



**UNIVERSIDAD CENTRAL
"MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LAS PLANTAS**



Tesis presentada para optar por el grado académico de
Master en Biotecnología Vegetal

**Regeneración vía organogénesis de plantas de *Bambusa vulgaris*
var. *vulgaris* Schrad ex Wendl.**



Autora: Ing. Yudith Yanet García Ramírez
Tutora: Dr. C. Marisol Freire Seijo

**Santa Clara, Cuba
2010**

Resumen

El cultivo de tejidos ofrece un medio rápido y confiable para la propagación *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl mediante la regeneración de plantas vía organogénesis. Este trabajo se realizó con el objetivo de establecer, multiplicar y enraizar plantas *in vitro* de *B. vulgaris* a partir de yemas axilares. Para esto se cuantificó el número de brotes por explante, se midió la altura de los brotes (cm) desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja, el número de hojas expandidas por cada explante y el número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles. Como resultado se determinó que la época del año influyó en el establecimiento *in vitro* de *B. vulgaris*. El mayor número de yemas brotadas por explantes (99%) y de explantes libres de contaminantes microbianos visibles (98%), se logró en los meses de enero-octubre. Se determinó que el 6-BAP influyó en el establecimiento *in vitro* de *B. vulgaris*. El mayor número de brotes por explantes (2,81) se alcanzó al emplear una concentración de 6-BAP de 3,0 mg.L⁻¹. Se comprobó que el medio de cultivo en estado líquido influyó en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*. El mayor valor de coeficiente de multiplicación de 3,0, se obtuvo en el quinto subcultivo de multiplicación. Se comprobó además, que el medio de cultivo en estado líquido influyó en el enraizamiento *in vitro* de *B. vulgaris*. Se demostró que el TDZ influyó en el enraizamiento *in vitro* de *B. vulgaris*. Los mayores porcentajes de raíces emitidas (88,2%) se alcanzaron al emplear una concentración de 0,6 mg.L⁻¹ de TDZ en el medio de cultivo líquido de enraizamiento. Estos resultados constituyen una alternativa para la regeneración de plantas vía organogénesis a través del empleo del medio de cultivo líquido de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad ex Wendl y para la propagación de grandes volúmenes de plantas para el escalado comercial de esta especie.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Generalidades del cultivo de bambúes	4
2.1.1 Origen y Distribución	4
2.1.2 Clasificación taxonómica y característica botánica	4
2.1.3 Cultivares de bambúes adaptados en Cuba	5
2.1.4 Importancia del género <i>Bambusa</i>	5
2.2- Métodos de propagación de bambúes	6
2.2.1 Métodos de propagación tradicionales	6
2.2.1.1 Propagación sexual o gámica	6
2.2.1.2 Propagación asexual o agámica	7
2.2.2 Métodos biotecnológicos	8
2.3 Propagación <i>in vitro</i> vía organogénesis en bambúes	9
2.3.1 Fase Preparativa o Fase 0	9
2.3.2 Fase de Establecimiento o Fase I	10
2.3.3 Fase de Multiplicación o Fase II	13
2.3.4 Fase de Enraizamiento o Fase III	15
3. Materiales y métodos	19
3.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>B. vulgaris</i>	21
3.1.1 Influencia de la época del año en el establecimiento <i>in vitro</i>	21
3.1.2 Influencia del 6-BAP en la brotación de las yemas axilares	22
3.1.3 Efecto del estado físico del medio de cultivo en el establecimiento	22
3.2 Multiplicación <i>in vitro</i> de <i>B. vulgaris</i>	23
3.2.1 Influencia del 6-BAP	23
3.2.2 Efecto del estado físico del medio de cultivo	24
3.2.3 Efecto del número de subcultivo	25
3.3 Enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>B. vulgaris</i>	26
3.3.1- Efecto del AIB	26
3.3.2- Efecto del TDZ	27
4.0 Resultados y Discusión	29
4.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>B. vulgaris</i>	29
4.1.1- Efecto de la época del año en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>B. vulgaris</i>	29
4.1.2- Efecto del 6-BAP en la brotación de las yemas axilares	32
4.1.3- Efecto del estado físico del medio de cultivo durante la fase de establecimiento	34
4.2 Multiplicación <i>in vitro</i> de <i>B. vulgaris</i>	36
4.2.1- Efecto del 6-BAP	36
4.2.2- Efecto del estado físico del medio de cultivo	39
4.2.3- Efecto del número de subcultivo	42
4.3 Enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>B. vulgaris</i>	45
4.3.1 Efecto del AIB	45
4.3.2 Efecto del TDZ	49
5. CONCLUSIONES	56
6. RECOMENDACIONES	57
7. REFERENCIAS	58

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha resurgido un gran interés en el empleo del bambú como fuente de materias primas para la industria, motivado por restricciones de carácter ecológico y la escasez de recursos forestales. Igualmente, por la posibilidad de emplear los bosques de bambú como un modulador del medio ambiente por su capacidad de crecimiento y por su adaptación a climas tropicales, subtropicales y templados, además de que favorece la conservación del agua, el suelo y la biodiversidad (Bystriakova *et al.*, 2004).

El bambú por las altas tasas de crecimiento es capaz de alcanzar elevados volúmenes de biomasa, hasta dos veces más que los árboles de rápido crecimiento. Este recurso representa una oportunidad para integrar iniciativas de desarrollo sostenible, ya que por su fortaleza, elasticidad y dureza, puede ser empleado en la fabricación de artesanías, muebles y viviendas, lo cual sería un recurso complementario como medio de vida de los pequeños productores rurales (INBAR, 1999; Morales, 2002). El desarrollo de nuevas utilidades para el bambú es recomendable por ser un recurso renovable y sostenible (Mejia *et al.*, 2009).

En Cuba, no se cuenta con recursos forestales suficientes y la disponibilidad de plantaciones de bambú es pequeña y dispersa, por lo que imposibilita una explotación económica para la industria (Mejia *et al.*, 2009).

Bambusa vulgaris var. vulgaris Schard. ex Wendl. es la especie más adaptada a los ecosistemas cubanos y se ha naturalizado a todo lo ancho y largo del país. Es fácil de cultivar, utilizar, transportar, cortar y moldear, tiene un rápido crecimiento y alcanza la madurez en un período de tiempo relativamente corto. Es una especie multipropósito de rápido crecimiento y proporciona beneficios a los cultivos agrícolas y ha sido empleada en plantaciones y sistemas agroforestales (Christanty *et al.*, 1997).

La regeneración natural de *B. vulgaris* se ve afectada por la duración del ciclo de floración y la viabilidad de las semillas. La propagación vegetativa a través de la división de rizomas se dificulta debido a los bajos porcentajes de enraizamiento y la poca disponibilidad de

propágulos (Reddy y Yekanthappa, 1989). Estos elementos constituyen limitantes para la propagación masiva de bambúes (Koshy y Gopakumar, 2005).

Desarrollar la propagación vía organogénesis sería una alternativa para propagar esta especie. Sin embargo, aunque el cultivo de tejidos ofrece un medio rápido y confiable para la regeneración de bambúes mediante el empleo de yemas axilares (Jiménez *et al.*, 2006; Ramanayake *et al.*, 2006), en Cuba no se han desarrollado protocolos para ello. A nivel mundial, la mayoría de los resultados obtenidos describen protocolos principalmente para *Bambusa vulgaris* var. *vittata* (Kalia *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2003, 2004) y *Dendrocalamus* sp. (Ramanayake *et al.*, 2001; Sood y Ahuja, 2002).

Según Saxena y Dhawan (2004) y Koshy y Gopakumar (2005), la contaminación en la fase de establecimiento, las bajas tasas de multiplicación y enraizamiento, así como los bajos porcentajes de supervivencia *ex vitro* han sido elementos que han afectado la propagación de diferentes especies de bambúes

En la búsqueda de posibles soluciones se han estudiado y puesto en práctica alternativas para elevar los coeficientes de multiplicación. En este sentido, varios autores han evaluado la influencia de citoquininas como 6-benzilaminopurina (6-BAP) sola o en combinación con kinetina o con la auxina ácido α -naftalenacético (ANA) (Yashodha *et al.*, 2007) y también se ha hecho referencia a la posibilidad de emplear medio de cultivo líquido tal y como fue descrito en la especie *Pseudoxynanthera stocksii* por Sanjaya *et al.* (2006).

En la fase de enraizamiento el empleo del ácido indole-3-butírico (AIB) y el thiadiazuron (TDZ) han sido los reguladores del crecimiento más estudiados y a pesar de aplicarse elevadas concentraciones de estos, los porcentajes de enraizamiento *in vitro* han sido bajos (Mishra *et al.*, 2007; Ramanayake *et al.*, 2008).

A partir de la problemática planteada, se formuló la siguiente hipótesis de trabajo:

“Mediante la regeneración vía organogénesis es posible propagar plantas *in vitro* de la especie *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* a partir de yemas axilares”

Para dar cumplimiento a la misma se plantearon los siguientes objetivos de trabajo:

Objetivos:

- ❖ Determinar la influencia de la época del año, la concentración del 6-BAP y el estado físico del medio de cultivo en la fase de establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var *vulgaris*
- ❖ Determinar durante la fase de multiplicación *in vitro* de plantas de *B. vulgaris* var. *vulgaris* la influencia de la concentración de 6 BAP y el estado físico del medio de cultivo.
- ❖ Definir la influencia del AIB y el TDZ en la fase de enraizamiento *in vitro* de las plantas multiplicadas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades del cultivo de bambúes

2.1.1 Origen y Distribución

Los bambúes son originarios de Asia y presentan diversidad en cuanto a especies y tamaño (Li, 2006). Son Poáceas de amplia distribución en el mundo desde el continente asiático hasta el americano. De los países asiáticos, China presenta una extensa gama de especies, con un total de 626, le sigue la India con 102, luego Japón con 84, Myanmar con 75 y Malasia con 50. De los países americanos, Brasil tiene la mayor diversidad con 141 especies de bambúes, le sigue Colombia con 72 especies (24 endémicas). En tercer lugar aparece Venezuela con 60, luego está Ecuador con 44. Le sigue por último Costa Rica y México con 39 especies leñosas (Londoño *et al.*, 2009).

2.1.2 Clasificación taxonómica y característica botánica

Según el sistema de clasificación sugerido por Watson y Smith (1961) y Chin (1977), la taxonomía del género es la siguiente:

Reino: *Plantae*

Filo: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida* (Monoc.)

Orden: *Poales*

Familia: *Bambusoideae*

Género: *Bambusa*.

Dentro de los bambúes el género *Bambusa* se destaca por su gran importancia desde el punto de medioambiental y tiene especies de gran interés económico como *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J.C. Wendl, conocido como bambú común o simplemente bambú. Es un tipo de bambú alto, sin espinas que forma macizos que comparten rizomas. La especie sobresale dentro del género por sus propiedades físico - mecánicas y por el tamaño de sus culmos; que alcanzan hasta 20 metros de altura y 15 centímetros de diámetro. Originaria del

Viejo Mundo, probablemente del Asia tropical. Es el bambú más cultivado en el trópico y en el subtropical, en la riberas de los ríos y como planta ornamental en las ciudades. En América, *B. vulgaris* se ha adaptado a diversos tipos de suelos y de climas, desde México hasta Uruguay, e Islas del Caribe (Das *et al.*, 2008).

2.1.3 Cultivares de bambúes adaptados en Cuba

Cuba cuenta dentro de la familia *Bambusoideae* con un grupo de bambúes herbáceos y leñosos con un 50% de endemismo. Solo *B.vulgaris* ha sido la especie más adaptada y naturalizada a todo lo largo y ancho del país (Catasús, 2003). Especies como: *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J.C. Wendl, *Bambusa vulgaris* var. *vittata* A. y C. Rivière, *Bambusa bambos* (L.) Voss, *Bambusa oldhamii* Munro, *Bambusa polymorpha* Munro, *Bambusa tuldooides* Munro, *Guadua angustifolia* Kunth, *Dendrocalamus strictus* (Roxburgh) Nees, *Dendrocalamus asper* (Schultes) Backer, sólo se encuentran en los jardines botánicos de Cienfuegos y Holguín, el Banco de germoplasma de la Asociación de Técnicos Agrícolas y Forestales (ACTAF) de Granma, Villa Clara, Ciudad de La Habana y Topes de Collantes (Catasús, 2000).

2.1.4 Importancia del género *Bambusa*

El género *Bambusa* representa uno de los más grandes recursos naturales renovables. Por sus excelentes propiedades físico-mecánicas, su resistencia al ataque de insectos, su belleza y por la diversidad de aplicaciones que se le dan; representa una valiosa alternativa económica que ha coadyuvado a mitigar la problemática social del campo en Cuba. Desde el punto de vista medio ambiental brinda cobertura al medio en donde crece por la sujeción del suelo que realiza mediante sus raíces y rizomas. Además evita la erosión y contribuye a eliminar las cárcavas que se forman en los cauces de los ríos a causa del mal uso de los suelos y la deforestación y como fijador de dióxido de carbono (Londoño *et al.*, 2002).

Es utilizado como materia prima para la obtención de celulosa y es la fuente principal para la fabricación del papel que se produce en la India (hasta el 70 %). Su uso como madera, dado las características propias de la especie y la rápida renovación de sus culmos, lo hacen un elemento de gran importancia (Catasús, 2003).

2.2- Métodos de propagación de bambúes

Los métodos de propagación de los bambúes pueden ser tradicionales y biotecnológicos. Estos se han llevado a cabo en un gran número de especies debido a la alta demanda que presentan en los diferentes programas de reforestación.

2.2.1 Métodos de propagación tradicionales

Los métodos de propagación de los bambúes pueden ser sexuales o asexuales (mediante el uso de semillas, rizomas, culmos y por secciones de tallos).

2.2.1.1 Propagación sexual o gámica

Propagación por semilla

El Bambú puede reproducirse a partir de sus semillas sexuales. Estas se pueden recolectar masivamente durante su florecimiento gregario o esporádico. La posibilidad de propagar bambúes por semilla no es un método práctico debido a los largos intervalos de florecimiento y a la poca disponibilidad del material vegetal en una determinada especie (Catasús, 2003).

Los porcentajes de germinación varían en función de la especie. Por ejemplo, en *Guadua angustifolia* Kunth oscilan entre 95-100% y a los 23 días después de la siembra se alcanza la germinación (Giraldo y Sabogal, 1999). Por otra parte, *D. strictus* cuenta con un alto porcentaje de germinación, lo que facilita su distribución por diferentes partes del mundo. En otras especies de bambú de los géneros *Bambusa*, *Gigantochloa* y la especie *Schizostachyum lumampao* se alcanza entre un 50-80% de germinación al séptimo día de sembradas.

Aunque *B. vulgaris* es una de las más vigorosas dentro de los bambúes (McClure, 1966), su fase vegetativa es persistente y florece esporádicamente (Ramanayake y Yakandawala, 1997; Koshy, 2000).

2.2.1.2 Propagación asexual o agámica

La propagación asexual constituye el método más empleado, debido a que las diferentes especies de bambúes no florecen regularmente y un elevado porcentaje de los frutos pueden ser estériles y tener escasa viabilidad. Los bambúes se pueden propagar asexualmente por división de rizomas con segmento de tallo, por división de plantones o trasplante directo, por segmentos de culmos y por segmentos de ramas.

División de rizomas con segmento de tallo: Es efectivo para todas las especies. Permite un 100% de supervivencia. Es un método práctico y ventajoso debido a la disponibilidad de material vegetal y a la facilidad de transportación. En *B. tuldoides* se ha alcanzado un 80% de éxito y ha sido ampliamente distribuida en la India para la reforestación. Colombia ha implementado este método para las reforestaciones con *G. angustifolia* (Londoño *et al.*, 2002).

División de plantones o trasplante directo: Permite un alto grado de éxito tanto por la tasa de supervivencia como su posterior desarrollo. Por lo general se emplea este sistema cuando se desea trasplantar un número muy pequeño de tallos con fines ornamentales (Catasús, 2003).

Segmentos de culmos: Es efectivo para propagar bambúes de gran tamaño y pared gruesa tales como *B. vulgaris*, *B. blumeana*, *D. asper* y *D. latiflorus*. Permite dar solución a problemas de escasez y peso del material vegetal para plantar. Se debe utilizar culmos de un año de sembrados y segmentos de culmo con uno o dos nudos por segmento. La siembra es mejor horizontal que vertical u oblicua y se deben enterrar a 20 cm de profundidad, regando dos veces al día. Los nuevos brotes se pueden empezar a observar entre la segunda y cuarta semana. Este método no es ventajoso por su alto costo y por la limitación

de material vegetal, los cuales pueden ser usados para otros propósitos (Londoño *et al.*, 2002).

Segmentos de ramas: Es útil, práctico y efectivo, además de ser fácilmente manejable. En Asia este método es ideal para establecer plantaciones a gran escala. Comúnmente se aplica en la siembra de *Dendrocalamus asper*, especie que se caracteriza por sus raíces aéreas en la base de las ramas laterales. Las ramas gruesas tienen mayor capacidad para enraizar que las delgadas. La eficiencia del enraizamiento varía en cada especie y depende del tamaño del culmo y del grosor de la pared. Los bambúes de pared gruesa poseen una mayor emisión de brotes y mejor enraizamiento probablemente debido a una mayor reserva de nutrientes.

Estos métodos constituyen una limitante para la propagación masiva de bambúes debido a la baja regeneración natural por el ciclo largo de floración y a la viabilidad de las semillas. A la poca disponibilidad de propágulos, a los bajos porcentajes de enraizamiento y supervivencia (Nadgauda *et al.*, 1990; Koshy y Gopakumar, 2005).

2.2.2 Métodos biotecnológicos

Los métodos biotecnológicos constituyen una herramienta fundamental para la propagación masiva, ya que permiten obtener un mayor número de plantas en un corto período de tiempo. La embriogénesis somática y la organogénesis constituyen los dos métodos más empleados en la propagación *in vitro* de bambúes (Lin *et al.*, 2004; Arshad *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2006; Ramanayake *et al.*, 2006).

2.3 Propagación *in vitro* vía organogénesis en bambúes

La gran mayoría de las especies de bambúes han sido propagadas vía organogénesis utilizando como material vegetal yemas axilares (Sood *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2004; Arshad *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2006; Ramanayake *et al.*, 2006;). Las especies *D. hamiltoni*; *G.*

angustifolia; *Bambusa vulgaris* var *vittata*, *B.wamin*, *B.edulis*) han sido propagadas mediante esta vía (Rajneesh y Hyamal, 2009).

Sin embargo, se presentan problemas derivados de varios factores como: la contaminación microbiana de los explantes, la baja tasa de multiplicación y de enraizamiento, además de la supervivencia *ex vitro*, representan aún hoy, significativas limitaciones para la propagación masiva (Ramanayake y Yakandawala, 1997; Bag *et al.*, 2000; Saxena y Dhawan, 2004).

Se reconocen cuatro fases en el proceso de propagación *in vitro*, estas son: Fase 0 o fase preparativa; fase I o fase de establecimiento; fase II o fase de multiplicación; fase III o fase de enraizamiento y fase IV o fase de aclimatización, algunos autores plantean un número mayor de fases, pero estas se encuentran implícitas dentro de las antes mencionadas.

2.3.1 Fase Preparativa o Fase 0

El objetivo de esta fase es garantizar un banco de plantas donantes de alta calidad genética y fitosanitaria, para disminuir los niveles de contaminantes microbianos visibles durante la fase de establecimiento *in vitro* y lograr una repetibilidad real del proceso (Mroginski *et al.*, 2004; George y Debergh, 2008).

La mayor fuente de contaminación primaria en los cultivos *in vitro* provienen de la planta madre. Si se logra establecer un explante axénico, la contaminación posterior será debido a fallos en las técnicas o procedimientos (Mroginski *et al.*, 2004).

Los factores que influyen sobre la calidad del explante son el tipo de órgano que sirve como explante inicial, su edad ontogénica y fisiológica, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante (Olmos *et al.*, 2004).

Es necesario establecer un plan de manejo fitosanitario en cada especie a propagar para reducir o eliminar bacterias sistémicas y virus. Este se debe definir bien en cada especie para lograr el éxito en el establecimiento *in vitro* (George y Debergh, 2008).

Autores como Jiménez *et al.* (2006) y Yasodha *et al.* (2007) describen en las metodologías desarrolladas para especies de bambúes como *B. nutans* y *G. angustifolia*, la importancia del establecimiento de un banco de plantas donantes en condiciones de invernadero y la aplicación sistemática de fungicidas comerciales, con el fin de disminuir los porcentajes de contaminación microbiana en la fase de establecimiento.

Una vez seleccionado el mejor explante se requiere desinfectarlo superficialmente, ya que en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante (Jiménez *et al.*, 2006)

2.3.2 Fase de Establecimiento o Fase I

El objetivo de esta etapa es lograr el establecimiento del explante fisiológicamente vigoroso y libre de contaminación microbiana para iniciar la multiplicación a gran escala (Olmos *et al.*, 2004).

Según Arshad *et al.* (2005) las pérdidas causadas por contaminaciones principalmente por hongos y bacterias constituyen un gran problema a escala mundial ya que sus efectos en condiciones *in vitro* pueden ser devastadores.

La selección del tejido vegetal, su estado fisiológico, el protocolo de desinfección a utilizar, así como el medio de cultivo tienen gran influencia en la efectividad del establecimiento *in vitro* (Ramanayake *et al.*, 2006).

Selección del explante

Como material vegetal en bambúes se han empleados semillas (Saxena, 1990; Chambers *et al.*, 1991 y Arya *et al.*, 1999), yemas axilares de 2-3 mm de diámetro (Sood *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2004; Arshad *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2006; Ramanayake *et al.*, 2006).

Por otra parte Mroginski *et al.* (2004) señalan que la edad del explante es un factor crítico, siendo la propagación *in vitro* a partir de tejidos jóvenes la de mayor éxito.

Olmos *et al.* (2004) plantean que en general, los órganos jóvenes tienen mejor respuesta en el establecimiento que los obtenidos a partir de materiales adultos.

Desinfección de yemas axilares

Para la desinfección de los explantes se han empleado diferentes compuestos, siendo los más comunes el etanol al 70%, las soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO) entre 1,0-2,0% (Das y Pal, 2005 a,b; Jiménez *et al.*, 2006; Ramanayake *et al.*, 2006) y el bicloruro de mercurio (HgCl₂) este último de mayor toxicidad y se emplea a bajas concentraciones en un corto período de tiempo (0,1% durante 1 a 3 minutos) (Nadgir *et al.*, 1984; Ramanayake y Yakandawala, 1997; Bag *et al.*, 2000; Marulanda *et al.*, 2005).

Conjuntamente con los desinfectantes se pueden añadir gotas de Tween con el objetivo de reducir la tensión superficial y eliminar las burbujas que se forman en la superficie y cavidades del explante. Terminado el tiempo de inmersión en desinfectante se realizan varios enjuagues con agua destilada estéril para eliminar sus restos (Alvarado *et al.*, 1997).

La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección, se determinan en gran medida por las características del explante. En la práctica se establecen experimentalmente por ensayo y error (Villalobos y Thorpe, 1991).

En otras especies de bambúes como: *D.strictus*, *B.arundinacea*, *D.asper*, *P.edulis*, *D.giganteus* y *B.polymorfa*, para la desinfección se han obtenido altos porcentajes de yemas brotadas al emplear hipoclorito de sodio 0,1% durante 5 min, combinándose con inmersión en bicloruro de mercurio (0,1%), durante 5 min (ICFRE, 2002).

Al respecto, Marulanda *et al.* (2005) para la desinfección de yemas axilares de *G.angustifolia* utilizaron una solución de bicloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,3% durante uno a tres minutos con lo que se alcanzaron un 74,0% de yemas brotadas y 52,0% de yemas brotadas para 5 minutos.

Por otra parte, Nidiye *et al.* (2006) obtiene entre un 80–100% de yemas brotadas durante el establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* al emplear NaClO al 2,0% durante 20 minutos.

Medios de cultivo

De acuerdo con Gielis *et al.* (2001) el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su fórmula física.

Autores como, Jiménez *et al.* (2006) hacen referencia a la cantidad de medios de cultivo utilizados en esta fase para la mayoría de las especies que han sido cultivadas en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al que se ha adicionado mio-inositol (100 mg.L^{-1}), sacarosa (30 g.L^{-1}), vitaminas MS ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) y ácido nicotínico ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$). Sin embargo las concentraciones de reguladores de crecimiento varían según las especie. Por ejemplo para *Bambusa balcooa*, Das y Pal (2005) combinaron kinetina ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) y 6-BAP ($2,5 \text{ mg.L}^{-1}$). De igual manera, Das y Pal (2005b) para *Bambusa tulda* emplearon kinetina ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) y 6-BAP ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Por su parte, Ramanayake *et al.* (2006) para *Bambusa vulgaris* var *vittata* proponen 6-BAP ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Similarmente, Marulanda *et al.* (2005) y Jiménez *et al.* (2006) para *Guadua angustifolia* emplearon 6-BAP ($1-3 \text{ mg.L}^{-1}$). Por otra parte, Ramanayake y Yakandawala (1997) para *Dendrocalamus giganteus* combinaron 6-BAP ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) y kinetina ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$).

2.3.3 Fase de Multiplicación o Fase II

El objetivo de esta etapa es incrementar el número de brotes a partir de explantes ya establecidos *in vitro*, sin comprometer la calidad genética de las plantas generadas. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio de cultivo mediante divisiones y resiembras en recipientes adecuados. De esta forma, aumenta el número de plantas en cada subcultivo. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo, lo que permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Castillo, 2008).

Esta es la fase más importante y determinante en todo programa de propagación *in vitro*. Es en ella que se realiza la verdadera multiplicación de una especie definiéndose no sólo el

número de plantas a obtener, sino su calidad genética por ser esta fase en la que se producen las variantes somaclonales (Orellana *et al.*, 1998)

Medios de cultivo

El estado físico de los medios de cultivo constituye un aspecto importante para el cultivo *in vitro*. Desde que se inició el cultivo de tejidos, los medios de cultivo han sido empleados en estado semisólido y líquido (Ramanayake *et al.*, 2001).

Autores como Bag *et al.* (2000) señalan que el empleo de medio de cultivo en estado líquido brinda la posibilidad a las plantas de absorber los nutrientes del medio con mayor facilidad e incrementar los coeficientes de multiplicación en un gran número de especies de bambúes en comparación con el medio de cultivo semisólido que limita la absorción de los nutrientes a la superficie basal del explante.

Reguladores de crecimiento

En general, la respuesta de un tejido al cultivo *in vitro* depende en mayor medida de la interacción entre el nivel hormonal endógeno y el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento añadidos al medio de cultivo tienen un rol importante en esta etapa debido a que varía en función de la especie y constituyen un factor determinante en el incremento de los coeficientes de multiplicación en especies de bambúes. De acuerdo con esto, cada explante o un mismo explante pero de diferentes especies, puede responder de manera distinta a una misma concentración de reguladores de crecimiento, a causa de diferencias en el contenido hormonal endógeno (Gielis *et al.*, 2001).

La proliferación de brotes se logra con la adicción de citoquininas al medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas. Uno de los posibles efectos de las auxinas en esta fase es anular el efecto depresivo de las altas concentraciones de citoquininas sobre la elongación de los brotes axilares y restablecer su crecimiento normal (Mroginski *et al.*, 2004).

Al respecto, Bag *et al.* (2000) obtuvieron altos coeficientes de multiplicación al emplear 6-BAP (1,13 mg.L⁻¹) para *Thamnocalamus spathiflorus*. De igual manera, Ramanayake *et al.* (2001) obtuvieron similares resultados al emplear 6-BAP (6,0mg.l⁻¹) para *Dendrocalamus giganteus*.

Por otra parte, Singh *et al.* (2001) para *Dendrocalamus strictus* elevaron la tasa de multiplicación al emplear Thidiazuron (0,5 mg.L⁻¹). De igual manera, Arya *et al.* (2001) para *Dendrocalamus asper* obtuvieron similares resultados al emplear 6-BAP (3,0 mg.L⁻¹).

Otros autores como Das y Pal (2005) combinan IBA (3,0 mg.L⁻¹) y 6-BAP (2 mg.L⁻¹) para incrementar el coeficiente de multiplicación en *Bambusa tulda*. Igualmente Sanjaya *et al.* (2005) combinan 6-BAP (1,0 mg.L⁻¹) y ANA (0,5mg.L⁻¹) para *Pseudoxytenanthera stocksii*, Kapoor y Rao (2006) para *Bambusa bambos* var. *Gigantea* obtuvieron altos coeficientes de multiplicación al emplear 6-BAP (0,45 mg.L⁻¹). De igual manera Ramanayake *et al.* (2006) para *Bambusa vulgaris* var *vittata* obtuvieron similares resultados al emplear 6-BAP (4,0 mg.L⁻¹). Jiménez *et al.* (2006) para *G. angustifolia* alcanzaron similares resultados al emplean 6-BAP (5,0 mg.L⁻¹).

2.3.4 Fase de Enraizamiento o Fase III

El objetivo de esta etapa es formar plantas completas con un sistema radicular que les permita ser trasplantadas a tierra en condiciones de vivero o invernadero. Esta fase es la más voluminosa de todo el proceso, en ella cada brote debe ser cultivado y manipulado *in vitro* para que desarrollen varias raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al ser sembrada sobre un sustrato enriquecido y convertirse en una planta lista para llevarse a campo (Mroginski *et al.*, 2004).

En esta fase se toman medidas para que el grupo de plántulas, sean capaces de llevar a cabo la fotosíntesis y la supervivencia sin el suministro artificial de los hidratos de carbono. Algunas plántulas necesitan un tratamiento especial de manera que no se atrofién cuando

estén en fase de aclimatización. En esta etapa por lo general es necesario adoptar un procedimiento por separado utilizando medios de cultivo idóneos para inducir las raíces *in vitro*. Varios autores eliminan esta fase para reducir los costos y posteriormente inducir las raíces bajo condiciones *ex vitro* (George y Debergh, 2008).

Medios de cultivo

Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento o con presencia de auxinas.

Las auxinas juegan un rol importante en la inducción y crecimiento de las raíces por lo que se emplean en la mayoría de los medios de cultivos de enraizamiento *in vitro* de varias especies de plantas. Se ha hecho referencia a la inmersión de los brotes durante varios minutos en una solución con concentraciones altas de auxinas y posteriormente estos brotes que no han emitido raíces son transferidos a un medio de cultivo MS libre de reguladores de crecimiento (Mroginski *et al.*, 2004).

También se recomienda elevar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo para lograr un crecimiento vigoroso de las raíces. Las plantas procedentes de los medios de cultivo con las mayores concentraciones de sacarosas presentan una mayor supervivencia al ser trasplantadas al suelo, tal vez debido a una mejor adaptación para soportar el estrés hídrico motivado por las condiciones de mayor presión osmótica donde se desarrollan, unido a una mejor constitución morfológica de las plantas *in vitro* (Mroginski *et al.*, 2004).

En esta etapa se hace alusión a la disminución del número de raíces *in vitro* en varias especies cuando se emplean medios de cultivo en estado semisólido debido a la poca difusión de sustancias tóxicas liberadas por el tejido en crecimiento, la aireación y la disponibilidad de nutrientes (Lane, 1979).

Los medios de cultivo líquidos ofrecen ventajas en esta fase, pues disminuye los costos por concepto de medio de cultivo al eliminarse el agar. Además permiten la difusión

de los residuos tóxicos de las plantas, fundamentalmente los fenoles que abundan durante la iniciación del crecimiento de las raíces y el desarrollo general de la planta es más rápido y se acorta el período de trasplantes (Hu y Wang, 1993).

Reguladores del crecimiento

El enraizamiento *in vitro* en bambúes constituye una limitante para la propagación *in vitro* de bambúes. La auxina más empleada ha sido el ácido indole-3-butírico (IBA) para inducir el enraizamiento *in vitro* en muchas especies de bambú como *Dendrocalamus strictus* (Nadgir *et al.*, 1984), *Dendrocalamus giganteus*, *D. strictus* (Das y Rout, 1991), *Dendrocalamus brandisii* y *Bambusa arundinacea* (Nadgauda *et al.*, 1997), *Thamnocalamus spathiflorus* (Bag *et al.*, 2000) y *Bambusa balcooa* (Das y Pal, 2005).

El empleo de IBA en la etapa de multiplicación induce espontáneamente raíces en *Bambusa* sp y *Dendrocalamus strictus* durante la fase (Shirgurkar *et al.*, 1996). Por su parte Sanjaya *et al.* (2005) ha reportado para *Pseudoxytenanthera stocksii* la adición de 6-BAP ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) y IBA ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$). De igual manera, Kapoor y Rao (2006) para *Bambusa vulgaris* var *gigantea* emplea ANA ($9,3 \text{ mg.L}^{-1}$), 6-BAP ($0,45 \text{ mg.L}^{-1}$); AG₃ ($0,035 \text{ mg.L}^{-1}$) y sacarosa (50 g.L^{-1}). Sin embargo, Ramanayake *et al.* (2006) ha inducido el enraizamiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var *vittata* al emplear Thidiazuron ($0,3 \text{ mg.L}^{-1}$) en cámaras de luz continua ($48 \text{ umol m}^2 \text{ s}^{-1}$).

Esta etapa es de vital importancia, ya que las plantas adquieren las características y condiciones necesarias, para ser trasplantadas a la fase de aclimatización ya que desarrollan un sistema radical que les permite adaptarse a estas condiciones. La eficiencia en la aclimatización de las plantas es trascendental para la propagación comercial de cualquier especie y de ella depende el éxito de la siembra en campo. En la literatura científica se hace poca referencia a dicha etapa y constituye unas de las principales limitantes durante la propagación de los bambúes empleando métodos de cultivo de tejidos.

A pesar de los avances existentes en la propagación de los bambúes no se refiere en la literatura internacional investigaciones en la especie *B. vulgaris* var *vulgaris* para la regeneración de plantas vía organogénesis.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Embriogénesis Somática y Transformación Genética del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), en el periodo comprendido de septiembre de 2008 hasta diciembre de 2010.

Material vegetal

En condiciones de casa de cultivo se creó un banco de plantas donantes de *B. vulgaris* var. *vulgaris* (Figura.1) partiendo de culmos y ramas seleccionadas en campo tal y como se recomienda en el Instructivo técnico para la Propagación vegetativa de *B. vulgaris* var. *vulgaris* (León *et al.*, 2010). Al banco de plantas donantes se le aplicaron dos fertilizaciones foliares semanales con formula completa (15-10-15-2) a razón de 2,0 g.L⁻¹ y y otra con Bayfolan Forte a razón de 1,5 mL.L⁻¹. Antes de seleccionar las yemas axilares para su establecimiento *in vitro* se aplicó durante diez días y de manera alterna cada dos días Fundazol (3,0 g.L⁻¹), Silvacur + Oxiclورو de cobre (1,5 mL.L⁻¹+3,0 g.L⁻¹) y Mancozeb (3,0 g.L⁻¹).



Figura.1 Banco de plantas donantes de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* en casa de cultivo.

Las yemas axilares se seleccionaron cuidadosamente teniendo en cuenta el grosor del tallo y el desarrollo de la yema axilar, tal y como se observa en la figura 2. Para el corte de las yemas se empleó tijera de poda. El corte fue realizado a 1,5 cm por encima y por debajo de la yema axilar e inmediatamente fueron colocadas en frascos de cultivo tapados para su traslado al laboratorio. El proceso de desinfección se realizó según el protocolo descrito por García-Ramírez *et al.* (2007) para *Bambusa vulgaris* var. *vittata*.



Figura 2. Características morfológicas de las yemas axilares de *B. vulgaris* var. *vulgaris* seleccionadas para el establecimiento *in vitro*.

Procedimientos generales

Los trabajos de laboratorio se realizaron en condiciones asépticas. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave vertical a 121 °C y 1.2 kg.cm⁻² de presión durante 15 minutos para tubos de ensayo (20,0 x 1,5 cm) con tapones de goma y 20 minutos para Erlenmeyer (250 mL de volumen). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 6,0±0,1 con el uso de HCl y KOH, previo a la esterilización.

El instrumental de laboratorio (pinzas y bisturís) se esterilizó con el equipo Incinerador (LAB Associates BV) a 300 °C. El material vegetal fue subcultivado en cabina de flujo laminar horizontal (IKEM).

Para el desarrollo de las plantas los frascos de cultivo se colocaron en cámaras de crecimiento con luz solar, el flujo de fotones fotosintéticos osciló entre 38,0-45,7 μM.m⁻².s⁻¹ y la temperatura fue de 26±2,0°C.

Procesamiento estadístico

El procesamiento estadístico de los datos de las variables estudiadas se realizó con *Statistic Package for the Social Science (SPSS)* versión 18 para

Windows. En cada acápite se detalla el procedimiento utilizado para el análisis de las diferentes variables.

3.1 Establecimiento *in vitro*

3.1.1 Influencia de la época del año en el establecimiento *in vitro*

El objetivo del presente experimento fue determinar la influencia de la época del año en el establecimiento *in vitro*.

Se realizaron un total de 24 establecimientos durante el año 2009 (dos cada mes), en cada uno de ellos se seleccionaron 100 yemas axilares y para la desinfección de las mismas se procedió según lo descrito en el epígrafe de procedimientos generales.

Para el establecimiento *in vitro* de las yemas axilares se empleó el medio de cultivo propuesto por Fajardo (2006) para esta misma fase de cultivo de la especie *Guadua angustifolia*. Dicho medio de cultivo contenía 2,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP y Gelrite® (SIGMA) (2,5 g.L⁻¹).

Los frascos de cultivo empleados fueron tubos de ensayo (20,0 x 1,5 cm) con tapones de goma. A cada tubo de ensayo se le adicionó 5,0 mL de medio de cultivo y en cada uno se colocó una yema axilar.

A los 20 días de cultivo se cuantificó el número de yemas brotadas y el número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles para posteriormente calcular el porcentaje de ambas variables para cada mes del año.

3.1.2 Influencia del 6-BAP en la brotación de yemas axilares

El objetivo del presente experimento fue determinar la influencia de diferentes concentraciones de 6-BAP en la brotación de las yemas axilares seleccionadas en casa de cultivo con características similares a las descritas en el acápite 3.1.1.

Se empleó un medio de cultivo compuesto por sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) (MS), mio-inositol (100 mg.L^{-1}), sacarosa (30 g.L^{-1}) y Gelrite® (SIGMA) ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$). Se diseñaron tres tratamientos con las siguientes concentraciones de 6-BAP (1,0; 2,0 y $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$) y un tratamiento control sin regulador del crecimiento.

Se emplearon 20 tubos por cada tratamiento. A los 20 días de cultivo se cuantificó el número de brotes por planta, además se midió la altura de la planta principal (cm) desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja, el número de hojas expandidas por cada explante y el número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles.

Los valores obtenidos fueron analizados mediante una prueba de *Kruskall Wallis*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

3.1.3 Efecto del estado físico del medio cultivado en el establecimiento *in vitro*

Con el objetivo de determinar el efecto del estado físico del medio de cultivo en la fase de establecimiento *in vitro*, se emplearon yemas axilares con características similares a las descritas en el acápite 3.1.1.

Estas fueron colocadas en un medio de cultivo compuesto por sales inorgánicas MS, mio-inositol (100 mg.L^{-1}), sacarosa (30 g.L^{-1}) y la mejor concentración de 6-BAP obtenida en el experimento anterior. Se establecieron como tratamientos: el medio de cultivo descrito anteriormente pero en estado líquido y como control el medio de cultivo en estado semisólido al cual se le agregó $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de Gelrite® (SIGMA).

Se emplearon 20 tubos por cada tratamiento. A los 20 días de cultivo se cuantificó el número de brotes por planta, además se midió la altura de la planta principal (cm) desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja, el número de hojas expandidas por cada explante y el número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles.

Los valores de las variables evaluadas fueron analizados mediante una prueba de *Mann-Whitney*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

3.2 Multiplicación *in vitro*

3.2.1 Influencia del 6-BAP

El objetivo en este experimento fue determinar la influencia de la concentración del 6-BAP en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris*.

Como material vegetal, se emplearon, plantas con una altura de 6,0 cm obtenidas después de 20 día de cultivo en la fase de establecimiento *in vitro* aplicando los resultados obtenidos en el acápite 3.1.

EL medio de cultivo estuvo compuesto por sales inorgánicas MS, mio-inositol (100 mg.L^{-1}) y sacarosa (30 g.L^{-1}). Se adicionaron tres concentraciones de 6-BAP ($3,0$; $4,5$ y $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$) y un tratamiento control sin regulador del crecimiento.

Los frascos de cultivo empleados en cada tratamiento fueron Erlenmeyer (250 mL de volumen). A cada uno se le adicionaron 50 mL de medio de cultivo y en cada frasco se colocaron cinco explante.

A los 20 días de cultivo se cuantificó el número de brotes por planta, además se midió la altura de la planta principal en cm desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja y el número de hojas expandidas por cada explante.

Los valores obtenidos fueron analizados mediante una prueba de *Kruskall Wallis*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

3.2.2 Efecto del estado físico del medio de cultivo

Este experimento se realizó con el objetivo de estudiar el efecto del estado físico del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*, el material vegetal empleado fue similar al descrito en el acápite 3.2.1.

El medio de cultivo estuvo compuesto por sales inorgánicas MS, mio-inositol (100 mg.L^{-1}), sacarosa (30 g.L^{-1}) y la mejor concentración obtenida en el acápite 3.2.1. Se establecieron dos tratamientos: el medio de cultivo descrito anteriormente pero en estado líquido y como control el medio de cultivo en estado semisólido al cual se le agregó $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de Gelrite® (SIGMA).

A los 20 días de cultivo se cuantificó el número de brotes por planta, además se midió la altura de la planta principal en cm desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja y el número de hojas expandidas por cada explante.

Los valores obtenidos fueron analizados mediante una prueba de *Mann-Whitney*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

3.2.3 Efecto del número de subcultivo

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto del número de subcultivo en el coeficiente de multiplicación. Como material vegetal, se emplearon plantas con una altura aproximada de 5,0 cm, que formaron grupos de a tres y obtenidos después de 20 días de cultivo (Figura 4).

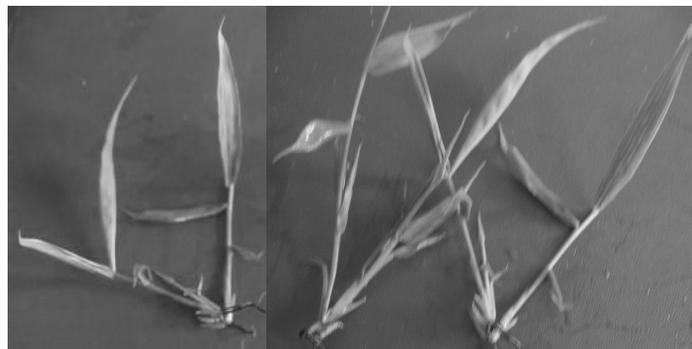


Figura 4. Plantas en grupo de a tres de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* a los 20 días cultivo.

Las plantas en grupos de a tres fueron colocados en un medio de cultivo líquido compuesto por las sales inorgánicas MS, mio-inositol (100 mg.L^{-1}), sacarosa (30 g.L^{-1}) y la mejor concentración del 6-BAP obtenida en el acápite 3.2.1.

A los 20 días de cultivo se calculó el coeficiente de multiplicación (CM) con la siguiente fórmula. Se realizaron cinco subcultivos de multiplicación.

CM= Número de plantas totales por frasco / número de plantas inicial por frasco.

3.3 Enraizamiento *in vitro* de plantas de *B. vulgaris* var *vulgaris*

3.3.1 Efecto del AIB

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de diferentes concentraciones de AIB en la formación de raíces *in vitro*. Como material vegetal se emplearon grupos de a tres plantas obtenidos en el quinto subcultivo de multiplicación en medio de cultivo líquido después de 20 días de cultivo con una altura entre cinco y seis centímetros.

Este experimento se llevó a cabo en dos etapas, en la primera las plantas fueron colocadas en un medio de cultivo líquido compuesto por 100% de las sales inorgánicas MS. Se estudiaron tres concentraciones de AIB (10,0 15,0 y 20,0 mg.L⁻¹) y sacarosa (20,0 g.L⁻¹), se utilizó además un tratamiento control con 20,0 g.L⁻¹ de sacarosa sin regulador del crecimiento. Posteriormente, a los 20 días de cultivo las plantas de cada tratamiento fueron transferidas a un medio de cultivo líquido compuesto por el 100% de las sales inorgánicas MS y 20,0 g.L⁻¹ de sacarosa.

Los frascos de cultivo empleados en cada tratamiento fueron Erlenmeyers (250 mL de volumen). A cada Erlenmeyer se le adicionó 50 mL de medio de cultivo líquido y en cada frasco se colocaron cinco grupos de plantas.

A los 20 días de cultivo se determinó el número de plantas con raíces, la altura de las plantas (cm) desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja y el largo de la raíz (cm).

Posteriormente, a los 30 días las plantas fueron transferidas a fase de aclimatización con una altura entre 5,0-6,0 cm de altura en grupos de 2 y 3 plantas.

Los valores obtenidos fueron analizados mediante una prueba de *Kruskal Wallis*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

3.3.2 Efecto del TDZ

El experimento tuvo como objetivo determinar el efecto de diferentes concentraciones de TDZ en la formación de raíces *in vitro*.

Este experimento se llevó a cabo en dos etapas, en la primera las plantas fueron colocadas en un medio de cultivo líquido compuesto por el 100% de las sales inorgánicas MS y se establecieron tres tratamientos, en los cuales se emplearon dos concentraciones de TDZ (0,3 y 0,6 mg.L⁻¹) y un tratamiento control sin regulador del crecimiento (Etapa 1). Posteriormente a los 20 días de cultivo las plantas de cada tratamiento fueron transferidas (Etapa 2) a un medio de cultivo líquido compuesto por el 50% de las sales inorgánicas MS, AIB (20,0 mg.L⁻¹) y sacarosa (20,0 mg.L⁻¹), según el protocolo descrito por Ramanayake *et al.* (2006).

Los frascos de cultivo empleados en cada tratamiento fueron Erlenmeyers (250 mL de volumen). A cada Erlenmeyer se le adicionó 50 mL de medio de cultivo líquido y en cada frasco se colocaron cinco grupos de plantas (cada grupo de plantas tenía 2-3 plantas).

A los 20 días de cultivo se determinó el número de plantas con raíces, la altura de las plantas (cm) desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja y el largo de la raíz (cm).

Luego de las dos etapas de enraizamiento las plantas fueron transferidas a fase de aclimatización con una altura entre 5,0-6,0 cm de altura en grupos de 2 y 3 plantas.

Los valores obtenidos fueron analizados mediante una prueba de *Kruskall Wallis*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

El análisis histológico se realizó con el objetivo de comprobar la diferenciación de las raíces formadas durante el enraizamiento *in vitro*. Para el análisis histológico se tomaron muestras de raíces emitidas en la segunda etapa de enraizamiento (Figura 5). Las muestras se fijaron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina al 0,1% según la técnica descrita por Gahan (1984).

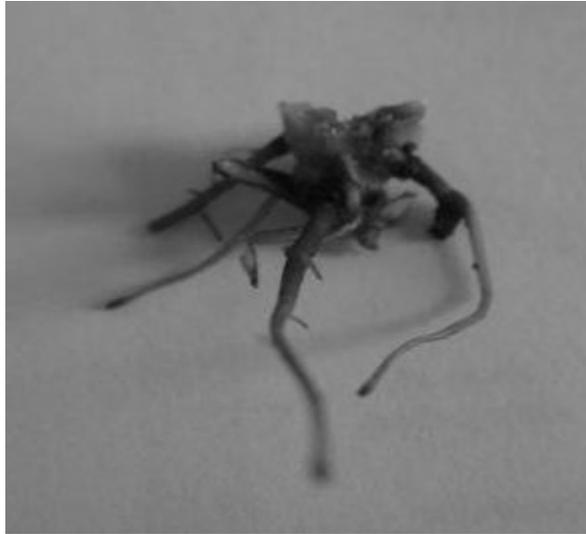


Figura 5. Raíces de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* empleadas en los análisis histológicos. Las secciones histológicas de las diferentes muestras se examinaron en microscopio (Novel), con observación de 400 x de aumento y las imágenes fueron captadas con una cámara digital (Canom Power Shot A 630) acoplada

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Establecimiento *in vitro* de *B. vulgaris*

4.1.1 Efecto de la época del año en el establecimiento *in vitro* de *B.vulgaris*

Se determinó que la época del año influyó tanto en la brotación *in vitro* de las yemas axilares como en la aparición de contaminantes microbianos visibles durante la fase de establecimiento *in vitro*.

En la figura 6 se observa el comportamiento mensual del porcentaje de yemas axilares brotadas y explantes libres de contaminantes microbianos visibles. Durante los meses de enero-abril y noviembre-diciembre los porcentajes de yemas axilares brotadas fueron los más elevados durante el año, el porcentaje de explantes libres de contaminantes microbianos visibles, también fue elevado durante este período. Los meses antes mencionados coinciden con la estación seca para Cuba y noviembre-diciembre mostraron condiciones meteorológicas similares a esta época.

La temperatura media diaria, durante esta época, fue siempre inferior a 25 °C, con precipitaciones muy escasas inferiores a los 10 mm de precipitaciones. La humedad relativa en el mes de enero fue del 77% y disminuyó hasta 71% en el mes de abril. En sentido general esta época estuvo caracterizada por pocas precipitaciones y temperaturas frescas (Anexo 1).

Todo lo contrario ocurrió durante los meses de mayo-octubre. El porcentaje de yemas axilares brotadas disminuyó hasta 65% en el mes de octubre. El desarrollo de los microorganismos se favoreció durante esta época lo cual trajo consigo que disminuyera el porcentaje de yemas axilares libres de contaminantes microbianos visibles hasta 14% en el mes de octubre (Figura 6).

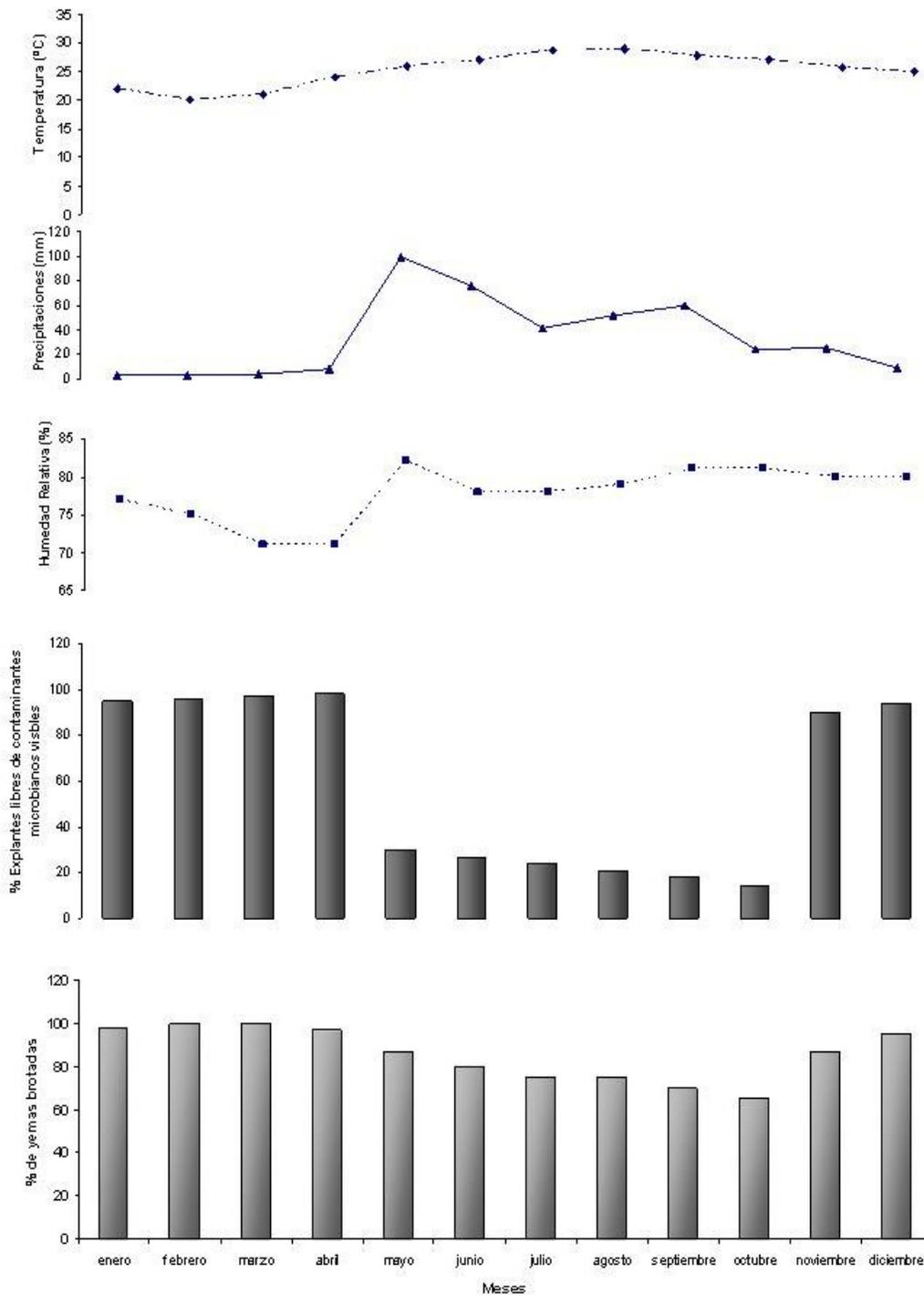


Figura 6. Influencia de las variables climáticas en el porcentaje de brotación de las yemas axilares y en el porcentaje de yemas axilares libres de contaminantes microbianos visibles. De manera general hubo presencia tanto por contaminantes bacterianos como fúngicos, pero fueron estos últimos los que causaron más afectaciones. Acosta *et al.* (2008) identificó en plantas de *B. vulgaris* var. *vulgaris* cultivadas en casa de cultivo como principales fuentes de

contaminantes fúngicos los géneros de *Botryotrichum*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Nigrospora*. Estos microorganismos mesófilos ante temperaturas elevadas y precipitaciones frecuentes encuentran condiciones favorables para su desarrollo. Dichas condiciones estuvieron presentes en los meses de mayo a octubre, fecha que coincidió con los menores porcentajes de explantes libres de contaminantes microbianos visibles.

Agnihotri y Ansari (2000) y Gieles (2002) señalaron que en condiciones *in vitro* la contaminación microbiana constituye una limitante para el establecimiento *in vitro* de bambúes, la misma en gran medida está relacionada con el tipo de explante, época del año y las atenciones fitosanitarias realizadas al banco de plantas donantes, ya que en períodos de escasas precipitaciones los porcentajes de contaminantes microbianos visibles se reducen y se incrementa el número de explantes con yemas brotadas.

Autores como Ramanayake y Yakandawala (1997) y Arya *et al.* (2001) destacaron la correlación existente entre las precipitaciones, humedad relativa y temperaturas en el incremento del número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles y el número de explantes con yemas brotadas durante el establecimiento *in vitro* de *D. giganteus* y *D. asper*.

Los resultados obtenidos permiten proponer los meses de enero-abril y noviembre-diciembre como el mejor período del año para realizar los establecimientos *in vitro* de las yemas axilares de plantas en casa de cultivo de *B. vulgaris* var. *vulgaris*.

4.1.2- Efecto del 6-BAP en la brotación de las yemas axilares

Se determinó que el 6-BAP influyó en el establecimiento *in vitro* de las yemas axilares de *B.vulgaris*. Los resultados del presente trabajo mostraron que al incrementar la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo semisólido, se incrementó el número de brotes por planta y la altura de las mismas. Los mejores resultados se alcanzaron cuando se

adicionó al medio de cultivo 3,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP con diferencias significativas respecto a los demás tratamientos (Tabla 1). El tratamiento control sin regulador de crecimiento no favoreció la emisión de nuevas plantas, a diferencia de los demás tratamientos a los que le fue adicionado el 6-BAP en el medio de cultivo (Figura 7).

No se encontraron diferencias significativas para las variables número hojas expandidas y número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles. El porcentaje de explantes libres de contaminantes osciló entre 85% - 90%. Autores como Ramanayake *et al.* (2000), Kumar *et al.* (2001) y Anil *et al.* (2002) refieren bajos porcentajes de explantes libres de contaminantes. Dichos investigadores obtuvieron entre un 47% y 50% de explantes libres de contaminantes en diferentes especies de bambúes como *B. atra*, *B. arundinacea* y *D. hamiltonii*.

El número de hojas expandidas varió entre 1,0 a 2,0. Las primeras hojas expandidas se observaron a los 14 días de cultivo.

Tabla 1. Efecto del 6-BAP en el establecimiento *in vitro* de *B. vulgaris* a los 20 días de cultivo.

Rangos Medios con letras diferentes dentro de una misma columna, difieren significativamente ($p < 0,05$) según Kruskal Wallis

Concentraciones de 6-BAP (mg.L ⁻¹)	Número de brotes / plantas	Rango medio	Altura/ planta(cm)	Rango medio
0	1,0	36,6 d	4,52	28,19 d
1,0	1,22	49,28 c	4,98	63,59 c
2,0	2,20	103,9 b	5,44	93,58 b
3,0	2,85	132,8 a	6,25	136,65 a

Tampoco existieron diferencias respecto al porcentaje de yemas axilares brotadas. A los siete días de cultivo se inició la brotación de las yemas axilares y se alcanzó un 100% de yemas brotadas en todos los tratamientos. Sin embargo, se observó que durante la primera semana de cultivo el crecimiento en altura de las yemas brotadas se favoreció con el aumento de la concentración del 6-BAP en el medio de cultivo. Resultados similares obtuvieron Ravikumar *et al.* (1998) para *D. strictus* durante la fase de establecimiento.

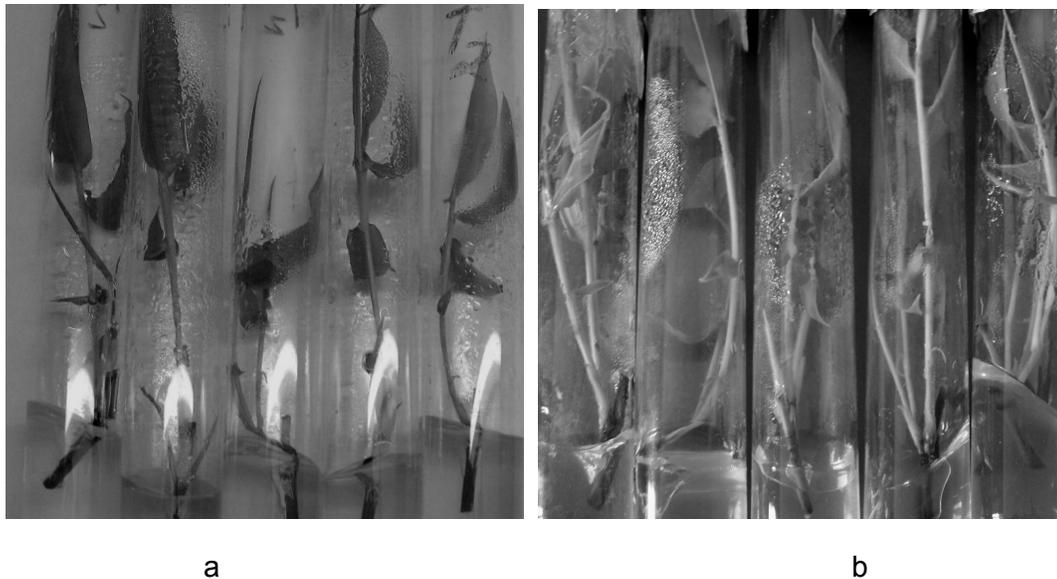


Figura 7. Explantes de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* a los 20 días de cultivo. (a) en medio de cultivo semisólido sin regulador de crecimiento y (b) en medio de cultivo semisólido con 6-BAP (3,0 mg.L⁻¹).

Marulanda *et al.* (2002) en la especie *G. angustifolia* al adicionar una concentración inferior de 6-BAP ($2,5 \text{ mg.L}^{-1}$) en medio de cultivo semisólido durante el establecimiento *in vitro*, también describe un comportamiento similar en la brotación de las yemas axilares.

El uso de 6-BAP ha sido sugerido para el establecimiento *in vitro* de *B. wamin*, *B. edulis*, *B. ventricosa* y *D. asper* (Huang y Huang, 1995; Arya, 1996; Lin y Chang, 1998; Bolsa, 2001; Sood *et al.*, 2002; Arshad *et al.*, 2005). Todos los autores antes mencionados, destacaron el papel fundamental que juega el 6-BAP en la brotación de las yemas axilares y posteriormente en la formación de plantas.

Al emplear $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP autores como Das y Pal (2005ab) refieren un incremento en el número de plantas por yema axilar para *B. balcooa*. Estos resultados coinciden con los expuestos anteriormente.

Los resultados obtenidos por Das y Pal (2005ab) demuestran que al adicionar concentraciones mayores de $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP al medio de cultivo de establecimiento *in vitro* de *D. strictus*, se afectan los porcentajes de brotación y disminuye la emisión de nuevas plantas. También Jiménez *et al.* (2006) para la especie *G. angustifolia* obtiene similares resultados al adicionar $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP.

4.1.3 Efecto del estado físico del medio de cultivo durante la fase de establecimiento *in vitro*

Se determinó que el estado físico del medio de cultivo no influyó en el establecimiento *in vitro* de las yemas axilares de *B. vulgaris*.

Los resultados del presente trabajo mostraron que no existieron diferencias significativas para ninguna de las variables evaluadas, número de brotes por planta, altura de la planta, número de hojas expandidas y número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles.

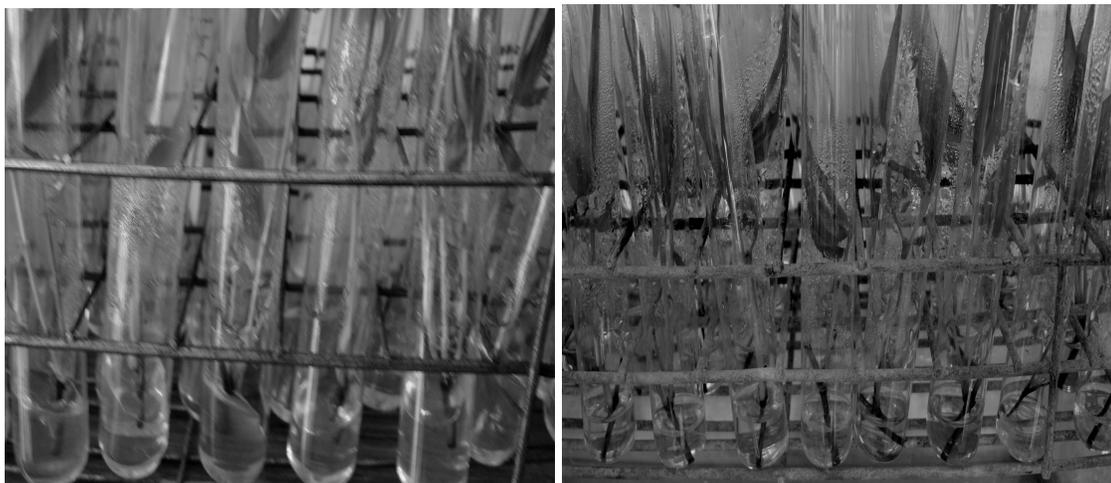
El número de brotes por planta osciló entre 2,05-2,28, altura de la planta osciló entre 6,18-6,25, el número de hojas expandidas osciló entre 2,0 y el número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles osciló entre 87%-92%.

Una vez transcurrido nueve días de cultivo se observó la formación de los brotes por plantas en medio de cultivo líquido. Sin embargo, en el medio de cultivo semisólido se retrasó la formación de brotes por planta a los once días de cultivo.

Posteriormente, se observó un incremento en el número de brotes por planta tanto en medio de cultivo líquido como semisólido a los 20 días de cultivo (Figura 8).

Desde el punto de vista cualitativo se pudo apreciar que no existieron diferencias en cuanto a la calidad del explante, mayor número de hojas expandidas y la altura de las plantas formadas en el medio de cultivo líquido y semisólido (Figura 8).

Estos resultados coinciden con los informados por Arshad *et al.* (2005) para *B. wamin* en los cuales alcanzaron similares resultados en cuanto a la altura y al número de brotes formados al emplear tanto el medio de cultivo en estado líquido como semisólido, sin diferencias significativas.



(a)

(b)

Figura 8. Plantas de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* a los 20 días de cultivo. (a) en medio de cultivo semisólido y (b) en medio de cultivo líquido.

Aunque en este trabajo no se observaron diferencias significativas, autores como Nadgauda *et al.* (1990) para *B. arundinacea* y Saxena (1990) para *B. tulda* encontraron diferencias en el número de brotes por planta y destacaron desde el punto de vista de la calidad de las plantas un mejor comportamiento en medio de cultivo en estado líquido en comparación con el medio de cultivo semisólido.

Los resultados obtenidos son de suma importancia pues nos permiten emplear el medio de cultivo líquido durante la fase de establecimiento de las yemas axilares y con ello se obtiene una serie de ventajas para los procesos productivos. Se pueden citar, por ejemplo, las facilidades para la detección de los microorganismos, fundamentalmente, bacterianos, se disminuyen los costos por concepto de medio de cultivo al eliminarse el agar.

4.2 Multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*

4.2.1 Efecto del 6-BAP

Se determinó que el 6-BAP influyó en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*. La emisión de nuevos brotes por planta se hizo visible a partir de la segunda semana de cultivo. A la tercera semana de cultivo las nuevas plantas se desarrollaron en altura y expandieron sus nuevas hojas.

A los 20 días de cultivo se observó que el número de brotes por planta se incrementó a medida que fue mayor la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo. Los mayores valores en cuanto al número de brotes por planta se alcanzaron cuando se emplearon 6,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 2). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para la variable número de hojas expandidas, la cual osciló entre 1,30 a 1,60.

Tabla 2. Efecto del 6-BAP en la multiplicación *in vitro* de *Bambusa vulgaris*.

Concentraciones de 6-BAP (mg.L ⁻¹)	Número de brotes/planta	Rango medio	Altura de las planta (cm)	Rango medio
0	1,0	14,0 d	6,18	69,6 a
3,0	1,75	31,2 c	5,35	41,5 b
4,5	3,25	51,2 b	4,86	21,7 c
6,0	4,70	65,5 a	5,04	29,1 c

Rango Medios con letras diferentes dentro de una misma columna, difieren significativamente ($p < 0,05$) según Kruskal Wallis

El tratamiento control sin regulador de crecimiento no favoreció la emisión de nuevos brotes, a diferencia de los demás tratamientos a los que le fue adicionado el 6-BAP en el medio de cultivo (Figura 9).

Estos resultados no difieren de los obtenidos por Saxena y Bhojwani (1993) quienes alcanzaron un incremento en la formación de brotes por planta al emplear 6,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP durante la multiplicación *in vitro* de *D. longispatus*.

Autores como Arya *et al.* (1999) para *D. asper*, Kapoor y Rao (2006) para *B. bambos*; Ramanayake *et al.* (2006) para *B. vulgaris*; Jiménez *et al.* (2006) para *G. angustifolia*, destacan el papel fundamental que juega el 6-BAP en la proliferación de plantas durante la multiplicación *in vitro*.



a b
Figura 9. Plantas de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* a los 20 días de cultivo en fase de multiplicación. (a) en medio de cultivo sin regulador de crecimiento y (b) en medio de cultivo líquido con 6-BAP (6,0 mg.L⁻¹).

Por otra parte, en cuanto a la altura de las plantas, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. A medida que se incrementó la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo líquido se apreció un decrecimiento en la altura de las planta, no ocurrió así en el tratamiento control sin regulador de crecimiento, en el cual se alcanzaron los valores más altos de altura (Tabla 2).

Al respecto, Barceló *et al.* (2007) señalaron que el uso de las citoquininas, en particular el 6-BAP estimula la formación de plantas durante la multiplicación *in vitro*. Las citoquininas además, intervienen en la emisión de nuevas hojas, pero reducen el desarrollo en altura de las planta y favorecen el ensanchamiento de las células ocasionando aumento del diámetro de las secciones y como consecuencia, un aumento de la masa fresca y seca sin que exista alargamiento.

Se ha destacado en la literatura científica la disminución de la altura de las planta al emplear concentraciones mayores de 7,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP, esto puede considerarse una limitante en la multiplicación *in vitro* de los bambúes (Bag *et al.*, 2000). Al respecto, Arya y Arya (2001) destaca el efecto de las altas concentraciones de las citoquininas y en particular el 6-BAP en la formación de plantas pequeñas y de poco grosor para *D. asper*.

En otras especies de bambúes se muestran los efectos de disminución de la altura al emplear concentraciones mayores de 6-BAP (8,0 mg.L⁻¹) Arya y Arya, (2001).

En sentido general el 6-BAP es el regulador del crecimiento más empleado para la propagación de los bambúes y sus concentraciones varían en dependencia del genotipo estudiado, para *B. vulgaris* var. *vulgaris* no existen en la literatura internacional referencias al respecto.

4.2.2- Efecto del estado físico del medio de cultivo

Se determinó que el estado físico del medio de cultivo influyó en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*.

Durante la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris* en medio de cultivo líquido, se observó la formación de nuevos brotes a partir de la segunda semana de cultivo. Sin embargo, en el medio de cultivo semisólido se retardó la emisión de nuevos brotes, estos no fueron visibles hasta los 17 días de cultivo.

Cuando se empleó el medio de cultivo líquido la emisión de nuevas plantas se favoreció, se formaron 4,60 brotes por cada planta, mientras que al emplear medio de cultivo semisólido solamente se formó como promedio un brote (Figura 10). Estos valores difirieron significativamente (Tabla 3). Sin embargo, el estado físico del medio de cultivo no provocó diferencias significativas entre los tratamientos cuando se analizaron las variables altura de las plantas y número de hojas expandidas.

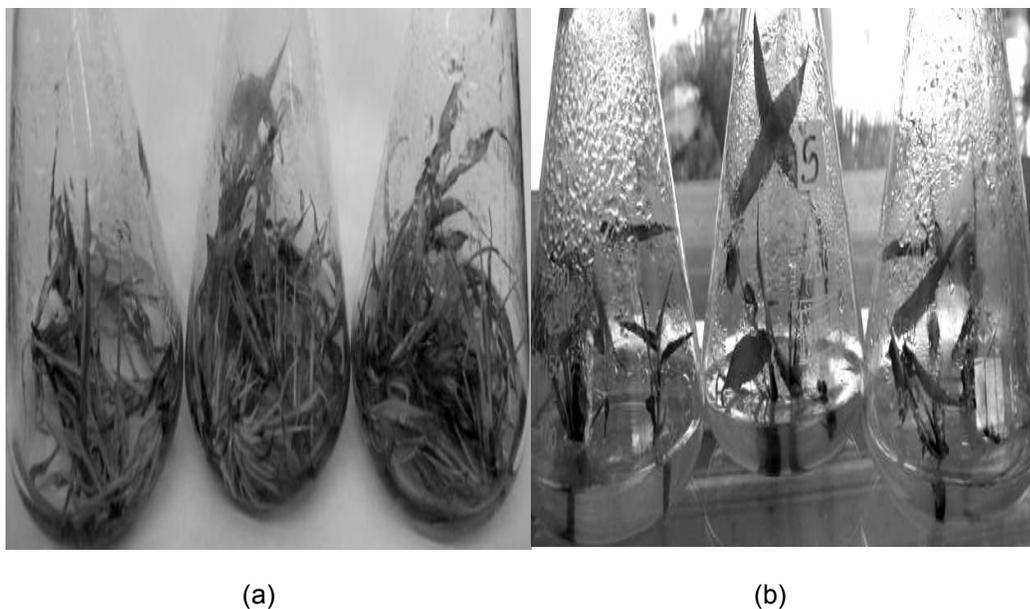


Figura 10. Plantas de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* a los 20 días de cultivo, (a) en medio de cultivo líquido y (b) en medio de cultivo semisólido.

Desde el punto de vista cualitativo se pudieron apreciar diferencias en cuanto al color de los plantas. Los brotes desarrollados en medio de cultivo líquido mostraban una coloración

verde-intensa con respecto a la coloración verde-opaca de los obtenidos en medio de cultivo semisólido.

Tabla 3. Efecto del estado físico del medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*.

Estado físico del medio de cultivo	Número de brotes / planta	Rango medio
Líquido	4,60	30,50 a
Semisólido	1,0	10,50 b

Medias con letras diferentes dentro de una misma columna, difieren significativamente ($p < 0,05$) según Mann-Whitney

La poca emisión de plantas en el medio de cultivo semisólido puede deberse a múltiples causas, una de ellas puede ser la presencia de fenoles en la zona de la base de las plantas. Autores como Nadgauda *et al.* (1997) describen que en la base de las plantas *in vitro* de *B. arundinacea* se acumularon fenoles y esto se asoció a un lento crecimiento de los plantas al emplear medio de cultivo semisólido. Estos mismos autores señalan que el lento crecimiento de los brotes pudiera atribuirse a las barreras físicas que impone el estado físico semisólido del medio de cultivo.

Coinciden con nuestros resultados Hernández y Gatica (2001) para *B. vulgaris*; Ndiaye *et al.* (2006) para *B. vulgaris var vittata*; Eiman *et al.* (2008) para *Oxytenanthera abyssinica*, señalaron la escasa formación de brotes por planta al emplear medio de cultivo semisólido en comparación con el medio de cultivo líquido.

Un gran número de artículos científicos relacionados con la multiplicación *in vitro* de los bambúes hacen referencia al empleo del medio de cultivo líquido durante esta etapa, debido a los efectos positivos sobre el incremento del número de brotes por planta y en el coeficiente de multiplicación en varias especies de bambúes (Arya *et al.*, 2001). En el medio de cultivo en estado líquido las plantas se encuentran parcialmente sumergidos, propiciando una mejor absorción de los nutrientes y por ende un mayor crecimiento y desarrollo del

explante (Sandal *et al.*, (2001). Además, aumenta la difusión gaseosa dentro y fuera de las células del tejido y el crecimiento se hace más rápido (George *et al.*, 2008).

Por su parte, autores como Mishra *et al.* (2007) en *B. tulda*; Shirin y Rana (2007) en *B. glaucescens*; Ramanayake *et al.* (2008) en *B. atra*, *D. giganteus* y *D. hookeri*; Sayanika y Sharma (2009) en *Arundinaria callosa* y Rajneesh y Hyamal (2009) en *D. Hamiltonii*, han corroborado el incremento del número de brotes por planta al emplear medio de cultivo líquido.

Los resultados demostraron que el medio de cultivo líquido favorece la emisión de nuevos brotes lo que se relaciona directamente con el incremento en el coeficiente de multiplicación y finalmente en el número de plantas para ser transferidas a fase de enraizamiento.

4.2.3 Efecto del número de subcultivo

Se determinó que el número de subcultivo influyó en el coeficiente de multiplicación de *B. vulgaris*.

Desde el punto de vista cualitativo no se observaron variaciones en las características de las plantas. No fueron visibles síntomas de hiperhidricidad a pesar de que todos los subcultivo se realizaron en medio de cultivo líquido y que esta es una especie leñosa. De manera general las plantas *in vitro* mantuvieron una coloración verde intenso, característico de la especie *B. vulgaris* (Figura 11).



Figura 11. Plantas de *Bambusa vulgaris* en el quinto subcultivo en medio de cultivo líquido.

El coeficiente de multiplicación, se incrementó a medida que se aumentó el número de subcultivo. En el quinto subcultivo de multiplicación se obtuvo un coeficiente de multiplicación de 3, 0 (Figura 12).

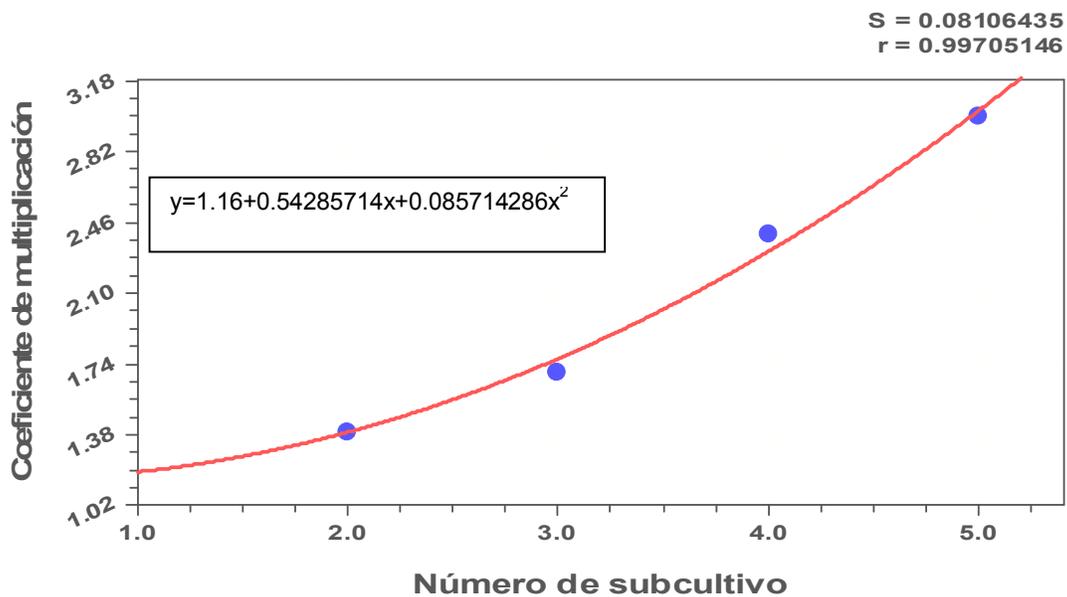


Figura 12. Curva de coeficiente de multiplicación en plantas de *Bambusa vulgaris*.

Investigadores como Ramanyake *et al.*, (2006) para *B. vulgaris* var *vittata* alcanzaron un incremento en el coeficiente de multiplicación al extender el número de subcultivo hasta el noveno.

Por su parte, Mishra *et al.* (2007) y Shirin y Rana (2007) alcanzaron un coeficiente de multiplicación de 3,20 y 4,0 al quinto subcultivo de multiplicación *in vitro* de *B. tulda* y *B. glaucescens*. Ramanayake *et al.* (2008) en *B. atra*, *D. giganteus* y *D. hookeri* alcanzaron un coeficiente de multiplicación de 3,0 y 4,2 respectivamente al sexto subcultivo de multiplicación *in vitro*. Los valores antes referidos son cercanos a los obtenidos en el presente trabajo para la especie *B. vulgaris*.

El empleo de medios de cultivo líquido permitió que las yemas axilares presentes en los tallos de las plantas brotaran al ponerse en contacto directo con el medio de cultivo. Este aspecto influyó en el incremento del coeficiente de multiplicación, especialmente a partir del tercer subcultivo de multiplicación. La brotación de estas yemas se tuvo en cuenta para el manejo de las plantas *in vitro* durante los subcultivo (Figura 11).

Al respecto, Saxena (1990) señaló que los bajos coeficientes de multiplicación constituyen una de las principales limitantes para la multiplicación *in vitro* de bambúes, lo cual puede estar relacionado con el manejo del explante, los reguladores de crecimiento y el estado físico del medio de cultivo. Muchos artículos científicos hacen referencia a la forma en la que deben ser subcultivados los explantes de bambú todos ellos coinciden en mantener pequeños grupos de plantas al momento de transferirlas. Dicho método contribuye al incremento de los coeficientes de multiplicación y evita la muerte de las plantas (Saxena, 1990; Prutpongse y Gavinlertvatana, 1992; Ramanayake y Yakandawala, 1997; Ravikumar *et al.*, 1998; Ramanayake *et al.*, 2001). Específicamente para *G. angustifolia* Jiménez *et al.* (2006) obtuvieron incrementos en el coeficiente de multiplicación al dividir las plantas en grupos de tres durante la multiplicación *in vitro* de esta especie.

Por su parte, autores como Yasodha *et al.* (2007) incrementaron el coeficiente de multiplicación, al dividir las plantas de *B. nutans* en grupos de tres y cuatro en medio de cultivo en estado líquido durante la multiplicación *in vitro* de esta especie. Al igual que, Dutta y Borthakur (2009) para *B. balcooa* aumentaron su coeficiente de multiplicación a 4,0 al emplear medio de cultivo líquido.

Autores como Sood *et al.* (1992) y Ramanayake *et al.* (2001), destacan el efecto que presenta el número de subcultivo durante la multiplicación *in vitro* en el incremento del coeficiente de multiplicación cuando se emplean medios de cultivo líquidos. Estos mismos autores señalaron la importancia del manejo de las plantas para el incremento del coeficiente de multiplicación, ya que se ha demostrado en la mayoría de especies de bambúes la muerte de los plantas una vez que estos se individualizan en el momento del subcultivo.

Los resultados demostraron que durante la fase de multiplicación de la especie *B. vulgaris* puede ser empleado el medio de cultivo líquido para la multiplicación de las plantas. También se puede afirmar que hasta el quinto subcultivo de multiplicación se producen incrementos en el coeficiente de multiplicación, adicionando $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6 BAP.

4. 3 Enraizamiento *in vitro* de *B. vulgaris* var vulgaris

4.3.1 Efecto de AIB

Se determinó que las diferentes concentraciones de AIB influyeron en el enraizamiento *in vitro* de *B. vulgaris* var. vulgaris y estimuló la emisión de raíces con geotropismo negativo.

Las primeras raíces fueron visibles a los 12 de colocadas las plantas en los medios de cultivos con AIB, independientemente de la concentración adicionada

A los 20 días de cultivo (Etapa 1) había incrementado el número de plantas con raíces (Figura 13) y se mostraron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al variable porcentaje de plantas con raíz.

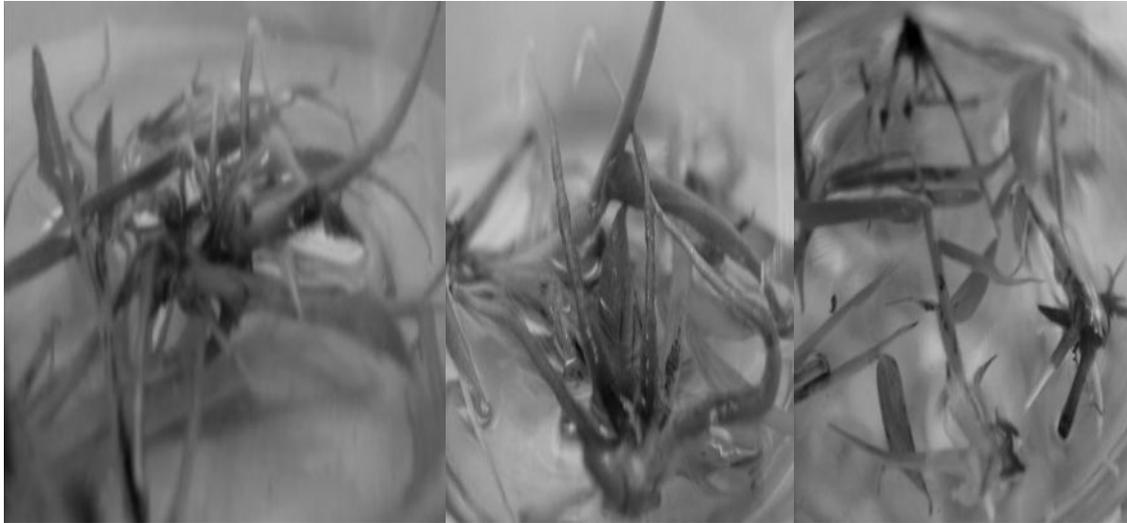


Figura 13. Plantas de *Bambusa vulgaris* con emisión de raíces a los 20 días de cultivo (Etapa 1).

Se observaron diferencias significativas en aquellos tratamientos donde se empleó el AIB como regulador de crecimiento en el medio de cultivo líquido, con diferencias significativas respecto al tratamiento control sin regulador de crecimiento (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto del AIB en el enraizamiento *in vitro* de *B. vulgaris* (Etapa 1).

Concentraciones AIB (mg. L ⁻¹)	Número de plantas con raíz (%)	Rango medio	Longitud de la raíz (cm)	Rango medio	Altura de las plantas (cm)	Rango medio
0	5,0	34,0 b	0,1	33,7 b	5,77	44,45 ab
10,0	15,0	38,0 ab	0,45	38,17 ab	6,05	46,93 a
15,0	45,0	50,0 a	1,60	51,33 a	5,32	40,28 ab
20,0	20,0	40,0 ab	0,06	38,8 b	4,62	30,35 b

Medias con letras diferentes dentro de una misma columna, difieren significativamente ($p < 0,05$) según Kruskal Wallis

Durante esta primera etapa se observó, la presencia de raíces pequeñas con geotropismo negativo, en aquellos tratamientos donde estaba presente el AIB como regulador del crecimiento, mientras que en el tratamiento control se observó la presencia de raíces pequeñas pero con geotropismo positivo (Figura 12). Las raíces emitidas solamente tuvieron una longitud entre 0,1 cm y 1,60 cm y las plantas mostraron alturas entre 4,62 cm y 6,05 cm. Luego de 20 días en el medio de cultivo líquido libre de reguladores de crecimiento (Etapa 2) se incrementó el número de plantas con raíces y la altura de las mismas. Los mayores

valores se alcanzaron al emplear 15 mg.L^{-1} de AIB, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto del AIB en el enraizamiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* (Etapa 2).

Concentraciones AIB (mg.L^{-1})	Número de plantas con raíz (%)	Rango medio	Longitud de la raíz	Rango medio	Altura de las plantas (cm)	Rango medio
0	15,0	27,5 b	1,20	27,53 b	5,77	44,45 ab
10,0	25,0	31,50 b	1,18	27,85 b	6,05	46,93 a
15,0	100,0	61,50 a	9,13	66,0 a	5,32	40,28 ab
20,0	50,0	41,50 b	3,76	40,63 b	4,62	30,35 b

Medias con letras diferentes dentro de una misma columna, difieren significativamente ($p < 0,05$) según Kruskal Wallis

Durante la segunda etapa de enraizamiento, se observó un aumento en la longitud de las raíces, pero al igual que en la primera etapa, mantenían el geotropismo negativo en aquellos tratamientos donde estaba presente el AIB como regulador del crecimiento, mientras que en el tratamiento control, se observó un aumento en el largo de las raíces y mantenían el geotropismo positivo (Figura 14).

Una vez que estas plantas se transfirieron a fase de aclimatización, se alcanzó un 43,5% de supervivencia independientemente del tratamiento de procedencia, sin diferencias significativas.

La presencia del geotropismo negativo en las raíces emitidas por plantas de *B. vulgaris* pudiera deberse, fundamentalmente al efecto marcado que presenta el etileno, sobre el bloqueo del movimiento normal de la auxina en respuesta a la gravedad. Una vez que las concentraciones de AIB se aumentaban en el medio de cultivo, pudo incrementarse en gran medida la síntesis de etileno, ya que la presencia de auxina constituye un requisito necesario para la conversión de ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) a etileno. La biosíntesis de etileno es controlada por la auxina en el paso de S-adenosilmetionina (SAM) a ACC, probablemente mediado por un incremento de ACC sintetasa causada por la auxina (Barceló *et al.*, 2007).

De esta forma, el etileno bloquea el movimiento normal de la auxina en respuesta a la gravedad. Precisamente, la concentración de auxina disminuye en la parte inferior del tallo, a causa del bloqueo del movimiento auxínico en respuesta a la gravedad y por lo tanto las raíces que se forman presentan un geotropismo negativo, además de presentar poca diferenciación (Vázquez y Torres, 2006).

Sin embargo, en aquellos tratamientos en los cuales no se adicionaron auxinas (AIB) en el medio de cultivo (tratamiento control), las raíces emitidas mostraban un geotropismo positivo, en este caso la auxina pudo pasar de la superficie superior a la inferior del tallo, la parte superior donde dicha concentración es más baja crecerá más rápido que la inferior del tallo y dará como resultado una curvatura geotrópica positiva en la raíz (Vázquez y Torres, 2006). Aunque en la literatura científica no se hace referencia al geotropismo negativo en raíces *in vitro* de bambúes, este fenómeno ha sido informado en otras especies de plantas como *Solanum tuberosum* por Gopal *et al.* (1998)

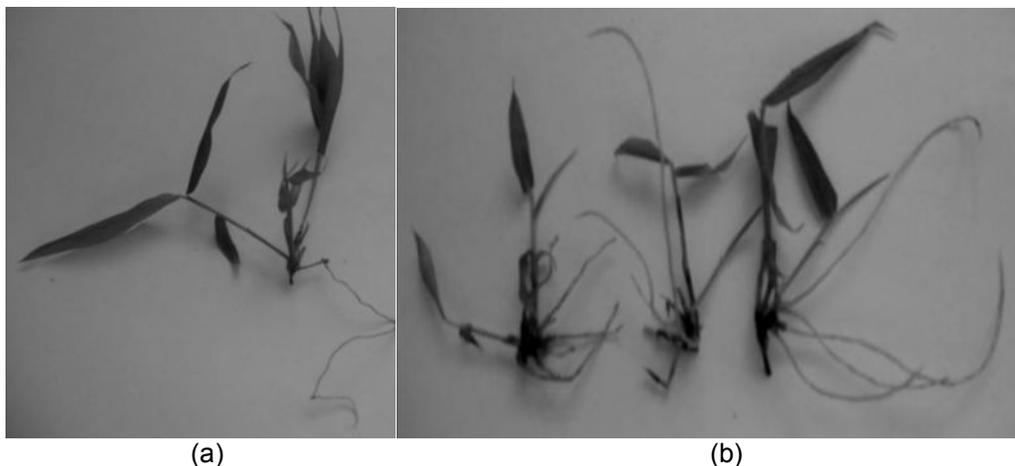


Figura 14. Plantas de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* con emisión de raíces a los 20 días de cultivo (a) Tratamiento sin AIB y (b) Tratamiento con AIB (15 mg.L^{-1}).

Al respecto, Kumar y Divakara (2001) señalaron que los bajos porcentajes de enraizamiento *in vitro* constituyen unos de los principales problemas durante la organogénesis directa en varias especies de plantas fundamentalmente en bambúes, la cual puede estar relacionada

con la altura del explante, los reguladores de crecimiento y el estado físico del medio de cultivo.

Ramanayake *et al.* (2008) alcanzaron porcentajes de enraizamiento *in vitro* de 88,9% y 96,7% en *D. hookeri* y un 45,6% en *D. giganteus* al emplear TDZ durante esta etapa. Todos estos resultados superiores a los obtenidos en este experimento.

Arshad *et al.* (2005) realizaron la fase de enraizamiento *in vitro* en dos etapas. Describen la presencia de raíces pequeñas durante la primera etapa de enraizamiento *in vitro* de *B. wamin*. Posteriormente, una vez que estas plantas se transfirieron a una segunda etapa a un medio de cultivo MS simple lograron también un incremento en el porcentaje de explantes con raíces y en la longitud de las mismas en 12,54 cm.

Por su parte, Rathore y Rai (2005) y Kapoor y Rao (2006) sugirieron para la inducción del enraizamiento *in vitro* de *P. stocksii* y *B. bambos* el empleo de bajas concentraciones de AIB.

De forma general se ha demostrado que el empleo de AIB en la primera etapa y posteriormente el empleo del medio de cultivo MS en la segunda etapa del enraizamiento *in vitro* en especies de bambúes ha sido beneficiosa para la inducción de raíces *in vitro*. Sin embargo, en *B. vulgaris* var *vulgaris* no tuvo un efecto positivo, ya que los requerimientos en cuanto a tipo y concentraciones de reguladores del crecimiento varían en función de la especie (Marulanda *et al.*, 2002).

4.3.2 Efecto de TDZ

Durante la primera fase de enraizamiento *in vitro* de *B. vulgaris* la adición del TDZ al medio de cultivo no estimuló la emisión de raíces, pero no existieron diferencias significativas en la variable altura entre 5,41 y 7,51 (Figura 15).

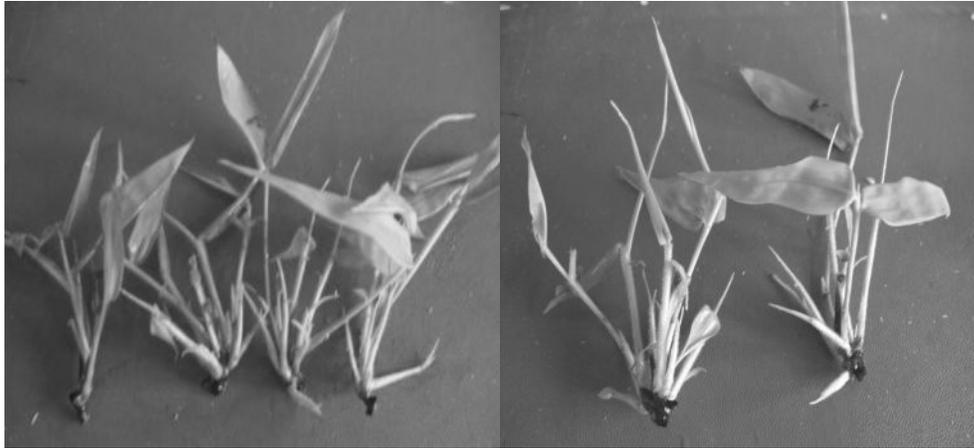


Figura 15. Plantas de *Bambusa vulgaris* cultivados durante 20 días en medio de cultivo con TDZ (Primera etapa de enraizamiento).

Durante la segunda etapa del enraizamiento se emitieron las raíces en todos los tratamientos (Figura 16).

El mayor porcentaje de plantas con raíces (88,2%) se obtuvo en el tratamiento que se empleó 0,6 mg.L⁻¹ de TDZ, en este mismo tratamiento las plantas alcanzaron 6,96 cm de altura y las raíces como promedio alcanzaron una longitud de 9,55 cm. Todas estas variables mostraron diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto del TDZ en el enraizamiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris*

Concentraciones de TDZ (mg.L ⁻¹)	Número de plantas con raíces	Rango medio	Longitud/raíz (cm)	Rango medio	Altura/plantas (cm)	Rango medio
0	12,0	24,0 b	0,82	23,4 c	5,22	11,6 d
0,1	24,0	28,0 b	1,24	26,3 bc	5,50	29,0 c
0,3	47,0	36,0 b	5,03	37,0 b	5,87	39,0 b
0,6	88,0	50,0 a	9,55	51,1 a	6,96	58,2 a

Medias con letras diferentes dentro de una misma columna, difieren significativamente ($p < 0,05$) según Kruskal Wallis

El número de plantas con raíces se incrementó a medida que se aumentó la concentración de TDZ. Sin embargo cuando se adicionaron concentraciones de TDZ de 0,1 y 0,3 mg.L⁻¹ no existieron diferencias con el tratamiento control.

Las raíces emitidas tenían geotropismo positivo (Figura 16). En este caso la presencia del geotropismo positivo, pudiera deberse, a la marcada influencia que ejercen las citoquininas

en la inhibición de la síntesis de etileno y en especial el TDZ que es un compuesto de las fenilureas que presenta alta actividad citoquininica es decir, que son activos por derecho propio (George *et al.*, 2008).



Figura 16. Plantas de *Bambusa vulgaris* con emisión de raíces a los 20 días de cultivo (Etapa 2).

Una vez que estas plantas se trasladaron a fase de aclimatización, se alcanzó un 48,0% de supervivencia independientemente del tratamiento de procedencia, sin diferencias significativas.

De esta forma, el TDZ controla la biosíntesis del etileno en el paso de S-adenosilmetionina (SAM) a ACC, lo cual provoca la inactivación de la ACC sintatasa y por lo tanto se inhibirá la síntesis de etileno (Barceló *et al.*, 2007). En este caso la auxina pasa de la superficie superior a la inferior, la parte superior donde dicha concentración es más débil crecerá más rápido que la inferior y dará como resultado una curvatura geotrópica positiva en la raíz. Estas raíces serán más diferenciadas que las raíces que presentan un geotropismo negativo (Vázquez y Torres, 2006).

Sin embargo, en el tratamiento control donde no se empleó TDZ, se logró la emisión de raíces en menor cantidad que los demás tratamientos, debido a que no presentaba el efecto inductor del TDZ para el enraizamiento *in vitro*.

Estos resultados guardan relación con los descritos por Ramanayake *et al.* (2001) quienes alcanzaron un 100% de enraizamiento cuando emplearon TDZ durante la segunda etapa del proceso de enraizamiento *in vitro* de *D. giganteus*.

Por otra parte, Murch y Saxena (2001) señalaron la influencia positiva del TDZ como estimulador para el enraizamiento *in vitro*, debido a su posibilidad de incrementar la absorción de auxinas en el medio de cultivo y su posterior movilidad a los tejidos, para la emisión de raíces *in vitro* en *B. vulgaris*.

Al respecto Ramanayake *et al.* (2006) obtuvieron un 95,0% de enraizamiento *in vitro* cuando emplearon TDZ como pretratamiento en plantas *in vitro* de *B. vulgaris*. Por otra parte Ramanayake *et al.* (2008) alcanzaron entre un 88,9% y un 96,7% de enraizamiento en *B. atra*, *D. giganteus* y *D. hookeri* empleando el TDZ como regulador del crecimiento en la primera fase del enraizamiento. De forma general se ha demostrado que el empleo de TDZ en la primera etapa y posteriormente el empleo del AIB (15 mg.L^{-1}) en la segunda etapa durante el enraizamiento *in vitro* en otras especies de bambúes ha sido beneficiosa para la inducción y emisión de raíces *in vitro* en esta especie.

Al realizar los cortes histológicos a las raíces emitidas, se observó claramente la disposición del cilindro central, parénquima cortical y la epidermis constituida por una capa de células de paredes delgadas, sin espacios intercelulares y recubiertos por una cutícula con tricomas pluricelulares glandulares simples. Además, se comprobó mediante el corte histológico transversal a plantas de *B. vulgaris* obtenidas durante este experimento, que el TDZ tuvo efecto positivo en la diferenciación de los tejidos de la raíz y su conexión con el sistema vascular de la planta y su desarrollo a fase de aclimatización (Figura 17).

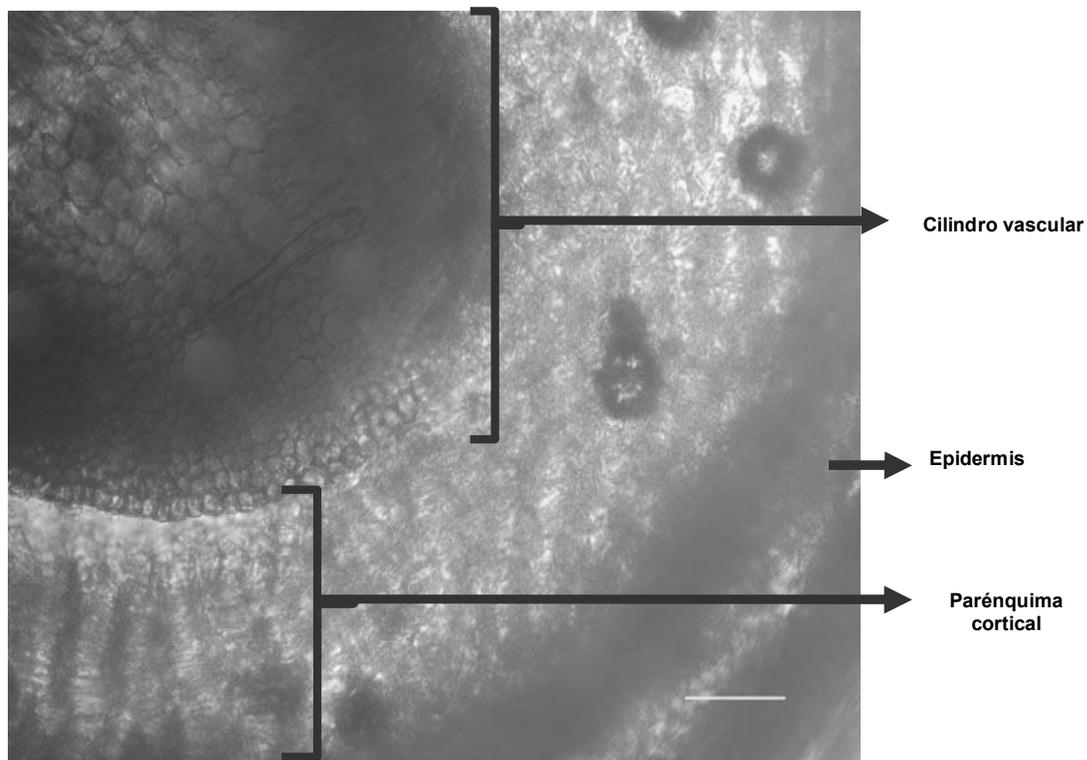


Figura 17. Cortes transversales de raíces *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* con geotropismo positivo.

Los métodos histoquímicos en investigación botánica permiten el reconocimiento de la complejidad morfológica de los tejidos de la planta. El análisis histológico podría ser una herramienta muy valiosa por lo rápido y sencillo en la visualización de primordios radicales para determinar con anterioridad la eficacia de un tratamiento aplicado para acelerar y mejorar el enraizamiento *in vitro*, sin necesidad de esperar el período completo que según su potencialidad emplee la especie a enraizar (Maldonado *et al.*, 2005).

Específicamente en especies de bambúes, Yasodha *et al.* (2007) realizó análisis histológicos, con el objetivo de determinar el efecto del AIB y la glucosa sobre el enraizamiento *in vitro* de *Bambusa nutans*.

Es importante destacar que la realización de estos análisis histológicos han servido de gran ayuda para demostrar el grado de diferenciación de las raíces *in vitro* de *B. vulgaris* obtenidas tanto por diferentes concentraciones de TDZ.

Cuando las plantas obtenidas en el presente experimento fueron llevadas a fase de aclimatización no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos respecto a los porcentajes de supervivencia luego de transcurridos 30 días. Entre el 50,0% y el 61,5% de las plantas sobrevivieron en fase de aclimatización.

En la figura 18 se muestra un protocolo de trabajo que resumen los principales resultados obtenidos en el presente trabajo. De manera resumida se propone por primera vez un protocolo de trabajo para la propagación *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris*. Es importante contar con la posibilidad de propagar esta especie empleando técnicas de cultivo de tejidos pues *B. vulgaris* var. *vulgaris* es la especie de bambú mejor adaptada a los ecosistemas cubanos. Los resultados obtenidos constituirán una alternativa para la propagación de grandes volúmenes de plantas para el escalado comercial en viveros y fincas con fines de reforestación.

El protocolo de trabajo se basa en la regeneración de plantas vía organogénesis directa a partir de yemas axilares de plantas desarrolladas en casa de cultivo. En todas las fases de la propagación se emplea medio de cultivo líquido, esto favoreció el desarrollo morfológico de las plantas *in vitro*, facilitó las operaciones y disminuyó el costo. Se definió la época de seca como la ideal para el establecimiento *in vitro* de las yemas axilares. Otra novedad dentro de la metodología fue la inducción y formación de raíces *in vitro* de *B. vulgaris*.

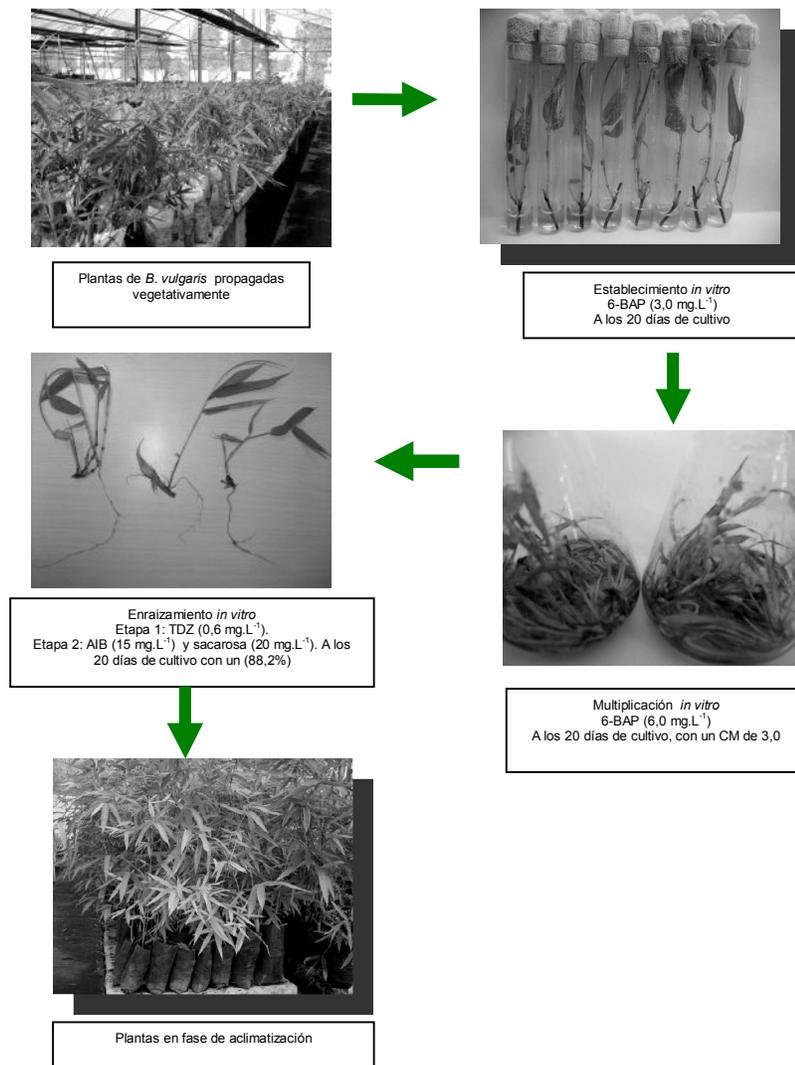


Figura 18. Esquema propuesto para desarrollar la propagación vía organogénesis de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*.

5. CONCLUSIONES

Conclusiones:

- ❖ Se determinó que la época del año influyó en el establecimiento *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris*. El mayor número de yemas brotadas (99%) y de explantes libres de contaminantes microbianos visibles (98%), se logró entre los meses de enero-abril y noviembre-diciembre.
- ❖ Se determinó que el 6-BAP influyó en la brotación de las yemas axilares durante la fase de establecimiento *in vitro*. Al adicionar al medio de cultivo una concentración de 6-BAP de 3,0 mg.L⁻¹ se emitió el mayor número de brotes por plantas (2,81).
- ❖ El estado físico del medio de cultivo influyó en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris*. El mayor coeficiente de multiplicación (3,0) se logró después de cinco subcultivos de multiplicación en medio de cultivo en estado líquido.
- ❖ Se definió que tanto el AIB como el TDZ influyeron en el enraizamiento *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris*. Al adicionar al medio de cultivo TDZ (0,6 mg.L⁻¹) se obtuvieron los mayores porcentajes de formación de raíces (88,2%) y estas fueron emitidas mostrando un geotropismo positivo.

6. RECOMENDACIONES

Recomendaciones

- ✓ Establecer yemas axilares de *B. vulgaris* var. *vulgaris* en los meses comprendidos entre enero-abril y noviembre-diciembre.
- ✓ Evaluar la influencia de concentraciones superiores a 3,0 mg. L⁻¹ de 6 BAP en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *B. vulgaris* var. *vulgaris* .
- ✓ Evaluar en la fase de multiplicación la respuesta *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris* después del quinto subcultivo.
- ✓ Emplear los medios de cultivo en estado líquido para la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, M, Alvarado Y, Cruz M, Roque B, Sánchez C, Leiva M, Freire M, García Y, Pérez Z, Salabarría T, Tejeda M, González M. y Hurtado O (2008). Micobiota de plantas donadoras y contaminantes fúngicos del establecimiento *in vitro* de especies de bambúes. *Bioteología Vegetal* **8**:57-61.
- Agnihotri, K y Ansari, S (2000). Adventitious rhizogenesis in relation to seasonal variation, size of culm branch cuttings and IAA treatment in bamboos. *Indian For.* **126**, 971–984.
- Agramonte, D (1997) Curso teórico-técnico de propagación masiva de plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba, pp. 193-206.
- Alvarado, Y, Herrera L, Suárez M, Rivero O, García L, Acosta M (1997). Control de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. En: Resúmenes Tercer Seminario Internacional de Sanidad Vegetal, Palacio de las Convenciones, pp. 76-77. Ciudad de la Habana, Cuba.
- Anil, S, Ahuja P, Sharma M, Sharma O, Godbole S (2002). *In vitro* protocols and field performance of elites of an important bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Nee et Arn. Munro. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **71**:55–63.
- Arrieta, G, Guevara E, Sancho G (1995). Cultivo *in vitro* de yemas axilares de papaya (*Carica papaya* L.): Determinación de las condiciones para la regeneración y multiplicación *in vitro* de tallos. *Boletín Técnico Estación Experimental Fabio Baudrit* **M. 28**: 13-27.
- Arshad, S, Kumar A, Bhatnagar S (2005). Micropropagation of *Bambusa wamin* through proliferation of mature nodal explants. *J. Biol. Res.*, **3**: 59-66.
- Arya, I, Arya S (1996). Introduction, mass multiplication and establishment of edible bamboo *Dendrocalamus asper* in India. *Indian journal of plant genetic resources*, **9**: 115-121.

- Arya, I, Arya S (1997). *In vitro* culture and establishment of exotic bamboo *Dendrocalamus asper* in India. Indian journal of experimental biology, 35: 1252-1255.
- Arya, S, Sharma S, Kaur R y Arya I (1999). Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. Plant Cell Rep. 18, 879–882.
- Arya, I, Satsangi R, Arya S (2001). Rapid micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus asper*. J. Sus. For. 14, 103–114.
- Arya, I, Rana P, Satsangi R, Muzaffar F, Sharma S y Arya S (2002). Rapid and mass multiplication of bamboos through tissue culture techniques. In *Role of Plant Tissue Culture in Biodiversity Conservation and Economic Development* (eds Nandi, S.K., Palni, L. M. S. and Kumar, G. B.), Gyanodaya Prakashan, Nainital, , pp. 29–39.
- Bag, N, Chandra S, Palni L y Nandi S (2000). Micropropagation of Dev-ringal [*Thamnocalamus spathiflorus* (Trin.) Munro] – a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. Plant Sci. 156, 125–135.
- Bag, N (2001). Mass propagation of tea, maggar bamboo and dev ringal. Ph.D Thesis, FfNB Garhwal University.
- Barceló, J, Nicolás G, Sabater B, Sánchez R (2007). Fisiología Vegetal. ediciones pirámides. colección ciencia y técnica (Madrid).
- Boissot, N, Valdez N y Guiderdoni E (1990). Plant regeneration from leaf and seed-derived calli and suspension cultures of the African perennial wild rice, *Oryza longistaminata*. Plant Cell Rep. 9: 447-450.
- Bystriakova, N, Kapos V, Lysenko I y Stapleton C (2004). Distribution and conservation status of forest bamboo biodiversity in the Asia Pacific region. Biodiversity and Conservation 12, 1833–1841.
- Castillo, A (2008). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA, 8 p.

- Catasús, L (2000). Guía para colecta y determinación de bambúes. Hábitat-Cuba, La Hab, 14 p.
- Cátasus, L (2003). Estudio de los bambúes arborescentes cultivados en Cuba. ACTAF. Cuba.
- Chambers, S, Heuch J y Pirrie A (1991). Micropropagation and *in vitro* flowering of the bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Munro. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 27, 45–48.
- Chaturvedi, H, Sharma M, Sharma A (1993). *In vitro* regeneration of *Dendrocalamus strictus* Nees through nodal segments taken from fieldgrown culms. Plant Sci. 91, 97–101.
- Chin, T (1977). Effects of cutting regimes on bamboo infested forest areas. Paper presented at the ASEAN Seminar on Tropical Rainforest Management. November 7 -10, 1977. Kuantan, Malaysia.
- Christanty, L, Kimmins J, Mailly D (1997). Without bamboo, the land dies':a conceptual model of the biogeochemical role of bamboo in an Indonesian agroforestry system. Forest Ecol. Manag. 91, 83–91.
- Das, M y Pal A (2005). *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. Plant Cell Tissue Organ Cult 81:109–112.
- Das, M y Pal A (2005a). Clonal propagation and production of genetically uniform regenerants from axillary meristems of adult bamboo. J. Plant Biochem. Biotechnol. 14, 185–188.
- Das, M y Pal A (2005b). *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 81, 109–112.
- Das, M, Bhattacharya S, Singh P, Figueiras T y Pal A (2008). Bamboo Taxonomy and Diversity in the Era of Molecular Markers. *Advances in Botanical Research*. 47 225-267.

- Dutta, M y Borthakur M (2009). *In vitro* micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through nodal explants from field-grown culms and scope for upscaling. *Current Science*. **96** (7): 962-966.
- Eiman, E, Diab E y Syadat E (2008). *In vitro* morphogenesis and plant regeneration of bamboos (*Oxytenanthera abyssinica* A. Rich. Munro) *Int. J. Sustain. Crop Prod.* **6** 72-79.
- Fajardo, L. (2006). Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Guadua angustifolia* Kunt. Tesis para aspirar por el grado científico Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. UCLV. IBP. Santa Clara. 73p.
- Fortes, A y País M (2000). Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* L. var Nugget (Cannabinaceae): Histological studies and changes in the starch content. *Amer. Jour. Bot.* **87**: 971-979.
- García, Y, Freire M, Fajardo L, Tejada M, Reyes M (2007). Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var Vittata. *Biotecnología vegetal* **7**(3):153-158.
- Gahan, P (1984). *Plant histochemistry and cytochemistry. An induction.* Academic Press. London. 301 pp.
- Gatica-Arias, A, Arrieta G y Espinoza A (2007). Comparison of three *in vitro* protocols for direct somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. *Agronomía Costarricense* **31**: 85-94.
- Giraldo, E, Sabogal A (1999). *Una Alternativa sostenible: La guadua.* Corporación Autónoma Regional del Quindío C.R.Q. 192 pp
- George, E y Sherrington, P (1984). *Plant propagation by tissue culture.* Exegetics Limited. Pg 39-71.
- George, E, Somerset M, Kingdom U, Hall M y Klerk G (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd Edition. *Springer. Volume 1.*
- Gielis J, Peeters H, Gillis K, Oprins J, Debergh P (2001). Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. *Acta Hort* **552**:195–203.

- Gielis, J y Oprins J (2002). Micropropagation of temperate and tropical woody bamboos from biotechnological dream to commercial reality. In Bamboo for sustainable development. Proceedings of the Vth International Bamboo Congress and the VIth International Bamboo Workshop, San José, Costa Rica. pp. 333–344.
- Gopal, J, Minocha J y Dhaliwal H (1998). Microtuberization in Potato (*Solanum tuberosum* L.). En : Plant Cell Reports 17: 795:798
- Hernández, A y Gatica, A (2001). Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* (Bambú amarillo tesis.
- Hu, C y Wang J (1993). Meristem, shoot tip and bud culture. In: Handbook of Plant Cell. Ed by Evans, D.A.; Ammirato, P.V.; Yameda, Y. p 256-290.
- Huang, L, Huang B (1995). Loss of the species distinguishing trait among regenerated *Bambusa ventricosa* McClure plants. Plant cell, tissue and organ culture, 42: 109-111.
- ICFRE (2002). Mass Propagation Protocol For Bamboos. Institute of Forest Genetics and Tree Breeding. Indian Council of Forestry Research and Education.12pp.
- INBAR (Red Internacional del Bambú y Ratán) (1999) Evaluation of bamboo resources in Latin America. Ed. Londoño X. Cali
- Jiménez, E (1997). Curso teórico-práctico de propagación masiva de plantas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, pp.25-30.
- Jiménez, V, Castillo J, Tavares E, Guevara E, Montiel M (2006). *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 86, 389–395.
- Kalia S, Kalia R, Sharma S (2004). *In vitro* regeneration of an indigenous bamboo (*Bambusa nutans*) from internode and leaf explant. J Bamboo Rattan 3: 217–228.
- Kataoka, I (1994). Influencia of rooting substrates on the morphology of papaya rood formed *in vitro*. Jpn. J. Trop. Agric. 38: 251 – 257.

- Kapoor, P y Rao I (2006). *In vitro* rhizome induction and plantlet formation from multiple shoots in *Bambusa bambos* var. *gigantea*. Bennet and Gaur by using growth regulators and sucrose. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 85, 211–217.
- Koshy, K y Harikumar D (2000). Flowering incidences and breeding system in *Bambusa vulgaris*. *Current Science* 79: 1650-1652.
- Koshy, K, Gopakumar B (2005). An improvised vegetative propagation technique for self-incompatible bamboos. *Curr. Sci.* 89, 1474–1476.
- Kumar, B, Divakara B (2001). Proximity, clump size and root distribution pattern in bamboo: A case study of *Bambusa arundinacea* (Retz.) Willd., *Poaceae*, in the Ultisols of Kerala, India. *J. Bamboo and Rattan* 1(1): 43-58.
- Lane, W (1979). *Physiol. Plant.* 45: pág. 260-264.
- Lara, A, Valverde R y Gómez.L (2003). Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotria acuminata*. *Agronomía Cos-tarricense* 27: 37-48.
- León, M, Freire M, Suárez M IBP (2010). Propagación vegetative de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J.C. Wendl. Instructivo técnico No. 001-2010. Santa Clara. Cuba
- Lin, C y Chang W (1998). Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of fieldgrown culms and flowering of regenerated plantlets. *Plant Cell Rep.* 17, 617–620.
- Lin, C, Lin C, Chang W (2003). *In vitro* flowering of *Bambusa edulis* and subsequent plantlet survival. *Plant Cell Tiss Org Cult* 72: 71–78.
- Lin, C, Lin C, Chang W (2004). Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 76: 75–82.
- LI, D (2006). Taxonomy and biogeography of the *Bambuseae* (Gramineae: Bambusoideae). <http://www.ipgri.cgiar.org/publications/HTMLPublication/572/ch11.htm>

- Londoño, X, Camayo G, Riaño N y López Y (2002). Characterization of the anatomy of *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoidae) culms. J. Am. Bamboo Soc. 16:18-31.
- Londoño, X (2009). Aspectos Generales de los Bambúes Americanos. [Sitio en Internet]. Disponible en: http://www.bambumex.org/paginas/ASPECTOS_GENERALES.pdf. Consultado: 18 de Septiembre de 2008.
- Maldonado, R, Ramirez G, Caraballo B (2005). Enraizamiento de estacas de semeruco (*Malpighia emarginata* Sessé & Moc. ex DC). *Rev. Fac. Agron.* vol.22, no.2, p.130-142. ISSN 0378-7818.
- Marulanda, M, Carvajalino M, Vargas C, Londono X (2002). La biotecnología aplicada al estudio y aprovechamiento de la *Guadua*. In Seminario-Taller. Avances en la Investigación sobre *Guadua*, Pereira, Colombia, pp 1-5.
- Marulanda, M, Gutiérrez LG, Márquez M (2005). Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunt. *Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal*, 27 (82): 5-15.
- Mukunthakumar, S, Mathur J, Nair P, Mathur S (1999). Micropropagation of *Dendrocalamus brandisii* Kurz. using *in vitro* nodal explants. *Indian Forester* 12:1239-1243; 1999.
- Mejía, A, Gallardo C, Vallejo J, Ramírez G, Arboleda C, Durango E, Jaramillo F y Cadavid E. (2009) Plantas del género *Bambusa*: Importancia y Aplicaciones en la Industria Farmacéutica, Cosmética y alimentaria. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. **16** (3): 396-405.
- McClure, F (1966). *The Bamboos-A fresh Perspective*. Cambridge: Harvard University Press.
- Mishraa, Y, Kumar P, Suman Y, Shirina F y Ansari S (2007). A micropropagation system for cloning of *Bambusa tulda* Roxb. *Scientia Horticulturae*. **115** 315-318.
- Mishra, Y, Patel P, Yadev S, Shirin F, Ansari S (2008). A micropropagation system for cloning of *Bambusa tulda* Roxb. *Sci. Hort.* 115, 315-318.

- Morales, D (2002). Análisis de la población y productores de bambú en Costa Rica. CATIE, Turrialba
- Mroginski, L, Sansberro P y Flaschland E (2004). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Parte V Métodos de propagación y conservación de germoplasma. En: Echenique, V, Rubinsten C y Mroginski L (Eds) Biotecnología y Mejoramiento Vegetal, pp. 35-42, editorial INTA Buenos Aires.
- Murch, S, Saxena P (2001). Molecular fate of thidiazuron and its effect on auxin transport in hypocotyl tissues of *Pelargonium x hortorum* Bailey. *Plant Growth Regul.* 35, 269–275.
- Murashige, T y Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
- Nadgauda, R, Parasharami V, Mascarenhas A (1990). Precocious flowering and seedling behaviour in tissue cultured bamboos. *Nature* 344:335–336; 1990.
- Nadgauda, R, John C (1997). A comparison of *in vitro* with *in vivo* flowering in bamboo: *Bambusa arundinacea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 48(3): 181-188. ("Clonal propagation of bamboo *Dendrocalamus strictus*") Div. Plant Tissue Culture, Natl. Chem. Lab., Pune 411 008, India.
- Nadgauda, R, John C, Parasharami V, Joshi M, Mascarenhas A (1997). A comparison of *in vitro* with *in vivo* flowering in bamboo: *Bambusa arundinacea*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 48:181±188.
- Nadgir, A, Phadke C, Gupta P, Parsharami, V, Nair S y Mascarenhas A (1984). Rapid multiplication of bamboo by tissue culture. *Silvae Genet.* 33, 219–223.
- Ndiaye, A, Mamadou S, Niang D y Gassama-Dia Y (2006). *In vitro* regeneration of adult trees of *Bambusa vulgaris*. *African Journal of Biotechnology.* 5 (13): 1245-1248.

- Orellana, P (1998). Propagación vía organogénesis. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. (Pérez Ponce, J *et al.*, eds). Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Santa Clara, pp 151-178.
- Olmos, Sofía, Luciani G y Galdeano E (2004). Micropropagación. Parte V. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. En: Echenique V, Rubinstein C y Mroginski L (eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal, (Ed.) INSTA, Buenos Aires, Argentina, pp. 163 - 178.
- Pérez Ponce, J, Jiménez F, Agramonte D (1999). Aclimatización (Fase IV), Características y problemáticas. En: Libro de reportes cortos. V Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal.
- Prutpongse P y Gavinlertvatana P (1992). *In vitro* propagation of 54 species from 15 genera of bamboo. Hort. Sci. 27: 453–454.
- Quiroz, F, Rojas R, Galaz R y Loyola V (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tiss Organ Cult. 86: 285-301.
- Rajneesh, A y Hyamal N (2009). *In vitro* Shoot Cut: A High Frequency Multiplication and Rooting Method in the Bamboo *Dendrocalamus hamiltonii*. *Biotechnology*. 8 (2): 259-263.
- Ramanayake, S y Yakandawala K (1997). Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. Plant Sci. 129, 213–223.
- Ramanayake, S, Weerawadene T, Amarasekara V (2000). Micropropagation and *in vitro* flowering in *Bambusa atra*. In: Abstracts: Proceedings of the Sri Lanka Association for the Advancement of Science. 56th Annual Session, Sri Lanka.

- Ramanayake, S, Wanniarachchi W, Tennakoon T (2001). Axillary shoot proliferation and *in vitro* flowering in an adult giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37: 667–671.
- Ramanayake, S, Wanniarachchi W (2003). Organogenesis in callus derived from an adult giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro). *Sci. Hort.* 98:195–200.
- Ramanayake, S, Meemaduma, V y Weerawardene T (2006). *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* 'Striata'). *Sci. Hort.* 110, 109–113.
- Ramanayake, S, Maddegoda K, Vitharana M y Chaturani G (2008). Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities *Scientia Horticulturae*. **118** 270-273.
- Rathore, T, Rai V (2005). Micropropagation of *Pseudoxytenanthera stocksii* Munro. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 44, 333–337.
- Ravikumar, R, Ananthkrishnan G, Kathiravan K, Ganapathi A (1998). *In vitro* shoot propagation of *Dendrocalamus strictus* Nees. *Plant Cell Tiss Org Cult* 52: 189–192.
- Reddy, Y, Yekanthappa A (1989). Propagation technique of *Oxytenanthera stocksii*. *Myforest* 25:30–32.
- Sandal I, Bhattacharya A, Ahuja P (2001). An efficient liquid culture system for tea shoots proliferation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 65: 75-80.
- Sanjaya, T y Ravishankar R (2005). Micropropagation of *Pseudoxynanthera stocksii* Munro *In vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* **41** 333-337.
- Saxena, S (1990). *In vitro* propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. *Plant Cell Rep.* 9, 431–434.
- Saxena, S y Bhojwani S (1993). *In vitro* clonal multiplication of 4-year-old plants of the bamboo, *Dendrocalamus longispathus* Kurz. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 29P, 135–142.
- Saxena, S y Bhojwani S (1993). *In vitro* clonal multiplication of 4 year old plants of the bamboo. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 29: 135–142.

- Saxena, S y Dhawan V (1999). Regeneration and larg-scale propagation of bamboo (*Dendrocalmus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 18: 438–444.
- Saxena, S y Dhawan V (2004). Commercialization of bamboo tissue culture: potentials and constraints. In: Singh, H.P., Dadlani, N.K. (Eds.), Abstracts, VIIIth World Bamboo Congress (pp101). VIIIth World Bamboo Congress, New Delhi, India.
- Sayanika, W y Sharma G (2009). *In vitro* Propagation of *Arundinaria callosa* Munro. An Edible Bamboo from Nodal Explants of Mature Plants. *The Open Plant Science Journal*. **3** 35-39.
- Shirgurkar, M, Thengane S, Poonawala I, Jana M, Nadgauda R, Mascarenhas A (1996). A simple *in vitro* method of propagation and rhizome formation in *Dendrocalamus strictus* Nees. *Curr. Sci.* 70, 940–943.
- Shirin, F y Rana P (2007). *In vitro* plantlet regeneration from nodal explants of field-grown culms in *Bambusa glaucescens* Willd. *Plant Biotechnology Reports*. **1** 141-147.
- Sood A, Sharma O, Palni L (1992). Improved methods of propagation of Maggar bamboo (*Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro) using single node cuttings taken from juvenile culms of elite seedlings. *J Am Bamboo Soc* 9:17–24.
- Sood A, Ahuja P, Sharma O, Godbole S (2002). *In vitro* protocols and field performance of elites of an important bamboo *Dendrocalmus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. *Plant Cell Tiss Org Cult* 71: 55–63.
- Teo, C y Chan L (1994). The effects of agar content nutrient concentration, genotypes and light intensity on the *in vitro* rooting of papaya microcuttings. *J. Hortic. Sci.*69: 267 – 273.
- Tartoura, K, da Rocha A, Youssef S (2004). Synergistic interaction between coumarin 1,2-benzopyrone and indole-3 butyric acid in stimulating adventitious root formation in *Vigna*

- radiata (L) Wilczek cuttings. I. Endogenous free and conjugated IAA and basic peroxidases. *Plant Growth Reg.* 42 (3), 253–262.
- Vásquez, E y Sinesio T (2006). *Fisiología Vegetal (Parte 1)*. editorial Félix Varela. La Habana.
- Vega, J (1996). *Embriogénesis somática en arroz (Oryza sativa L cultivar CR-5272): Anatomía e histología de los procesos embriogénicos*. Tesis de maestría, Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Villalobos, V y Thorpe T (1991). *Micropropagación: conceptos, metodologías y resultados*. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. (Ed): Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, pp. 128 - 141.
- Watson, G y Wyatt-Smith.J (1961). *Eradication of the bamboo, Gigantochloa levis (Blanco) Merr. Malayan Forester* 24:225-229.
- Yasodha, R, Kamala S, Kumar A, Kumar D y Kalaiarasi K (2007). *Effect of glucose on in vitro rooting of mature plants of Bambusa nutans. Scientia Horticulturae.* **116** 113-116.

ANEXOS

Anexo1. Datos promedios mensuales de temperatura, humedad relativa y precipitaciones en el año 2009 tomados de la provincia de Villa Clara.

Meses	% de yemas axilares brotadas	% de explantes libres de contaminantes microbianos visibles	Temperatura media (°C)	Humedad relativa media (%)	Precipitaciones (mm)
Enero	98	95	22	77	3,0
Febrero	100	96	20	75	2,9
Marzo	100	97	21	71	4,0
Abril	97	98	24	71	8,5
Mayo	87	30	26	82	100
Junio	80	26	27	78	76
Julio	75	24	28,7	78	42,2
Agosto	75	21	28,9	79	51,8
Septiembre	70	18	27,8	81	60
Octubre	65	14	27	81	24
Noviembre	87	90	25,6	80	25
Diciembre	95	94	25	80	8,7