

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS**

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**EFECTO DE NaClO, CLORANFENICOL Y BENZOMIL 500 EN LA
DESINFECCIÓN DE YEMAS DE BAMBÚ, *Guadua angustifolia kunth*,**

PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *in vitro*.

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Bach. ALEJOS TORRES, YURICO NICOL

Bach. CANCHIS COPPOLA, LUCIANA EMPERATRIZ

ASESOR:

Blgo. Mblgo. ETERIO ALVA MUÑOZ

NUEVO CHIMBOTE - 2022

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**Efecto de NaClO, Cloranfenicol y Benzomil 500 en la
Desinfección de Yemas de Bambú, *Guadua angustifolia Kunth*,
para el establecimiento del cultivo *in vitro*.**

**Tesis para obtener el Título Profesional de Licenciado en
Biotecnología**

Autores:

**Bach. Alejos Torres, Yurico Nicol
Bach. Canchis Coppola, Luciana Emperatriz**

Asesor:

Blgo. Mblgo. Alva Muñoz, Eterio

**Nuvo Chimbote - Perú
2022**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS**

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**EFFECTO DE NaClO, CLORANFENICOL Y BENZOMIL 500 EN LA
DESINFECCIÓN DE YEMAS DE BAMBÚ, *Guadua angustifolia kunth*,
PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *in vitro*.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO
EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORES:

Bach. ALEJOS TORRES YURICO NICOL

Bach. CANCHIS COPPOLA LUCIANA EMPERATRIZ

Revisado y Aprobado por el Asesor:

Blgo. Mblgo. ETERIO ALVA MUÑOZ, Ms. C

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS**

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**EFFECTO DE NaClO, CLORANFENICOL Y BENZOMIL 500 EN LA
DESINFECCIÓN DE YEMAS DE BAMBÚ, *Guadua angustifolia kunth*,
PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *in vitro*.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO
EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORES:

Bach. ALEJOS TORRES YURICO NICOL

Bach. CANCHIS COPPOLA LUCIANA EMPERATRIZ

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

Blgo. Mblgo. CARLOS AZAÑERO DÍAZ, Dr.
PRESIDENTE

Blgo. Mblgo. ETERIO ALVA MUÑOZ, Ms. C
INTEGRANTE

Blgo. Mblgo. LINDA EDDY ESPEJO VARGAS, Ms. C
INTEGRANTE

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el Laboratorio de Biología Acuática - EPBA, siendo las 11:00 horas del día Lunes 17 de Octubre del 2022, dando cumplimiento a la Resolución N° 354-2022-UNS-FC, se reunió el Jurado Evaluador presidido por Dr. Carlos Alberto Azanero Díaz, teniendo como miembros a Mg. Linda Eddy Espejo Vargas (secretario) (a), y Mg. Eterio Amaro Alva Muñoz (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de Licenciada en Biotecnología, realizado por el, (la), (los) tesista (as)

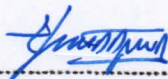
Yunico Nicol Algas Torres (Cód. 0201223048) y Luciana Emperatriz Canchis Coppola (Cód. 0201223033), quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada:

"Efecto de Nalco, cloranfenicol y benzamilo 500 en la desinfección de yemas de bambú Guadua angustifolia Kunth para el establecimiento del cultivo in vitro"

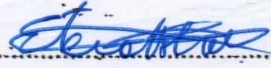
Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como Muy Bueno asignándole un calificativo de Dieciocho (18) puntos, según artículo 103° del Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa, vigente (Resolución N° 492-2017-CU.-R-UNS)

Siendo las 13:00 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad


Nombre: Carlos A. Azanero Díaz.
Presidente


Nombre: Linda E. Espejo Vargas
Secretario


Nombre: Eterio A. Alva Muñoz
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (), tesistas P3 y archivo (02).



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por bendecirme con una familia maravillosa, que me ha educado en valores, de igual manera han sido ejemplo de superación y sacrificio. También le agradezco por brindarme salud, guiar mi camino y permitirme cumplir uno de mis objetivos a nivel profesional.

Doy gracias a mi madre Julia Torres Sánchez, quien ha sido mi mayor motivación por ser una mujer luchadora que ha aprendido a salir adelante sola y así mismo por asumir el rol de padre. Le agradezco la confianza, el amor y el respaldo brindado durante mi formación académica. A mi hermano Eder Alejos Torres, por la comprensión y el apoyo brindado durante todo este tiempo.

Al Biólogo Víctor Guevara Valverde y la Técnico Marcela Bazán Rodríguez, por la confianza, amistad y el apoyo incondicional en todo momento.

Al profesor Eterio Alva Muñoz, por los conocimientos inculcados y por orientarnos en el transcurso de la elaboración de la tesis.

A mi pareja, amigas y todas aquellas personas que de una u otra manera me han brindado su respaldo y me alentaron a seguir adelante luchando para cumplir cada objetivo propuesto.

Yurico Nicol Alejos Torres

A mis amados padres y hermana, quienes me brindaron las facilidades y apoyo incondicional para lograr mis metas trazadas, a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, por darme el espacio académico para mi formación.

Al profesor Eterio Alva Muñoz, por su paciencia y apoyo constante en la elaboración del presente trabajo, sus conocimientos y motivación fueron muy importantes.

En el proceso de formación profesional mi agradecimiento al Mbglo. José Peredo Arias, quien fue mi mentor y guía en mi especialización en el campo de la biotecnología vegetal, por siempre estar presto para incentivar mis anhelos de conocimiento dentro del laboratorio, además de darme consejos desde la perspectiva de su experiencia.

Al Proyecto Especial Chavimochic, en especial al equipo de integrantes del laboratorio de Biotecnología Vegetal por compartir su experiencia y brindarme las locaciones que me permitieron desarrollar mi tesis de manera continua, no escatimando en aportar la información y consejos para lograr buenos resultados.

Luciana Emperatriz Canchis Coppola

DEDICATORIA

A mi madre Julia, quien a su vez cumplió
el rol de padre, por el amor y apoyo
incondicional brindado durante mi
formación académica.

A mi hermano, Eder por el apoyo, tiempo,
confianza y la motivación para cumplir
metas.

A mis abuelitos, Andrés y Margarita por
el amor brindado desde pequeña y cuidar
de mí desde el cielo.

A mi pareja y amigas, por la paciencia y
por siempre estar presentes en todo
momento alentándome a seguir adelante y
no rendirme ante las adversidades.

Yurico Nicol Alejos Torres

Esta tesis está dedicada a la memoria de papá Moisés,
mamá María y mi tía María Elena, quienes incentivaron
desde pequeña el amor a la naturaleza y, por ende, el
querer desarrollarme en un campo de estudio relacionado
a ella. Su recuerdo fue la fuerza y motor de impulso
cuando quise rendirme.

A mis padres Margarita, Víctor y mi hermana Carmen
Rosa quienes, con sus consejos, apoyo y motivación
lograron inculcar buenos valores en mí, ellos son el
pilar y soporte para
lograr mis metas.

Luciana Emperatriz Canchis Coppola

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hipótesis.....	3
1.2. Objetivos.....	4
1.2.1. Objetivo general.....	4
1.2.2. Objetivos específicos.....	4
1.3. Justificación.....	4
II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Generalidades del bambú.....	5
2.2. Morfología de <i>Guadua angustifolia kunth</i>	5
2.2.1. Culmo.....	5
2.2.2. Yema.....	6
2.2.3. Hoja caulinar.....	6
2.2.4. Rizoma.....	6
2.2.5. Rama.....	6
2.2.6. Hojas.....	6
2.2.7. Inflorescencia.....	6
2.2.8. Estados de madurez del tallo.....	7
2.3. Hábitat.....	8
2.4. Precipitación pluvial.....	8

2.5. Clima	8
2.6. Suelo	8
2.7. Características del cultivo de <i>Guadua angustifolia kunth</i>	9
2.8. Micropropagación.....	9
2.8.1. Etapas de la micropropagación.....	10
2.9. Medios de Cultivo	12
2.9. Organogénesis a partir de fragmentos nodales	14
2.10. Agentes desinfectantes para el establecimiento <i>in vitro</i>	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Identificación y selección de plantas élites.....	17
3.2. Siembra de chusquines seleccionados	18
3.3. Preparación de medio de cultivo	18
3.4. Recolección de yemas	19
3.5. Desinfección de yemas de <i>Guadua angustifolia kunth</i>	19
3.6. Siembra de yemas.....	20
3.7. Evaluación de los tratamientos	20
IV. RESULTADOS	21
V. DISCUSIÓN.....	26
VI. CONCLUSIONES.....	28
VII. RECOMENDACIONES	30
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
IX. ANEXOS.....	36

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).....	13
Tabla 2. Concentración de desinfectantes, según tratamiento de desinfección de Bambú	19
Tabla 3. Supervivencia y contaminación promedio durante la primera semana del establecimiento <i>in vitro</i> de yemas de bambú.	22
Tabla 4. Porcentajes de contaminación y supervivencia promedio de plántulas de bambú, luego de la segunda semana de su establecimiento <i>in vitro</i>	23
Tabla 5. Porcentajes promedio de contaminación y supervivencia de plántulas de bambú, luego de la tercera semana de su establecimiento.	23
Tabla 6. Porcentajes promedio de contaminación y supervivencia de plántulas de bambú, luego de la cuarta semana de su establecimiento <i>in vitro</i>	24
Tabla 7. Obtenido de PROBIOTEK, medio listo para activación	36
Tabla 8. Contaminación y supervivencia de plántulas de bambú, durante la primera semana de establecimiento.	37
Tabla 9. Número de plantas sobrevivientes y contaminadas de bambú, durante la segunda semana de establecimiento.....	37
Tabla 10. Contaminación y supervivencia de plántulas de bambú, durante la tercera semana de establecimiento	38
Tabla 11. Contaminación y supervivencia de plántulas de bambú, durante la cuarta semana de establecimiento	38
Tabla 12. ANOVA para datos de contaminación por hongos, durante el establecimiento <i>in vitro</i> de bambú.....	39
Tabla 13. Pruebas de Rangos múltiples realizada para la contaminación por hongos, durante el establecimiento <i>in vitro</i> de bambú. Se muestran los datos de acuerdo a cada tratamiento en estudio.	39
Tabla 14. ANOVA para datos de contaminación por bacteria, durante el establecimiento <i>in vitro</i> de bambú.....	40
Tabla 15. Pruebas de Rangos múltiples realizada para la contaminación por bacteria, durante el establecimiento <i>in vitro</i> de bambú. Se muestran los datos de acuerdo a cada tratamiento en estudio.	40

Tabla 16. Tabla ANOVA para datos de contaminación por hongo y bacteria, durante el establecimiento <i>in vitro</i> de bambú.	41
Tabla 17. Pruebas de Rangos múltiples realizada para la contaminación por hongo y bacteria, durante el establecimiento <i>in vitro</i> de bambú. Se muestran los datos de acuerdo con cada tratamiento en estudio.	41
Tabla 18. ANOVA para datos de contaminación por fenolización, durante el establecimiento <i>in vitro</i> de bambú.	42
Tabla 19. Pruebas de Rangos múltiples realizada para la contaminación por fenolización, durante el establecimiento <i>in vitro</i> de bambú. Se muestran los datos de acuerdo con cada tratamiento en estudio.	42
Tabla 20. Evaluación ANOVA de las plántulas que sobrevivieron durante el proceso de establecimiento <i>in vitro</i> de bambú	43
Tabla 21. Pruebas de Rangos múltiples realizada para sobrevivencia, durante el establecimiento <i>in vitro</i> de bambú. Se muestran los datos de acuerdo con cada tratamiento en estudio.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de micropropagación de plantas en condiciones <i>in vitro</i> y su aclimatación <i>ex vitro</i>	10
Figura 2. Proceso de desarrollo de chusquines de bambú, <i>Guadua angustifolia kunth</i> , para la obtención de plantas donantes. A. Desarrollo de chusquín al primer mes de su establecimiento, B. Desarrollo de chusquín al segundo mes de su establecimiento, C. Obtención de plantas donantes luego de tres meses de su establecimiento.	18
Figura 3. Proceso de desarrollo y crecimiento de plántulas de bambú, desde su establecimiento en condiciones <i>in vitro</i> hasta la aparición de los primeros brotes. A. Establecimiento de yemas en medio MS a diferentes tratamientos de desinfección, B. Aparición y desarrollo de brotes del establecimiento.....	21
Figura 4. Identificación macroscópica de contaminación por microorganismos durante el establecimiento de yemas de bambú, A. Visualización de hongos en la base de yemas establecidas sobre medio de cultivo, B. Identificación de contaminación por bacterias en yemas de bambú, C. Oscurecimiento del medio de cultivo por fenoles expulsados por las yemas de bambú	21
Figura 5. Desarrollo y crecimiento de las plántulas de bambú durante el primer mes de su establecimiento <i>in vitro</i> , así como el avance de la contaminación por hongo y bacteria respecto al porcentaje de sobrevivencia para los tratamientos blanco, T1, T2 y T3.	25

RESUMEN

El presente proyecto tuvo con finalidad evaluar el efecto del NaClO 5%, cloranfenicol 0.05 g/L y benzomil 500 0.1 g/L sobre la desinfección de yemas de bambú, *Guadua angustifolia kunth*, durante su establecimiento *in vitro*. El efecto fue determinado mediante un método experimental, compuesto por tres tratamientos y diez repeticiones por tratamiento, considerando como muestra control de la desinfección al NaClO 5%, Tratamiento 1: NaClO 5% + cloranfenicol 0.05 g/L, Tratamiento 2: NaClO 5% + benzomil 500 0.1 g/L y Tratamiento 3: NaClO 5% + cloranfenicol 0.05 g/L + benzomil 500 0.1 g/L. Luego de la desinfección se procedió al establecimiento *in vitro* de las yemas de bambú y durante las cuatro semanas siguientes se procedió a realizar la evaluación para determinar la efectividad de los tratamientos, obteniendo que el Tratamiento 3, tuvo mayor eficacia en desinfección, puesto que presentó tasas de sobrevivencia de 56.7 % respecto al demás tratamiento y porcentajes de contaminación de 3.33 %, 10% y 16.67% para hongo, bacteria y hongo + bacteria respectivamente; concluyendo que es el tratamiento idóneo para lograr un óptimo establecimiento de yemas de bambú.

Palabras claves: *Guadua angustifolia kunth*, *in vitro*, NaClO, cloranfenicol y benzomil.

ABSTRACT

The purpose of this project was to evaluate the effect of NaClO 5%, chloramphenicol 0.05 g/L and benzomil 500 0.1 g/L in the disinfection of bamboo buds, *Guadua angustifolia kunth*, in the establishment of *in vitro* culture. For which a factorial experimental method was carried out, with 3 treatments and 10 repetitions; considering NaClO 5% as target, Treatment 1: NaClO 5% + chloramphenicol 0.05 g/L, Treatment 2: NaClO 5% + benzomil 500 0.1 g/L and Treatment 3: NaClO 5% + chloramphenicol 0.05 g/L + benzomil 500 0.1 g/L. After four weeks, the *in vitro* establishment phase was completed and it was determined that Treatment 3 has greater efficacy in disinfection, since it presented survival rates of 56.7% compared to the other treatments and contamination percentages of 3.33%, 10% and 16.67%. for fungus, bacteria and fungus+bacteria respectively; concluding that it is the ideal treatment to achieve an optimal establishment of bamboo buds.

Keywords: *Guadua angustifolia kunth*, *in vitro*, NaClO, chloramphenicol and benzomil.

I. INTRODUCCIÓN

El bambú, *Guadua angustifolia*, es una especie de trascendencia histórica, cultural, económica y ecológica en nuestro país; su aporte significativo radica en la economía rural, por la generación de divisas obtenidas a partir de la exportación de grandes cantidades de productos y subproductos con fines industriales y comerciales (Kaur *et al.*, 2011). El bambú, es considerado como la materia prima principal usada para la construcción de viviendas en las zonas rurales y periurbanas a lo largo de nuestro país (González, 2020).

Por otro lado, ambientalmente, este cultivo contribuye en la protección de cuencas hidrográficas, recuperación de las zonas deforestadas, protección de los suelos y la biodiversidad, captura de CO₂, regula el microclima local y embellece el paisaje (Giraldo y Sabogal, 2007 citado por Ramírez, 2014). Asimismo, el bambú es considerado una de las mejores especies del mundo, debido a su capacidad para absorber energía y tolerar mayor flexión, haciendo de esta especie un material ideal para construcciones sismorresistentes (Solar, 2012); por otro lado, esta capacidad se le atribuye al tamaño de sus culmos que logran hasta 30 m de altura y 25 cm de diámetro (Añasco, 2013).

Por esta razón, China se ha consolidado como el mayor proveedor de productos y subproductos de este cultivo. Las principales importaciones de productos de bambú que realiza Perú provienen de este país, para la fabricación de diversos productos; los cuales a su vez tiene como destino final Estados Unidos, considerado el mayor importador (Añasco, 2015). Sin embargo, América latina, es la región más rica en diversidad y número de especies de bambú leñoso, con 20 géneros y 429 especies extendidas desde México a Chile (Añasco, 2013).

Del mismo modo Ecuador juega un rol importante en el abastecimiento de cañas de bambú hacia el Perú, proveyendo alrededor del 80 % a 90% de la materia prima consumida (SERFOR, 2018). A nivel nacional, existen muchos vacíos de información relacionados con los volúmenes de producción respecto a lo observado en el campo, una de las principales falencias de la cadena es la formalización, que es deficiente en todos los eslabones y que termina influyendo negativamente en los precios finales (Añasco, 2015).

Por esta razón, en las regiones de Cajamarca y Amazonas el Estado viene promoviendo la reforestación con bambú, también conocido como caña Guayaquil, lo que ha incrementado el área de plantaciones de manera significativa en los últimos años, conociéndose en la actualidad alrededor de 1000 hectáreas aproximadamente, para lo que cual se han seguido métodos tradicionales de cultivo (GOREA 2016). No obstante, los métodos tradicionales de propagación de este cultivo en forma sexual y vegetativa presentan problemas en la multiplicación a gran escala (Martínez, 2020). La propagación sexual resulta casi inviable por el tipo de floración que presentan y en Perú aún no se cuenta con un registro sustentado de producción de semillas de *Guadua angustifolia Kunth* (Lárraga *et al.*, 2011).

Por otro lado, tampoco se ha logrado uniformizar la calidad de las plantas de esta especie, es por ello por lo que la micropropagación o cultivo *in vitro* constituye una alternativa viable para la propagación del bambú a gran escala en espacios y tiempos controlados, que permitan lograr la calidad deseada por el consumidor (Oblitas, 2019).

Guadua angustifolia, es un cultivo de difícil manejo, por lo que a nivel *in vitro* durante el establecimiento de segmentos nodales presenta como principal inconveniente la contaminación por microorganismos, causando pérdidas biológicas y económicas (Ramírez *et al.*, 2009). En las fases de micropropagación vegetal, la contaminación por hongos y bacterias es un problema común pues limita el éxito del cultivo *in vitro*, haciendo necesarias las prácticas de desinfección superficial de los explantes (Cruz *et al.*, 2009). Por consiguiente, es importante el estudio de métodos que conduzcan a la eliminación de los contaminantes microbianos presentes en el cultivo de tejidos vegetales (López, 2012).

En Cuba, Borges *et al.*, 2004, estudiaron el Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia Kunth*, demostrando que el método de desinfección basado en el uso de NaClO 2% durante 5 minutos con repetición a las 24 horas fue el más adecuado para el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de *Guadua angustifolia Kunth*.

Del mismo modo en Colombia, Ramírez, 2014, desarrolló un estudio acerca de la Evaluación de tratamientos de desinfección en segmentos nodales de *Guadua angustifolia* para el establecimiento del cultivo *in vitro*, concluyendo que se lograron

mejores resultados de desinfección y brotación de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* aplicando NaClO 2% durante 15 min representando una alternativa para la obtención de plántulas libres de hongos y bacterias.

En nuestro país, Corrales, 2017, observó el establecimiento *in vitro* del Bambú *Guadua angustifolia kunth* bajo seis tratamientos de desinfección usando segmentos nodales procedentes de ramas primarias, concluyendo que el explante con yema semi diferenciada tiene un mejor establecimiento y desarrollo *in vitro* en el mes de junio frente a lo realizado en el mes de setiembre, teniendo evidencia en que la caracterización cualitativa de las secciones nodales de las ramas primarias de *Guadua angustifolia kunth* desarrollada.

Así también, Oblitas, 2019, en su investigación enfocada en la Micropropagación *in vitro* de *Guadua angustifolia kunth* en Jaén, Cajamarca, describe que durante la fase de desinfección se debe emplear NaClO 2 % por 25 min para lograr el 96 % de explantes limpios y que en la fase de establecimiento el medio más adecuado fue MS a concentración de 4.7 g/l, lo cual tuvo un crecimiento promedio de 18.8 mm en 30-50 días por plántula, mientras que en la fase de multiplicación aplicando BAP a concentración 2.5 mg/l de se consiguieron 2.08 brotes en promedio frente a las otras dosificaciones.

Por todo lo antes mencionado y teniendo en cuenta la importancia económica, social y ambiental que representa el Bambú en nuestro país, se ha planteado el siguiente trabajo de investigación con el fin de evaluar ¿Cuál será el efecto de NaClO, cloranfenicol y Benzomil 500 en la desinfección de yemas de bambú *Guadua angustifolia kunth* para el establecimiento del cultivo *in vitro*?

1.1. Hipótesis

Se plantea la siguiente hipótesis de estudio:

Si la desinfección de yemas de bambú, *Guadua angustifolia kunth*, es realizada usando NaClO, cloranfenicol y benzomil 500 en el establecimiento *in vitro* del cultivo, se disminuirán los porcentajes de contaminación causadas por bacterias y hongos obteniéndose altas tasas de sobrevivencia de yemas.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del NaClO 5%, Cloranfenicol 0.05 g/L y Benzomil 500 0.1 g/L en la desinfección de yemas de bambú, *Guadua angustifolia kunth*, para el establecimiento del cultivo *in vitro*.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de NaClO 5 % como agente desinfectante en yemas para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Guadua angustifolia kunth*.
- Determinar el efecto de NaClO 5% + cloranfenicol 0.05 g/L como método de desinfección en yemas para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Guadua angustifolia kunth*.
- Determinar el efecto de NaClO 5% + benzomil 500 0.1 g/L como método de desinfección en yemas para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Guadua angustifolia kunth*.
- Determinar el efecto de NaClO 5% + cloranfenicol 0.05 g/L y benzomil 0.1 g/L como método de desinfección en yemas para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Guadua angustifolia kunth*.

1.3. Justificación

La producción de Bambú, *Guadua angustifolia kunth*, en nuestro país es carente, debido a que las técnicas tradicionales usadas en el proceso productivo no permiten la obtención rápida de este cultivo, haciendo necesaria la implementación de nuevas técnicas de cultivos a fin de cumplir con las demandas del mercado. Por otro lado, la alta carga microbiana que presenta el bambú ha hecho que los ensayos de producción a nivel laboratorio no hayan sido exitosos por las altas tasas de mortandad debido a índices de contaminación en la etapa inicial. Sin embargo, aplicando nuevas técnicas de producción *in vitro* y desinfectantes como NaClO, cloranfenicol y benzomil 500 con mayor espectro permiten la obtención de resultados con menores tasas de contaminación fungobacteriana.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades del bambú

En base a su taxonomía pertenece al reino *Plantae*, en la división *Magnoliophyta* dentro de la clase *Liliopsida* y en el orden *Poales* de la familia *Poaceae* siendo parte de la subfamilia *Bambusoideae*, incluido en el género *Guadua*, cuya especie es *Guadua Angustifolia Kunth* (Byng *et al.*, 2016).

El bambú, *Guadua angustifolia Kunth*, es leñosa teniendo como adjetivo ser continua y eficiente en su crecimiento. En cuanto a sus tallos se observa su consistencia de madera (lignificados), de forma cilíndrica, recta y fuertes, enlazados por nudos y entrenudos; finalmente, sus hojas son denominadas lanceoladas por la forma de su hoja semejante a una lanza siendo más ancha (oblonga), con ápice puntiagudo y de consistencia lisas (Corrales, 2017).

Castaño & Moreno (2004) aseveran que el término “chusquín” posee similitud con brotes basales de rizoma y plántulas del tipo bambú americano. Asimismo, señalan que brota del rizoma teniendo raíz, tallo, hojas y ramas. El cual, puede producir de 7 a 10 nuevas plantas en 4 meses.

2.2. Morfología de *Guadua angustifolia kunth*

2.2.1. Culmo

Su brotación inicia en el rizoma con forma de eje aéreo, obteniendo de altura hasta 15 m con 10 cm de diámetro. El cual, cuenta con cuello, entrenudos y nudos. Siendo el cuello, la unión de rizoma y tallo; como resistencia para el tallo están los nudos que es el resultado del punto de unión de los entrenudos; este, es una parte del tallo (hueca) teniendo como longitud que aumenta en la punta (SERFOR, 2021).

2.2.2. Yema

Es la primera hoja que fue modificada siendo una estructura pequeña. Su ubicación está en la línea de nudos desarrollando potencialmente la raíz y tallo en su propagación.

2.2.3. Hoja caulinar

Posee características fundamentales para el crecimiento y desarrollo; el cual, en su etapa inicial de crecimiento protege las yemas y tallo. Puesto que al activarse las yemas; está, se cae. Asimismo, está ubicada en cada nudo con forma triangular presentando color marrón.

2.2.4. Rizoma

También denominada raíz, con características de ser grueso, curvo y corto; con raíces secundarias, teniendo como función principal asimilar los nutrientes del suelo; además es el soporte de la planta. Posee partes como el cuello, raíces secundarias y rizomas.

2.2.5. Rama

Existen ramas primarias, secundarias y terciarias; estas, se desarrollan a partir de las yemas y su crecimiento es por encima de la línea nodal. Al culminar el crecimiento del tallo lleva a cabo su desarrollo, brindando la importancia de sostener las hojas.

2.2.6. Hojas

Tienen formas alternas, largas y angostas; por ello, el nombre de *Guadua angustifolia*; es decir, “angustus” de angosto; y “folium”, hoja. Además, es fundamental para la fotosíntesis cuya composición de vaina y lámina.

2.2.7. Inflorescencia

Sus flores están compuestas por brácteas con la función de proteger sus semillas; estas, tienen la característica parecida al grano de arroz. Presenta pocos estudios en la mecánica de la floración; puesto que, es de poca frecuencia (esporádica), presenta tiempos irregulares y su forma es aislada.

2.2.8. Estados de madurez del tallo

Presenta distintas etapas en su desarrollo para diferenciar el principal proceso de aprovechamiento. De tal manera, esta parte de la planta es la más útil de color verde y en sus nudos posee doble banda de vellosidad cuyo color es blanco. Posee 4 estados; los cuales son, brote, verde, maduro y seco.

a. Brote

Este estado es el inicio para su desarrollo, se adhiere al rizoma y posee hojas caulinares. Se denomina brote hasta lograr su máxima altura; esto ocasiona el desprendimiento de sus hojas al igual que su tallo maduro, las yemas se activan para obtener las ramas; este proceso se realiza en un año aproximadamente.

Finalmente, la plantación contiene brotes durante todo el año; el cual, garantiza ser continuo y su desarrollo exitoso.

b. Verde

Segundo estado que presenta color verde intenso y bien definida su línea nodal presentando hojas y hojas caulinares, ramas y yemas en su base. Su periodo es de 2 a 3 años; el cual, depende de su edad de plantación, zona y características del tallo.

c. Maduro

Este estado se considera así, porque alcanzó la madurez fisiológica y propiedades físico-mecánicas mejores; por consiguiente, activa el uso para construcción, muebles y artesanía. También, inicia su presencia de manchas blancas con forma de plaquetas que las producen los líquenes. Otra de las características es el cambio de color de verde claro a oscuro; al igual que las ramas tienden a secarse.

Su periodo para este estado es de 3 a 5 años a partir de su brotación del suelo.

d. Seco

En este último estado no tiene valor comercial porque pierde sus propiedades físico-mecánicas; de igual manera, disminuyen su productividad. Las características que presenta es su cobertura de líquenes y hongos; así también, presenta color amarillento.

2.3. Hábitat

Su crecimiento de *Guadua angustifolia kunth* inicia al nivel del mar hasta 2 600 m.s.n.m., se ubica en clima cálido; en cuanto a su altitud oscila en 600 m.s.n.m. y 2 000 m.s.n.m. (Castaño & Moreno, 2004). En la cordillera andina de Latinoamérica, el desarrollo de especies a 4 500 m.s.n.m. Por otro lado, el aumento de estas especies a orillas de playas del Caribe; además, en zona asiática, playas de Oceanía e Himalaya a 3 500 m.s.n.m. (Oblitas, 2019).

Esta especie puede permanecer en bosque tropical muy húmedo, subtropical, Montano bajo y seco (Castaño & Moreno, 2004).

La ubicación nativa de esta especie está en Venezuela, Colombia y Ecuador; sin embargo, la identificación en zonas que son naturales de esta especie está al nor-este del Perú y áreas limítrofes con Colombia y Ecuador. Existen áreas pequeñas en donde fueron sembradas como Selva Central, Tumbes, Piura, Lambayeque, Sur de Lima y San Martín. (Gonzales, 2005).

2.4. Precipitación pluvial

Se desarrolla en zonas con precipitación anual de 6 350 mm como máximo y 762 mm como mínimo. La zona óptima para su desarrollo se reporta en rango de 1 300 a 5 000 mm (Casanova, 2018)

2.5. Clima

Esta especie mantiene su temperatura entre 20° C a 30°C siendo ideal; sin embargo, al aumentar o disminuir la temperatura, tiende a reducirse su diámetro y altura afectando su desarrollo (IICA, 2005). Por otro lado, las humedades relativas de la mayoría de bambúes son desarrollados en ambientes de 70 y 90 % (Oblitas, 2019).

2.6. Suelo

Para esta especie es recomendable que sean franco arcilloso con drenaje. Asimismo, estas especies se ubican en suelos arenosos y lechos húmedos. Por consiguiente, suelos arcillosos o pesados, no son eficientes para su desarrollo (IICA,2005).

2.7. Características del cultivo de *Guadua angustifolia kunth*

Como se ha mencionado sus condiciones adecuadas para su desarrollo y producción; esta especie, puede crecer aislada, entre árboles o en las orillas de los ríos. También, tienden a desarrollar “manchales” y bosques. (Olivier, 2008).

Sus características más conocidas es ser espinosa y grande, en ellos posee culmos erectos teniendo 25 m de altura con 10 a 25 cm de diámetro. Por ello, se le considera como tercera especie más grande, el cual, posee fibras que son naturales y fuertes para permitirles desarrollar aglomerados, pisos, esteras y entre otros (IICA, 2005).

Habitualmente esta especie es de rápido crecimiento con hábito perenne; de igual manera, posee rizomas que se desarrollan bien puesto que, es almacén de nutrientes y posteriormente se da la propagación asexual con la separación de ramas (Mercedes,2006)

2.8. Micropropagación

Es una de las técnicas aplicadas para realizar propagación de cultivos; es decir, con pequeñas partes de planta madre; creando condiciones viables para obtener crecimiento aséptico en recipientes herméticos o tubos (Oblitas,2019). A partir de ello, se obtiene asexualmente plantas de manera eficiente y en gran proporción; también, libre de bacterias que pueden ocasionar enfermedades (Ramos, 2012).

Esta técnica está basada en principios como totipotencia, regulación hormonal, control y manipulación de procesos (Oblitas, 2019).

Finalmente, estas técnicas necesitan que su medio sea nutritivo y esenciales incluyendo sales inorgánicas, fuente de carbono; los cuales son glucosa o sacarosa, vitaminas y mantener regulado su crecimiento (Casanova, 2018).

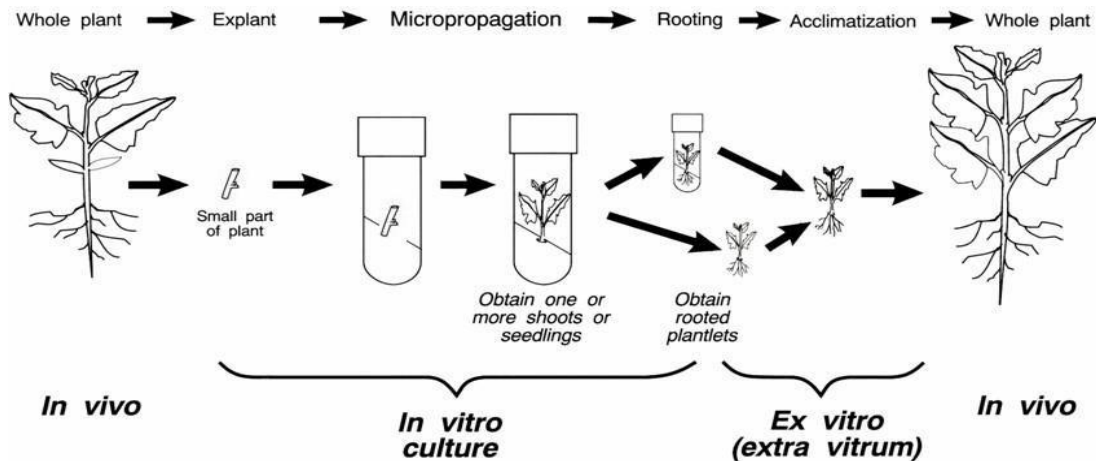


Figura 1. Proceso de micropropagación de plantas en condiciones *in vitro* y su aclimatación *ex vitro*.

2.8.1. Etapas de la micropropagación

La micropropagación está determinada por seis etapas o fases, cada una diferenciada por factores ambientales y requerimientos nutricionales, según Bhojwani y Dantu, 2013, se describen a continuación:

Fase 1: Elección de la planta donante

Una vez identificado el tipo de planta a estudiar, se realizan monitoreos biométricos y fitosanitarios que ayudan a determinar las plantas con las mejores características agronómicas, que servirán como donantes de material vegetal para su establecimiento en el laboratorio. Es preciso tener en cuenta el tipo de material vegetal a usar y que la planta donante se encuentre en estado vegetativo puesto que su totipotencia mejorará el establecimiento.

Fase 2: Desinfección del material vegetal

Una vez elegida la planta madre, se extraerán fragmentos conocidos como explantes; los cuales, pueden ser: yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc.

Antes de extraer los explantes, se hará una desinfección de los fragmentos de la planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente (Mendoza, 2009).

Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia; por ejemplo, se trabajará en cabinas de flujo laminar, para extraer los explantes a partir del material vegetal; además se desinfectará el explante con hipoclorito de sodio, puro o diluido durante un período de 5 a 15 min, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada.

Estos explantes se introducirán en tubo de ensayo (esterilizados) con medio de iniciación para poder controlar sanidad y viabilidad.

Fase 3: Introducción del material *in vitro*.

Luego de la desinfección superficial de semillas o yemas, dependiendo del material seleccionado, se insertan en medio de cultivo estéril. En un período de 7 a 15 días, tiempo después del cual comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.

Fase 4: Multiplicación de los brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la FASE 2 y 3, originen brotes de procedencia axilar o adventicia con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema, y se desarrollará luego de ser establecida con el medio de cultivo. En paralelo, los nuevos brotes se deben cultivar en nuevo medio, con divisiones y siembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados.

Estas operaciones se realizan en cámara de flujo laminar o en lugares aislados que permita mantener las condiciones de asepsia; de esta forma, aumenta el número de plantas en cada repique; el cual, dependerá de la especie vegetal y condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.

Fase 5: Elección de un medio de enraizamiento de los explantes

Para enraizar los explantes, se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximadamente de 5 cm. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar esta etapa y emiten raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas; por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurre en forma simultánea.

Fase 6: Aclimatación de los explantes enraizados

Los explantes recién enraizados, son muy sensibles a los cambios ambientales; por lo tanto, el éxito o fracaso del proceso depende de la aclimatación.

En esta etapa, las plantas sufrirán cambios permitiendo la adaptación a vivir en condiciones naturales. En el instante que extraen los explantes o plantines enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernadero; puesto que, su desarrollo y crecimiento fueron en condiciones adecuadas y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta). Por otro lado, crecer en ambientes húmedos suele implicar la falta de cutícula con cera desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua.

2.9. Medios de Cultivo

Conjunto de elementos o sustancias que proporcionan los nutrientes necesarios para la conservación y desarrollo de los microorganismos u otras células. Dichos elementos o sustancias mencionadas pueden ser de origen orgánico o inorgánico, natural o artificial, y están destinados a asegurar el crecimiento de organismos o células, su identificación o diferenciación en un grupo de ellos o incluso pueden inhibir el desarrollo de otros (BIOCEN, 2018).

En la actualidad, en diferentes estudios han reportado el medio Murashige y Skoog (1962), también conocido como medio MS o medio basal, suplementado con

citoquinina o en combinación con auxina. Sin embargo, se puede sintetizar una cantidad mínima de citoquinina mediante el desarrollo de brotes; asimismo, no es suficiente para el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Por consiguiente, más del 85% de los medios de cultivo utilizados en micropropagación, contienen hormonas de tipo citoquinina (Fajardo, 2006).

Tabla 1. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)

Compuestos	Concentración (g/L)
Macronutrientes	
Nitrato de amonio	16.50
Nitrato de potasio	19.00
Sulfato de magnesio heptahidratado	3.70
Cloruro de calcio dihidratado	4.40
Fosfato monopotásico	1.70
Micronutrientes	
Yoduro de potasio	0.0083
Ácido bórico	0.062
Sulfato de manganeso tetrahidratado	0.223
Sulfato de zinc tetrahidratado	0.086
Molibdato de sodio dihidratado	0.0025
Sulfato de cobre hexahidratado	0.00025
Cloruro de cobalto hexahidratado	0.00025
Hierro (para 350 ml)	
Etilendiamina tetraacético disódico	0.373
Sulfato ferroso heptahidratado	0.278
Vitaminas	
Ácido nicotínico	0.005
Piridoxina HCl	0.005
Tiamina HCl	0.001
Glicina	0.020

Además, el medio de cultivo incluye; agua, fuente de carbono, compuestos inorgánicos (sales minerales), vitaminas, hormonas y factores reguladores del crecimiento. Por lo general, el pH del medio se mantiene entre 5.0 y 6.5 (Casanova, 2018).

Actualmente, se admite que la composición de un medio debe adecuarse a las necesidades de cada especie. De este modo, el crecimiento y la diferenciación celular

se controlan *in vitro*, mediante cambios en la proporción de hormonas y reguladores de crecimiento; si la relación entre citoquininas y auxinas es mayor a 1, se desarrollan brotes; si es menor, raíces; y si son iguales, callos (Fajardo, 2006).

2.9. Organogénesis a partir de fragmentos nodales

La micropropagación mediante organogénesis es un proceso de 2 etapas que incluye; proliferación (meristemos axilares) de brotes unipolares seguido de una escisión de brotes e inducción de meristemos radiculares. Las plantas regeneradas a partir de ápices o yemas nodales, se consideran genéticamente estables y no están sujetas a variaciones somaclonales (George & Debergh, 2008).

Factores que controlan la organogénesis:

- **Explante:** El brote de las yemas nodales cultivadas; son determinadas por genotipo, estado fisiológico de tejidos y etapa vegetativa de la planta (Singh *et al.*, 2013).
- **Medio de cultivo:** Los nutrientes que se requieren para el crecimiento óptimo de tejido *in vitro*, varían según la especie. En bambú, el medio MS es el más utilizado para la organogénesis directa e indirecta (Singh *et al.*, 2013).
- **Reguladores de crecimiento:** La frecuencia de brotación en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento es baja (Singh *et al.*, 2013). Se sabe que los niveles endógenos (reguladores de crecimiento), son variables. Por lo tanto, el nivel y tipo de reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo, determinarán el éxito del procedimiento de cultivo de tejidos. Además de citoquininas y auxinas, se incluyeron en el medio de proliferación otros aditivos como sulfato de adenina, carbón activado y aminoácidos (Singh *et al.*, 2013).
- **pH del Medio de Cultivo:** La concentración de iones de hidrógeno en el medio de crecimiento, afecta el crecimiento del tejido al cambiar el pH de las células. Concentraciones más altas de iones "H", estimula la precipitación de fosfatos, gelatinización del agar, destrucción de vitaminas y reguladores del crecimiento (Singh *et al.*, 2013). Sin embargo, la mayoría de los tejidos vegetales tienen un pH entre 5.0 a 5.5, que puede variar. El crecimiento de brotes fue efectivo a pH 4.5 -5.8, *Dendrocalamus giganteus*.

Asimismo, el mejor crecimiento de brotes se obtuvo en medio con pH de 4.5 (Singh *et al.*, 2013).

- **Fuente de Carbono:** La sacarosa es la fuente de carbono más utilizada en el cultivo de tejidos vegetales, su concentración varía del 2 al 6 %. Asimismo, la administración de glucosa ha mostrado efectos perjudiciales sobre la multiplicación de brotes (Singh *et al.*, 2013).
- **Enraizamiento de los brotes:** La inducción de raíces en brotes removidos y sobrevivencia de las plántulas en suelos, son pasos para un protocolo exitoso de micropropagación. La presencia de auxinas en el desarrollo de la raíz está certificada y estandarizada por Bisht, Pant y Kant (2010). Algunas auxinas difieren en sus actividades fisiológicas según el movimiento; a través de tejidos, permanece en las células o se metaboliza. Además, suficiente citoquinina residual será viable en los brotes, lo cual requiere poco o ninguna necesidad de inducción de raíces.
- **Aclimatación y establecimiento en campo:** La transición de condiciones *in vitro* a *ex vitro*, sigue siendo un gran dilema en la comercialización de cultivos de tejidos. Esto se debe al estrés al que están sometidas las plántulas *in vitro*, cuando se transfieren de un ambiente de cultivo con baja irradiación y alta humedad a un ambiente natural, con alta irradiación y baja humedad.

Las plantas *in vitro* exitosas, suelen tener hojas con un poco o ningún crecimiento de cera cuticular, mecanismos estomáticos deteriorados, pigmento fotosintético bajo, actividad fotosintética deficiente, desarrollo vascular y conectividad deficiente. Por lo tanto, se necesita una técnica de adaptación eficiente para asegurar una mayor sobrevivencia de las plántulas *in vitro* en campo. La reducción paulatina del aporte de nutrientes y humedad durante estos procesos obliga a la planta a fortalecer sus propios mecanismos fotosintéticos y de defensa, preparándose para crecer en condiciones *ex vitro* (Singh *et al.*, 2013).

2.10. Agentes desinfectantes para el establecimiento *in vitro*

Para el establecimiento *in vitro* de plantas leñosas, posee el problema de oscurecimientos letales. Esto, es debido a las bacterias que ocasionan este dilema en el cultivo *in vitro* de las plantas. Por consiguiente, el empleo de antibióticos en medio de cultivo es una de las soluciones para la mitigación. Además, son limitadas puesto que, existen efectos fitotóxicos sobre el material vegetativo (Sabale *et al.*, 2015).

Por lo tanto, con esta problemática se determina el uso de antibióticos para el control de estos contaminantes; y así, obtener eficiente producción de plantas *in vitro* (Abreu *et al.*, 2016). En algunas investigaciones, determinaron que durante el proceso de crecimiento en cultivo *in vitro* es intervenido por dos causas: las pérdidas por contaminantes microbianos y oscurecimiento de los tejidos cultivados (oxidación fenólica) (Kulus, 2014).

Para Sosa *et al.* (2014), afirma que el tejido vegetal es exógeno; puesto que, libera sustancias fenólicas y son acumuladas en el medio de cultivo; por consiguiente, éstas impiden su desarrollo siendo uno de los problemas más habituales en propagación y establecimiento de cultivos *in vitro*. Entonces, teniendo en cuenta que los antibióticos son relevantes para el establecimiento del cultivo *in vitro* en distintos tipos de material vegetal. En esta investigación tenemos:

- Hipoclorito de sodio (NaClO): es letal para varios microorganismos, virus y bacterias vegetativas, pero es menos efectivo contra esporas bacterianas, hongos y protozoarios. La actividad del hipoclorito se ve reducida en presencia de iones metálicos, biocapas, materiales orgánicos, bajo pH o luz UV (Anand *et al.*, 2013). Al incrementar la concentración de NaClO y el tiempo, brinda como resultados menos número de explantes contaminados; sin embargo, como consecuencia se obtiene mayor número de explantes muertos (Bedoya *et al.*, 2016).

- Cloranfenicol: es generalmente bacteriostático, ya que inhibe el desarrollo de las bacterias, pero en altas concentraciones puede ser bactericida. Su actividad antibiótica resulta de la inhibición de la síntesis de proteínas de las células bacterianas (Abreu *et al.*, 2016). Utilizar este agente en la sumersión previa del material vegetativo a 2.5 mg/mL, por 4 horas (Murashige y Skoog, 1962); asimismo, adicionar en medio de cultivo como constituyente (30 µg/mL) (Murashige y Skoog, 1962); esta combinación, obtiene como resultado mayor porcentaje de explantes sanos a comparación de tratamientos por separados (Héctor *et al.*, 2005). Caso contrario en algunos vegetales descartan su empleo por los cambios fenológicos, teniendo apariciones en zonas precoces de clorosis (Azofeifa, 2009).
- BENZOMIL 500: es un fungicida preventivo y orgánico, adecuado para combatir con la variedad de hongos que afectan a los cultivos vegetativos en campo. Su modo de acción es la inhibición e interferencia en la división nuclear del hongo; por consiguiente, bloquea la mitosis y ocasiona la muerte del hongo. Por lo que se recomienda usar antes de obtener el material vegetativo (explante), para que su posterior procedimiento esté libre de agentes infecciosos y no altere resultados en el cultivo *in vitro*. Este agente, tiene compatibilidad con la mayoría de contaminantes, sin embargo, no con aguas carbonatadas y de reacción alcalina (Neoagrum S. A. C., 2017).

Del mismo modo, algunos materiales vegetativos no toleran concentraciones elevadas de este fungicida. Algunas investigaciones emplean este agente como desinfección (obteniendo el 80 % desinfectados del total de material vegetativo) incluyen en medio de cultivo MS; siendo la mejor concentración 2 g/L para controlar la inocuidad de los explantes, logrando obtener 0% de contaminación (Rivero, 2016).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Identificación y selección de plantas élites

Siguiendo la metodología de Botero, 2020, se identificaron plantas de *Guadua angustifolia kunth* con características agronómicas sobresalientes, en el invernadero

de la Fam. Coppola, en la provincia de Huaral, Lima. De las plantas seleccionadas se extrajeron segmentos delgados y pequeños conocidos como chusquines, mismos que tuvieron la capacidad de generar rizomas; dichos chusquines tuvieron un grosor aproximado de 0.6 cm, fertilidad y sanidad como tallos rectos, entrenudos uniformes y follaje verde intenso.

3.2. Siembra de chusquines seleccionados

Los chusquines colectados, fueron embalados en papel toalla humedecidos con aguay solución antioxidantes, a fin de mantenerlos frescos y dispuestos en un cooler herméticamente cerrado se trasladaron hasta la ciudad de Chimbote, donde se sembraron en baldes de 20L usando sustrato de musgo sphagnum de la marca “4 Estaciones”. El desarrollo de las plantas se realizó bajo condiciones ambientales controlados, usando un termohigrómetro digital el cual marcó temperatura promedio de 23 °C durante el día y humedad relativa de 88%. El tiempo en el que se logró el desarrollo de nuevos brotes fue de tres meses.

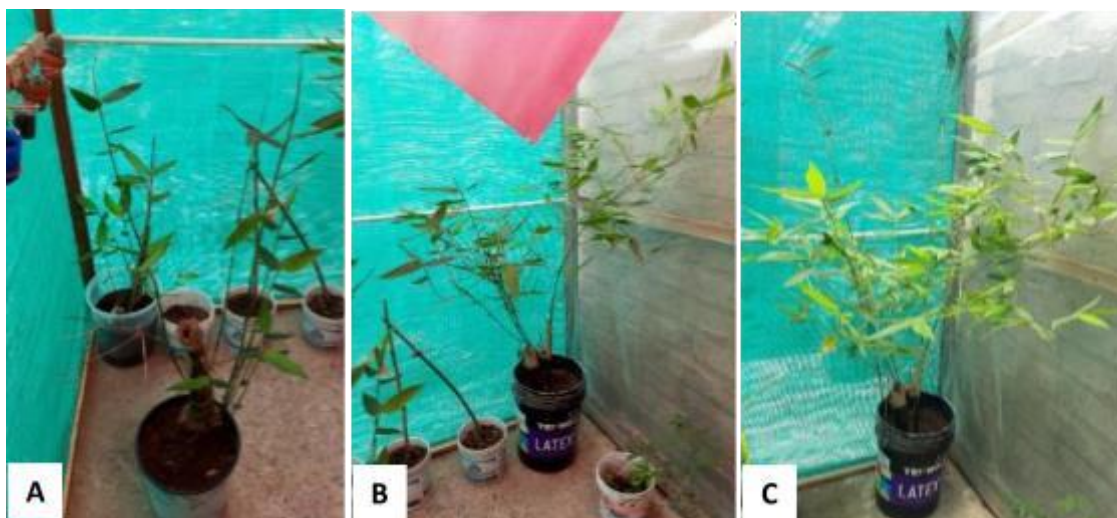


Figura 2. Proceso de desarrollo de chusquines de bambú, *Guadua angustifolia kunth*, para la obtención de plantas donantes. **A.** Desarrollo de chusquín al primer mes de su establecimiento, **B.** Desarrollo de chusquín al segundo mes de su establecimiento, **C.** Obtención de plantas donantes luego de tres meses de su establecimiento.

3.3. Preparación de medio de cultivo

Para el establecimiento de los explantes de *Guadua angustifolia kunth*, se usó medio MS descrito por Murashige y Skoog (1962). Se adquirió un medio MS para hidratar de la marca PROBIOTEC, que cumplía con los requisitos nutricionales (ANEXO I).

El medio fue suplementado con sacarosa en proporción de 30 g/L y agar 7 g/L.

Usando agua destilada estéril, se procedió a diluir 4.3 g/L de medio MS, tal como lo indica el proveedor y de forma seguida se agregó el azúcar y se mezcló hasta diluir por completo. Una vez diluido se midió y ajustó el pH del medio a 5.5 (pH óptimo del bambú) y finalmente se agregó 7g/L de agar. El medio fue dispuesto en tubos de ensayo de 10mL que sellados de forma semihermética se llevaron a esterilizar en el autoclave a 121°C.

3.4. Recolección de yemas

Se utilizó frascos de vidrio con agua destilada para recolectar las yemas de *Guadua angustifolia kunth* y su posterior transporte al laboratorio de Biotecnología Vegetal del Proyecto Especial Chavimochic, dichos frascos fueron cubiertos con papel aluminio. Las yemas, fueron extraídas empleando bisturíes previamente desinfectados, este proceso se realizó en cámara de flujo laminar.

3.5. Desinfección de yemas de *Guadua angustifolia kunth*.

Una vez obtenidas, las yemas se sometieron a procesos de desinfección variados, según se muestra en la Tabla 2. Siendo previamente lavados con detergente industrial a concentración de 5g/l y enjuagados con agua estéril.

Tabla 2. Concentración de desinfectantes, según tratamiento aplicado en la desinfección de Bambú

Tratamiento	NaClO 5%	Cloranfenicol (0.05 g/L)	Benzomil 500 (0.1 g/L)
Blanco	X		
T1	X	X	
T2	X		X
T3	X	X	X

Para el tratamiento en BLANCO: Las yemas fueron dispuestas en frascos de vidrio y se procedió a la desinfección con NaClO 5% por un período de 10 min., culminado el tiempo se realizaron 3 enjuagues consecutivos usando agua estéril.

- Para el TRATAMIENTO 1: Las yemas en frascos de vidrio se desinfectaron usando NaClO 5% por un período de 10 min., culminado el tiempo se realizaron 3 enjuagues consecutivos usando agua estéril, de forma seguida se realizó una segunda desinfección con cloranfenicol 0.05 g/L por un período de 5 min, culminado el tiempo se realizaron 3 enjuagues consecutivos usando agua estéril.
- Para el TRATAMIENTO 2: Las yemas en frascos de vidrio se desinfectaron usando NaClO 5% por un período de 10 min., culminado el tiempo se realizaron 3 enjuagues consecutivos usando agua estéril, de forma seguida se realizó una segunda desinfección con benzomil 0.1 g/L por un período de 5 min, culminado el tiempo se realizaron 3 enjuagues consecutivos usando agua estéril.
- Para el TRATAMIENTO 3: Las yemas en frascos de vidrio se desinfectaron usando NaClO 5% por un período de 10 min., culminado el tiempo se realizaron 3 enjuagues consecutivos usando agua estéril, de forma seguida se realizó una segunda desinfección con benzomil 0.1 g/L por un período de 5 min, culminado el tiempo se realizaron 3 enjuagues consecutivos usando agua estéril y finalmente se añadió cloranfenicol 0.05 g/L por un período de 5 min y se retiró el exceso mediante 3 enjuagues finales de agua estéril.

3.6. Siembra de yemas

Dicho procedimiento se llevó a cabo en cámara de flujo laminar previamente desinfectada con alcohol 70 % y NaClO 5%. Se realizó la siembra de yemas en tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio MS suplementado (sacarosa 30g/L y agar 7g/L), una vez introducida la yema, los tubos fueron sellados con parafilm. Posteriormente, se trasladaron al área de incubación, donde se evaluaron semanalmente los parámetros horas luz (16 horas de luz, 8 horas de oscuridad) y temperaturas de 21 °C (Seabrook, 2005).

3.7. Evaluación de los tratamientos

La evaluación fue realizada cada 7 días, teniendo en cuenta los porcentajes de contaminación microbiana, fenolización y porcentaje de sobrevivencia de las yemas establecidas (Botero, 2020).

IV. RESULTADOS

De acuerdo con lo ensayado en el laboratorio (ANEXO II), se presentan los datos obtenidos del crecimiento y desarrollo de plantas de bambú evaluados durante un período de 4 semanas, en las que se determinó los porcentajes de sobrevivencia, así como mortalidad por fenolización y finalmente contaminación microbiana.

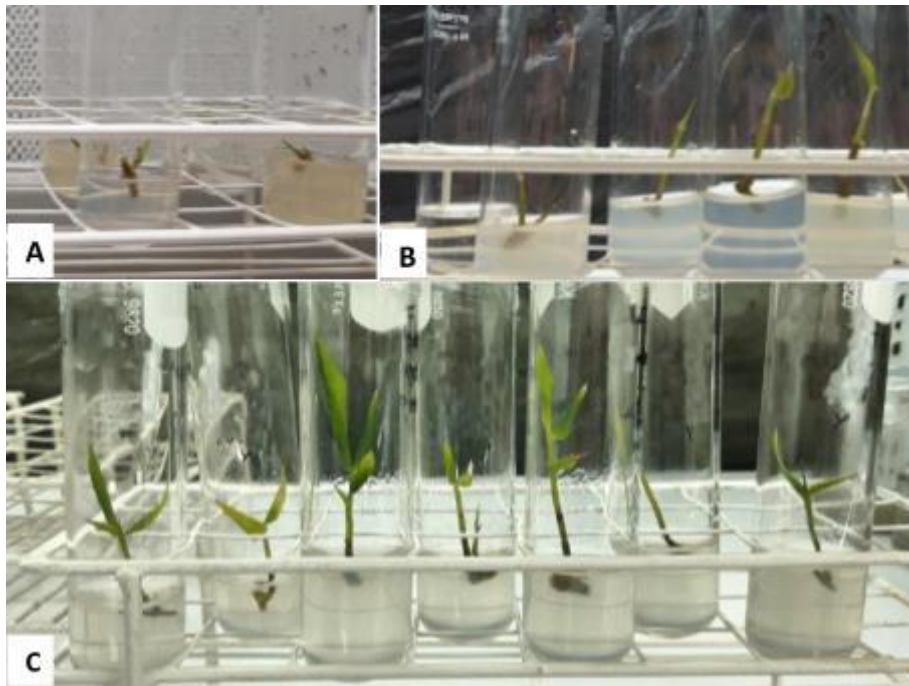


Figura 3. Proceso de desarrollo y crecimiento de plántulas de bambú, desde su establecimiento en condiciones *in vitro* hasta la aparición de los primeros brotes. **A.** Establecimiento de yemas en medio MS a diferentes tratamientos de desinfección, **B.** Aparición y desarrollo de brotes durante la segunda semana de establecimiento, **C.** Plántulas de bambú a la cuarta semana del establecimiento.



Figura 4. Identificación macroscópica de contaminación por microorganismos durante el establecimiento de yemas de bambú, **A.** Visualización de hongos en la base de yemas establecidas sobre medio de cultivo, **B.** Identificación de contaminación por bacterias en yemas de bambú, **C.** Oscurecimiento del medio de cultivo por fenoles expulsados por las yemas de bambú.

En la Fig. 3 se muestra el desarrollo de las yemas de bambú, desde su establecimiento hasta la generación de los primeros brotes durante las cuatro semanas de evaluación, así mismo en la Fig. 4 se muestra la contaminación de agentes bacterianos y fúngicos que al estar presente en el microclima de cultivo impidieron el crecimiento de las yemas, esta contaminación está relacionada con los microorganismos que se encuentran de forma endógenas en los tejidos vegetales y que durante el proceso de desinfección no logran ser destruidos o al proceso de manipulación durante su establecimiento *in vitro*; a este hecho se suma la fenolización, causada por la sobreexposición de las yemas a los métodos de desinfección o lesiones causadas durante el proceso *in vitro*, lo que conduce a la no viabilidad de las mismas o que se traduce en muerte vegetal.

Por otro lado, a fin de obtener datos precisos que ayuden a determinar de forma cuantitativa los porcentajes de sobrevivencia y mortalidad de las yemas luego de la aplicación de los diferentes tratamientos de desinfección aquí estudiados, se obtuvieron los resultados mostrados en las tablas siguientes de acuerdo con las semanas de evaluación:

Tabla 3. Sobrevivencia y contaminación promedio durante la primera semana del establecimiento *in vitro* de yemas de bambú.

Tratamiento	N° tubos	Porcentajes de tubos contaminados				% Fenolización	% sobrevivencia
		Hongo		bacteria			
		(%)	(%)	(%)	(%)		
Blanco	10	40	30	20	3.33	6.67	
T1	10	10	30	16.67	10	33.33	
T2	10	13.33	23.33	10	10	43.33	
T3	10	16.67	6.67	0	3.33	73.33	

De la tabla anterior, se observa que durante la primera semana del establecimiento *in vitro* de las yemas de bambú, el T3 fue el que presentó mayor porcentaje de sobrevivencia con un valor de 73.33% respecto a los demás tratamientos en estudio, seguido del T2 con un valor de sobrevivencia de 43.33%. Del mismo modo se determinó que el tratamiento Blanco o control, presenta el valor de sobrevivencia más bajo con 6.67%. Las mayores pérdidas de material vegetal (yemas) durante la primera semana se dio por la contaminación

fúngica y bacteriana con valores 40% y 23.33% respectivamente. De lo que se deduce que los agentes desinfectantes y su combinación en el proceso de desinfección tienen un efecto significativo en la viabilidad de las yemas.

Tabla 4. Porcentajes de contaminación y sobrevivencia promedio de plántulas de bambú, luego de la segunda semana de su establecimiento *in vitro*

Tratamiento	N° tubos	Porcentajes de tubos contaminados			% fenolización	% sobrevivencia
		(%)				
		Hongo	Bacteria	Hongo + bacteria		
Blanco	10	33.33	26.67	33.33	3.33	3.33
T1	10	16.67	23.33	23.33	10	26.67
T2	10	13.33	20.00	16.67	13.33	36.67
T3	10	10.00	6.67	6.67	6.67	70

Pasado siete días de la primera evaluación a las yemas de bambú establecidas *in vitro*, se procedió a realizar una segunda evaluación determinando que el T3 a pesar de disminuir en 3% su porcentaje de sobrevivencia sigue manteniendo altos porcentajes respecto a los demás tratamientos en estudio con 70% de yemas viales y libres de contaminación lo que se traduce que la combinación de desinfectantes está dando resultados óptimos, puesto que, en el T2 se muestra 36.67% de yemas vivas y en el T1 26.67% de sobrevivencia. Por otro lado, es preciso mencionar que la reducción de las tasas de sobrevivencia está ligada a la contaminación cruzada de hongo + bacteria y el aumento de la fenolización del medio de cultivo como mecanismo de defensa de agentes fenólicos de las plantas durante el proceso de generación de nuevos brotes.

Tabla 5. Porcentajes promedio de contaminación y sobrevivencia de plántulas de bambú, luego de la tercera semana de su establecimiento.

Tratamiento	N° tubos	Porcentajes de tubos contaminados			% fenolización	% sobrevivencia
		(%)				
		Hongo	Bacteria	hongo + bacteria		
Blanco	10	33.33	20	43.33	3.33	0
T1	10	16.67	20	30.00	13.33	20
T2	10	13.33	20.00	20	13.33	33.33
T3	10	6.67	6.67	10	13.33	63.33

En la tercera semana de evaluación, se observa que el tratamiento Blanco o control llegó a un 0% de yemas sobrevivientes, deduciendo que al no existir un agente antimicrobiano óptimo durante el proceso de desinfección de las yemas estas no llegan a ser viables o que lleva a una pérdida económica. Mientras que el T3 a pesar de haber disminuido su porcentaje de sobrevivencia en un 7% respecto a la evaluación anterior, mantiene viabilidad alta respecto a los tratamientos en estudio con un 63.33% de sobrevivencia, seguido del T2 con 33.33% de viabilidad. En esta semana de evaluación se observa también que existió mayor pérdida de yemas por fenolización con porcentajes de hasta 13.33% en los tratamientos T1, T2 y T3.

Tabla 6. Porcentajes promedio de contaminación y sobrevivencia de plántulas de bambú, luego de la cuarta semana de su establecimiento *in vitro*

Tratamiento	N° tubos	Porcentajes de tubos contaminados			% fenolización	% sobrevivencia
		(%)				
		hongo	bacteria	hongo + bacteria		
BLANCO	10	33.33	20	43.33	3.33	0
T1	10	10	13.3	43.33	13.33	20
T2	10	13.33	16.67	26.67	13.33	30
T3	10	3.33	10	16.67	13.33	56.7

Finalmente, completadas las cuatro semanas de evaluación, se determinó que el T3 es el tratamiento con porcentajes mayores de sobrevivencia sobre los demás tratamientos en estudio con un valor de 56.7% de viabilidad de yemas, que han logrado establecerse en condiciones *in vitro* y posteriormente serán multiplicadas para el aumento masivo del bambú. Sin embargo, se observa que la mayor pérdida de material vegetal está dada por contaminación cruzada de hongos y bacterias alcanzando valores de hasta 43.33% en el blanco y T1, por lo que se deduce que los agentes de desinfección usados en el proceso no son de alto espectro y no llegan a eliminar a los agentes contaminantes del material vegetal.

Así también, se ha diseñado una gráfica de barras que nos permitirá tener mejor visualización del avance de contaminación por tratamiento y evidenciará lo descrito en las tablas anteriores.

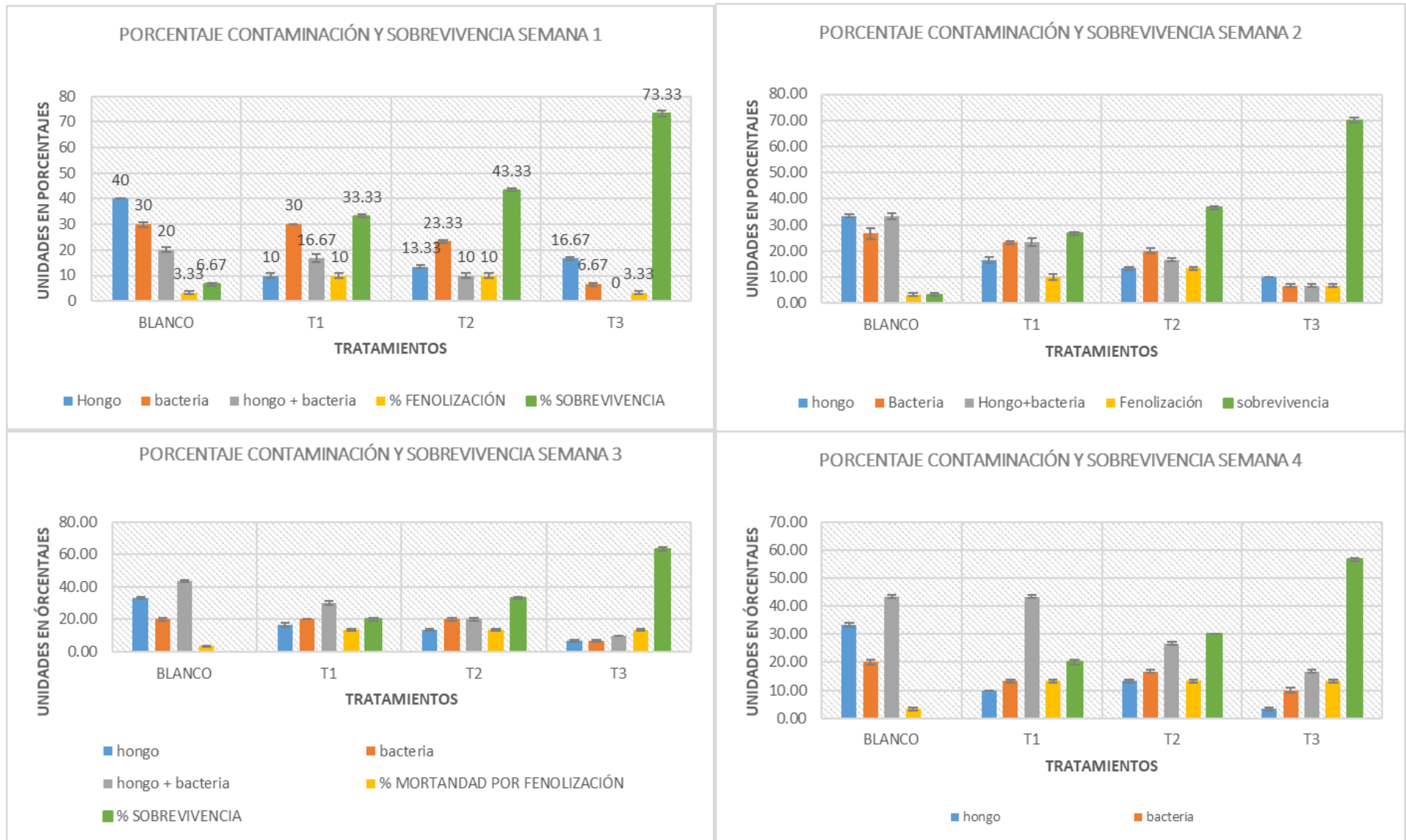


Figura 5. Desarrollo y crecimiento de las plántulas de bambú durante el primer mes de su establecimiento *in vitro*, así como el avance de la contaminación por hongo y bacteria respecto al porcentaje de supervivencia para los tratamientos blanco, T1, T2 y T3.

V. DISCUSIÓN

Según el procedimiento descrito por IICA, 2005; en un trabajo realizado con *Musgo sphagnum* donde estudió las temperaturas óptimas de crecimiento *in vitro*, menciona que es preciso mantener ambientes de cultivo por arriba de los 23°C a fin de estimular el desarrollo de las plántulas, por esta razón el ambiente donde se mantuvieron las yemas de bambú, se registraron rangos de temperatura 20°C a 30°C. De igual manera, Oblitas, 2019, menciona que la humedad relativa debe mantenerse entre 70 y 90%; en esta investigación, se mantuvo en 88%. De acuerdo con la literatura el bambú le favorece los suelos arcillosos y con drenaje; por ello, se ubican en lechos húmedos y suelos arenosos; así reporta IICA,2005; el cual, en conjunto con Oblitas, 2019, coinciden en mantener humedad relativa altas; para simular los suelos arcillosos, buscando efectividad en el desarrollo de la planta.

El ambiente de cultivo de *Guadua angustifolia kunth*, según Castaño y Moreno, 2004, es óptimo a altitudes entre 600 m.s.n.m y 2000 m.s.n.m. Además, Gonzales, 2005, confirma la existencia de pequeñas áreas plantadas en Tumbes, Piura, Sur de Lima, entre otras partes de Perú. Por ello, para Mercedes, 2006, el bambú tiene rápido desarrollo incluyendo los rizomas donde son almacenados los nutrientes; el cual, nos permitió la propagación al separar una de sus ramificaciones. Por consiguiente, en la primera semana se observa que, la sobrevivencia es mayor en el tratamiento 3 con un porcentaje promedio de 73 %; asimismo, presenta menor porcentaje de contaminación de hongo y bacteria, obteniendo 0% para ambos contaminantes (Tabla3). Esto se debe a sus tallos que poseen lignina haciéndolos fuertes.

En cuanto a la fenolización, el porcentaje varía porque no se utilizaron antioxidantes; además, en la desinfección fueron distintos tiempos para cada tratamiento. Corrales, 2017, explica que depende en qué mes fue realizado; por ejemplo, él realizó un tratamiento por mes, en establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia kunth* por 6 meses, obteniendo mejores resultados en los meses de Junio y Septiembre. De igual manera, Mudoí *et al.*, 2014, evaluaron el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de bambú en base a las estaciones del año, obteniendo mejores brotaciones en otoño (septiembre – diciembre) y mayor contaminación de microorganismos y oxidación fenólica fue en primavera – verano. Los autores George *et al.*, 2008, sustentan que

existen especies tropicales; de las cuales, poseen concentraciones altas de sustancias fenólicas que cuando están dañadas se oxidan; en consecuencia, la acumulación de sustancias liberadas en el medio por el material vegetativo inhibe el crecimiento llevando al necrosamiento de la plántula.

En la semana siguiente los cambios son más perceptibles (Tabla 4). En el tratamiento 3, se observa aumento de contaminación en los tubos; de igual manera en la fenolización. Sin embargo, el porcentaje de sobrevivencia aún continúa en el rango $\leq 70\%$. Para López, 2012, el mayor inconveniente es la contaminación por microorganismos, puesto que genera pérdidas biológicas, económicas y dificultando el manejo. Por ello, él recomienda realizar estos tipos de trabajo de desinfección superficial de las plántulas. Además, se observa que, añadiendo estos agentes desinfectantes con NaClO, inhibe el crecimiento microbiano en comparación al control. De igual manera, para López es imprescindible que algún estudio elimine en totalidad los contaminantes microbianos. Para Muñoz, 2003, la oxidación fenólica puede ocasionar problemas en el establecimiento y sobrevivencia del explante, se observa de manera característica como el ennegrecimiento del MS comenzando cerca del material vegetativo extendiéndose por todo el medio afectando al crecimiento y provocando hasta la muerte.

En la tabla 5, los porcentajes no varían; puesto que, las plántulas están en proceso de crecimiento y absorben los nutrientes del medio. Sin embargo, el nivel de sobrevivencia es < 70 , en el tratamiento 3; debido al aumento de oxidación en las plántulas lo que se refleja en el porcentaje de fenolización. Ante ello, Borges *et al.*, 2004, asevera que, se debe a la concentración del hipoclorito de sodio; puesto que, en su estudio empleó 2% por 5 minutos con repetición a 24 horas, es el más apropiado para el establecimiento *in vitro*. La figura 5, nos indica que el porcentaje de contaminación con los agentes desinfectantes es más eficiente que solo el control, indicando también el nivel de sobrevivencia mayor en el tratamiento 3. Según Galindo, 2015, para evitar la oxidación, empleó ácido cítrico como antioxidante en el medio MS; el cual, redujo 7% de oxidación en el sembrado.

Datos de la última semana de observación (Tabla 6); por ello, se considera que el tratamiento 3 durante todo el proceso fue eficiente, aunque el porcentaje de

sobrevivencia haya oscilado en >55 y <70 . Sin embargo, Oblitas, 2019, realizó su fase de desinfección del mismo modo que Borges *et al.*, 2004; el cual, emplearon NaClO 2%, con la diferencia de tiempo, Oblitas realizó durante 25 minutos y logró 96% de explantes limpios; también modificó su medio MS (4.7 g/L) y aplicó fitohormonas para la fase de multiplicación y enraizamiento logrando mayor brotación y longitud. Al igual que, realizó Becerra y Tafur, 2019, empleó hipoclorito de sodio 2% pero el varió los tiempos 10, 15, 20 y 25 minutos; su resultado fue similar a Oblitas, 2019, que la fase de desinfección es mejor en 25 minutos; en ello, lograron 46% de explantes limpios. Esto nos indica que para que no ocurra la mortandad por fenolización se debe evitar mayor concentración de hipoclorito de sodio; de esta manera, si se desea obtener mayor porcentaje de sobrevivencia es conveniente que se mantenga en más tiempo el desinfectante hipoclorito de sodio 2%.

Sin embargo, se contradice con Castillo *et al.*, 2005; puesto que, ellos utilizaron detergente alcalino que incluía Benomyl y Agrimycin junto con hipoclorito de sodio 1.5%; con el cual, se logró disminuir la contaminación externa en los explantes. Además, añadió agente biocida 2mL/L y fitohormonas para la brotación. Es decir, que añadiendo más agentes desinfectantes el establecimiento del cultivo *in vitro* es mejor. Por ejemplo, el trabajo de Muralanda *et al.*, 2005, evaluaron en la etapa de desinfección, el bicloruro de mercurio ($HgCl_2$) y el hipoclorito de sodio (NaClO) con diversos tiempos de aplicación; lo cual, les permitió realizar la micropropagación de *Guadua angustifolia kunth*.

Asimismo, para Sánchez *et al.*, 2005, aseveran que el propósito de los agentes desinfectantes es la inhibición del crecimiento fungobacteriano, sin modificar la pared celular del tejido vegetal. El desinfectante altera las funciones de los microorganismos presentes en el medio. Al igual que, se tiene en cuenta el tiempo adecuado para eliminar una determinada población bacteriana.

VI. CONCLUSIONES

La aplicación de NaClO 5% (Tratamiento control /Blanco) por 10 minutos en yemas de Bambú, es considerado el tratamiento menos viable, por presentar porcentajes de sobrevivencia de 0% y valores de contaminación microbiana de hasta 43.33%.

El tratamiento 1 (NaClO 5% + cloranfenicol 0.05 g/L), presentó porcentajes de yemas sobrevivientes de 20% y contaminación microbiana de 43.33%, por ende, no es un tratamiento idóneo para la desinfección de yemas bambú, por la alta pérdida de material vegetal.

El tratamiento 2 (NaClO 5% + benzomil 500 0.1 g/L) alcanzó el 30% de yemas sobrevivientes y que la pérdida de material vegetal está relacionado a altos porcentajes contaminación microbiana con 26.67% y fenolizaciones de hasta 13.33%, convirtiéndolo en un tratamiento poco eficaz y no recomendable.

El uso combinado de NaClO 5%, Cloranfenicol 0.05 g/L y Benzomil 500 0.1 g/L (T3) en la desinfección de yemas de bambú, *Guadua angustifolia kunth*, proporcionó mayores tasas de sobrevivencia con porcentajes de 56.7% de yemas viables y bajas tasas de contaminación microbiana con valores de 16.67%, respecto a todos los tratamientos en estudio, considerándose el más eficiente.

VII. RECOMENDACIONES

- Tener en cuenta para trabajos posteriores, la influencia de los fungobactericidas usados en el presente trabajo de investigación sobre el desarrollo de las plantas en condiciones *ex vitro*; con la finalidad de evidenciar que no existe una pérdida de la totipotencia de las plántulas.
- Realizar identificación microscópica y bioquímica de los microorganismos patógenos que invaden a *Guadua angustifolia kunth*, en la etapa de propagación *in vitro*, para mejorar el uso de agentes desinfectantes en el proceso y obtener mayores tasas de sobrevivencia.
- Realizar estudios respecto al tiempo de contacto de desinfectante y material vegetal con la finalidad de disminuir los porcentajes de fenolización de los brotes y explantes en condiciones *in vitro*.
- Usar antioxidantes en la etapa de establecimiento *in vitro* de bambú, para evitar la fenolización de los explantes.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, E., Sosa del Castillo, M., Ascunce del Sol, G., & González, G. (2016). Efecto de antibióticos en la propagación *in vitro* de *Agave Fourcroydes Lem*. *Biología Vegetal*, 16(1), 31-36.
- Anand, M; Brar, J; Sood, A. (Enero, 2013). *In vitro* propagation of an edible bamboo *Bambusa bambos* and assessment of clonal fidelity through molecular markers. *Journal of Medical and Bioengineering* 2(4):257-261. R.
- Añasco, M. (2013). Estudio de Vulnerabilidad del Bambú (*Guadua angustifolia*) al Cambio Climático en la costa del Ecuador y norte Perú. Comisión Europea.
- Añasco, M. (2015). Estudio de la cadena desde la producción al consumo del bambú (*Guadua angustifolia*) en Perú. Comisión Europea.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*. 20(1), 153 – 175.
- Becerra, M., V., Tafur, S., S., (2019). Micropropagación *in vitro* de *Guadua angustifolia kunth* en Jaén, Cajamarca. Universidad Nacional de Cajamarca, Ciencias Agrarias, Ingeniería Forestal.
- Bedoya, J. C., Sánchez-Jaramillo, C. J., Bermúdez-Gómez, S. M., & Ramírez-Restrepo, S. (2016). Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo *in vitro* de *Aloysia tryphilla*. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2),38-46.
- Bhojwani, S., & Dantu, P. (2013). En *Micropropagation. Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer.
- Bisht, P; Pant, M; Kant A. (2010). *In vitro* propagation of *Gigantochloa atrovioleaceae* *Widjaja* through nodal explants. *Journal of American Science* 6(10):1019–1026.
- Borges, M., Ros, C., Castellanos, Y., Milanes, S., Velásquez, R. (2004). Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia kunth*. *Biología Vegetal*. 4, 237- 242.

- Botero, L. (2020). Reproducción de la *Guadua angustifolia* por método de chusquines. International Network for Bamboo and Rattan (INBAR). Guayaquil, Ecuador.
- Casanova, F. (2018). Determinación de medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de bambú (*Guadua weberbaueri*). Anales Científicos. 80, 150 – 159.
- Castaño, F., & R.D. Moreno. (2004). *Guadua* para todos: cultivo y aprovechamiento. Bogotá, Colombia.
- Castillo, J., Guevara, E., M., Jiménez, V., Montiel, M., Tavares, E. (2005). Micropropagación de *Guada angustifolia Kunth*. Simposio Internacional Guada. Pereira-Colombia 2004.
- Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN). 2018. Manual de medios de cultivo.
- Corrales Holguin, D. (2017). Establecimiento *in vitro* del Bambú *Guadua angustifolia kunth* bajo seis tratamientos de desinfección aplicados en segmentos nodales procedentes de ramas primarias. [Tesis para título, Universidad Nacional Agraria la Molina].
- 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*. Biotecnología Vegetal. 7, 9-13.
- Fajardo, L. (2006). Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Guadua angustifolia kunt*. [Tesis para Titulo, Universidad Central “Martha Abreu” de las Villas].
- Galindo, G., DAS. (2015). Evaluación de medios de cultivo para la propagación *in vitro* de bambú (*Guada angustifolia; poaceae*), tesis de grado. Universidad Rafael Landivar. La democracia- Escuintla, Guatemala. 48.
- George, E., Pasillo, M., & Klerk, G. (2008). Propagación de plantas por cultivo de tejidos. Springer.
- Gobierno Regional de Amazonas (GOREA). 2016. Zonificación Ecológica y Económica del Departamento de Amazonas. Instituto de investigación de la Amazonía Peruana (IIAP). 1era edición. Lima, Perú.
- Gonzaga, L., López, R., & Morales, T. (2016). Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) utilizando un sistema de inmersión temporal RITA.

Academic Journals. 15,1503-1510.

Gonzales, H. (2005). Elaboración de una propuesta para el aprovechamiento y la transformación del bambú en el ámbito del PRODAPP (Puerto Inca – Oxapampa),

Gonzales, H. (2020). Bambú como material sostenible para la construcción (3era ed.).
BAMBUCYT.

Héctor, E., Barrón, M., Godoy, L., Díaz, B., Hernández, M., & Torres, A. (2005). En método para la desinfección y el establecimiento *in vitro* de la menta japonesa. *Cultivos Tropicales*.26(1),69-71.

IICA (2005). La competitividad de las cadenas agroproductivas en Colombia.
Recuperado de <https://repositorio.iica.int/handle/11324/14349>.

Kaur, H., Salwan, R., Chand, R., Anand, M., & Sood, A. (2011). Evaluación de la fidelidad clonal de plantas criadas *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth usando marcadores basados en ADN. *Academic Journals*. 5,5636-5641.

Kulus, M. (2014). Micropropagation of selected *Agave* species. En Czubenko, M.(Eds.). *PhD Interdisciplinary Journal* (pp. 75-84).

Lárraga, N., Gutiérrez, N., López, H., Pedraza, M., Santos, G., Santos, U., & Vargas, J. (2011). Propagación vegetativa de tres especies de bambú. *Redalcy*. 7,205-218.

López, R. (2012). Efecto predesinfectante del oxiclورو de cobre sobre hongos contaminantes en segmentos nodales de *Guadua angustifolia kunth*, para su establecimiento *in vitro*. *Revista de Investigaciones – Universidad del Quindío*. 23,120-126.

Martínez, J. (2020). "Propagación *in vitro* de *Guadua angustifolia* (bambú), a partir de microestacas de plantas desarrolladas en invernadero". [Tesis para título, Universidad Nacional Agraria la Molina].

Mendoza, M (2009). Establecimiento de un protocolo para la multiplicación *in vitro* de bambú (*Guadua angustifolia*): fase 1. [Tesis para título, Universidad EARTH].

Mercedes, J. (2006). Guía Técnica Cultivo de Bambú. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. CEDAF. Santo Domingo, República Dominicana.

- Mudoj, K; Saikia, S y Borthakur, M. 2014. Effect of nodal positions, seasonal variations, shoot clump and growth regulators on micropropagation of commercially important bamboo, *Bambusa nutans* Wall. Ex. Munr. African Journal of Biotechnology 13(19):1961-1972.
- 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. 120p.
- Muralanda, M., Guitiérrez, L., Marquez, MP., 2005. Micropropagación de *Guadua angustifolia kunth*. Trabajo de investigación. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia. Pag 14.
- NEOAGRUM S. A. C. (2017). Benzomil 500.
- Oblitas, W. (2019). “Micropropagación *in vitro* de *Guadua angustifolia kunth* en Jaén, Cajamarca”. [Tesis para título, Universidad Nacional de Cajamarca].
- Olivier, J. (2008). *Gramíneas (Poaceae) bambusiformes* del Río de Los Amigos, Madre de Dios, Perú. Revista Peruana Biológica. 15, 121- 126.
- Ramírez, L., Castaño, S., & López, R. (2009). Identificación de Bacterias que afectan el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Guadua angustifolia Kunth*. Revista de Investigaciones. 19,151-158.
- Ramirez, L., Granados, J., & Carreño, N. (2014). Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia Kunth* para el establecimiento del cultivo *in vitro*. Dialnet. 5,155-169.
- Ramos, J. (2012). Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas. [Tesis para Título, Universidad Nacional Abierta y a Distancia].
- Rivero Fonseca, J. A. (2016). Determinación de un protocolo para la regeneración *in vitro* de yemas y hojas de tornillo (*Cedrelinga cateniformis Ducke (Ducke)*). Recuperado de <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/1125>.
- Sabale, S. N., Patil, D. M., Gokhale, N. B., Sawardekar, S. V. & Swant S. S. (2015). Elimination of bacterial contamination by using antibiotics in micropropagation of banana (*Musa spp.*). *Grand naine Journal of Cell and Tissue Research* 15(2), 5111-5115.

- Sánchez L, Sáens E. 2005. Antisépticos y desinfectantes. *Dermatología Peruana*. Volúmen 15. N° 2.
- Seabrook, J. (2005). Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) *in vitro*: A review. *American Journal of Potato Research*, 353-367.
- Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR). (13 de diciembre de 2018). Crece la producción de bambú en Piura.
- Singh, SR, Singh, R., Kalia, S., Sunita, D., Dhawan, A., & Rajwant, k. (2013). Limitaciones, avances y perspectivas de la aplicación de herramientas biotecnológicas en el mejoramiento del bambú, una planta con extraordinarias cualidades. *Physiol Mol Biol Plants* 19, 21–41.
- Solar, J. (2012). Proyecto de factibilidad para la exportación de bambú a Chile, 2011-2020. [Tesis para título, Universidad Tecnológica Equinoccial].
- Sosa, M., Alemán, S., Pérez, Y., Abreu, E., Sosa, D., & González, G. (2014). Caracterización de la lámina foliar de plantas de *Agave fourcroydes* Lem. obtenidas por propagación asexual. *Biotecnología Vegetal*, 14(1), 37-44.

IX. ANEXOS

ANEXO I: Formulación de medio Musharige & Skoog,

Tabla 7. Obtenido de PROBIOTEK, medio listo para activación. Según ficha técnica se describe los siguientes compuestos

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN
Macronutrientes	
Nitrato de amonio	1.650 mg/L
Nitrato de potasio	1.900 mg/L
Sulfato de magnesio heptahidratado	370 mg/L
Cloruro de calcio dihidratado	440 mg/L
Fosfato monopotásico	170 mg/L
Micronutrientes	
Yoduro de potasio	0.83 mg/L
Ácido bórico	6.2 mg/L
Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.3 mg/L
Sulfato de zinc tetrahidratado	8.6 mg/L
Molibdato de sodio dihidratado	0.25 mg/L
Sulfato de cobre hexahidratado	0.025 mg/L
Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025 mg/L
Etilendiamina tertraacético disódico	37.2 mg/L
Sulfato ferroso heptahidratado	27.8 mg/L
Vitaminas	
Inositol	100 mg/L
Niacina	0.5 mg/L
Piridoxina HCl	0.5 mg/L
Tiamina HCl	0.1 mg/L
Glicina	2 mg/L

ANEXO II: Datos generales obtenidos del ensayo realizado a nivel laboratorio.

Tabla 8. Contaminación y sobrevivencia de plántulas de bambú, durante la primera semana de establecimiento.

TRATAMIENTO	N° tubos	CONTAMINACIÓN			FENOLIZACIÓN	SOBREVIVENCIA
		hongo	bacteria	hongo + bacteria		
BLANCO	10	4	2	3	1	0
BLANCO	10	4	4	1	0	1
BLANCO	10	4	3	2	0	1
T1	10	2	3	0	2	3
T1	10	1	3	3	0	3
T1	10	0	3	2	1	4
T2	10	1	2	1	2	4
T2	10	1	2	2	0	5
T2	10	2	3	0	1	4
T3	10	1	1	0	0	8
T3	10	2	1	0	1	6
T3	10	2	0	0	0	8

Tabla 9. Número de plantas sobrevivientes y contaminadas de bambú, durante la segunda semana de establecimiento

TRATAMIENTO	N° tubos	CONTAMINACIÓN			FENOLIZACIÓN	SOBREVIVENCIA
		hongo	bacteria	hongo + bacteria		
BLANCO	10	3	2	4	1	0
BLANCO	10	3	5	2	0	0
BLANCO	10	4	1	4	0	1
T1	10	3	2	1	2	2
T1	10	1	2	4	0	3
T1	10	1	3	2	1	3
T2	10	1	1	2	2	4
T2	10	1	2	2	1	4
T2	10	2	3	1	1	3
T3	10	1	1	0	1	7
T3	10	1	1	1	1	6
T3	10	1	0	1	0	8

Tabla 10. Contaminación y sobrevivencia de plántulas de bambú, durante la tercera semana de establecimiento

TRATAMIENTO	N° tubos	CONTAMINACIÓN			FENOLIZACIÓN	SOBREVIVENCIA
		hongo	bacteria	hongo + bacteria		
BLANCO	10	3	1	5	1	0
BLANCO	10	3	3	4	0	0
BLANCO	10	4	2	4	0	0
T1	10	3	2	2	2	1
T1	10	1	2	4	1	2
T1	10	1	2	3	1	3
T2	10	1	2	2	2	3
T2	10	1	1	3	1	4
T2	10	2	3	1	1	3
T3	10	0	1	1	1	7
T3	10	1	1	1	2	5
T3	10	1	0	1	1	7

Tabla 11. Contaminación y sobrevivencia de plántulas de bambú, durante la cuarta semana de establecimiento

TRATAMIENTO	N° tubos	CONTAMINACIÓN			FENOLIZACIÓN	SOBREVIVENCIA
		hongo	bacteria	hongo + bacteria		
BLANCO	10	3	1	5	1	0
BLANCO	10	3	3	4	0	0
BLANCO	10	4	2	4	0	0
T1	10	1	2	4	2	1
T1	10	1	1	5	1	2
T1	10	1	1	4	1	3
T2	10	1	1	3	2	3
T2	10	1	2	3	1	3
T2	10	2	2	2	1	3
T3	10	0	2	1	1	6
T3	10	1	0	2	2	5
T3	10	0	1	2	1	6

ANEXO III: Estadístico de los datos obtenidos en laboratorio mediante el uso de software STATGRAPHICS

Tabla 12. ANOVA para datos de contaminación por hongos, durante el establecimiento *in vitro* de bambú.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1640.63	3	546.876	37.47	0.0000
Intra grupos	175.15	12	14.5958		
Total (Corr.)	1815.78	15			

La tabla ANOVA descompone la varianza de HONGO en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 37.4679, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro-de grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de HONGO entre un nivel de TRATAMIENTO y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 13. Pruebas de Rangos múltiples realizada para la contaminación por hongos, durante el establecimiento *in vitro* de bambú. Se muestran los datos de acuerdo a cada tratamiento en estudio.

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T3	4	9.1675	X
T2	4	13.33	X
T1	4	13.335	X
BLANCO	4	34.9975	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
BLANCO - T1	*	21.6625	5.886
BLANCO - T2	*	21.6675	5.886
BLANCO - T3	*	25.83	5.886
T1 - T2		0.005	5.886
T1 - T3		4.1675	5.886
T2 - T3		4.1625	5.886

Tabla 14. ANOVA para datos de contaminación por bacteria, durante el establecimiento *in vitro* de bambú.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	660.889	3	220.296	10.57	0.0011
Intra grupos	250.0	12	20.8333		
Total (Corr.)	910.889	15			

La tabla ANOVA descompone la varianza de BACTERIA en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 10.5742, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de BACTERIA entre un nivel de TRATAMIENTO y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 15. Pruebas de Rangos múltiples realizada para la contaminación por bacteria, durante el establecimiento *in vitro* de bambú. Se muestran los datos de acuerdo a cada tratamiento en estudio.

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T3	4	7.5025	X
T2	4	20.0	X
T1	4	21.665	X
BLANCO	4	24.1675	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
BLANCO - T1		2.5025	7.0321
BLANCO - T2		4.1675	7.0321
BLANCO - T3	*	16.665	7.0321
T1 - T2		1.665	7.0321
T1 - T3	*	14.1625	7.0321
T2 - T3	*	12.4975	7.0321

Tabla 16. Tabla ANOVA para datos de contaminación por hongo y bacteria, durante el establecimiento *in vitro* de bambú.

Fuente	Suma Cuadrados	de	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1632.8		3	544.267	6.25	0.0084
Intra grupos	1044.29		12	87.0241		
Total (Corr.)	2677.09		15			

La tabla ANOVA descompone la varianza de HONGO- BACTERIA en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 6.25421, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de HONGO- BACTERIA entre un nivel de TRATAMIENTO y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 17. Pruebas de Rangos múltiples realizada para la contaminación por hongo y bacteria, durante el establecimiento *in vitro* de bambú. Se muestran los datos de acuerdo con cada tratamiento en estudio.

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T3	4	8.335	X
T2	4	18.335	XX
T1	4	28.3325	XX
BLANCO	4	34.9975	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
BLANCO - T1		6.665	14.3723
BLANCO - T2	*	16.6625	14.3723
BLANCO - T3	*	26.6625	14.3723
T1 - T2		9.9975	14.3723
T1 - T3	*	19.9975	14.3723
T2 - T3		10.0	14.3723

Tabla 18. ANOVA para datos de contaminación por fenolización, durante el establecimiento *in vitro* de bambú.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	205.611	3	68.537	8.71	0.0024
Intra grupos	94.3723	12	7.86436		
Total (Corr.)	299.983	15			

La tabla ANOVA descompone la varianza de FENOLIZACIÓN en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 8.7149, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de FENOLIZACIÓN entre un nivel de TRATAMIENTO y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 19. Pruebas de Rangos múltiples realizada para la contaminación por fenolización, durante el establecimiento *in vitro* de bambú. Se muestran los datos de acuerdo con cada tratamiento en estudio.

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
BLANCO	4	3.33	X
T3	4	9.165	X
T1	4	11.665	X
T2	4	12.4975	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
BLANCO - T1	*	-8.335	4.32053
BLANCO - T2	*	-9.1675	4.32053
BLANCO - T3	*	-5.835	4.32053
T1 - T2		-0.8325	4.32053
T1 - T3		2.5	4.32053
T2 - T3		3.3325	4.32053

Tabla 20. Evaluación ANOVA de las plántulas que sobrevivieron durante el proceso de establecimiento *in vitro* de bambú

Fuente	Suma Cuadrados	de	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8312.95		3	2770.98	80.37	0.0000
Intra grupos	413.745		12	34.4787		
Total (Corr.)	8726.69		15			

La tabla ANOVA descompone la varianza de SOBREVIVENCIA en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 80.3679, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de SOBREVIVENCIA entre un nivel de TRATAMIENTO y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 21. Pruebas de Rangos múltiples realizada para sobrevivencia, durante el establecimiento *in vitro* de bambú. Semuestran los datos de acuerdo con cada tratamiento en estudio.

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
BLANCO	4	2.5	X
T1	4	25.0	X
T2	4	35.8325	X
T3	4	65.8325	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
BLANCO - T1	*	-22.5	9.04652
BLANCO - T2	*	-33.3325	9.04652
BLANCO - T3	*	-63.3325	9.04652
T1 - T2	*	-10.8325	9.04652
T1 - T3	*	-40.8325	9.04652
T2 - T3	*	-30.0	9.04652

Tesisbiotec

por Yurico Alejos Torres Luciana Canchis Coppola

Fecha de entrega: 25-ago-2022 01:37a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1886784118

Nombre del archivo: Tesis_de_Luciana_y_Yurico_-_modificado_13_06_22_2.pdf (1.19M)

Total de palabras: 13427

Total de caracteres: 69156

18%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

ENCONTRAR COINCIDENCIAS CON TODAS LAS FUENTES (SOLO SE IMPRIMIRÁ LA FUENTE SELECCIONADA)

13%

★ repositorio.lamolina.edu.pe

Fuente de Internet

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo