

Efecto de biocidas y consistencia del medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia*

Viability of biocides and consistency of the culture medium on the *in vitro* establishment of *Guadua angustifolia*

José J. Tejada-Alvarado ^a, Jegnes B. Meléndez-Mori ^{**}, Nuri C. Vilca-Valqui ^a, Eyner Huaman-Huaman ^a, Segundo M. Oliva-Cruz ^a

*Autor de correspondencia: ^a Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM), Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES), Chachapoyas, Perú, jbenjamin@indes-ces.edu.pe

SUMMARY

The efficient establishment of nodal segments during the micropropagation of *Guadua angustifolia* is limited by factors such as the high percentage of microbial contamination and necrosis due to the exudation of phenols. Therefore, this study aimed at evaluating the effect of different concentrations of two broad-spectrum biocides (Germon and PPMTM) and the consistency of the culture medium (liquid and semi-solid) on the response to the *in vitro* establishment of *G. angustifolia*. The experiment was established under a completely randomized design (DCA) with factorial arrangement. Data were subjected to an analysis of variance and Duncan's test ($P \leq 0.05$). Results indicate that the explants treated with 1 mL L⁻¹ of Germon 80 for 10 min had a lower percentage of oxidation, although to reduce microbial contamination it is necessary to increase the disinfection time and the concentration of the disinfectant agent. On the other hand, the addition of 2 mL L⁻¹ of Plant Preservative Mixture (PPMTM) to the culture medium allowed improving the control of endophytic contaminants, favoring the efficient development and elongation of axillary shoots. Regarding the culture media, it can be mentioned that the use of liquid medium generally led to better responses in the *in vitro* establishment of the explants.

Keywords: di quaternary ammonium, plant preservative mixture, *Guadua angustifolia*, organogenesis.

RESUMEN

El establecimiento eficiente de segmentos nodales durante la micropropagación de *Guadua angustifolia*, está limitado por factores como el elevado porcentaje de contaminación microbiana y la necrosis, producto de la exudación de fenoles. Por ello, el estudio tuvo por objetivo evaluar el efecto conjunto de dos biocidas - los explantes fueron pretratados con diferentes concentraciones Germon 80 (amonio cuaternario) durante dos tiempos de inmersión, y luego se cultivaron en medio de cultivo (líquido y semisólido) con diferentes dosis de mezcla conservante de plantas (PPMTM) - sobre la respuesta al establecimiento *in vitro* de *G. angustifolia*. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial y los datos se sometieron a un análisis de varianza y la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$). Los resultados indican que los explantes tratados con 1 mL L⁻¹ de Germon 80 durante 10 min presentaron menor porcentaje de oxidación, pero para reducir la contaminación microbiana es necesario incrementar el tiempo de desinfección y la concentración del agente desinfectante. La adición de 2 mL L⁻¹ de PPMTM al medio de cultivo permitió reducirlos contaminantes endófitos, favoreciendo el eficiente desarrollo y elongación de brotes axilares. El uso de medio líquido condujo a mejores respuestas en el establecimiento *in vitro* de los explantes.

Palabras clave: amonio cuaternario, mezcla conservante de plantas, *Guadua angustifolia*, organogénesis.

INTRODUCCIÓN

Los bambúes que pertenecen a la subfamilia Bambusoideae exhiben gran diversidad genética distribuida alrededor del mundo, excepto en la Antártida y Europa (Clark *et al.* 2015). El bambú representa a las especies leñosas con mayor impacto económico, social, ecológico y ambiental a nivel global (Clark *et al.* 2015, Thapa *et al.* 2018). En el Perú se desarrollan distintas especies de bambú, tanto nativas como introducidas (Olivier 2008), siendo *Guadua*

angustifolia Kunth. la especie introducida con mayor realce económico para la sostenibilidad del nororiente peruano (Landauro *et al.* 2016, Móstiga *et al.* 2019). Sin embargo, la expansión y cultivo comercial del bambú se ha limitado por el precario sistema de propagación (rizomas y culmos), así como por el prolongado tiempo que la semilla botánica requiere para su desarrollo (Casanova *et al.* 2019).

Para superar las limitantes de la propagación y producción masiva de plantas élite, es ineludible el aporte del cultivo de tejidos vegetales, debido a que permite ob-

tener plantas mediante la regeneración *in vitro*. La propagación vía organogénesis asegura estándares de sanidad y calidad, permitiendo, además, la producción masiva de plántulas en corto tiempo. Sin embargo, el cultivo *in vitro* de bambúes es un proceso poco explorado (Ribeiro *et al.* 2016), por lo tanto, se tiene diversos factores que influyen en los resultados. La consistencia del medio de cultivo se ha estudiado para el establecimiento *in vitro* de diversas especies de bambú puesto que es un factor que puede influir en la asimilación de nutrientes, la oxidación y contaminación del explante (García-Ramírez *et al.* 2010, Santos *et al.* 2019).

Por otro lado, la micropropagación del bambú *G. angustifolia* Kunth está condicionada por la prevalencia de hongos y bacterias endófitos que originan la contaminación superficial del explante (Nadha *et al.* 2012, Ray y Ali 2016, Sandhu *et al.* 2017, Furlan *et al.* 2018). Esta problemática ha derivado en el desarrollo de diversos protocolos de esterilización superficial con desinfectantes, antibióticos y fungicidas comunes que no son totalmente eficientes (Ray y Ali 2016). Al mismo tiempo, diversos investigadores (Bakshi *et al.* 2015, Saini *et al.* 2016, Nogueira *et al.* 2019) informan que las soluciones a base de cloruro de mercurio (HgCl_2) son eficientes en los protocolos de esterilización. Sin embargo, el uso descontrolado e inadecuada manipulación de este producto pueden traer graves consecuencias debido a su alta toxicidad (Branco *et al.* 2017), además de elevar los riesgos de contaminación ambiental producto de los residuos químicos generados en el cultivo *in vitro* (Ornellas *et al.* 2019).

La dificultad para obtener un desarrollo organogénico a partir de segmentos nodales con yemas axilares latentes es aún un reto mayor (Furlan *et al.* 2018). La importancia de controlar el desarrollo de agentes contaminantes en el medio de cultivo abre una alternativa, hacia la evaluación de productos biocidas de amplio espectro (Santos *et al.* 2019), los cuales podrían permitir el establecimiento aséptico de segmentos nodales. Asimismo, es necesario profundizar los estudios relacionados con la influencia de las variaciones en el medio de cultivo sobre el desarrollo de explantes del género *Guadua*. En ese contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto conjunto de dos biocidas en el control de microorganismos epifitos o endófitos durante el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia*. Para ello, los explantes fueron pretratados con diferentes concentraciones de Germon 80 (amonio cuaternario) durante dos tiempos de inmersión, y luego se cultivaron en un medio de consistencia líquida o semisólida, suplementado con diferentes dosis de Plant Preservative Mixture™.

MÉTODOS

Material vegetal. Se recolectaron chusquines de *Guadua angustifolia*, procedente de un lote de guaduales ubicado en áreas reforestadas de la provincia de Bongará (Latitud

5° 54' 27" sur y Longitud 77° 58' 17" oeste), noreste del Perú. El material vegetal colectado tenía buen desarrollo morfológico y fisiológico y ausencia de patógenos, y fue trasladado a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, donde se sembró en bolsas de polietileno que contenían 10 kg de una mezcla de tierra agrícola y arena (1:1), previamente se aplicó ácido indol butírico a concentración de 2.000 mg L⁻¹. Las plantas se mantuvieron durante 6 meses en un microtúnel, a una temperatura de 24 ± 2 °C y Humedad relativa de 80 ± 2 % (Datalogger Elitech Rc-4hc). Durante este periodo, se realizó el control de la carga patogénica con aplicaciones de Carbendazim (1 mL L⁻¹), y se estimuló la actividad fisiológica con Enzyprom (2 mL L⁻¹).

Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales. Se recolectaron ramas primarias y se extrajeron segmentos nodales (1,5 cm a ambos polos del nudo) de la parte media y basal para ser usados como explantes. Cada explante contenía una yema cubierta por la hoja caulinar (verde - amarilla). En el laboratorio se retiró la hoja caulinar y dejó reposar por 15 min en agua corriente, luego se limpiaron con solución de detergente comercial (24 g L⁻¹), seguido se sumergieron en benomil (1 g L⁻¹) durante 25 min. Se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

En condiciones asépticas, los explantes se sumergieron en alcohol isopropílico al 70 % por 1 min, seguido de hipoclorito de sodio al 1 % más 1 gota (por cada 50 mL de solución) de Tween-20 durante 10 min. A continuación, y como etapa previa a su introducción *in vitro*, los explantes se sometieron a un pretratamiento por inmersión en distintas dosis (1, 1,5 y 2 mL L⁻¹) del biocida Germon 80 y se mantuvieron en agitación constante durante dos tiempos de inmersión (10 y 20 min).

Durante la esterilización superficial se eliminó los extremos de los explantes y luego se sembraron en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 20 g L⁻¹ de sacarosa, 50 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 0,5 mg L⁻¹ ácido nicotínico, 100 mg L⁻¹ myo-inositol, 50 mg L⁻¹ sulfato de gentamicina (Pasqualini *et al.* 2019a, Nogueira *et al.* 2019); adicionalmente contenían distintas concentraciones del biocida Plant Preservative Mixture (1, 2 y 4 mL L⁻¹ PPM™). El pH fue ajustado (NaOH y / o HCl) a 5,7 y, para el medio de cultivo semisólido se agregó 6 g L⁻¹ de agar, luego se esterilizó en autoclave a 120 °C (~1 kgf cm⁻²) por 20 min. Los explantes se subcultivaron a intervalos de 7 días y se incubaron en una sala de crecimiento a temperatura de 25 ± 2 °C, con fotoperiodo de 16 h de luz y una intensidad luminosa de 3.000 lux proporcionado por barras fluorescentes blancas.

El experimento se condujo bajo un diseño completamente al azar con 36 tratamientos y 10 repeticiones cada una (1 explante por unidad experimental). Los tratamientos se obtuvieron de la combinación factorial de tres concentraciones de Germon 80 (amonio cuaternario), dos tiempos de inmersión (10 y 20 minutos), tres dosis de PPM™ y dos

consistencias del medio de cultivo (líquido o semisólido). Después de 30 días de cultivo se evaluó el porcentaje de oxidación (supervivencia a la desinfección), porcentaje de contaminación (bacterias / hongos), porcentaje de viabilidad (explantes vivos no contaminados), número de brotes por explante y longitud del brote. Los datos en porcentaje se transformaron con $\sqrt{x/100}$ y las demás variables con $\text{LN}(x + 1)$. El análisis estadístico se realizó con la librería agricolae del Software R (R CoreTeam 2020). Las medias se compararon con la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

Sobrevivencia de explantes. Todos los segmentos nodales iniciaron el desarrollo de brotes durante los primeros siete días de cultivo. Sin embargo, durante este periodo, los explantes liberaron fenoles que ocasionaron el pardeamiento y oscurecimiento del medio de cultivo (figura 1A), independientemente de su consistencia. Este suceso afectó la viabilidad de los brotes y ocasionó la muerte progresiva de estos. Para contrarrestar este efecto negativo fue necesario realizar subcultivos a intervalos de siete días (figura 1B).

Los resultados mostraron que el nivel más alto de oxidación (100 %) se registró en los explantes que se desinfectaron con 2 mL L^{-1} de Germon 80 durante 20 min y luego se cultivaron en medio (tanto al medio líquido como semisólido) suplementado con 4 mL L^{-1} de PPMTM. En cuanto a la contaminación, los resultados mostraron que, entre los 36 tratamientos evaluados, 21 inhibieron exitosamente el desarrollo de microorganismos contaminantes, pero provocaron que el nivel de oxidación se registrara entre 40 % y 100 % (cuadro 1).

El tratamiento de los explantes con $1,5 \text{ mL L}^{-1}$ de Germon 80 durante 10 min, seguido de su introducción en un

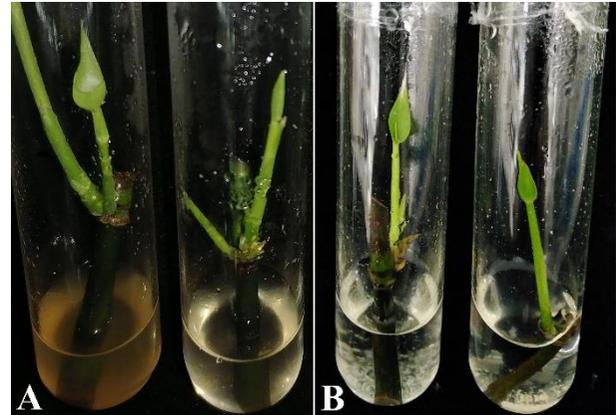


Figura 1. Fenolización del medio sin subcultivo (A) y con subcultivo de explantes (B).

Phenolization of the medium without subculture (A) and with subculture of explants (B).

medio líquido suplementado con 4 mL L^{-1} de PPMTM mostró una alta eficiencia para lograr la mayor tasa de viabilidad (80 %). El efecto de las diferentes concentraciones y tiempo inmersión en los biocidas, y la consistencia del medio de cultivo durante el establecimiento de segmentos nodales, se detallan en el cuadro 1.

Número y longitud de brote. Los explantes introducidos (figura 2C) desarrollaron exitosamente nuevos brotes sin la necesidad de agregar reguladores de crecimiento al medio de cultivo (figura 2D). El número promedio de brotes formados en explantes cultivados en medio líquido suplementado con 2 mL L^{-1} de PPMTM varió de 2,1 a 2,5 brotes, y no hubo diferencia estadística entre estos tratamientos (cuadro 1).

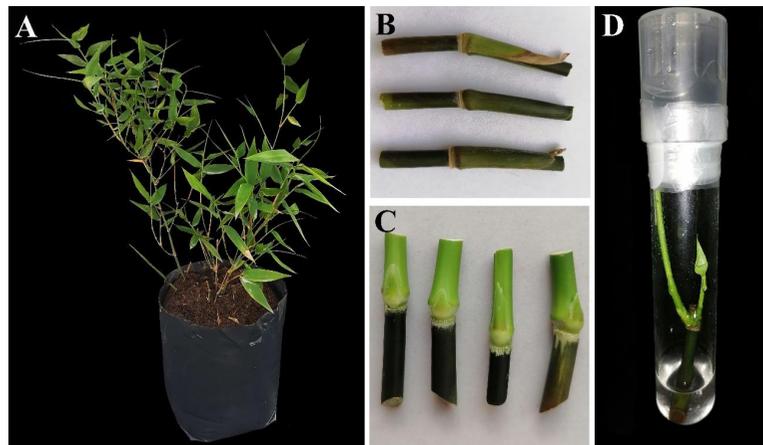


Figura 2. Propagación *in vitro* de *Guadua angustifolia*. Planta donadora de explantes (A), segmento del tercio medio con presencia de la hoja caulinar (B), yemas axilares en el entrenudo (C), y proliferación de brote asépticos en medio líquido (D).

Organogenesis of *Guadua angustifolia*. Plant donor of explants (A), segment of the middle third with presence of the caulinar leaf (B), axillary buds in the internode (C), and aseptic shoot proliferation in liquid medium (D).

Cuadro 1. Influencia de dos biocidas y la consistencia del medio de cultivo en la sobrevivencia de explantes y el desarrollo de brotes durante el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia*.

Influence of biocides and the consistency of the culture medium on the survival of explants during the *in vitro* establishment of *Guadua angustifolia*.

FACTORES				Oxidación (%)	Contaminación (%)	Viabilidad (%)	Número de brotes	Longitud del brote (cm)
Germon 80 (mL L ⁻¹)	Tiempo de inmersión (min)	Consistencia del medio	PPM™ (mL L ⁻¹)					
1,0	10	líquido	1,0	0k	70a	30e	1,9a	5,87a
1,0	20	líquido	1,0	0k	60b	40d	1,9a	5,82a
1,5	10	líquido	1,0	10j	30e	60b	2,4a	5,36a
1,5	20	líquido	1,0	40g	30e	30e	1,5b	6,08a
2,0	10	líquido	1,0	40g	10g	50c	1,5b	5,96a
2,0	20	líquido	1,0	50f	0h	50c	1,3b	6,26a
1,0	10	líquido	2,0	30h	10g	60b	2,1a	5,91a
1,0	20	líquido	2,0	50f	0h	50c	2,2a	5,49a
1,5	10	líquido	2,0	10j	10g	80a	2,5a	6,19a
1,5	20	líquido	2,0	40g	0h	60b	2,2a	5,72a
2,0	10	líquido	2,0	60e	0h	40d	2,2a	6,00a
2,0	20	líquido	2,0	80c	0h	20f	2,2a	5,77a
1,0	10	líquido	4,0	40g	0h	60b	1,7a	6,02a
1,0	20	líquido	4,0	50f	0h	50c	1,6b	6,00a
1,5	10	líquido	4,0	70d	0h	30e	1,8a	5,64a
1,5	20	líquido	4,0	80c	0h	20f	1,4b	5,75a
2,0	10	líquido	4,0	90b	0h	10g	1,5b	5,50a
2,0	20	líquido	4,0	100a	0h	0h	0,0c	0,00c
1,0	10	semisólido	1,0	20i	60b	20f	1,4b	3,89b
1,0	20	semisólido	1,0	20i	50c	30e	1,1b	4,15b
1,5	10	semisólido	1,0	20i	40d	40d	1,2b	4,36b
1,5	20	semisólido	1,0	50f	30e	20f	1,1b	4,47b
2,0	10	semisólido	1,0	40g	20f	40d	1,2b	3,91b
2,0	20	semisólido	1,0	60e	10g	30e	1,1b	4,25b
1,0	10	semisólido	2,0	40g	10g	50c	1,2b	3,82b
1,0	20	semisólido	2,0	60e	0h	40d	1,4b	3,94b
1,5	10	semisólido	2,0	40g	0h	60b	1,4b	4,68b
1,5	20	semisólido	2,0	60e	0h	40d	1,0b	4,52b
2,0	10	semisólido	2,0	50f	20f	30e	1,3b	3,98b
2,0	20	semisólido	2,0	80c	0h	20f	1,0b	4,51b
1,0	10	semisólido	4,0	60e	0h	40d	1,0b	4,48b
1,0	20	semisólido	4,0	90b	0h	10g	1,0b	4,13b
1,5	10	semisólido	4,0	60e	0h	40d	1,0b	3,52b
1,5	20	semisólido	4,0	90b	0h	10g	1,0b	3,69b
2,0	10	semisólido	4,0	100a	0h	0h	0,0c	0,00c
2,0	20	semisólido	4,0	100a	0h	0h	0,0c	0,00c

Las medias dentro de una columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba Duncan a $P \leq 0,05$.

El crecimiento de los nuevos brotes mostró una mejor respuesta en explantes cultivados en medio líquido, y su longitud fue mayor a 5 cm, y significativamente ($P \leq 0,05$) superior que la respuesta observada en explantes cultivados en medio semisólido (cuadro 1).

DISCUSIÓN

El uso de biocidas en la micropropagación de bambú para reducir la contaminación microbiana es relativamente nuevo; aunque existe evidencia reciente de que se utiliza como complemento en el medio de cultivo (Santos *et al.* 2019), aún existen pocos estudios sobre su efecto en el pretratamiento por inmersión de los segmentos nodales (Torres *et al.* 2016).

En este estudio, los explantes que se trataron con 1,5 mL L⁻¹ de Germon 80 durante 10 min y luego se cultivaron en un medio suplementado con una concentración de PPMTM de menos de 4 mL L⁻¹, presentaron una tasa de viabilidad (explantes vivos no contaminados) entre 40 % y 80 %. Este resultado es mejor que la esterilización de explantes de *Gadua chacoensis* (Rojas Londoño y P.M. Peterson utilizando una solución de NaClO al 4 % (sin adición de ningún biocida), ya que solo el 22 % de los explantes se desarrolló sin contaminación (Ornellas *et al.* 2019). Según Casanova *et al.* (2019), el mejor tratamiento para reducir la contaminación de explantes de *Guadua weberbaueri* Pilg. fue el uso de NaClO al 2,5 % por 10 min seguido de una segunda desinfección con NaClO al 1,5 % por 3 minutos, lo que llevó a un porcentaje de contaminación del 33 % y una tasa de sobrevivencia del 50 %. Por otro lado, Correa *et al.* (2014) reportaron que el tratamiento con NaClO al 2 % llevó a un 32 % de asepsia en explantes de *G. angustifolia*. Los resultados tan variables, indican que, es fundamental probar y perfeccionar las condiciones de cultivo *in vitro* para cada especie / género de bambú (Jiménez y Guevara 2007).

Diversos estudios han descrito a la esterilización de segmentos nodales de bambú como una labor compleja, porque la esterilización superficial por sí sola no logra controlar la contaminación del explante. Por lo tanto, y con base en los resultados alcanzados, se puede mencionar que el uso de Germon 80 es una alternativa atractiva al uso de antibióticos y fungicidas convencionales para el control de contaminantes epífitos en explantes de *G. angustifolia*, por tratarse de un desinfectante a base de dos amonios cuaternarios, que actúan de forma sinérgica provocando la lisis celular que le confiere amplio espectro de acción.

Este estudio muestra que el medio suplementado con 4 mL L⁻¹ de PPMTM logró un control efectivo de la contaminación microbiana. Según resultados similares de Pasqualini *et al.* (2019a), la adición de PPMTM (4 mL L⁻¹) permitió reducir el desarrollo de microorganismos en el establecimiento *in vitro* de *Bambusa oldhamii* Munro, registrando una tasa de contaminación microbiana total de 4 % en medio líquido y 13 % medio semisólido. Además, para Santos

et al. (2019), la adición de PPMTM (2 mL L⁻¹ o 4 mL L⁻¹) demostró ser eficaz para el establecimiento *in vitro* de *Berberis vulgaris* L., *Phyllostachys bambusoides* f. shouzhui Yi y *Dendrocalamus asper* B. PPMTM se considera un microbiciocida eficaz contra bacterias y hongos, y está compuesto de dos isotiazolonas, 5-cloro-2-metil-3(2H)-isotiazolona y 2 metil-3(2H)-isotiazolona (Guri y Patel 1998), que pueden penetrar la pared celular microbiana e inhiben diversas enzimas clave del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones (Plant Cell Technologies 2017). Cabe mencionar que, en este estudio, si bien la adición de 4 mL L⁻¹ de PPMTM redujo la contaminación, este provocó mayores signos de oxidación; lo que podría estar relacionado con un posible efecto de fitotóxico por ser un compuesto ácido y, por lo tanto, es necesario evaluar el efecto de diferentes concentraciones (Thomas *et al.* 2017).

De acuerdo con lo planteado por Santos *et al.* (2019), el efecto del biocida varía según su concentración y la especie de bambú; esto último debido a las características fisiológicas y genéticas específicas de los explantes (según el genotipo) que influyen directamente durante el desarrollo *in vitro* (Polesi *et al.* 2019). Además, la dificultad para desinfectar los tejidos del bambú puede explicarse por el tipo de explante, ya que los segmentos nodales contienen alta carga de microorganismos endófitos (Pasqualini *et al.* 2019b), los cuales se introducen en los espacios intercelulares generados durante el aislamiento del explante (Ray y Ali 2016). Este aspecto dificulta la desinfección de los explantes debido a que los microorganismos endófitos tienen mayor profundidad de penetración en el tejido (Pasqualini *et al.* 2019b). En ese contexto, los biocidas como PPMTM se han descrito como una alternativa para controlar el crecimiento de hongos y bacterias endófitas (Plant Cell Technologies 2017).

Por otro lado, los explantes establecidos en medio líquido mostraron mayor formación y crecimiento de brotes comparado con el desarrollo registrado en el medio semisólido. Experiencia con similar éxito se reportó en la multiplicación *in vitro* de *G. angustifolia* utilizando un sistema de inmersión temporal (Gutiérrez *et al.* 2016). Estos resultados pueden visualizarse dado que el uso de medios de cultivo libre de agente gelificante facilita la movilidad de nutrientes a través del explantes, mientras que su solidificación actúa como barrera física para la liberación y absorción de los mismos (García-Ramírez *et al.* 2010, Ribeiro *et al.* 2016). A partir de estos datos se confirman que, la proliferación de brotes en bambú está mediado por la consistencia del medio de cultivo. Cabe resaltar que, los explantes de *G. angustifolia* no registraron problemas visibles de hiperhidricidad; trastorno fisiológico que fue reportado en explantes de *Dendrocalamus* (Sandhu *et al.* 2017). En general, se puede mencionar que el establecimiento *in vitro* de *G. angustifolia* utilizando medio líquido tiene efectos positivos sobre la inducción y crecimiento de brotes; variables que tienen relación directa con el coeficiente de multiplicación, dado que es posible obtener mayor número

de plantas para ser transferidos a las fases de enraizamiento y aclimatación (García-Ramírez *et al.* 2010).

CONCLUSIONES

Este estudio muestra que el efecto conjunto del biocida Germon 80 (utilizado para el pretratamiento de explantes por inmersión) y PPM™ (agregado al medio de cultivo) presenta diferentes respuestas dependiendo de la concentración del biocida. Se ha observado que la adición de 2 mL L⁻¹ o 4 mL L⁻¹ de PPM™ redujo el desarrollo de microorganismos contaminantes, sin embargo, a estas concentraciones, la tasa de viabilidad (explantes vivos no contaminados) se ve afectada por el aumento en la tasa de oxidación. Además, el medio sin agente gelificante demostró ser beneficioso para la formación y elongación de brotes.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el financiamiento realizado a través del proyecto CUI N° 2252878 (SNIP N° 312252) “Creación del Servicio de un Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas”, ejecutado por el Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva.

REFERENCIAS

- Bakshi M, C Tiwari, S Razvi. 2015. Conservation of an important montane bamboo *Thamnochalamus falconeri* Hook.f. ex Munro through axillary bud proliferation. *Journal of Forestry Research* 26(1): 179-185. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11676-015-0022-3>
- Branco V, S Caito, M Farina, J Rocha, M Aschner, C Carvalho. 2017. Biomarkers of mercury toxicity: Past, present, and future trends. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B* 20(3): 119-154. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10937404.2017.1289834>
- Casanova FE, G Domínguez, ML Tapia. 2019. Determinación de medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de bambú (*Guadua weberbaueri*). *Anales Científicos* 80(1): 160-167. DOI: <http://dx.doi.org/10.21704/ac.v80i1.1380>
- Clark L, X Londoño, E Ruiz-Sanchez. 2015. Bamboo taxonomy and habitat. In Liese W, M Köhl eds. Springer International Publishing. Switzerland. *Bamboo* 10: 1-30. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-14133-6_1
- Correa LA, JE Moreno, NE González. 2014. Evaluation of the effect of disinfection treatments with sodium hypochlorite over nodal segments present in *Guadua angustifolia* Kunth for the establishment of the *in vitro* culture. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 5(1): 155-169.
- Furlan FC, NH Gavilan, AZ Zorz, LS Oliveira, ER Konzen, GE Brondani. 2018. Active chlorine and charcoal affect the *in vitro* culture of *Bambusa vulgaris*. *Bosque* 39(1): 61-70. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002018000100006>
- García-Ramírez Y, M Freire-Seijo, BR Perez, O Hurtado. 2010. Efecto del estado físico del medio de cultivo y el número de subcultivos en la fase de multiplicación *in vitro* de plantas de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*. *Schrad. ex Wendl. Biotecnología Vegetal* 10(2): 113-119.
- Guri AZ, KN Patel. 1998. Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media. *United States Patent* 5(750): 402.
- Gutiérrez LG, R López-Franco, T Morales-Pinzón. 2016. Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA. *African Journal of Biotechnology* 15(28): 1503-1510. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2016.15390>
- Jiménez VM, E Guevara. 2007. Micropropagation of bamboo species through axillary shoot proliferation. In Jain M, H Haggman eds. *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Amsterdam, Netherlands. Springer. p. 465-467. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6352-7_43
- Landauro DA, M Araujo, F Trujillo. 2016. Características de preservación por el método de inmersión del culmo de *Guadua angustifolia* Kunth (bambú), proveniente del distrito de La Florida, Cajamarca. *Revista Forestal Del Perú* 31(2): 47-57. DOI: <http://dx.doi.org/10.21704/rfp.v31i2.1026>
- Móstiga RC, BG Cano, LR Quispe, MJ Móstiga. 2019. Análisis morfológico y molecular de especies de bambú del género *Guadua* (Poaceae: Bambusoideae) procedentes de las regiones San Martín y Cajamarca, Perú. *Revista de Investigación Agroproducción Sustentable* 3(1): 83-91. DOI: <http://dx.doi.org/10.25127/aps.20191.486>
- Murashige T, F Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
- Nadha HK, R Salwan, RC Kasana, M Anand, A Sood. 2012. Identification and elimination of bacterial contamination during *in vitro* propagation of *Guadua angustifolia* Kunth. *Pharmacognosy Magazine* 8(30): 93-97. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1296.96547>
- Nogueira JS, HT Gomes, JE Scherwinski-Pereira. 2019. Micropropagation, plantlets production estimation and ISSR marker-based genetic fidelity analysis of *Guadua magna* and *G. angustifolia* L. *Pesquisa Agropecuaria Tropical* 49: e53743. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632019v4953743>
- Olivier J. 2008. Gramíneas (Poaceae) bambusiformes del río de los amigos, Madre de Dios, Perú. *Revista Peruana de Biología* 15(1): 121-126.
- Ornellas TS, CK Marchetti, GH Oliveira, Y Fritsche, MP Gueirra. 2019. Micropropagation of *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson. *Pesquisa Agropecuaria Tropical* 49: e55450. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632019v4955450>
- Pasqualini APdA, MC Santos, BF Sant, A Santos, HPDF Fraga, M Quoirin. 2019b. *In vitro* culture and diversity of endophytic fungi in *Bambusa oldhamii*. *Pesquisa Agropecuaria Tropical* 49: e53760. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632019v4953760>
- Pasqualini APdA, GX Schneider, HPF Fraga, LA Biasi, M Quoirin. 2019a. *In vitro* establishment of *Bambusa oldhamii* Munro from fieldgrown matrices and molecular identification of endophytic bacteria. *Pesquisa Agropecuaria Tropical* 49: e53673. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632019v4953673>
- Plant Cell Technologies. 2017. PPM™-Plant Preservative Mixture Product Information. Consultado 18 nov. 2020. Dispo-

- nible en <http://www.plantcelltechnology.com/ppmproduct-information>.
- Polesi LG, HP Fraga, LN Vieira, AS Heringer, TS Ornellas, HP Santos, MP Guerra, R Pescador. 2019. Chloroplast ultrastructure and hormone endogenous levels are differently affected under light and dark conditions during *in vitro* culture of *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson. *Acta Physiologiae Plantarum* 41(1): 10. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-018-2804-7>
- Ray SS, N Ali. 2016. Biotic contamination and possible ways of sterilization: a review with reference to bamboo micropropagation. *Brazilian archives of biology and technology* 59: e16160485. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2016160485>
- R Core Team. R. 2020. a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Ribeiro AS, GE Brondani, GCR Tormen, AJR Figueiredo. 2016. Cultivo *in vitro* de bambu em diferentes sistemas de propagação. *Nativa* 4(1): 15-18. DOI: <http://dx.doi.org/10.14583/2318-7670.v04n01a04>
- Saini H, ID Arya, S Arya, R Sharma. 2016. *In vitro* Micropropagation of Himalayan Weeping Bamboo, *Drepanostachyum falcatum*. *American Journal of Plant Sciences* 7(9): 1317-1324. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2016.79126>
- Sandhu M, SH Wani, VM Jiménez. 2017. *In vitro* propagation of bamboo species through axillary shoot proliferation: a review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 132: 27-53. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-017-1325-1>
- Santos DWRd, TP Rocker, TS Ornellas, MP Guerra. 2019. Effects of a commercial biocide, kasugamycin and consistency of the culture medium on the *in vitro* establishment of bamboo. *Pesquisa Agropecuaria Tropical* 49: e55435. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632019v4955435>
- Thapa P, A Bhattacharya, P Sood, K Devi, A Sood. 2018. Advances in bamboo biotechnology: Present status and future perspective. *Biotechnologies of Crop Improvement* 1: 243-265. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-78283-6_7
- Thomas P, M Agrawal, CB Bharathkumar. 2017. Use of Plant Preservative Mixture for establishing *in vitro* cultures from field plants: Experience with papaya reveals several PPM™ tolerant endophytic bacteria. *Plant Cell Reports* 36(11): 1717-1730. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-017-2185-1>
- Torres GRC, LM Houllou, RA Souza. 2016. Control of contaminants during introduction and establishment of *Bambusa vulgaris in vitro*. *Research in Biotechnology* 7(1): 58-67.

Recibido: 20.12.20

Aceptado: 16.06.22

