

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Guadua angustifolia* var. *bicolor*
A PARTIR DE MICROESTACAS

EDEN SANIN SUÁREZ HERNÁNDEZ
LUIS EMERSON TOVIO ANAYA

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2005

**PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Guadua angustifolia* var. *bicolor*
A PARTIR DE MICROESTACAS**

**EDEN SANÍN SUÁREZ HERNÁNDEZ
LUIS EMERSON TOVIO ANAYA**

**Trabajo como requisito para optar al título de Biólogo con énfasis en
Biotecnología**

Director:

JAVIER DARIO BELTRÁN HERRERA Ph.D.

Asesor:

ROBINSON SALAZAR DÍAZ

B.Sc. Biólogo con énfasis en Biotecnología

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO**

2005

Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en este trabajo. Artículo 12 Resolución 02 de 2003.

HOJA ACEPTACIÓN

Firma del primer Jurado

Firma del segundo Jurado

Firma del Decano

Firma del tercer Jurado

Firma del Director

Firma del presidente del Jurado

Nota de aceptación

Sincelejo, 25 de noviembre de 2005.

DEDICATORIA

Al Dios Todopoderoso , A la memoria de Abel Suárez P y Berta Garay, A Doris Hernández B, Jairo Suárez G,(mis progenitores). Levy, Jairo M. y Linda mis hermanos y a Veronica Andrea.

EDEN SANIN

DEDICATORIA

A DIOS, por su infinito amor.

A mis padres: Doris Anaya y Emerson Tovio. Mis hermanos: Sofía, Katherine, Indira y Daniel.

A mi sobrino Oscar Daniel.

A la memoria de: mi abuelo Francisco Tovio; mi hermano Oscar David; mi tío Carlos Humberto "Papi" Anaya y mi abuela Sofía Noble.

LUIS EMERSON

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos por su respaldo, a Luis Emerson, Luis Santiago Ruiz P, Hernando Gomez F, Geovany Montes, Pedro Blanco ,Pedro Martinez , A los maestros Jaime Niño y Oscar Mosquera quienes pese a la distancia estuvieron cerca, a la doctora Ximena Londoño, a Maria Eugenia , a Liz Yajaira Perez M. “La Flaca” ,a Adelmo Alvarez, Everardo Martinez ,a los amigos Oscar Caldera, Leonar (ojos), Viviana Barrios, Maria Angelica T, Antonio (pirro), Milton Manuel M, Rafael O ,Edilsa, Lelia, Dary Cardenas, Libardo, Katia, Beatriz B, Gloria Ramirez, Luis Gregorio (el chichi), Remberto J, Tanya, Carmen, Ember, Garrido, Lisandro, Oscar J, Janeth, Jose Santander, Jose Viera, Jose David, Gamer, Lorena Acosta, Cesar, Jorge B, Maria Luisa, Humberto, Roger, Norma, Rosana, Paola, Rosa, Anais, Jose Suarez, Yina, Alex Bohórquez, Harold, Wuilliams, Gloria, Marisella, Robinson S, Yiris, Fredys E, Edwin M, y a todas las personas que en este momento escapan a mi memoria pero que de igual forma fueron un apoyo valioso, a la música que siempre está conmigo GRACIAS TOTALES.

EDEN SANIN

AGRADECIMIENTOS

A todos mis familiares por su desinteresada ayuda y colaboración, en especial a Tía Isela Anaya y Tío Ramiro “acho” Tovio.

A los Maestros Oscar Mosquera y Jaime Niño, Dra. Ximena Londoño, Hernando Gómez, Giovanni Montes, Pedro Martínez, Luis Santiago Ruíz, Javier Beltrán H., Oscar Caldera, Liney Jaraba Díaz, Familia Viera Martínez, Familia Martínez Suárez.

A todas (os) mis compañeras (os): Eden Suárez, las trillizas j...: Rosana García, Carmen Ramírez, Tania Sierra. Beatriz Beltrán, Ember Arias, Harold Rico, Edilsa Arrieta, Los Garridos (Alberto Garrido, Humberto Benitez, María Luisa Fuentes); Javier Tous, Roger Viera, Norma Pérez, Paola Pereira, Rosa, Gloria Sánchez, Marisella Monterroza, José Suárez, Yina Suárez, Rafael Ortega, Remberto Jaraba, Victor Bohórquez.

A todas las personas que debo especial gratitud y que por motivos espacio-temporales escapan a mi memoria y no están registradas en el presente documento, a ellas les pido disculpas y comprensión.

LUIS EMERSON

RESUMEN

La guadua es un recurso que ha estado estrechamente ligado con las actividades humanas desde mucho antes de la llegada de los españoles. Es un recurso natural renovable y de buena disponibilidad y con una gran versatilidad para actividades como las artesanías y la construcción. Y, que hoy día presenta utilidad a nivel industrial, características estas no igualadas por otra especie vegetal. Representando esto, una importante solución a nivel socioeconómico y que contribuye además favorablemente en la problemática social del campo. En zonas rurales de los municipios de Sincelejo y Corozal predomina una especie de guadua conocida vulgarmente como: caña o caña brava (*Guadua ampliexifolia* Presl.) perteneciente a la familia *Poaceae*. A raíz de la gran demanda de este recurso se ha mermado considerablemente las plantaciones silvestres de caña brava, en virtud de ello, se hace necesario aplicar acciones que tiendan a mejorar de la manera más rápida y eficaz posible la reforestación de dichas plantaciones, acelerando los procesos de multiplicación del material vegetal con tecnologías que lo permitan rápida y eficazmente como el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Para este propósito se evaluaron diferentes protocolos de desinfección, siendo el más adecuado aquel en el cual el hipoclorito de sodio (NaClO) tenía una concentración de 1,12% y un tiempo de exposición de 30 minutos, con un porcentaje de explantes no contaminados de alrededor del 75%. En la etapa de multiplicación se evaluó el efecto de los reguladores de crecimiento: BAP (bencilaminopurina) y ANA (ácido α -naftalenacético), dando un mayor porcentaje de brotación cuando se utiliza una concentración de 4,0 mg.L⁻¹ de BAP y 0,0 mg.L⁻¹ de ANA. En la etapa de enraizamiento se evaluó el efecto de IBA (ácido indolbutírico) y de ANA, presentando mejores resultados en la inducción y desarrollo de raíces un rango de ANA de 3,0 a 9,0 mg.L⁻¹. Los anteriores resultados confirman la posibilidad y el potencial de la propagación *in vitro* de la caña brava en el Departamento de Sucre.

PALABRAS CLAVES: Guadua, micropropagación, cultivo *in Vitro*, morfogénesis

ABSTRACT

The guadua is a plant closely associate to human activities yet before the Spaniards arrival. It is a renewable resource with high demand in industrial, construction and artesanal activities as any other woody plant. Therefore, it is playing very important socioeconomical role for country ride people. In rural areas of Sincelejo and Corozal municipalities there is a predominant specie of Guadua, known as "caña brava" (*Guadua ampiexifolia* Presl.) belonging to the Poaceae family. Due to it's great demand, the wild or natural plantations have decreased dramatically, almost to extinction. So, it is necessary to protect and renew these plantations, acceleration the multiplication process of planting material, throughout the application of new technologies like tissue culture. In order to evaluate the potential of multiplication of guadua some protocols were applied for disinfection and *in vitro* multiplication. Disinfection with sodium hypochlorite (NaClO) at 1,12% for 30 minutes give 75% of non contaminated material. *In vitro* multiplication in media with 4,0 mg.L⁻¹ BAP and 0,0 mg.L⁻¹ of ANA give of best results. Similarly, induction of roots showed the best growth in the range of 3 mg.L⁻¹ to 9 mg.L⁻¹ of ANA. These results confirm the possibility and great potential for the *in vitro* propagation of "caña brava" in the Department of Sucre.

KEYWORDS: Guadua, micropropagation, tissue culture, morphogenesis.

CONTENIDO

	Págs.
1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. ESTADO DEL ARTE	5
3.1 Descripción botánica de la planta	5
3.2 Clasificación taxonómica	5
3.3 Distribución geográfica	6
3.4 Ecología	6
3.5 Generalidades sobre el cultivo de tejidos vegetales	7
3.5.1 Etapas de la micropropagación	8
3.5.2 Manejo del cultivo <i>in vivo</i> de la guadua	10
3.6 Propagación <i>in vitro</i> de la guadua	11
4. METODOLOGÍA	14
4.1 Localización geográfica	14
4.2 Selección y predesinfestación del material vegetal	14
4.2.1 Desinfestación del material vegetal procedente de campo	15
4.2.2 Desinfestación del material vegetal procedente del invernáculo	15
4.3 Etapa de multiplicación	16
4.4 Etapa de enraizamiento	17
4.5 Diseño experimental	18
4.5.1 Población	18
4.5.2 Número repeticiones	18
4.5.3 Unidad experimental	19
4.5.4 Indicadores	19
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1 De la obtención de brotes a partir de chusquines de <i>Guadua amplexifolia</i> Presl.	21
5.2 De la desinfestación del material vegetal procedente de campo	22
5.3 De la desinfestación del material vegetal procedente del invernáculo	23
5.4 De la etapa de multiplicación	24
5.5 De la etapa de enraizamiento	27

6. CONCLUSIONES	30
7. RECOMENDACIONES	32
8. BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXOS	36

LISTA DE TABLAS

	Págs
Tabla 1. Rasgos genealógicos para la clasificación de la guadua	5
Tabla 2. Tratamientos ensayados en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Guadua angustifolia</i> Var. <i>bicolor</i>	16
Tabla 3. Tratamientos ensayados en la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Guadua angustifolia</i> Var. <i>bicolor</i>	17
Tabla 4. Indicadores en la etapa de desinfestación	19
Tabla 5. Indicadores en la etapa de multiplicación	19
Tabla 6. Indicadores en la etapa de enraizamiento	20
Tabla 7. Resultados promedios obtenidos de los chusquines de <i>Guadua amplexifolia</i> Presl. en condiciones semicontroladas	22
Tabla 8. Resultados promedios de la obtención de brotes múltiples en la etapa de multiplicación	24
Tabla 9. Resultados promedios de la inducción y desarrollo de raíces de <i>Guadua angustifolia</i> Var. <i>bicolor</i>	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Múltiples brotes de <i>Guadua angustifolia</i> <i>Var. bicolor</i>	25
Figura 2. Proliferación de hojas verdes en la etapa de multiplicación	26
Figura 3. Inducción de raíces en la etapa de enraizamiento	28
Figura 4. Elongación de la raíz principal	29

LISTA DE ANEXOS

	Págs.
ANEXO 1. FORMATOS DE EVALUACIÓN	37
ANEXO 1.1 Inducción de brotes <i>in vivo</i> a partir de chusquines en condiciones semicontroladas	37
ANEXO 1.2 Etapa de desinfestación de explantes	38
ANEXO 1.3 Etapa de multiplicación	39
ANEXO 1.4 Etapa de enraizamiento (Experimento 1)	40
ANEXO 1.5 Etapa de enraizamiento (Experimento 2)	41
ANEXO 2. Componentes básicos del medio Murashige y Skoog (1962) para preparar 1 litro (1 L)	42
ANEXO 3. PROTOCOLOS ENSAYADOS EN LA ETAPA DE DESINFESTACIÓN	43
ANEXO 3.1 Protocolo 1	43
ANEXO 3.2 Protocolo 2	44
ANEXO 3.3 Protocolo 3	45
ANEXO 3.4 Protocolo 4	46
ANEXO 3.5 Protocolo 5	47
ANEXO 3.6 Protocolo 6	48
ANEXO 3.7 Protocolo 7	49
ANEXO 3.8 Protocolo 8	50
ANEXO 3.9 Protocolo 9	51
ANEXO 3.10 Protocolo 10	52
ANEXO 4. PRUEBAS ESTADÍSTICAS	53
ANEXO 4.1 Análisis de varianza en la etapa de multiplicación	53
ANEXO 4.2 Análisis de varianza en la etapa de enraizamiento	54

1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La guadua es un bambú espinoso de América, perteneciente a la Familia *Poaceae*, a la Subfamilia *Bambusoideae* y a la Tribu *Bambuseae*. En 1820 el botánico Kunth, constituye este género utilizando el vocablo “*guadua*” con el que los indígenas de Colombia y Ecuador se referían a este bambú. Este género que reúne aproximadamente 30 especies, se puede distinguir de los demás principalmente por los tallos robustos y espinosos, por las bandas de pelos blancos en la región del nudo y por las hojas caulinares de forma triangular. (Londoño, 2002).

La Guadua es de gran importancia para la comunidad porque presenta características de gran valor. Entre estas por ser una planta perenne, de alto rendimiento de madera por hectárea, por alcanzar su madurez (para su aprovechamiento) en tiempo relativamente corto, por su longitud, trabajabilidad y buena durabilidad (Giraldo y Sabogal, 1999). Posee propiedades estructurales sobresalientes, que no sólo superan a las de la mayoría de las maderas, sino que además pueden ser comparadas con las del acero y algunas fibras de alta tecnología. La guadua absorbe gran cantidad de energía, admite grandes niveles de flexión y por lo tanto es ideal para levantar construcciones sismoresistentes, muy seguras y a costos muy bajos (En: <http://www.revista-mm.com/rev34/guadua.htm>).

Sus principales usos están en la construcción de viviendas urbanas y rurales, en la protección de aguas y suelos, en la elaboración de artesanías y de manera especial se caracteriza por su belleza escénica (Pérez, 1980), (Vargas, 1990).

La sobreexplotación de este recurso ha alterado el equilibrio dinámico entre el suelo y la vegetación que lo ocupa, generándose así, procesos erosivos en zonas de microcuencas y cuencas hidrográficas. Según Ponce de León (2000) "La destrucción de la cubierta vegetal genera una disminución de la capacidad de retención y la calidad del agua en las cuencas hidrográficas, la destrucción del equilibrio suelo-vegetación y la pérdida de la biodiversidad".

La extracción acelerada de la caña guadua para múltiples usos, junto a la tala de árboles ha debilitado la protección que brindan las raíces y el follaje a las riberas de los arroyos, provocando en estos procesos erosivos. Este debilitamiento del suelo a su vez, provoca graves alteraciones en el funcionamiento de las cuencas hidrográficas, incrementando la sedimentación en los cauces (Francke, 1996). Igualmente, una explotación forestal a tala rasa en sectores altos de las cuencas, que no cuente con un mínimo de medidas protectoras, puede generar un proceso erosivo que a la larga culmine con la generación de zonas de depositación (de sedimentos) en las zonas bajas de la cuenca, lo que puede traer como consecuencia la verificación de procesos de inundación con mayor recurrencia estadística (Pizarro, 1999).

Por lo anterior se hace necesario recurrir al cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, el cual posee ventajas sobre los sistemas de propagación vegetativa más usuales, entre estos últimos: rizoma solo; rizoma y parte del tallo; sección de tallo con buenas yemas y llenos con agua las dos terceras parte de los entrenudos, ramas jóvenes con o sin fragmento de ramas laterales y segmentos de tallo delgado con su trozo de rizoma basal, con una o varias yemas activas (CAJA AGRARIA, 1990).

Entre las ventajas del cultivo *in vitro* se tienen: se reduce el tiempo de multiplicación, mayor control sobre la sanidad del material que se propaga,

posibilidad de manipular grandes cantidades de plantas en superficies reducidas, a bajos costos y en tiempo económicamente costeables, garantizar la condición fitosanitaria del material propagado, incremento del número de plantas por genotipo y la posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existen pocos individuos (Roca y Mroginski, 1991). Pudiendo así, crear bancos de germoplasma para este género, ya que, los bambúes producen semillas después de largos intervalos de tiempo. Variando los ciclos de una especie a otra entre 30 y 100 años y dado que la fecha exacta en la cual florecen y fructifican no se puede predecir (Manzur, 1986).

Debido a esta problemática, esta investigación pretende contribuir no solo a resolver problemas de tipo ecológico, sino también de tipo socioeconómico, ya que la guadua o caña no solo se utiliza para la construcción de casas de bahareque, sino que también se utiliza en la fabricación de artesanías, instrumentos musicales, puentes, papel, obras de ingeniería, entre otros (Proyecto U.T.P.-GTZ, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer la propagación *in vitro* de *Guadua angustifolia* var. *bicolor* a partir de microestacas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar el proceso de desinfección óptimo de las microestacas de *Guadua angustifolia* var. *bicolor* y de *Guadua amplexifolia* Presl.
- ❖ Evaluar diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento para la multiplicación de los explantes, inducción y desarrollo de raíces.

3. ESTADO DEL ARTE

3.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA PLANTA.

Planta arborescente rizomatosa, cespitosa, con culmos huecos, estípulas abrazadoras, triangulares, pelúcidas hacia fuera y glabras internamente; entrenudos marcados con corteza amarilla con bandas longitudinales verdes, ramas arqueadas sin espinas, ramitas alternas delgadas: hojas alternas simples con peciolo envainador de 3-8 cms., peciolo libre corto, limbo lanceolado, base redondeada, ápice acuminado, borde liso, inflorescencia en espiga comprimida amarilla, fruto en cariósides con cascarilla amarilla y semilla negra (En: www.eco-index.org/search/pdfs/299report_5.pdf+descripcion+bot%c3%A1nica%28guadua&hl=es&ie=UTF-8).

3.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Tabla 1. Rasgos genealógicos para la clasificación de la guadua. (En: <http://www.gadua.biz/paq/taxon.html>)

RANGO	TAXONOMÍA
Reino	Vegetales
División	Espermatófita
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Liliópsidas/Monocotiledónea
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales/Glumiflorales
Familia	Gramineae/Poaceae
Subfamilia	Bambusoidae
Supertribu	Bambusodae
Tribu	Bambuseae
Subtribu	Guaduinæ
Género	Guadua
Especie	Angustifolia
Variedad	Bicolor
Forma	Cebolla, Macana, Rayada, etc.

3.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El género *Guadua* reúne las especies más grandes y económicamente más importantes de América tropical; es endémico del Nuevo Mundo con aproximadamente treinta (30) especies que se distribuyen desde México (22° 55' N), hasta el norte de Argentina (30° S), y desde el nivel del mar hasta un máximo de 2.800 m., prefiriendo las bajas altitudes (0 a 1500 m) y las regiones húmedas. La temperatura parece ser el factor limitante en su distribución latitudinal y altitudinal. Se sabe que cerca de la línea ecuatorial no soporta temperaturas por debajo de 0°C con duraciones mayores de seis (6) horas diarias (Londoño, 2002).

3.4 ECOLOGÍA

La *guadua* por su desarrollo es una planta social, de grandes beneficios para el ambiente y el hombre y sus productos actúan a manera de reguladores térmicos y acústicos cuando son empleados como elementos integrales de la construcción de vivienda; es de rápido crecimiento, los rizomas y las hojas en descomposición conforman en el suelo similares de esponjas, evitando que el agua fluya de manera rápida y continua, con lo cual se propicia la regulación de los caudales.

El sistema entretrejido de rizomas y raicillas originan una malla de grandes dimensiones que le permite comportarse como muros biológicos eficientes de contención que controlan la socavación lateral y amarran fuertemente el suelo, evitando la erosión y haciendo de la *guadua* una especie protectora.

De los aportes más valiosos de la especie es de mencionar su comportamiento como una bomba de almacenamiento de agua cuyo funcionamiento es el principio de vasos comunicantes, absorbiendo

importantes volúmenes de agua que almacena tanto en su sistema rizomático como en el tallo.

Es de resaltar la purificación que realiza en el ambiente la guadua y más agradable a la vista cuando los guaduales ondean en el paisaje, dando una sensación de descanso visual y de tranquilidad espiritual ya que su silueta es única, contrastando con las demás estructuras del medio. (En: www.gaduaalomodemula.8m.com/ecologia.htm).

La guadua cumple una función extraordinariamente importante desde el punto de vista ecológico, tanto por su rol en la dinámica regenerativa de las especies arbóreas y faúnicas, así como por la protección que brinda al suelo contra fuertes alteraciones como incendios y talas (Donoso, 1997). Las características de la raíz, su follaje tupido y el peso relativamente liviano de su tallo hacen de esta especie una de las mejores para utilizar en la protección de cuencas hidrográficas y en estabilización de suelos (Alvarez y Ramírez, 1998).

3.5 GENERALIDADES SOBRE EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

La micropropagación o cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una técnica que permite obtener nuevas plantas a partir de un segmento de tejido proveniente de una planta seleccionada mediante el cultivo en condiciones estériles y controladas (Prehn *et al.*, 1999a).

Esta técnica es muy apropiada por la rápida multiplicación y obtención de individuos vegetales, dado el alto grado de control de las características hormonales del medio de cultivo, así como las condiciones asépticas en las que se desarrolla la técnica.

Esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación; siendo las más importantes:

- Incremento del tiempo de plantas por genotipo
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga
- Posibilidad de manipular grandes cantidades de plantas en superficies reducidas.
- Reducción del tiempo de multiplicación
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad deseable de la cual solo existan pocos individuos (clonación).
- Garantizar su condición fitosanitaria
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, facilitando trámites aduaneros y cuarentenarios (Roca y Mroginski, 1991).

3.5.1 Etapas de la micropropagación

Según Prehn *et al.*, (1999a) se han desarrollado protocolos específicos de micropropagación en muchas especies vegetales, los cuales poseen etapas claramente diferenciadas que son comunes entre estos. Por esta razón, en forma general, se ha dividido el proceso en 5 etapas, las cuales son:

FASE 0: Se refiere a lo que ocurre antes de que el cultivo *in vitro* comience. Esto implica el pretratamiento correcto del material inicial, manteniéndolo, en la medida de lo posible, libre de enfermedades.

FASE 1: Involucra el diseño del medio de cultivo para estimular la formación de yemas o la iniciación de los brotes y su desarrollo, o para estimular la

ruptura precoz de las yemas axilares y su desarrollo. En esta etapa se utilizan reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas.

Ambos reguladores son necesarios para la formación de brotes y raíces en los explantes utilizados, dependiendo de la relación entre estas en el medio de cultivo. Ocasionalmente, bajos niveles de ácido giberélico pueden ser usados, lo cual permite una extensión de la fase de crecimiento.

FASE 2: Involucra el incremento del nivel de producción de yemas o brotes laterales. Esto último se produce generalmente por un aumento en el nivel de citoquininas. Sin embargo, muchas veces es preferible optar por realizar una multiplicación lenta y usar bajos niveles de citoquininas. Además, el uso de altas concentraciones de citoquininas favorece el proceso de vitrificación del explante, donde este toma un aspecto vidrioso e hiperhidratado con baja sobrevivencia *ex vitro*.

FASE 3: Involucra el uso de auxinas para estimular la formación de raíces y la formación de una planta completa.

FASE 4: Se denomina también "aclimatación", y consiste en el establecimiento de la plántula *ex vitro* en condiciones de invernadero.

Por otra parte, un aspecto de vital importancia en la obtención de las plántulas para el cultivo de tejidos es la juvenilidad de las mismas. Por ello, es esencial en este tipo de micropropagación estandarizar los componentes del medio de cultivo, especialmente los reguladores de crecimiento, a fin de obtener un clon genéticamente idéntico al árbol del que proviene y que además presente características juveniles (Prehn *et.al.*, 1999b).

3.5.2 Manejo del cultivo *in vivo* de la guadua

Según CAJA AGRARIA (1990), las poblaciones naturales de guadua han sido explotadas en forma antitécnica y sin ningún control. Algunos pasos a seguir en el cultivo y manejo de poblaciones de guadua son los siguientes:

* Siembra. El material vegetativo o semilla se puede llevar en bolsas o eras de transplante. Durante los primeros 8 o 15 días debe permanecer en penumbra alta y luego al sol. Debe proporcionársele abundante riego. Entre los 3 y 5 meses se puede plantar en el sitio definitivo.

* Distancia de siembra. Se debe sembrar de 3 a 4,5 m en cuadro, solo o con cultivos intercalados como frijol y maíz. En este caso debe mantenerse el suelo libre de malezas y sombreado para favorecer el desarrollo del guadua.

* Edad de corte. Se debe tener en cuenta el uso que se le va a dar, ya sea en construcción o artesanía.

La edad de corte oscila entre los 2 y los 6 años.

Época de corte en menguante, época de savia descendente. Las maderas cortadas en creciente se secan con dificultad y duran poco, porque están muy sujetas a la carcoma.

* Prácticas de manejo. El mayor rendimiento del guadua se obtiene efectuando los cortes por el sistema de entresaca de tallos maduros o hechos. Los cortes totales son los menos indicados.

El número de tallos a cortar varía del 10 al 50%, de acuerdo con la densidad. Siempre se deben buscar los tallos maduros. El guadua debe quedar con una densidad que permita a los distintos tallos servir de apoyo unos a otros, en caso de que se presenten fuertes vientos.

Se aconseja efectuar los cortes en época seca, ya que la lluviosa no es conveniente. Un guadua con promedio de 7.000 tallos por hectárea puede rendir 2.800 a 3.200 tallos anualmente, lo cual da un índice de las posibilidades de este material para su industrialización.

3.6 PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE LA GUADUA.

La guadua es una de las mejores especies en la recuperación de suelos y para la retención de agua. Las técnicas de cultivo de tejidos se han utilizado en la propagación de especies forestales ampliamente, en la guadua se han desarrollado tanto a nivel nacional como internacional una serie de estudios sobre el tema:

En el proceso de desinfección *in vitro* se han reportado los siguientes tratamientos: Para la desinfección de yemas axilares de *Guadua angustifolia* Kunth se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% durante 10 minutos; para el caso de las microestacas el tratamiento desinfectante más apropiado fue el de hipoclorito de sodio al 1,5% durante 5 minutos. Para controlar la oxidación el ácido ascórbico con una concentración de 60 ppm y tiempo de inmersión de 10 minutos (Montes, 1998).

Para la etapa de establecimiento *in vitro* se han utilizado los siguientes medios nutritivos y suplementos: sales Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con: 30 g.L⁻¹ de sacarosa; 4,5 g.L⁻¹ de agar; 2 mg.L⁻¹ de glicina; 100 mg.L⁻¹ de mioinositol; 0,5 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico; 0,5 mg.L⁻¹ de piridoxina y 0,5 mg.L⁻¹ de tiamina en explantes de *Guadua angustifolia* Kunth. (Manzur, 1986).

Nadgauda *et al.*, (1997) utilizaron el medio (Murashige y Skoog, 1962) (MS) suplementado con 0,2 mg.L⁻¹ de 6-bencilaminopurina, adicionando 5% de agua de coco y 2% de sucrosa en frascos de 250 mL para la inducción de plántulas a partir de yemas axilares de *Dendrocalamus strictus*.

Giraldo y Sabogal, (1999) trabajaron con explantes (segmentos nodales) de *Guadua argustifolia* Kunth, quienes emplearon medio (MS) suplementado con sacarosa 30 g.L⁻¹; agar 4,5 g.L⁻¹; glicina 2 mg.L⁻¹; ácido nicotínico 0,5 mg.L⁻¹; piridoxina 0,5 mg.L⁻¹; tiamina 0,5 mg.L⁻¹; ácido naftalenacético 0,5 mg.L⁻¹; β-bencilaminopurina 0,5 mg.L⁻¹ y mioinositol 50 mg.L⁻¹.

En la fase de multiplicación se han reportado los siguientes tratamientos: El mejor medio para inducir múltiples retoños a partir de brotes jóvenes de *Bambusa nana* fue el medio basal MS suplementado con 20 μM (4,5 mg.L⁻¹) de BAP y concentraciones de ANA en un rango de 0-20 μM (0 - 3,72 mg.L⁻¹) (Pattanavibool y Ramyarangsi, 2000).

Marulanda *et al.*, (2005) para la multiplicación de *Guadua argustifolia* Kunth reportan que el medio de cultivo en el que se presentaron mejores respuestas estaba compuesto por las sales y vitaminas MS suplementado con 2,5 mg.L⁻¹ de 6 BAP, 10 mg.L⁻¹ de mioinositol, 30 g.L⁻¹ de sacarosa y gelificado con 2,5 g.L⁻¹ de gelrite.

Ramanuja *et al.*, (1991) produjeron múltiples explantes de *Bambusa arunainacea* a partir de yemas axilares utilizando BAP y 2,4-D en un rango de concentración de 1 a 25 mg.L⁻¹.

Para la fase de enraizamiento se reportan los siguientes tratamientos: para el enraizamiento de explantes de *Bambusa nana* el mejor tratamiento fue el medio basal MS suplementado con 100 μM (8,9 mg.L⁻¹) de ANA, sacarosa al

2%, 25 días antes de transferir las plántulas a medio MS sin reguladores de crecimiento (Pattनावibool y Ramyarangsi, 2000).

Nadgauda *et.al.*,(1997) emplearon en explantes de *Dendrocalamus strictus* medio semi-líquido MS suplementado con 2% de sacarosa y auxina (IAA, IBA, ANA) en un rango de concentración de 0,05 a 5 mg.L⁻¹.

4. METODOLOGÍA

4.1 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA

Esta investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre (L.C.T.V.-US) sede Puerta Roja, Sincelejo (Sucre), cuyas coordenadas geográficas son: 9° 58' 23,8" latitud Norte y 74° 58' 58,4" longitud Oeste de Greenwich, con una altitud de 200 m.s.n.m., con 29°C de temperatura media mensual, humedad relativa promedio de 75% y precipitación media mensual de 1100 mm. Barros (2002).

4.2 SELECCIÓN Y PREDESINFESTACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se colectaron muestras (microestacas) de plantas de *Guadua amplexifolia* Presl. (Londoño, 2005) y *Guadua angustifolia* var. *bicolor* que presentaron un alto grado de conservación y por lo menos 1,5 años de edad. Las primeras se colectaron en zona rural del municipio de Sincelejo; las segundas en el Campus de la Universidad de Sucre, sede Puerta Roja. También se colectaron **chusquines** (el término CHUSQUÍN deriva del parecido morfológico existente entre los primeros estados de desarrollo de una plántula de Chusque con un brote basal del rizoma de la guadua) de plantas de *Guadua amplexifolia* Presl. en zona rural del municipio de Corozal. Estos chusquines fueron lavados con detergente comercial al 5% durante 20 minutos y enjuagados con agua del grifo. Seguidamente fueron sumergidos en solución de benoagro® al 2% durante 30 minutos. Luego fueron dispuestos sobre papel absorbente por una hora para descartar excedente de benoagro®. Finalmente fueron colocados en frascos de 250 mL con 150 mL de agua estéril y se establecieron por dos (2) meses bajo condiciones semicontroladas de temperatura: 26 +/- 2°C; humedad relativa de 45-60% y una intensidad lumínica de 67 +/- 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en el invernáculo del

(L.C.T.V.-US) para la consecución de microestacas para la fase *in vitro*. Los registros de los datos se realizaron semanalmente durante 56 días y se consignaron en los respectivos cuadros. (ver Anexo 1).

4.2.1 Desinfestación del material procedente de campo

Para la desinfestación de microestacas de *Guadua amplexifolia* Presl. y *Guadua angustifolia* var. *bicolor* procedentes de campo se ensayaron varios protocolos (Anexo 3.1 a 3.10). Protocolos 7 y 8 fueron modificados a partir de protocolo de desinfección suministrados por Jaime Niño y Oscar Mosquera (2004) en todos, se evaluó la actividad del hipoclorito de sodio (NaClO).

Una vez realizado el respectivo protocolo de desinfestación a las microestacas, se procedió a obtener los explantes con un tamaño de 1,0 a 1,5 cm. de longitud aproximadamente en área aséptica (cabina de flujo laminar), después fueron establecidos en frascos de 120 mL con 16 mL (aproximadamente) de medio básico Murashige y Skoog (MS)(1962)(Anexo 2). Luego se transfirieron al cuarto de incubación bajo las siguientes condiciones ambientales: temperatura promedio de 27 +/- 2°C, una intensidad lumínica de 50 +/- 5 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{S}^{-1}$ durante 12 horas/luz y una humedad relativa del 45-60%. Estos fueron evaluados cada 3 días durante 21 días, los datos se registraron en las tablas respectivas que se encuentran en el anexo 1.2.

4.2.2 Desinfestación del material vegetal procedente del invernáculo

Una vez que los chusquines generaron brotes de 2,5 a 5,0 cms estos fueron colectados en un recipiente estéril y transferidos al (L.C.T.V.-US). En la desinfestación de estos brotes (microestacas) de *Guadua amplexifolia* Presl.

provenientes del invernáculo se ensayó el protocolo (Anexo 3.4). Y se evaluó la actividad del hipoclorito de sodio (NaClO).

Al obtener explantes (a partir de chusquines) con un tamaño aproximado de 0,5 a 1,0 cm., estos fueron establecidos en frascos de 120 mL con 16 mL de medio básico (MS) y transferidos al cuarto de incubación bajo las mismas condiciones a las reportadas para el material vegetal procedente de campo. Este material fue evaluado durante una semana, los datos se registraron en los cuadros respectivos (Anexo 1.2).

4.3 ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

Cuando se obtuvo el material vegetal suficiente procedente de la etapa de desinfestación. Y, cuando los brotes de esta etapa alcanzaron un rango de longitud entre 3,0 y 5,5 cms, fueron transferidos a frascos de 120 mL con 16 mL de medio básico (MS) de multiplicación (Manzur, 1986) enriquecido con: 30 g.L⁻¹ de sacarosa; 4,5 g.L⁻¹ de agar; 2 mg.L⁻¹ de glicina; 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol; 0,5 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico; 0,5 mg.L⁻¹ de piridoxina y 0,5 mg.L⁻¹ de tiamina. El pH fue ajustado en un rango de 5,7 a 5,8 y se evaluó el efecto de 6-bencilaminopurina (BAP) y de ácido α -naftalenacético (ANA) en diferentes concentraciones como lo indica la siguiente Tabla.

Tabla 2. Tratamientos ensayados en la etapa de multiplicación *in vitro* de *Guadua angustifolia* var. *bicolor*.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento	
	Concentración de BAP (mg.L ⁻¹)	Concentración de ANA (mg.L ⁻¹)
B0	0,0	0,00
B1	2,0	0,25
B2	4,0	0,00
B3	4,0	0,25
B4	8,0	0,00
B5	8,0	0,25

Una vez que los frascos fueron sellados y rotulados, se transfirieron al cuarto de incubación, para ser evaluados semanalmente durante 56 días, los datos se consignaron en los cuadros respectivos (Anexo 1.3).

4.4 ETAPA DE ENRAIZAMIENTO

Al obtener brotes múltiples de la etapa de multiplicación con un rango de longitud de 3,0 a 5,0 cms, se realizó la individualización de los brotes, los cuales se sembraron en frascos de 120 mL con 16 mL de medio (MS) enriquecido con: 30 g.L⁻¹ de sacarosa; 4,5 g.L⁻¹ de agar; 2,0 mg.L⁻¹ de glicina; 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol; 0,5 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico; 0,5 mg.L⁻¹ de piridoxina y 0,5 mg.L⁻¹ de tiamina. Ajustando el pH en un rango de 5,7 a 5,8. Se evaluó la acción de los reguladores de crecimiento: ácido indolbutírico (IBA) y ácido α -naftalenacético (ANA) según lo muestra la siguiente Tabla.

Tabla 3. Tratamiento ensayados en la etapa de enraizamiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* var. *bicolor*.

Tratamiento	Experimento 1: Concentración de IBA (mg.L ⁻¹)
IB1	1,0
IB3	3,0
IB9	9,0

Tratamiento	Experimento 2: Concentración de ANA (mg.L ⁻¹)
AN1	1,0
AN3	3,0
AN9	9,0

Los frascos con un respectivo brote fueron sellados y rotulados. Luego se transfirieron al cuarto de incubación para finalmente ser evaluados durante 56 días, los registros de los datos se consignaron en los cuadros respectivos (Anexo 1.4 y 1.5).

4.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

En esta investigación se utilizó un diseño experimental completamente al azar en todas sus etapas, a los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza y una Prueba Tukey en las etapas de multiplicación y enraizamiento para determinar en cual de los tratamientos se obtienen los mejores resultados.

4.5.1 Población

El número de unidades experimentales (explantes) utilizadas en esta investigación fue de: **715**. Distribuidas por etapas así:

Etapa de desinfestación: 650

Etapa de multiplicación: 30

Etapa de enraizamiento: 35

4.5.2 Número de repeticiones

En la etapa de desinfestación el número de repeticiones varió según el protocolo empleado.

Para la etapa de multiplicación y enraizamiento fue de cinco (5) repeticiones.

4.5.3 Unidad experimental

Como unidad experimental se empleó un explante por frasco de cultivo en todas las etapas.

4.5.4 Indicadores

Tabla 4. Indicadores en la etapa de desinfectación

Indicadores / variable dependiente	Variable Independiente
Número explantes contaminados por hongos	Concentración de NaClO. Tiempo de exposición de los explantes a NaClO.
Número de explantes contaminados por bacterias	
Número de explantes necrosados	
Longitud brote (cm)	

Tabla 5. Indicadores en la etapa de multiplicación

Indicadores / variable dependiente	Variable Independiente
Número de brotes / explante	Concentración de BAP / ANA
Longitud promedio de brotes (cm)	
Número de hojas verdes	

Tabla 6. Indicadores en la etapa de enraizamiento

Indicadores / variable dependiente	Variable Independiente
Número de raíces individuales	Concentración de IBA y ANA
Longitud raíz principal (cm)	
Número de hojas verdes	
Número de brotes	
Longitud de brotes (cm)	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DE LA OBTENCIÓN DE BROTES A PARTIR DE CHUSQUINES DE *Guadua amplexifolia* Presl.

Los chusquines de *Guadua amplexifolia* Presl. empiezan su desarrollo con la formación de brotes, los cuales a los 25 días alcanzaron un promedio de 2,60 brotes/chusquín y una longitud promedio de 2,7 cm. Posteriormente, al final de la primera semana empiezan a desarrollarse nuevas raíces, las cuales a los 25 días alcanzaron una longitud promedio de 7,4 cm; un promedio de 4,5 raíces/chusquín y 3,5 hojas/brote.

A los 56 días los chusquines de *Guadua amplexifolia* Presl. presentaron un promedio de 3,1 brotes/chusquín, una longitud promedio de brotes de 5,5 cm. y una longitud promedio de raíces de 16,4 cm., un promedio de 4,6 raíces/chusquín y 5,5 hojas/brote.

El 100% de los chusquines desarrolló brotes y raíces. Sin embargo, aproximadamente el 20% de los chusquines presentó hojas cloróticas y/o con manchas blancuzcas, lo cual posiblemente sea causado por cambios fisiológicos inducidos bajo condiciones *in vitro*. Los explantes cultivados en condiciones *in vitro* aunque se contaminaron, el crecimiento del explante no cesaba, es así como se presentaron brotes con un crecimiento óptimo a pesar de presentar una contaminación muy notable.

Los resultados obtenidos para el establecimiento de chusquines de *Guadua amplexifolia* Presl. bajo condiciones semicontroladas en el invernáculo se presentan en la siguiente Tabla.

Tabla 7. Resultados promedios obtenidos de los chusquines de *Guadua amplexifolia* Presl. en condiciones semicontroladas.

Número de brotes / chusquín	Longitud de brotes (cm.)	Número de raíces/ chusquín	Longitud promedio de raíces (cm.)	Número de hojas/brote
3,1	5,5	4,6	16,4	5,5

El establecimiento de chusquines de *Guadua amplexifolia* Presl. (caña o caña brava) bajo condiciones semicontroladas en el invernáculo mostró ser un eficiente método para la producción de material vegetal para la propagación *in vitro*.

5.2 DE LA DESINFESTACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PROCEDENTE DE CAMPO

Se ensayó varios protocolos para la desinfectación de microestacas de *Guadua amplexifolia* Presl. y de *Guadua angustifolia* var. *bicolor*, pero sólo empleando una concentración de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,12% y tiempo de exposición de 30 minutos (Anexo 3.7) se presentó un porcentaje de explantes no contaminados del 75%. En el resto de protocolos y tratamientos el porcentaje de no contaminados fue menor al 75%.

La concentración de hipoclorito de sodio utilizada en este protocolo es similar a la reportada por Montes (1998), la cual fue de 1,5% de NaClO. Sin embargo, el tiempo de exposición al hipoclorito es muy inferior (5 minutos) al utilizado en esta investigación (30 minutos). Aunque desconocemos el porcentaje de explantes no contaminados obtenidos por Montes (1998).

Se ensayó el protocolo 10 (ver Anexo 3.10), en el cual se probó la acción de algunos antibióticos. En este protocolo, el porcentaje de explantes no contaminados fue de 37,5% en todos los tratamientos. Sin embargo, al someter los explantes contaminados por hongos que presentaban brotes provenientes del protocolo 10 nuevamente a la acción del clotrimazol (100% v/v), se obtuvo un porcentaje de no contaminados del 80%. Mientras que, a los explantes contaminados por bacterias y sometidos nuevamente a la acción de gentamicina a 8000 ppm. se obtuvo un porcentaje de explantes no contaminados del 85%. La anterior metodología se desarrolló por sugerencia de Gómez (2005).

5.3 DE LA DESINFESTACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PROCEDENTE DEL INVERNÁCULO

Para las microestacas de *Guadua amplexifolia* Presl. procedentes del invernáculo se ensayó un protocolo (Protocolo 4) (Anexo 3.4) en el cual se obtuvo un porcentaje de contaminación del 100% a la primera semana de efectuada la siembra. Lo anterior contrasta con los resultados reportados por Sehuanes y Florez (2004), donde utilizaron explantes de *Gynerium sagittatum* (Beauv. C.V. "criolla" provenientes de invernáculo y luego propagados *in vitro*, donde el porcentaje de explantes no contaminados fue de alrededor del 75%.

Este resultado sugiere la posibilidad que las plantas de *Guadua amplexifolia* Presl. presenten algún tipo de hongos y/o bacterias endógeno o exógeno que se deben controlar en etapa posterior bajo condiciones *in vitro*.

5.4 DE LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

Para esta etapa se utilizó explantes de la etapa de desinfectación (protocolo 7 y 10). En esta el mejor tratamiento fue B2 (4,0 mg.L⁻¹ de BAP y 0,0 mg.L⁻¹ de ANA) con un promedio de brotes múltiples por explante de 4,0 brotes múltiples a los 56 días de efectuada la siembra, los cuales exhibían un excelente estado de desarrollo en todos los brotes, esto es: crecimiento; color, forma y número de hojas (ver Figura 1). Los promedios de los resultados de esta etapa se ilustran en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados promedios de la obtención de brotes múltiples la etapa de multiplicación.

Tratamiento	Número promedio de brotes	Longitud promedio de brotes (cm)	Número promedio de hojas verdes.
B0	0,8	2,16	0,8
B1	1,4	3,24	2,4
B2	4,0	4,16	2,0
B3	1,6	3,24	1,0
B4	2,2	3,26	2,0
B5	3,0	4,52	3,8



Figura 1. Múltiples brotes de *Guadua angustifolia* var. *bicolor*

El análisis de varianza (Anexo 4.1) mostró que la prueba es estadísticamente significativa al 5% ($\alpha = 0,05$) y altamente significativa al 1% ($\alpha = 0,01$) entre los tratamientos, además se aplicó la Prueba Tukey para establecer el mejor entre estos. Esta arrojó que el tratamiento B2 presenta la mayor producción de brotes múltiples por explante.

La mayor longitud promedio de brotes se obtuvo en el tratamiento B5 (8,0 mg.L⁻¹ BAP y 0,25 mg.L⁻¹) con un promedio de longitud de 4,52 cm. seguido por el tratamiento B2 con un promedio de 4,16 cms. El análisis de varianza ($\alpha = 0,05$ y 0,01) (Anexo 4.1) mostró diferencias significativas. Si embargo, al realizar la Prueba Tukey todos los tratamientos son significativamente iguales.

El mayor número promedio de hojas verdes se presentó en el tratamiento B5 con un promedio de hojas verdes de 3,8 (ver Figura 2) El análisis de varianza ($\alpha = 0,05$ y $0,01$) mostró diferencia significativa. Mediante una Prueba Tukey se estableció que entre este tratamiento y B3 ($4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP y $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA) existe diferencia significativa, pero no con los demás tratamientos. (Anexo 4.1).

La tasa de multiplicación para esta investigación sería de 4,0 brotes por explante, que cultivados durante 7 ciclos de subcultivo de 5 días cada ciclo, sería posible obtener aproximadamente 16,384 plantas en 13,06 meses (392 días). Este valor coincide al reportado por Manzur (1986) y al de Gielis y Oprins (1998), pero con la ventaja para esta investigación que se alcanza en menor tiempo (13,06 meses) en comparación con los 14 meses reportados por Manzur. Convirtiéndose en una alternativa para la consecución de material vegetal de esta planta.



Figura 2. Proliferación de hojas verdes en la etapa de multiplicación

Por lo anterior, se infiere que el mejor tratamiento para número de brotes; longitud promedio de brotes y número de hojas es el B2 (4,0 mg.L⁻¹ BAP). Esta concentración de BAP coincide a la reportada por Manzur (1986) y a la de García y López (2000) y se aproxima a las reportadas por Pattanavibool y Ramyarangsi (2000), quienes utilizaron 4,5 mg.L⁻¹ de BAP y un rango de 0,0 a 3,72 mg.L⁻¹ en *Bambusa nana*. Sin embargo, Manzur utilizó concentración de ANA (0,5 mg.L⁻¹). Para esta investigación los mejores resultados en la obtención de múltiples brotes se presentó cuando no se adicionó ANA al medio. Estas diferencias en cuanto a la concentración de los reguladores de crecimiento puede ser debida a que se trabajó con una especie diferente a las utilizadas por Manzur; García y López (*Guadua argustifolia* kunth.), Pattanavibool y Ramyarangsi (*Bambusa nana*).

5.5 DE LA ETAPA DE ENRAIZAMIENTO

Los explantes obtenidos a partir de múltiples brotes fueron inoculados en un medio MS suplementado con IBA y con ANA. Los resultados promedios del ensayo de enraizamiento se encuentran en la Tabla 9.

El mejor tratamiento para la obtención de raíces fue AN3 con un promedio de número de raíces individuales de 4,2 un promedio de hojas verdes de 4,4 cm y un promedio de longitud de brote de 1,2 cm. (ver Figura 3). En la Figura 4. se puede apreciar la mayor longitud de raíz, no es una raíz principal puesto que las gramíneas no presenta dicha raíz. Además se aprecian manchas en las hojas, lo cual nos sugiere que posiblemente existan deficiencias en los requerimientos nutricionales que no son proveídos por el medio de cultivo.

Tabla 9. Resultados promedios de la inducción y desarrollo de raíces de *Guadua angustifolia* var. *bicolor*.

Tratamiento	Número de raíces individuales	Longitud raíz principal (cm)	Número hojas verdes	Número de brotes	Longitud de brotes
IB-AN(0)	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0
IB1	0,2	2,2	2,2	0,4	0,74
IB3	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0
IB9	0,2	0,04	1,4	0,0	0,0
AN1	0,2	0,06	2,6	0,2	0,12
AN3	4,2	0,74	4,4	0,4	1,2
AN9	2,8	1,58	3,4	0,4	0,78



Figura 3. Inducción de raíces en la etapa de enraizamiento



Figura 4 Elongación de la raíz principal

El análisis de varianza ($\alpha = 0,05$) (Anexo 4.2) no mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Basados en los promedios de los resultados el tratamiento AN3 es quien presenta los valores más altos en la mayoría de los indicadores evaluados. Lo anterior difiere considerablemente a las concentraciones reportadas por Pattanavibool y Ramyarangsi (2000), los cuales utilizaron una concentración de ANA de $8,9 \text{ mg.L}^{-1}$ en *Bambusa nana*. y a las de Nadgauda *et. al.* (1997) los cuales utilizaron (AIA, IBA, ANA) en un rango de concentración de $0,05$ a 5 mg.L^{-1} en *Dendrocalamus strictus*. La variación considerable en relación con las concentraciones de reguladores de crecimiento puede ser debida a las diferentes especies vegetales estudiadas en cada investigación, ya que estas no pertenecen a un mismo género..

6. CONCLUSIONES

- ❖ La persistencia de contaminación en los diferentes ensayos de desinfección puede ser causada por patógenos endógenos, que no son observables en estado silvestre, pero que bajo condiciones de asepsia se hacen notables, haciéndose necesario una posterior desinfección.
- ❖ El establecimiento de chusquines de *Guadua amplexifolia* Presl. en condiciones semicontroladas presentó un desarrollo de brotes y raíces del 100% que podrían ser utilizados para la propagación de este material vegetal.
- ❖ La concentración de hipoclorito de sodio (NaClO) de 1,12% durante 30 minutos resultó ser satisfactoria en la desinfección de explantes procedentes de campo con un porcentaje de aproximadamente el 75% de explantes viables.
- ❖ Aunque hubo un alto grado de contaminación de los explantes provenientes de campo en la etapa de desinfección, estos presentaron una respuesta notable de brotación y desarrollo, infiriéndose que estos contaminantes no son de carácter patogénico.
- ❖ En la etapa de multiplicación la concentración de 4,0 mg.L⁻¹ de BAP resultó ser la más adecuada para la producción de múltiples brotes con un promedio máximo de 4,0 brotes / explante, permitiendo la obtención de aproximadamente 16.384 plantas en un período de 13,06 meses en 7 ciclos de subcultivos.

- ❖ La concentración de ANA en un rango de 3,0 a 9,0 mg.L⁻¹ indujo la formación de raíces en la etapa de enraizamiento de *Guadua argusifolia* var. *bicolor* con un promedio máximo de 4,2 raíces por explante.

7. RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar estudios microbiológicos u otro tipo de pruebas que permitan caracterizar y/o identificar los organismos endógenos.
- ❖ Evaluar la respuesta de los chusquines (procedentes de campo) establecidos en el invernáculo a condiciones *in vivo*.
- ❖ Implementar una metodología que posibilite la aclimatación del material vegetal obtenido *in vitro* a condiciones *in vivo*, involucrando diferentes sustratos.
- ❖ Evaluar la acción de otros reguladores de crecimiento en las diferentes etapas de la propagación *in vitro*.
- ❖ Realizar ensayos de propagación con Medio para Plantas Leñosas (WPM) para determinar tasas de propagación con este medio.

8. BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ, O. y RAMÍREZ, M. (1998) Cultivo de Bambú : El control de las inundaciones en la cuenca baja del Río Chamor. En : Revista Bosques y Desarrollo. No.18-19.

BARROS, G. (2002). Ingeniero Agrícola y profesor de planta, Facultad de Ingeniería. Universidad de Sucre (Comunicación personal)

CAJA AGRARIA. (1990) Almanaque creditario : La guadua. Bogotá : La Caja, p. 82-87.

DONOSO, M. (1997) Chusquea quila : Símbolo de ruina. En : Chile Forestal. Año 22 No. 251; p. 28-29.

FRANCKE, S. (1996) Elementos de ordenación de cuencas y conservación de suelos. En : Chile Forestal, Documento Técnico. No. 101; 12 p.

GARCÍA, S. y LÓPEZ, A. (2000) Manual de biotecnología. Centro Nacional para el estudio del Bambú-Guadua. Armenia: Universidad del Quindío-Corporación Autónoma Regional del Quindío.

GIELIS, J. and OPRINS, J. (1998) Micropropagation of temperate and tropical woody bamboos from biotechnological dream to commercial reality.

GIRALDO, E. y SABOGAL, A. (1999) Una alternativa sostenible : La Guadua, técnicas de cultivo y manejo. Armenia : Corporación Autónoma Regional del Quindío, 192 p.

GÓMEZ, H. (2005) Biólogo con Énfasis en Botánica y profesor catedrático, Facultad de Educación y Ciencias. Universidad de Sucre (Comunicación personal).

HARTMANN, H. y KESTER, D. (1992) Propagación de plantas : Principios y prácticas. 2 ed. México : Continental, 760 p. ISBN. 968-26-0789-2.

LONDOÑO, X. (2002) Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los bambúes del Nuevo Mundo. Santafé de Bogotá, Módulo Guadua. Universidad Nacional de Colombia. Disponible en Internet: <http://www.quadua.org/>

LONDOÑO, X. (2005) Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú-Guadua. (comunicación personal vía correo electrónico).

LONDOÑO, X. Taxonomía de la Guadua. [citado en octubre 16 de 2005] Disponible en Internet: <http://www.quadua.biz/pag/taxon.html>

MANZUR, D. (1986) Cultivo de embriones de *Guadua angustifolia* Kunth in vitro. En : Revista de la Universidad de Caldas. Vol. 7 No. 1-2; p. 26-33.

MARULANDA, M., GUTIÉRREZ, L. Y MARQUÉZ, M. (2005) Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth. Volumen Actual, vol. 27 Número 82/enero-junio 2005. Disponible en Internet [En: <http://matematicas.udea.edu.co/~actubio/Vol27-82Resumen.htm>

MONTES, A. (1998) Evaluación de técnicas para la desinfección de explantes de *Guadua angustifolia* Kunth : Centro Nacional para el Estudio del Bambú-Guadua, Córdoba-Quindío. Armenia. Trabajo de Grado. Universidad del Quindío. Facultad de Ciencias Básicas y Tecnológicas. Programa de Biología y Educación Ambiental. Disponible en Internet : <<http://www.unalmed.edu.co/~befego/adquisiciones/anexo3.htm>>.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* (1962). 92-473 p

NADGAUDA, R.S.; JOHN, C.K.; JOSHI, M.S.; PARASHARAMI, V.A. y MASCARENHAS, A.F. (1997) Application of *In vitro* techniques for bamboo improvement. The Bamboos.

PATTANAVIBOOL, R. y RAMYARANGSI, S. (2000) *In vitro* micropropagación of young buds of *bambusa nana*. [citado en octubre 20 de 2005]. Disponible en Internet : <URL:http://www.forest.go.th/Research/English/abstracts_Silvic/phai.htm>

PÉREZ, O. (1980) Reforestación con Guadua. En : Revista Esso Agrícola. Vol. 37 No. 1 p.5-8.

PIZARRO, R. (1999) Restauración de ríos y riberas : Alternativas de gestión para zonas ribereñas. En : Chile Forestal, Documento Técnico. No.125; 8 p.

PONCE DE LEÓN, E. (2000) Restauración ecológica y reforestación. Santafé de Bogotá : Prisma asociados, 385 p. ISBN. 958-8128-00-5.

PREHN, D.; SERRANO, C. y ARCE-JHONSON, P. (1999a) Propagación vegetativa en especies forestales (I parte) : Digno de replicarse. En : Chile Forestal. Año 24 No. 271; p.34-36.

PREHN, D.; SERRANO, C. y ARCE-JHONSON, P. (1999b) Propagación vegetativa en especies forestales (II parte) : La vía genética. En : Chile Forestal. Año 24 No. 272; p.34-36.

PROYECTO UTP-GTZ. (2001) Guía para la construcción de puentes de Guadua. Pereira : El Proyecto, 48 p.

RAMANUJA, I.V.; YUSOFF, A.M. y SASTRY, C.B. (1991) Propagation of bamboo and rattan through tissue culture. [citado en octubre 18 de 2005]. Disponible en Internet : <URL:http://www.inbar.int/publication/txt/INBAR_BR_03.htm>.

ROCA, W. y MROGINSKI, L. (1991) Cultivo de tejidos en la agricultura : Fundamentos y aplicaciones. Cali : Centro Internacional de Agricultura Tropical, 969 p. ISBN. 958-9183-15-8.

SEHUANES, I. y FLOREZ, H. (2004) Micropropagación *in vitro* de la caña flecha (*Gynerium sagittatum*) Beauv. c.v. "criolla" mediante el uso de segmentos nodales. Sincelejo. Trabajo de Grado. Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de Biología Énfasis en Biotecnología.

VARGAS, R. (1990) La guadua un regalo de la naturaleza. En : Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Boletín No. 72.

ANEXOS

ANEXO 1. FORMATOS DE EVALUACIÓN

1.1 Inducción de brotes *in vivo* a partir de chusquines en condiciones semicontroladas.

Fecha: _____ No. Evaluación: _____ Temperatura: _____ °C

Humedad relativa: _____ % Fotoperíodo: _____ Hora: _____

Chusquín	Número de Brotes / chusquín	Longitud de Brotes (cm)	Número de raíces / chusquín	Longitud de raíces (cm)	Número de hojas / brote

OBSERVACIONES: _____

Evaluated por: _____

1.2 Etapa desinfectación de explantes

Fecha: _____ No. Evaluación: _____ Temperatura: _____ °C
 Humedad relativa: _____ % Fotoperíodo: _____ Hora: _____

Tratamiento	Repetición	Explante NO contaminado	Explante contaminado por hongos	Explante contaminado por bacterias	Explante Necrosado	Longitud de brote (cm)	Porcentaje de No contaminados
	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	8						

OBSERVACIONES: _____

Evaluado por: _____

1.3 Etapa de multiplicación

Fecha: _____ No. Evaluación: _____ Temperatura: _____ °C
 Humedad relativa: _____ % Fotoperíodo: _____ Hora: _____

Tratamiento	Concentración BAP (mg.L ⁻¹)	Concentración ANA (mg.L ⁻¹)	Repetición	Número de brotes	Longitud promedio de brotes (cm)	Número de hojas verdes
			1			
			2			
			3			
			4			
			5			
			1			
			2			
			3			
			4			
			5			

OBSERVACIONES: _____

Evaluado por: _____

1.4 Etapa de enraizamiento (Experimento 1)

Fecha: _____ No. Evaluación: _____ Temperatura: _____ °C

Humedad relativa: _____ % Fotoperíodo: _____ Hora: _____

Tratamiento	Concentración de IBA (mg.L ⁻¹)	Repetición	Número de raíces individuales	Longitud principal (cm)	Número de hojas verdes	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)
		1					
		2					
		3					
		4					
		5					
		1					
		2					
		3					
		4					
		5					
		1					
		2					
		3					
		4					
		5					

OBSERVACIONES: _____

Evaluado por: _____

1.5 Etapa de enraizamiento (Experimento 2)

Fecha: _____ No. Evaluación: _____ Temperatura: _____ °C
 Humedad relativa: _____ % Fotoperíodo: _____ Hora: _____

Tratamiento	Concentración de ANA (mg.L ⁻¹)	Repetición	Número de raíces individuales	Longitud principal (cm)	Número de hojas verdes	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)
		1					
		2					
		3					
		4					
		5					
		1					
		2					
		3					
		4					
		5					
		1					
		2					
		3					
		4					
		5					

OBSERVACIONES: _____

Evaluado por: _____

ANEXO 2

Componentes básicos del medio Murashige y Skoog (1962) para preparar 1 litro (1 L).

Componente	Mg.L ⁻¹	Concentración (Molar)
NH ₄ NO ₃	1650	20,61 mM
KNO ₃	1900	18,79 mM
CaCl ₂ 2·H ₂ O	332,2	2,99 mM
MgSO ₄ 4·H ₂ O	180,7	1,50 mM
KH ₂ PO ₄	170	1,25 mM
KI	0,83	5,00 µM
H ₃ BO ₃	6,2	100 µM
MnSO ₄ 4·H ₂ O	16,9	100 µM
ZnSO ₄ 7·H ₂ O	8,6	29,91 µM
Na ₂ MoO ₄ 2·H ₂ O	0,25	1,03 µM
CuSO ₄ 5·H ₂ O	0,025	0,10 µM
CoCl ₂ 6·H ₂ O	0,025	0,11 µM
Na ₂ EDTA	37,26	100 µM
FeSO ₄ 7·H ₂ O	27,8	100 µM

Fuente: Hartmann y Kester, 1992.

ANEXO 3. PROTOCOLOS ENSAYADOS EN LA ETAPA DE DESINFESTACIÓN

3.1 Protocolo 1.

1. Explantes colectados en campo (*Guadua amplexifolia* Presl.).
2. Se sumergen en Tween 20 (5 gotas en 100 mL de agua) durante cinco (5) minutos.
3. Se enjuagan cinco (5) veces con abundante agua del grifo.
4. **EN CABINA DE FLUJO LAMINAR:** Se sumergen en solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 2% (v/v) durante dos (2) minutos.
5. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
6. Se sumergen en solución de etanol al 70% (v/v) durante un minuto.
7. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
8. Se sumergen en solución de hipoclorito de sodio ($NaClO$) al 1%, 2%, 3% (v/v) y (0,0% como control) durante cinco, diez y quince minutos (5,10 y 15 min.) en combinatoria con las soluciones de hipoclorito de sodio reportadas.
9. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
10. Se siembran en medio básico Murashige y Skoog (MS) (1962).

OBSERVACIONES: Se empleó un total de diez (10) tratamientos con diez (10) repeticiones cada uno para un total de 100 unidades experimentales. A la semana de la siembra, sólo resultaron tres (3) explantes sanos, el resto se contaminó por hongos.

ANEXO 3.2 Protocolo 2.

1. Explantes colectados en campo (*Guadua angustifolia* var. *bicolor*).
2. Se sumergen en Tween 20 (5 gotas en 100 mL de agua) durante cinco (5) minutos.
3. Se enjuagan cinco (5) veces con abundante agua del grifo.
4. **EN CABINA DE FLUJO LAMINAR:** Se sumergen en solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 2% (v/v) durante dos (2) minutos.
5. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
6. Se sumergen en solución de etanol al 70% (v/v) durante un minuto.
7. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
8. Se sumergen en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2,5%, 5%, 10% (v/v) y (0,0% como control) durante cinco, diez y quince minutos (5,10 y 15 min.) en combinatoria con las soluciones de hipoclorito de sodio reportadas.
9. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
10. Se siembran en medio básico Murashige y Skoog (MS)(1962) suplementado con (1g/L) de carbón activado.

OBSERVACIONES: Se empleó un total de diez (10) tratamientos con diez (10) repeticiones cada uno para un total de 100 unidades experimentales. A las dos semanas de efectuada la siembra, sólo resultaron cuatro (4) explantes sanos, el resto contaminado por hongos o necrozados. El promedio de longitud de brotes fue de 0,8 cms.

ANEXO 3.3 Protocolo 3.

1. Explantes colectados en campo (*Guadua angustifolia* var. *bicolor*).
2. Se sumergen en Tween 20 (5 gotas en 100 mL de agua) durante cinco (5) minutos.
3. Se enjuagan cinco (5) veces con abundante agua del grifo.
4. **EN CABINA DE FLUJO LAMINAR:** Se sumergen en solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 2% (v/v) durante dos (2) minutos.
5. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
6. Se sumergen en solución de etanol al 70% (v/v) durante un minuto.
7. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
8. Se sumergen en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2,5%, 5%, 10% (v/v) y (0,0% como control) durante cinco, diez y quince minutos (5,10 y 15 min.) en combinatoria con las soluciones de hipoclorito de sodio reportadas.
9. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
10. Se siembran en medio básico Murashige y Skoog (MS)(1962) sin suplemento.

OBSERVACIONES: Se empleó un total de diez (10) tratamientos con diez (10) repeticiones cada uno para un total de 100 unidades experimentales. A las dos semanas de efectuada la siembra, sólo resultaron tres (3) explantes sanos con un promedio de longitud de brotes de 1,3 cms. El resto se contaminó por hongos.

ANEXO 3.4 Protocolo 4.

1. Explantes **procedentes del invernáculo** (*Guadua amplexifolia* Presl.).
2. Se sumergen en Tween 20 (5 gotas en 100 mL de agua) durante cinco (5) minutos.
3. Se enjuagan cinco (5) veces con abundante agua del grifo.
4. **EN CABINA DE FLUJO LAMINAR:** Se sumergen en solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 2% (v/v) durante dos (2) minutos.
5. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
6. Se sumergen en solución de etanol al 70% (v/v) durante un minuto.
7. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
8. Se sumergen en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,5%, 1%, 1,5% (v/v) y (0,0% como control) durante cinco, diez y quince minutos (5,10 y 15 min.) en combinatoria con las soluciones de hipoclorito de sodio reportadas.
9. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
10. Se siembran en medio básico Murashige y Skoog (MS)(1962).

OBSERVACIONES: Se empleó un total de diez (10) tratamientos con cinco (5) repeticiones cada uno para un total de 50 unidades experimentales. A la semana de efectuada la siembra todos los explantes resultaron contaminados por hongos y/o bacterias, en proporciones respectivas de 85% y 15% aproximadamente.

ANEXO 3.5 Protocolo 5.

1. Explantes colectados en campo (*Guadua angustifolia* var. *bicolor*).
2. Se sumergen en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,5% (v/v) durante cuarenta y cinco (45) minutos.
3. Se enjuagan tres (3) veces con abundante agua del grifo.
4. Se lavan con detergente comercial (1g/100 mL) más Tween 20 (5 gotas/100 mL de agua) durante quince (15) minutos.
5. **EN CABINA DE FLUJO LAMINAR:** Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril y se sumergen en solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 2% (v/v) durante dos (2) minutos.
6. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
7. Se sumergen en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%, 2%, 3% (v/v) y (0,0% como control) durante cinco, diez y quince minutos (5,10 y 15 min.) en combinatoria con las soluciones de hipoclorito de sodio reportadas.
8. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
9. Se sumergen en solución de etanol al 70% (v/v) durante un minuto.
10. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
11. Se siembran en medio básico Murashige y Skoog (MS)(1962).

OBSERVACIONES: Se empleó un total de diez (10) tratamientos con siete (7) repeticiones cada uno para un total de 70 unidades experimentales. A las dos semanas de efectuada la siembra, sólo cuatro (4) explantes resultaron sanos, el resto se contaminó por hongos.

ANEXO 3.6 Protocolo 6.

1. Explantes colectados en campo (*Guadua angustifolia* var. *bicolor*).
2. Se sumergen en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,5% (v/v) durante cuarenta y cinco (45) minutos.
3. Se enjuagan tres (3) veces con abundante agua del grifo.
4. Se lavan con detergente comercial (1g/100 mL) más Tween 20 (5 gotas/100 mL de agua) durante quince (15) minutos.
5. **EN CABINA DE FLUJO LAMINAR:** Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril y se sumergen en solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 2% (v/v) durante dos (2) minutos.
6. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
7. Se sumergen en solución de Timerosal® al 2% (v/v) durante cinco (5) minutos.
8. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
9. Se sumergen en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%, 2%, 3% (v/v) y (0,0% como control) durante cinco, diez y quince minutos (5,10 y 15 min.) en combinatoria con las soluciones de hipoclorito de sodio reportadas.
10. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
11. Se sumergen en solución de etanol al 70% (v/v) durante un minuto.
12. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
13. Se siembran en medio básico Murashige y Skoog (MS)(1962).

OBSERVACIONES: Se empleó un total de diez (10) tratamientos con siete (7) repeticiones cada uno para un total de 70 unidades experimentales. A la semana de efectuada la siembra sólo tres (3) explantes resultaron sanos, el resto se contaminó por hongos.

ANEXO 3.7 Protocolo 7.

1. Explantes colectados en campo (*Guadua angustifolia* var. *bicolor*).
2. Se sumergen en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,5% (v/v) durante cuarenta y cinco (45) minutos.
3. Se enjuagan tres (3) veces con abundante agua del grifo.
4. Se lavan con detergente comercial (1g/100 mL) más Tween 20 (5 gotas/100 mL de agua) durante quince (15) minutos.
5. Se enjuagan tres (3) veces con abundante agua del grifo.
6. Se sumergen en solución de **Glutarex** al 100% durante dieciocho (18) horas en agitación constante.
7. **EN CABINA DE FLUJO LAMINAR:** Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril y se sumergen en solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 2% (v/v) durante dos (2) minutos.
8. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
9. Se sumergen en solución de Timerosal® al 2% (v/v) durante cinco (5) minutos.
10. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
11. Se sumergen en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,12% y 1,68% (v/v) y (0,0% como control) durante veinte y treinta minutos (20 y 30 min.) en combinatoria con las soluciones de hipoclorito de sodio.
12. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
13. Se sumergen en solución de etanol al 70% (v/v) durante un minuto.
14. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
15. Se siembran en medio básico Murashige y Skoog (MS)(1962).

OBSERVACIONES: Se empleó un total de cinco (5) tratamientos con ocho (8) repeticiones cada uno para un total de 40 unidades experimentales. A las tres (3) semanas de efectuada la siembra sólo diecinueve (19) explantes resultaron sanos, el resto se contaminó por hongos y/o bacterias o se necrozó.

ANEXO 3.8 Protocolo 8.

1. Explantes colectados en campo (*Guadua angustifolia* var. *bicolor*).
2. Se sumergen en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,5% (v/v) durante cuarenta y cinco (45) minutos.
3. Se enjuagan tres (3) veces con abundante agua del grifo.
4. Se lavan con detergente comercial (1g/100 mL) más Tween 20 (5 gotas/100 mL de agua) durante quince (15) minutos.
5. Se enjuagan tres (3) veces con abundante agua del grifo.
6. Se sumergen en solución de **Glutarex al 50% y 100%** durante diez (10) horas en agitación constante.
7. **EN CABINA DE FLUJO LAMINAR:** Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril y se sumergen en solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 2% (v/v) durante dos (2) minutos.
8. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
9. Se sumergen en solución de Timerosal® al 2% (v/v) durante cinco (5) minutos.
10. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
11. Se sumergen en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,12% y 1,68% (v/v) y (0,0% como control) durante veinte y treinta minutos (20 y 30 min.) en combinatoria con las soluciones de hipoclorito de sodio.
12. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
13. Se sumergen en solución de etanol al 70% (v/v) durante un minuto.
14. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
15. Se siembran en medio básico Murashige y Skoog (MS)(1962).

OBSERVACIONES: Se empleó un total de cinco(5) tratamientos con seis (6) repeticiones cada uno para un total de 30 unidades experimentales. A la semana de efectuada la siembra todos los explantes resultaron contaminados por hongos y/o bacterias.

ANEXO 3.9 Protocolo 9.

1. Explantes colectados en campo (*Guadua angustifolia* var. *bicolor*), se sumergen en solución de **Benoagro®** al 10% (10 g/100mL) durante doce (12) horas.
2. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
3. Se agitan vigorosamente en solución de detergente comercial (1 g/100mL) y se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
4. El paso anterior se repite tres (3) veces.
5. **EN CABINA DE FLUJO LAMINAR:** Los explantes se sumergen en solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 2% (v/v) durante dos (2) minutos.
6. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
7. Se sumergen en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%, 2% y 3% (v/v) (0,0% como control) durante diez y veinte minutos (10 y 20 min.) en combinatoria con las soluciones de hipoclorito de sodio.
8. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
9. Se sumergen en solución de etanol al 70% (v/v) durante 30 segundos.
10. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
11. Se siembran en medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

OBSERVACIONES: Se empleó un total de diez (10) tratamientos con cinco (5) repeticiones cada uno para un total de 50 unidades experimentales. A la semana de efectuada la siembra todos los explantes resultaron contaminados por hongos.

ANEXO 3.10 Protocolo 10.

1. Explantes colectados en campo (*Guadua angustifolia* var. *bicolor*).
2. Se sumergen en solución de detergente comercial al 1% (1 g/100 mL) durante diez (10) minutos y se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
3. El paso anterior se repite tres (3) veces.
4. Se sumergen en solución de **Benoagro®** al 10% (10 g/100mL) durante veinticuatro (24) horas.
5. **EN CABINA DE FLUJO LAMINAR:** Los explantes se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril y se sumergen en solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 2% (v/v) durante dos (2) minutos.
6. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
7. Se sumergen en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% (v/v) durante diez minutos (10 min.)
8. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
9. Se sumergen en solución de etanol al 70% (v/v) durante 30 segundos.
10. Se enjuagan tres (3) veces con agua destilada estéril.
11. Antes de la siembra en medio básico Murashige y Skoog (MS)(1962). Los explantes se sumergen en diferentes soluciones así:
 - Diez (10) explantes en gentamicina a 8.000 ppm
 - Diez (10) explantes en clotrimazol al 100% (v/v).
 - Diez (10) explantes en clotrimazol al 100% (v/v) y gentamicina a 8.000 ppm.
 - Diez (10) explantes en clotrimazol al 50% (v/v).

OBSERVACIONES: Se empleó un total de cuatro (4) tratamientos con diez (10) repeticiones cada uno para un total de 40 unidades experimentales. A las cuatro (4) semanas de efectuada la siembra, diecisiete (17) explantes resultaron no contaminados. Pasada la quinta semana doce (12) de estos explantes se contaminaron repentinamente por hongos.

ANEXO 4.

PRUEBAS ESTADÍSTICAS

4.1 Análisis de varianza en la etapa de multiplicación

Número de brotes por explante

Source	DF	SS	MS	F	P	F = 0,05 y 0,01
Tratamiento	5	34,17	6,83	6,31	0,001	Rechazo Ho
Error	24	26,00	1,08	X	X	X
Total	29	60,17	----	X	X	X

Longitud promedio de brotes (cm.)

Source	DF	SS	MS	F	P	F = 0,05 y 0,01
Tratamiento	5	17,175	3,435	4,68	0,004	Rechazo Ho
Error	24	17,628	0,734	X	X	X
Total	29	34,803	----	X	X	X

Número de hojas verdes

Source	DF	SS	MS	F	P	F = 0,05 y 0,01
Tratamiento	5	29,20	5,84	5,23	0,002	Rechazo Ho
Error	24	26,80	1,12	X	X	X
Total	29	56,00	----	X	X	X

4.2 Análisis de varianza de la etapa de enraizamiento

Número de raíces individuales

Source	DF	SC	CM	Fc	P	F _T = 0,05
Tratamiento	5	79,9	16,0	1,17	0,353	Acepta Ho
Error	24	328,0	13,7	X	X	X
Total	29	407,9	----	X	X	X

Número de hojas verdes

Source	DF	SC	CM	Fc	P	F _T = 0,05
Tratamiento	5	32,4	6,5	0,56	0,72	Acepta Ho
Error	24	276,8	11,5	X	X	X
Total	29	309,2	----	X	X	X

Número de brotes

Source	DF	SC	CM	Fc	P	F _T = 0,05
Tratamiento	5	0,967	0,193	1,05	0,404	Acepta Ho
Error	24	4,400	0,83	X	X	X
Total	29	5,367	----	X	X	X

(continuación del análisis de varianza de la etapa de enraizamiento)

Longitud de brote

Source	DF	SC	CM	Fc	P	F _T = 0,05
Tratamiento	5	6,331	1,266	1,45	0,242	Acepta Ho
Error	24	20,928	0,872	X	X	X
Total	29	27,259	----	X	X	X

Longitud de raíz principal (cm.)

Source	DF	SC	CM	Fc	P	F _T = 0,05
Tratamiento	5	21,66	4,33	0,75	0,596	Acepta Ho
Error	24	139,18	5,80	X	X	X
Total	29	160,84	----	X	X	X