propagación de *Guadua weberbaueri* considerando que no se ha encontrado antecedentes del cultivo *in vitro* de esta especie.

La desinfección de los explantes de la especie *Guadua weberbaueri* realizado con el tratamiento 3 (inmersión en alcohol de 70°, limpieza con NaOCl al 2,5% por 10 minutos seguido de una segunda desinfección con NaOCl al 1,5% por 3 minutos) mostró mayor efectividad.

El medio basal en el que se comportó mejor la especie *Guadua weberbaueri*, fue el medio Moorashige & Skoog (1962) o MS por lo que se puede tomar como base para futuros estudios de multiplicación.

5. Agradecimientos

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

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

6. Literatura citada

- Casanova, F. 2018. Determinación de medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de bambú (*Guadua weberbaueri*). Tesis de ingeniero Forestal, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. 71 p.
- Caula, A. 2011. Getting started with tissue culture: media preparation, sterile technique and laboratory equipment. En: Trigiano, R. (ed.). 2011. Plant tissue culture, development and biotechnology, pp. 235-239. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos.
- Corrales, D. 2017. Establecimiento *in vitro* de Bambú (*Guadua angustifolia* Kunth) mediante segmentos nodales de ramas primarias. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Galindo, D. 2015. Evaluación de medios de cultivo para la propagación *in vitro* de bambú (*Guadua angustifolia*; Poaceae). Tesis de pregrado. Universidad Rafael Landívar, Escuintla, Guatemala.) Disponible en recursosbiblio.url.edu.gt/sisjcem/2015/06/17/Galindo-Dilia.pdf
- García, M.; Araluce, C.; Rubio, Y.; Rodríguez, S.; Fera, R. 2004. Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotecnología vegetal* 4 (4): 237-242.
- George, E.; Hall, M.; De Klerk, G. Eds. 2008. *Plant propagation by tissue culture. The background* 1. 3a Edición. Springer, Dordrecht, Holanda.
- Khan, H.; Burla, S.; Siri, N.; Lavanya, P. 2014. Effect of nutrient media and phytohormones on *in vitro* establishment of *Bambusa balcooa*. *Roxb. International Letters of Natural Sciences* 12 (1): 1-11.
- Londoño, X. 2012. Evaluation of bamboo resources in Latin America. A summary of the final Report of Project N° 96-8300-01-4. INBAR, Colombia. Disponible en http://www.inbar.int/wpcontent/uploads/downloads/2012/09/inbar_working_paper_no33.pdf
- López, A. 2011. Bambú: Biología, Cultivo, Manejo y Usos en el Perú. Dirección general de Competitividad agraria. Minagri, Lima, Perú.

- Marulanda, M.; Gutiérrez, L.; Márquez, M. 2005. Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth. Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal 27 (82). Disponible en <http://matematicas.udea.edu.co/~actubiol/Vol27-82Resumen.htm>
- Mathur, N.; Ramawat, K.; Nandwani, D. 1995. Rapid *in vitro* multiplication of jujube through mature stem explants. Plant Cell, Tissue and Organ culture 43 (1): 75-77.
- Mudoi, K.; Saikia, S.; Goswami, A.; Gogoi, A.; Bora, D.; Borthakur, M. 2013. Micropropagation of important bamboos: A review. African Journal of Biotechnology 12 (20): 2770-2785.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A Revised médium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. Physiologia planetarium. Disponible en http://priede.bf.lu.lv/groz/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/03_Murashige%20Skoog1962.pdf
- Ndiaye, A.; Diallo, M.; Niang, D.; Gassamadia, Y. 2006. In vitro regeneration of adult trees of *Bambusa vulgar*. African Journal of Biotechnology 5 (13): 1245-1248. Disponible en www.academicjournals.org
- Ramanayake, S.; Meemaduma, V.; Weerawardene, T. 2006. In vitro shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* "Striata"). Scientia Horticulturae 110 (1): 109-113.
- Ramírez, L.; Milena, S.; López, R. 2009. Identificación de bacterias que afectan el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth. Revista Universidad del Quindío 19: 151-158. Disponible en <http://bladel.uniquin>
- Ramírez, Y.; Freire, M.; Hurtado, O. 2011. Propagación *in vitro* de bambúes. Biotecnología vegetal 11 (3): 131-142.
- Ramage, C.; Williams, R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. Vitro cellular and development biology 38 (2): 116-124.
- Roca, W.; Mogrinski, L. 1991. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cultivo de Tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia.
- Smith, R. 2013. Plant tissue culture: techniques and experiments. Elsevier, Waltham, Estados Unidos.
- Trigiano, R. Editor. 2011. Plant tissue culture, development and biotechnology. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos.