



CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

Premio de la Academia de Ciencias de Cuba, 2019

Alternativas para la propagación de *Bambusa vulgaris* Schard. ex Wendl

Yudith García Ramírez¹ <https://orcid.org/0000-0002-9873-4285>

Marisol Freire Seijo¹ <https://orcid.org/0000-0002-1962-2809>

Mallelyn González González² <https://orcid.org/0000-0002-7088-8805>

Yelenys Alvarado Capó¹ <https://orcid.org/0000-0003-1721-717X>

Mayra Acosta Suárez¹ <https://orcid.org/0000-0002-1256-5688>

Ortelio Hurtado Ribalta¹ <https://orcid.org/0000-0002-1704-569X>

Ambrosio Amado Pérez Cabrera¹ <https://orcid.org/0000-0002-4584-6996>

Raúl Barbón Rodríguez¹ <https://orcid.org/0000-0002-4284-0281>

Miladys León Quintana¹ <https://orcid.org/0000-0002-7920-4609>

Mariana la O Cárdenas¹ <https://orcid.org/0000-0003-2300-2458>

Leonardo Ribero Quintana¹ <https://orcid.org/0000-0003-3627-9421>

Sinesio Torres García² <https://orcid.org/0000-0003-2382-112X>

Ángel Mollineda Trujillo³ <https://orcid.org/0000-0002-5057-4411>

Fernando Martirena Hernández⁴ <https://orcid.org/0000-0002-8841-9628>

Pedro Seijo Pérez⁴ <https://orcid.org/0000-0002-5674-1444>

Berto Arteaga Arbolaes⁵ <https://orcid.org/0000-0002-5665-9440>

Armando Solano Cabrera⁶ <https://orcid.org/0000-0002-4903-3191>

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Santa Clara, Cuba

² Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas (FCA)

³ Centro de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas (CIAP)

⁴ Centro de Investigación y Desarrollo de Estructuras y Materiales, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas (CIDEM)

⁵ Empresa Agroforestal de Villa Clara

⁶ Instituto de Investigaciones Agroforestales-Villa Clara

*Autor para la correspondencia: yudith@ibp.co.cu

Palabras clave

bambúes; macropropagación; propagación *in vitro*

RESUMEN

Introducción. La alta tasa de contaminantes microbianos visibles en la fase de establecimiento, así como una baja tasa de multiplicación, enraizamiento y supervivencia *ex vitro*, constituyen los principales problemas durante la propagación *in vitro* en *Bambusa vulgaris* Schard. ex Wendl. El presente trabajo se realizó con el objetivo de proponer nuevas alternativas para la propagación de *Bambusa vulgaris* Schard. ex Wendl combinando técnicas tradicionales.



Métodos. Se determinó la influencia de las condiciones climáticas en el establecimiento *in vitro* de los segmentos caulinares. Además, se estudió el efecto de las condiciones de cultivo en los brotes multiplicados en medio de cultivo líquido estático y Sistemas de inmersión temporal, así como su respuesta durante la fase de aclimatización. **Resultados.** Fueron identificados por primera vez los contaminantes microbianos de alta frecuencia de aparición asociados a las plantas en casa de cultivo e *in vitro*. Durante el establecimiento *in vitro* de las yemas axilares se logró un 99 % de brotación y 98 % de explantes libres de contaminantes microbianos visibles entre los meses de enero-abril y noviembre-diciembre. Se demostró que los brotes multiplicados entre el sexto y octavo subcultivo con 12 μM de 6-BAP pueden ser utilizados para la multiplicación en Sistemas de Inmersión Temporal. Se logró incrementar la calidad morfo-fisiológica y bioquímica de los brotes cultivados en los SIT con la menor concentración de 6-BAP (6,0 μM) y un tiempo de inmersión de 2 min, aspectos poco abordados en las especies de bambúes. Se describieron los primeros estudios en la especie sobre el efecto de la sacarosa en la respuesta morfo-fisiológica, anatómica y bioquímica de los brotes en los SIT durante la transición *in vitro-ex vitro*. Las plantas llevadas a la casa de cultivo pudieron emitir entre 4 y 7 nuevos brotes con altas tasas de supervivencia durante la extracción de retoños.

Alternatives for the propagation of *Bambusa vulgaris* Schard. ex Wendl

ABSTRACT

Introduction. The high rate of visible microbial contaminants in the establishment phase, as well as a low rate of multiplication, rooting and survival *ex vitro*, constitute the main problems during *in vitro* propagation in *Bambusa vulgaris* Schard. exWendl. The present work was carried out with the objective of proposing new alternatives for the propagation of *Bambusa vulgaris* Schard. exWendl combining traditional techniques. **Methods.** The influence of climatic conditions on the *in vitro* establishment of stem segments was determined. In addition, the effect of the culture conditions on the multiplied shoots in static liquid culture medium and temporary immersion systems was studied, as well as their response during the acclimatization phase. **Results.** Microbial contaminants with a high frequency of appearance associated with plants in cultivation and *in vitro* were identified for the first time. During the *in vitro* establishment of the axillary buds, 99 % sprouting and 98 % explants free of visible microbial contaminants were achieved between the months of January-April and November-December. It was shown that shoots multiplied between the sixth and eighth subculture with 12 μM 6-BAP can be used for multiplication in Temporary Immersion Systems. It was possible to increase the morpho-physiological and biochemical quality of the shoots grown in the SITs with the lowest concentration of 6-BAP (6,0 μM) and an immersion time of 2 min, aspects little addressed in the bamboo species. The first studies in the species on the effect of sucrose on the morpho-physiological, anatomical and biochemical response of shoots in SITs during the *in vitro-ex vitro* transition were described. The plants brought to the grow house were able to emit between 4 and 7 new shoots with high survival rates during the extraction of suckers.

Keywords

Bamboo; macropropagation; *in vitro* propagation

INTRODUCCIÓN

Los bambúes son especies protectoras del ambiente y juegan un papel determinante por la cobertura que brindan al hábitat donde crecen. La sujeción del sustrato, mediante sus raíces y rizomas, evita la erosión hídrica y elimina las cárcavas. Además, ayudan a fijar el dióxido de carbono atmosférico

(CO₂), de una manera mucho más eficiente que los árboles del bosque tropical. Por otra parte, poseen gran importancia en la conservación de los recursos hídricos en países de América Latina.⁽¹⁾ *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl (*B. vulgaris*) es la especie mejor adaptada a los ecosistemas cubanos y es capaz de crecer en suelos con poca capacidad productiva.⁽²⁾

La regeneración natural de esta especie se ve afectada por un largo período de floración y por la baja viabilidad de la semilla. Del mismo modo, la propagación vegetativa por la división de los rizomas se obstaculiza por las bajas tasas de enraizamiento y escasa disponibilidad de propágulos.⁽³⁾ Las razones anteriormente expuestas acentúan la baja disponibilidad de posturas para Cuba.⁽⁴⁾

Como una alternativa a las limitantes en la propagación vegetativa de esta especie, los métodos biotecnológicos permiten obtener un mayor número de plantas en un corto período de tiempo.⁽⁵⁾ La organogénesis y la embriogénesis somática son las técnicas más abordadas en las investigaciones relacionadas con la propagación *in vitro* de los bambúes.⁽⁶⁾ En *B. vulgaris* se establecieron protocolos para la regeneración de plantas vía organogénesis, con el empleo de medios de cultivo en estado semisólido.^(7,8,9) Sin embargo, estos protocolos poseen bajos coeficientes de multiplicación y porcentajes de supervivencia de las plantas en condiciones *ex vitro*. Por tanto, dichas limitantes impiden contar con un protocolo repetible y eficiente para la propagación de *B. vulgaris*. El objetivo de la presente investigación fue proponer nuevas alternativas para la propagación de *B. vulgaris* combinando técnicas tradicionales.

MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el laboratorio de propagación masiva de plantas del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas.

Para el desarrollo de los experimentos *in vitro* se definieron cinco bloques de experimentos, el primero de ellos referido a la influencia de las condiciones climáticas en el establecimiento *in vitro* de los segmentos caulinares de *B. vulgaris*. El segundo al efecto del 6-BAP y el número de subcultivo en la multiplicación de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en medio de cultivo líquido estático. El tercero al efecto de las condiciones de cultivo en la multiplicación, morfo-fisiología y bioquímica de los brotes de *B. vulgaris* en Sistemas de inmersión temporal (SIT). El cuarto al efecto de la sacarosa en la morfo-fisiología, anatomía y bioquímica de los brotes cultivados en los SIT durante la transición de las condiciones *in vitro* a *ex vitro* y un último bloque relacionado con el deshije de las plantas aclimatizadas.

RESULTADOS

Establecimiento del banco de plantas donantes

Fueron definidas las condiciones para el mantenimiento del banco de plantas donantes teniendo en cuenta su influencia en el establecimiento *in vitro* de las yemas axilares. Se de-

terminó la microbiota de plantas donadoras y los resultados de relacionaron con la aparición de hongos filamentosos contaminantes de la fase de establecimiento. Se comprobó que las plantas donadoras de poseían una micobiota integrada por *Alternaria*, *Botryotrichum*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Nigrospora*. Los géneros *Asteromella*, *Bipolaris* y *Humicola* se identificaron en fase de establecimiento, mientras que *Alternaria*, *Botryotrichum*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Nigrospora* aparecieron en plantas donadoras y en el establecimiento. Se confeccionó un plan de defensa fitosanitario para plantas donadoras que incluyó fungicidas sistémicos y de contacto cuyo espectro de acción cubría los géneros de hongos identificados.⁽¹⁰⁾

Influencia de las condiciones climáticas en el establecimiento *in vitro* de los segmentos caulinares de *B. vulgaris*

Con el objetivo de determinar la influencia de las condiciones climáticas en el establecimiento *in vitro* de los segmentos caulinares de *B. vulgaris*, se realizó el presente experimento. Como material vegetal se seleccionaron segmentos caulinares con una longitud entre 2,0 a 3,0 cm procedentes del banco de plantas donantes de *B. vulgaris* en casa de cultivo a partir de riendas y culmos. A partir de esta selección, los segmentos fueron sumergidos en una solución de etanol al 70 % (v/v) e hipoclorito de sodio (NaClO) al 2,0 % con 0,2 mL de Tween-80 durante 20 min para su desinfección y luego se colocaron en un medio de cultivo líquido con 6,0 μ M de 6-BAP. Por primera vez para Cuba se logra reducir en los meses de enero-abril y noviembre-diciembre la tasa de contaminantes microbianos visibles (98,38 %) e incrementar el porcentaje de yemas axilares brotadas (99 %).⁽¹¹⁾ Los resultados alcanzados en este estudio constituyen un aporte científico, ya que la mayoría de las investigaciones científicas realizadas en las especies de bambúes hacen referencia a la toma del material vegetal de brotes de campo procedentes de chusquines, sin ninguna atención fitosanitaria.

Efecto del 6-BAP y el número de subcultivo en la multiplicación de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en medio de cultivo líquido estático

Este experimento se realizó con el objetivo de estudiar efecto del 6-BAP y el número de subcultivo sobre la respuesta morfológica de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en medio de cultivo líquido estático. Los mejores resultados durante la multiplicación de los brotes se lograron con la concentración de 12 μ M de 6-BAP, en la cual se alcanzaron los mayores valores en cuanto al número de brotes por explantes (4,92), número de hojas expandidas por brotes (4,80) y la longitud de los brotes (5,76 cm). Se logró incrementar el coeficiente

de multiplicación y la longitud de los brotes a partir del sexto hasta el octavo subcultivo. Los explantes procedentes de estos subcultivos fueron seleccionados como material vegetal en los siguientes experimentos. Por primera vez para Cuba se logra la multiplicación de brotes de *B. vulgaris* en medio de cultivo líquido estático, lo cual reviste de gran utilidad para la propagación masiva de especies de bambúes.^(12, 13)

Efecto de las condiciones de cultivo en la multiplicación, morfología y fisiología de los brotes de *B. vulgaris* en sistemas de inmersión temporal (SIT)

Para el desarrollo de este experimento se tomaron explantes procedentes del medio de cultivo líquido estático. Se determinó el efecto del 6-BAP, el tiempo de inmersión y la densidad de inóculo en la multiplicación, morfología y fisiología de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en SIT. Para este propósito, se estudiaron tres concentraciones de 6-BAP (6,0; 12,0 y 18,0 μM) y un tratamiento control sin regulador del crecimiento, basado de resultados previos.⁽¹⁴⁾ Posteriormente, se estudiaron tres tiempos de inmersión: uno, dos y tres minutos, según estudios anteriores.⁽¹⁵⁾ Finalmente, se evaluaron tres densidades de inóculo: 6, 12 y 18 brotes por SIT.

A partir de los resultados obtenidos, se logró definir la menor concentración de 6,0 μM de 6-BAP como la más adecuada para la multiplicación de los brotes de *B. vulgaris* en los SIT, teniendo en cuenta que con esta concentración, se logra alcanzar los mejores resultados, en cuanto al número de brotes por explante (24,45), número hojas expandidas por brotes (9,20) y la longitud de los brotes (9,39 cm), así como el contenido de clorofilas totales (130,62 $\mu\text{g/g}$ MF), fenoles totales (51,55 mg AG.g⁻¹ MS) y lignina (32,9 %). Se logró incrementar la calidad morfológica y fisiológica de los brotes de *B. vulgaris* con un tiempo de inmersión de 2 min, lo que está en correspondencia con el incremento del número de brotes por explantes (27,9), número de hojas expandidas por brotes (17,01) y la longitud de los brotes (10,35 cm). Además se obtienen los mejores resultados, en cuanto al mayor contenido de clorofilas total (140,87 $\mu\text{g/g}$ MF), fenoles (66,6 mg AG.g⁻¹ MS) y lignina (36,2 %).

Los estudios revelaron que el mayor número de brotes por explantes (28,83), número de hojas expandidas por brotes (17,01), longitud de los brotes (10,35 cm) y contenido de clorofilas total (146,40 $\mu\text{g/g}$ MF) se alcanzaron con la densidad de inóculo de 12 explantes/SIT.⁽¹⁶⁾ Por vez primera en la especie se describe el efecto de las condiciones de cultivo en los SIT sobre la calidad morfo-fisiológica de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en SIT, aspectos pocos abordados en la literatura científica para las especies de bambúes.

Efecto de la sacarosa en la morfofisiología, anatomía y bioquímica de los brotes cultivados en los SIT durante la transición de las condiciones *in vitro* a *ex vitro*

Esta investigación se llevó a cabo con el objetivo de estudiar el efecto de la sacarosa en la morfofisiología, anatomía y bioquímica de los brotes cultivados en los SIT durante las condiciones *in vitro* para su posterior aclimatización a las condiciones en casa de cultivo. Se estudiaron dos concentraciones de sacarosa (20 y 30 g L⁻¹) y un tratamiento control sin sacarosa, mediante la evaluación de los indicadores morfo-fisiológicos, anatómicos y bioquímicos se definió el tratamiento más adecuado. El mejor resultado se alcanzó en el tratamiento sin sacarosa, los brotes mostraron desde las condiciones *in vitro* un mayor número de hojas expandidas por brotes (22,8), longitud de los brotes (13,41 cm), contenido de masa fresca (2,68 g) y seca (0,25), así como un alto contenido de clorofila total (314,31 $\mu\text{g/g}$ MF), un desarrollo estomático similar al de las plantas *in vivo*, una mayor capacidad antioxidante para enfrentar el estrés oxidativo y la adaptación en casa de cultivo en comparación con los explantes provenientes del tratamiento con sacarosa.

Por primera vez en la especie *B. vulgaris* se logra incrementar la respuesta morfo-fisiológica, anatómica y bioquímica de los brotes cultivados en los SIT en un medio de cultivo sin sacarosa. La evaluación de indicadores morfofisiológicos y bioquímicos, así como la caracterización estomática mediante microscopía electrónica de barrido permitieron definir parámetros de la calidad temprana en los brotes de *B. vulgaris* durante el crecimiento *in vitro* y su posterior adaptación a la fase *ex vitro*, resultados nunca antes descritos en la literatura científica internacional.⁽¹⁷⁾

Deshije de las plantas aclimatizadas

Las plantas llevadas a casa de cultivo fueron capaces de emitir entre 4 y 7 nuevos hijos con altos porcentajes de supervivencia luego del deshijes. Las plantas sembradas en casa de cultivo fueron capaces de emitir entre 4 y 7 nuevos hijos con altos porcentajes de supervivencia luego del deshijes. Estos resultados demuestran la posibilidad de emplear estrategias de trabajo de desarrollo local en las que se permita el acceso de los campesinos a los productos de las altas tecnologías.⁽¹⁸⁾

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo son de gran novedad científica. Por primera vez se logró un protocolo de propagación de plantas de *B. vulgaris* vía organogénesis en medio de cultivo líquido empleando SIT. Se profundizó en los estudios morfológicos y fisiológicos durante la transición *in vitro-ex vitro*. Se realizó la caracterización de la anatomía foliar mediante

microscopía electrónica de barrido y el análisis morfométrico del complejo estomático de los brotes cultivados *in vitro*. Se cuantificaron indicadores bioquímicos y enzimas antioxidantes en respuesta al estrés oxidativo en brotes cultivados *in vitro*. Se propone un procedimiento de trabajo para el deshielo de las plantas aclimatizadas que complementa la estrategia general para la propagación comercial de *B. vulgaris*. La combinación de los métodos biotecnológicos y tradicionales de propagación permitieron proponer a los productores una nueva alternativa para la propagación de *B. vulgaris* que puede ser aplicada a otras especies de bambúes y a partir de la cual se establecieron plantaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sánchez-Medrano, M.; Espuna Mújica, J.; Roux Gutierrez, R. El bambú como elemento estructural: la especie *Guadua amplexifolia*. *Nova Scientia*, 2016; 8(17): 657-677.
- Catasús Guerra, L. Estudio de los bambúes arborescentes cultivados en Cuba. La Habana-Cuba: ACTAF. 2003, p. 56.
- Mudoji, K.; Saikia, S.; Goswami, A.; Gogoi, A.D.; Borthakur, M. Micropropagation of important bamboos: a review. *African Journal of Biotechnology*, 2013;12(20): 2770-2785. DOI: 10.5897/AJB12.2122
- Cordero-Miranda, E. Propuesta para el manejo sostenible de *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendl con objetivo protector en diferentes condiciones ecológicas del río Cuyaguatije, Pinar del Río. Tesis en opción al grado científico de doctor en Ciencias Ecológicas, Universidad de Pinar del Río, Pinar del Río. (2010, pp. 11-20.
- Goyal, A.; Pradhan, S.; Basistha, B.; Sen, A. Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. *3 Biotech*, 2015;5(4): 473-482. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0244-7>
- Goyal, A.; Sen, A. In vitro regeneration of bamboos, the "Green Gold": an overview. *Indian Journal of Biotechnology*, 2016;15(1):9-16.
- Gielis, J.; Peeters, H.; Gillis, K.; Oprins, J.; Debergh, P. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. *Acta Horticulturae*, 2001;552:195-203. DOI: 10.17660/ActaHortic.2001.552.22
- Gajjar, H.; Raval, A.; Raval, H.; Patel, H.; Ramchandra, S. In Vitro Propagation of *Bambusa vulgaris* Through Branch Node. *International Journal of Current Research and Academic Review*. 2017;5(8):12-17. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcrar.2017.508.002>
- Furlan, C.; Gavilan, N.; Zorz, A.; de Oliveira, L.; Konzen, E.; Bron-dani, G. Active chlorine and charcoal affect the in vitro culture of *Bambusa vulgaris*. *Oficina de la Revista: Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, Valdivia, Chile*. 2018;39(1-2018):61-70. DOI: 10.4067/S0717-92002018000100006
- Acosta-Suárez, M.; Alvarado-Capó, Y.; Cruz-Martín, M.; Roque, B.; Sánchez-García, C.; Leiva-Mora, M.; Tejeda, M. Micobiota de plantas donadoras y contaminantes fúngicos del establecimiento in vitro de especies de bambúes. *Biotecnología vegetal*. 2008;8(1):57-61.
- García-Ramírez, Y.; Freire-Seijo, M.; Pérez, B.; Hurtado O. Establecimiento in vitro de *Bambusa vulgaris* var *vulgaris* Schrad. ex Wendl. en diferentes épocas del año. *Biotecnología Vegetal*. 2010;10(3): 151-156.
- García-Ramírez, Y.; Freire-Seijo, M.; Hurtado, O. Propagación in vitro de bambúes. *Biología Vegetal*. 2011;11(3):131-142.
- García-Ramírez, Y.; González-González, M.; Freire-Seijo, M.; La O-Cárdenas, M.; León-Quintana, M.; Roque-Morales, B.; Rive-ro-Quintana, L. Effect of morphological and physiological deve-lopment on the acclimatization of in vitro plants of *Bambusa vul-garis* Schrad ex Wendl in Liquid Culture Medium. *Open Access Library Journal*. 2015;2(09):1-6. DOI: 10.4236/oalib.1101787
- García-Ramírez, Y.; González, M.; Mendoza, E.; Seijo, M.; Cárde-nas, M.; Moreno-Bermúdez, L.; Ribalta, O. Effect of BA treatments on morphology and physiology of proliferated shoots of *Bam-busa vulgaris* Schrad. Ex Wendl in temporary immersion Ameri-can Journal of Plant Sciences. 2014;5:205-211. DOI: <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.52027>
- González, M.; García-Ramírez, Y.; Quiala, E.; La O, M.; Roque, B.; Mena, E.; Freire-Seijo, M. Efecto del tiempo de inmersión sobre la multiplicación in vitro de *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendl en SIT RITA®. *Biología Vegetal*. 2013;13(1):33-39.
- García-Ramírez, Y.; González-González, M.; García, S.; Freire-Seijo, M.; Pérez, M.; Trujillo, A.; Barbón, R. Efecto de la densidad de inó-culo sobre la morfología y fisiología de los brotes de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl cultivados en Sistema de Inmersión Temporal. *Biología Vegetal*. 2016;16(4): 231-237.
- García-Ramírez, Y.; Barrera, G.; Seijo, M.; Barbón, R.; Concep-ción-Hernández, M.; Mendoza-Rodríguez, M.; Torres-García, S. Effect of sucrose on physiological and biochemical changes of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex Wendl in temporary immersion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01564-z>
- Freire-Seijo, M.; García-Ramírez, Y.; Hurtado, O.; León, M.; Rosabal, L.; Cruz-Martín, M.; Roque, B. Combinación de técnicas biotec-nológicas y tradicionales para la propagación de diferentes espe-cies de bambú. *Biología Vegetal*. 2011;11(3): 99-102

Recibido: 28 de abril de 2020

Aprobado: 30 de mayo de 2020

Conflicto de interés: No existen conflictos de intereses.

Contribución de autoría:

- Conceptualización: Yudith García Ramírez,
- Curación de datos: Yudith García Ramírez, Mallelyn González
- Análisis formal: Yudith García Ramírez,
- Adquisición de fondos: Yudith García Ramírez, Marisol Freire Seijo, Fernando Martirena Hernández, Pedro Seijo Pérez
- Investigación: Yudith García Ramírez, Marisol Freire Seijo, Mallelyn González
- Metodología: Yudith García Ramírez, Marisol Freire Seijo, Mallelyn González, Yelenys Alvarado Capó, Mayra Acosta Suárez, Ortelio Hurtado Ribalta, Ambrosio Amado Pérez Cabrera, Miladys León Quintana, Ángel Mollineda Trujillo

7. Administración del proyecto: Yudith García Ramírez, Marisol Freire Seijo, Fernando Martirena Hernández, Pedro Seijo Pérez
8. Recursos: Yudith García Ramírez, Marisol Freire Seijo, Mallelyn González, Yelenys Alvarado Capó, Mayra Acosta Suárez, Ortelio Hurtado Ribalta, Ambrosio Amado Pérez Cabrera, Miladys León Quintana, Mariana la O Cárdenas, Leonardo Ribero Quintana, Berto Arteaga Arbolaes, Armando Solano Cabrera
9. Software: Yudith García Ramírez
10. Supervisión: Sinesio Torres García
11. Validación: Yudith García Ramírez, Marisol Freire Seijo, Sinesio Torres García, Raúl Barbón Rodríguez
12. Visualización: Yudith García Ramírez
13. Redacción – borrador original: Yudith García Ramírez
14. Redacción – revisión y edición: Yudith García Ramírez

