



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRISLISTOGA. 1948

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS



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

Multiplicación *in vitro* de brotes de *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland
en medio de cultivos líquidos



Autora: Lic. Mallelyn González González
Tutora: Dr. C. Marisol Freire Seijo
Consultante: MSc. Yudith Yanet García Ramírez

Santa Clara, Cuba
2013

A mi Familia, en especial a mis niñas y esposo

Agradecimientos

Un agradecimiento especial es para Yudith García por ser una amiga incondicional, gracias por tu empeño, las horas interminables y por la paciencia que has tenido.

A mi tutora Dra. C Marisol Freire, por su ayuda, preocupación y sabias sugerencias.

A mis niñas y esposo por su amor y espera.

A todos mis profesores y compañeros del IBP que han contribuido en mi formación y en la culminación de esta investigación.

A todos aquellos que de una forma u otra han contribuido en esta investigación.

A todos, muchas gracias de corazón.

Resumen

En Cuba, la plantación a escala comercial de *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland (*B. vulgaris*) constituye una opción viable para atenuar los problemas medioambientales. El presente trabajo tuvo como objetivo multiplicar brotes *in vitro* de *B. vulgaris* en medio de cultivos líquidos. Para esto se cuantificó una serie de indicadores morfológicos y fisiológicos partiendo de la determinación del contenido de agua, fenoles, lignina y clorofilas totales. Se pudo determinar la concentración de 3,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP como la más adecuada, para la multiplicación de los brotes en los SIT. El mayor número de brotes por explantes (5,1) se alcanzó al emplear una concentración de 3,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP. Estos brotes presentaron una morfo-fisiología normal, a diferencia de los brotes multiplicados en medio de cultivo líquido estático donde se requiere de una concentración más alta de 6-BAP (6,0 mg.L⁻¹) para alcanzar un número menor de brotes por explantes (2,10). Se determinó que la frecuencia de inmersión influyó en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*. Los resultados demostraron que se incrementó el número de brotes por explante (6,5), con inmersiones cada seis horas. Se demostró que tiempos cortos de inmersión (un minuto) favorecen la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*, lográndose una mayor calidad en los brotes obtenidos expresada en el número de brotes por explante (5,0), contenido de agua (92,1 %), fenoles totales (49,1 mg GAE.g-1MS) y contenido de lignina (13,1%). Los resultados de este estudio proporcionan, por primera vez información sobre la propagación rápida y exitosa de *B. vulgaris* por SIT.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 El cultivo del Bambú (<i>Bambusa vulgaris</i> Schard. ex Wendl.)	4
2.2 Importancia del cultivo	5
2.3 Propagación de bambúes por métodos tradicionales	7
2.4 Propagación por métodos biotecnológicos	8
2.4.1 Limitantes de la propagación <i>in vitro</i> de Bambúes	9
2.5 Empleo de medios de cultivos líquidos	11
2.5.1 Sistemas de Inmersión Temporal.	12
3. MATERIALES Y METODOS	17
3.1. Efecto del número de subcultivos sobre la multiplicación <i>in vitro</i> de los brotes de <i>B. vulgaris</i> en medio de cultivo líquido estático	20
3.2. Efecto del 6-BAP sobre la multiplicación <i>in vitro</i> de los brotes de <i>B. vulgaris</i> cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA)	21
3.3. Determinación del efecto de la frecuencia de inmersión sobre la multiplicación <i>in vitro</i> de los brotes de <i>B. vulgaris</i> cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA)	24
3.4 Determinación del efecto del tiempo de inmersión sobre la multiplicación <i>in vitro</i> de los brotes de <i>B. vulgaris</i> cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA)	25
4. RESULTADOS Y DISCUSION	26
4.1 Efecto del número de subcultivos sobre la multiplicación <i>in vitro</i> de los brotes de <i>B. vulgaris</i> en medio de cultivo líquido estático	26

4.2 Efecto del 6-BAP sobre la multiplicación <i>in vitro</i> de los brotes de <i>B. vulgaris</i> cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA)	28
4.3 Determinación del efecto de la frecuencia de inmersión sobre la multiplicación <i>in vitro</i> de los brotes de <i>B. vulgaris</i> cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA)	41
4.4 Determinación del efecto del tiempo de inmersión sobre la multiplicación <i>in vitro</i> de los brotes de <i>B. vulgaris</i> cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA)	45
5. CONCLUSIONES	53
6. RECOMENDACIONES	54
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	55

1. INTRODUCCIÓN

Los bambúes son especies de gran importancia ambiental por la cobertura que brinda al medio donde crece por la sujeción del suelo que realiza mediante sus raíces y rizomas. Además, incrementa la retención de agua en el suelo, evita la erosión y controla el aumento de la concentración de CO₂ atmosférico mediante su secuestro (Wang *et al.*, 2008; Pardos, 2010). Las cualidades físicas de los bambúes, su bajo costo y disponibilidad; hacen de ellos, el material ideal para la construcción de viviendas, muebles, artículos decorativos utilitarios y artesanía. Es un recurso natural renovable de rápido crecimiento y fácil manejo, que además aporta importantes beneficios ecológicos durante su crecimiento (Vogtländer *et al.*, 2010; García-Ramírez *et al.*, 2011).

Las especies de bambú tienen un peso importante en las proporciones de diferentes recursos forestales a establecer con múltiples objetivos en el Programa de Desarrollo Forestal de Cuba hasta el año 2015, donde los servicios ambientales y la diversificación de especies es prioritaria (González-Anasco *et al.*, 2011).

En Cuba, la plantación a escala comercial de especies de bambúes constituye una opción viable para atenuar los problemas medioambientales. Los bambúes tienen la particularidad de reunir una amplia gama de estos servicios; por tal motivo las áreas existentes se incrementarán en 4 110,0 ha para el año 2015. Ello permitirá mitigar los efectos del cambio climático y detener el proceso de degradación en zonas concretas del país, a través de la reforestación de bambúes (González *et al.*, 2011).

Bambusa vulgaris Schrader ex Wendland (*B. vulgaris*) es la especie más diseminada y mejor adaptada a los ecosistemas cubanos, especialmente en áreas con poca capacidad productiva de los suelos, por ser una especie eficaz en la protección de la erosión de los suelos y la conservación de las aguas, cuando se utiliza como faja forestal hidrorreguladora y en forma de plantones (Lárraga-Sánchez, 2011).

Sin embargo, su aprovechamiento comercial a través de la propagación vegetativa se dificulta debido a los largos intervalos de florecimiento, bajos porcentajes de germinación y a la poca disponibilidad del material vegetal. Por todo esto los métodos tradicionales empleados por los viveristas en Cuba para la propagación de los bambúes, son ineficientes, trabajosos y económicamente desfavorables (Catasús, 2003).

Por lo anterior, es necesario desarrollar metodologías que permitan la propagación masiva de esta especie a gran escala. Esto ha convertido al cultivo de tejidos *in vitro* en el método más eficiente para la propagación *in vitro* de plantas de bambúes con alta uniformidad en un corto período de tiempo (Jiménez *et al.*, 2006; Ramanayake *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2009). En consecuencia, se han desarrollado varios protocolos de regeneración de plantas vía organogénesis de *B. vulgaris* con el empleo de medios de cultivo semisólidos (Gatica *et al.*, 2001; Ndiaye *et al.*, 2006). No obstante, las bajas tasas de multiplicación y enraizamiento *in vitro*, además de los bajos porcentajes de supervivencia *ex vitro* obtenidos en estas investigaciones han impedido su aplicación a escala comercial. Para dar solución a dicha problemática se han empleado los medios de cultivo líquidos, lo cual permite reducir los costos de producción y facilita la automatización durante el proceso de propagación *in vitro* en bambúes (Ramanayake *et al.*, 2006). En este sentido, han sido ensayadas diversas alternativas con el objetivo de incrementar el número de plantas *in vitro* de *B. vulgaris*, para satisfacer las demandas en el sector forestal, a través del empleo de los medios de cultivo líquidos, así como el empleo de las técnicas de macro propagación (Freire-Seijo *et al.*, 2011; García *et al.*, 2011).

La combinación de estas dos estrategias permitirán dar solución a las limitantes que han afectado la propagación *in vitro* en bambúes, con una mayor eficiencia en la transferencia de las plantas a condiciones de casa de cultivo y posteriormente a campo (Sanjaya *et al.*, 2005). Por otro lado, la propagación del bambú contribuirá a la conservación de la biodiversidad, así como a su adaptación a diferentes condiciones ecológicas, a partir de su implementación en los proyectos de reforestación (Wang *et al.*, 2008).

Tomando en consideración lo antes expuesto, se formuló la siguiente hipótesis de trabajo: “Será posible multiplicar brotes *in vitro* de *Bambusa vulgaris*, empleando los Sistemas de inmersión Temporal, si se conoce el número de subcultivo, la concentración del 6-BAP, además de la frecuencia y el tiempo de inmersión en los SIT”

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

Objetivo General:

- ❖ Multiplicar *in vitro* brotes de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl en medio de cultivos líquidos.

Objetivos Específicos:

- ❖ Determinar el efecto del número de subcultivo sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de *Bambusa vulgaris* en medio de cultivo líquido estático.
- ❖ Determinar el efecto de la concentración del 6-BAP, así como la frecuencia y el tiempo de inmersión, sobre la multiplicación de los brotes de *Bambusa vulgaris* en SIT.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 El cultivo del Bambú (*Bambusa vulgaris* Schard. ex Wendl.). Origen y distribución.

Descripción botánica y taxonómica.

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 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).

En América, *B. vulgaris* se ha adaptado a diversos tipos de suelos y de climas, desde México hasta Uruguay, e Islas del Caribe, originaria del Viejo Mundo, probablemente del Asia tropical (Das *et al.*, 2008).

El bambú se clasifica dentro de la familia de las *Poaceae*, subfamilia *Bambusoideae* es una especie perenne, de crecimiento continuo, herbácea o leñosa, generalmente hueca, pero muy sólida en los nudos, es por estas características que son objeto de aprovechamiento. (Flores *et al.*, 1998). La velocidad de crecimiento promedio es de 10 hasta 30 cm por día y algunas especies llegan a 120 cm diarios. A diferencia de los árboles maderables, el bambú necesita que se le retiren regularmente las cañas maduras y viejas para mantener un crecimiento vigoroso. Los brotes de bambú contienen alrededor de 88.8% de agua, más 3.9% de proteínas y 17 aminoácidos (Satya *et al.*, 2010).

Cuba cuenta dentro de la familia *Bambusoideae* con un grupo de bambúes herbáceos y leñosos con un 50 % de endemismo. *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 simpódicos gruesos y firmes.

La especie sobresale dentro del género por sus propiedades físico-mecánicas y por el tamaño de sus culmos erectos o inclinados en la mitad superior, que alcanzan de 10 hasta

20 metros de altura, con un diámetro de 5,0 a 15 centímetros (cm), de color verde, y desnudos en la mitad inferior; nudos basales enraizados; entrenudos huecos hasta 45 cm de largo, paredes de siete 7,0 a 15 mm de grosor. Hojas de las ramas con limbos linear lanceolados articulados a la vaina, acuminados, vainas vellosas hacia el ápice. Florecen los 80-90 años, puede presentar floración esporádica estéril durante su desarrollo. Después de completado el ciclo fenológico, las plantas muere junto a toda su línea clonal.

Reino: [Plantae](#)

División: [Magnoliophyta](#)

Clase: [Liliopsida \(Monocotiledónea\)](#)

Orden: [Poales](#)

Familia: [Poaceae](#)

SubFamilia: [Bambusoideae](#)

Género: [Bambusa](#)

Especie: [Bambusa vulgaris Schrader ex J.C. Wendland](#)

2.2 Importancia del cultivo

El bambú se ha convertido en una prominente alternativa forestal sostenible. Considerado de alta importancia económica, social y cultural, porque se han registrado hasta 1500 subproductos (Ramanayake *et al.*, 2006). Es considerado una fuente importante de material textil, papel y madera y por su versatilidad se ha estimado que aproximadamente 2,5 millones de personas en todo el mundo utilizan el bambú (Heinricher, 2012). En la India 3,2 millones de toneladas se utiliza para papel (Das y Pal, 2005). Solamente las exportaciones de China por productos de bambú alcanza los 600 millones de dólares y el valor total de la industria del bambú se estima en 12 mil millones de dólares. En el estado de Himalaya, los culmos de bambú son usados para rituales religiosos (Kumar *et al.*, 2013), así como los brotes son considerados un vegetal ideal en la dieta diaria por el contenido de diferentes enzimas y minerales (Satya *et al.*, 2010). Por sus innumerables usos se han desarrollado estrategias para su propagación y explotación racional.

Se estima que una hectárea de bambú captura 40 % más de dióxido de carbono que una hectárea de coníferas o eucaliptos en 10 ó 14 años (González, 2007; Torres, 2010). Se ha reconocido que supera al *Eucalyptus camaldulensis* Dehn en un 18.75 % en la captura de carbono y al *Pinus pinea* L. en 37 % aproximadamente, llega a producir cuatro veces más oxígeno que otros árboles (Franquis e Infante, 2003). Además, produce seis veces más celulosa que el pino y genera hasta 40 t ha⁻¹ de biomasa cada año y transforma la radiación solar en bienes y servicios ambientales útiles (Embaye *et al.*, 2005). Otras ventajas del bambú consisten en que puede establecerse en todo tipo de terreno, sirve para incorporar tierras sin uso al cultivo, evita la erosión de los suelos, rehabilita tierras degradadas y favorece la formación de microclimas para la regeneración de los bosques (Oramas, 2010). Crece tres veces más rápido que los eucaliptos y se puede cosechar constantemente, a partir del quinto año por un período de 80-120 años, lo que no es común en especies maderables. También se considera que la producción de 60 ha de *Guadua* sp., equivale a la madera de 500 ha de valiosos árboles tropicales (Daquinta *et al.*, 2007).

B. vulgaris, posee su mayor protagonismo en los programas de reforestación y en diversos proyectos para su propagación. Representa un recurso de suma importancia para la industria del papel, la artesanía, la construcción, para confeccionar muebles, en la protección de suelos y cuencas hidrográficas muy eficaz en la protección de las aguas, cuando se utiliza como faja forestal hidrorreguladora y en forma de plantones, se utiliza además, como plantas ornamentales y como fijador de dióxido de carbono (Londoño *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008). Constituye una valiosa alternativa económica que ha coadyuvado a mitigar la problemática social en los campos de Cuba. (Kumar *et al.*, 2013; Nath y Das, 2008).

2.3 Propagación de bambúes por métodos tradicionales

La propagación de los bambúes pueden ser sexual o asexual: mediante el uso de semillas, rizomas, culmos y por secciones de tallos (Pérez-García *et al.*, 2009; González-Anasco *et al.*, 2011; Lárraga-Sánchez *et al.*, 2011).

El Bambú puede reproducirse a partir de sus semillas sexuales. 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. *B. vulgaris* es una de las más vigorosas dentro de los bambúes, su fase vegetativa es persistente y florece esporádicamente (Londoño *et al.*, 2009).

Como resultado de estas dificultades con la propagación de bambú por semilla, el bambú típicamente se propaga por técnicas asexuales. La propagación asexual constituye el método más empleado, debido a que las diferentes especies de bambúes no florecen regularmente y un elevado porcentaje de las semillas pueden ser estériles y tener escasa viabilidad. Los bambúes se pueden propagar asexualmente por división de rizomas con segmento de tallo, por división de plántones o trasplante directo, por segmentos de culmos y por segmentos de ramas.

Estas técnicas de propagación asexual, sin embargo, son insuficientes para satisfacer la demanda proyectada por el mundo porque tanto su capacidad de producción a gran escala como su eficacia práctica, son muy bajas. Además, muchos métodos de propagación asexual tienen la desventaja de no poder eliminar los patógenos presentes en las plantas donantes (Heinricher, 2012).

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 (Koshy y Gopakumar, 2005).

2.4 Propagación por métodos biotecnológicos

Los recientes avances en la micropropagación *in vitro* sugieren retirar la barrera técnica y económica para la propagación a gran escala de los bambú (Heinricher, 2012). Siendo los métodos biotecnológicos 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; Ramanayake *et al.*, 2006; Jiménez, 2009; Yuan *et al.*, 2009).

La embriogénesis somática ha sido desarrollada en los programas de mejoramiento genético y en la propagación a gran escala de genotipos superiores, la cual ha sido empleada con éxito en la multiplicación *in vitro* de bambúes y en especial en *Bambusa* spp. La mayoría de los informes describen protocolos principalmente para especies del género *Bambusa* (Lin *et al.*, 2004) y *Dendrocalamus* sp. (Ramanayake *et al.*, 2006). Sin embargo, aún no se ha desarrollado un protocolo eficiente debido a las bajas frecuencias en la formación de embriones somáticos.

La gran mayoría de las especies de bambúes han sido propagadas vía organogénesis utilizando como material vegetal yemas axilares (Lin *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2006; Ramanayake *et al.*, 2006; Dutta y Borthakur, 2009). Las especies *Dendrocalamus hamiltoni* Munro, *Guadua angustifolia* Kunth, *Bambusa vulgaris* var. *vittata*, *Bambusa wamin* L. y *Bambusa edulis* L., han sido propagadas mediante esta vía (Rajneesh y Hyamal, 2009); *Bambusa balcoa* Roxb. (Dutta y Borthakur, 2009); *Arundinaria callosa* Munro (Sayanika *et al.*, 2009); *B. vulgaris* (García-Ramírez *et al.*, 2010); *Dendrocalamus hamiltonii* Nees. (Zhang *et al.*, 2010); *Dendrocalamus membranaceus* Munro (Brar *et al.*, 2013).

No obstante, 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*, los cuales aún hoy, limitan la propagación masiva (García-Ramírez *et al.*, 2012; Hurtado *et al.*, 2012).

2.4.1 Limitantes de la propagación *in vitro* de Bambúes

Los bajas tasas de multiplicación constituyen una de las principales limitantes para la multiplicación *in vitro* de bambúes, lo cual puede estar relacionado con el estado físico del medio de cultivo, el manejo del explante, y los reguladores de crecimiento (Heinricher, 2012).

El estado físico del medio de cultivo es un factor determinante para la multiplicación *in vitro*

de bambúes. Nadgauda *et al.* (1997) hacen referencia a la baja proliferación de plantas *in vitro* de *Bambusa arundinacea* Retz en el medio de cultivo semisólido y le atribuyeron como causas, la presencia de fenoles que se acumulan en la base de las plantas, donde el lento crecimiento de los brotes pudiera atribuirse a las barreras físicas que impone el estado físico semisólido del medio de cultivo.

En la literatura se hace 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. Este método contribuye al incremento de los coeficientes de multiplicación y evita la muerte de las plantas (Ramanayake *et al.*, 2006).

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 añadidas al medio de cultivo, el cual varía en función de la especie e influyen en el incremento de los coeficientes de multiplicación en especies de bambúes. Todas las especies no responden de igual forma a una misma concentración de reguladores de crecimiento, causado por las diferencias en el contenido hormonal endógeno (Segura, 2008).

Durante la fase de multiplicación, las citoquininas son esenciales para la formación de nuevos brotes, ya que la elongación y el incremento en la proliferación de los mismos depende de la presencia de una fuente externa de estas hormonas (Kim *et al.*, 2005) y son indispensable para el cultivo de las especies leñosas (Billard y Lallana, 2005; Ríos *et al.*, 2005; Quintanilla, 2007).

En consecuencia, se han empleado diferentes concentraciones de citoquininas en la multiplicación de brotes de bambúes, vía organogénesis, para la obtención de altos coeficientes de multiplicación. Siendo el 6-BAP la citoquinina más empleada, la cual puede ser sola o combinada con kinetina o auxinas y sus concentraciones varían en dependencia del genotipo en estudio (Heinricher, 2012).

Se ha empleado $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ en diferentes especies como *Dendrocalamus giganteus* Munro, Ramanayake *et al.* (2001); *Bambusa vulgaris* var. *vittata*, Ramanayake *et al.* (2006);

Guadua angustifolia, Jiménez *et al.* (2006); *B. vulgaris*, García-Ramírez *et al.* (2010). En combinación con el ácido indolbutírico (AIB), en *Bambusa tulda* Roxb, 6-BAP (2,0 mg.L⁻¹) y AIB (3,0 mg.L⁻¹), Das y Pal (2005); *Arundinaria callosa* Munro 6-BAP (1,0 mg.L⁻¹) y AIB (1,0 mg.L⁻¹) Sayanika *et al.* (2009). Combinado con ácido naftalenácetico (ANA) en *Pseudoxytenanthera stocksii*, 6-BAP (1,0 mg.L⁻¹), ANA (0.5mg.L⁻¹), Sanjaya *et al.* (2005); además combinado el 6-BAP con ANA y Kinetina (KT) en *Dendrocalamus hamiltonii* Nees., 6-BAP (2,0 mg.L⁻¹), ANA (1,0 mg.L⁻¹) y KT (1,0 mg.L⁻¹) Zhang *et al.* (2010) y en *Dendrocalamus membranaceus* Munro 6-BAP (4,4 mg.L⁻¹) y (1,15 mg.L⁻¹) de Kinetina (KT), Brar *et al.* (2013).

2.5 Empleo de medios de cultivos líquidos

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 (García-Ramírez *et al.*, 2011).

Para la micropropagación se han empleado tanto los medios de cultivo en estado semisólido como líquido, posibilitando estos últimos un aspecto primordial en la automatización de la micropropagación y en el desarrollo de técnicas para la producción a gran escala (Ziv, 2005).

Dentro de las ventajas de los medios de cultivo en estado líquido se incluyen la facilidad de preparación, esterilización y manipulación, los nutrientes se absorben con mayor rapidez, hay mayor difusión de sustancias tóxicas producidas por el propio metabolismo de las plantas, se incrementa el número de plantas que se obtiene, dado por la disminución en el tiempo de subcultivo, lo que disminuye los plazos de propagación (Jiménez *et al.*, 2006). Permiten aumentar la productividad de los operarios de cabinas de flujo laminar, debido a que los explantes sólo deben ser colocados en contacto con el medio de cultivo sin necesidad de manipularlos de forma individual (Ziv, 2005). Esto permite grandes posibilidades para la automatización y pueden reducir los costos de producción (Preil,

2005), así como una mayor eficiencia en la transferencia de las plantas a condiciones *ex vitro* (Berthouly y Etienne, 2005).

No obstante, el medio de cultivo líquido presenta algunas desventajas como son: no todas las especies responden igual al crecimiento, ni todos los genotipos dentro de una misma especie se comportan igual, se observa una tendencia a la reducción del coeficiente de multiplicación a medida que se dan subcultivos continuos en medio de cultivo líquido, disminuye la oxigenación de los tejidos, pueden ocasionar hiperhidricidad (Preil, 2005; Ziv, 2005). Se requiere de la utilización de un alto número de recipientes de cultivo, mayor manipulación en la limpieza y llenado de los mismos, además de otras que aumentan el costo y dificultan las producciones de grandes volúmenes de plantas (Aragón *et al.*, 2009).

Por tanto, se requiere el empleo de técnicas ventajosas, siendo la automatización del cultivo *in vitro* una de ellas para la cual se han descrito diversos diseños (Preil, 2005), pero dentro de ellos, los sistemas basados en la inmersión temporal (SIT) han sido los más exitosos (Berthouly y Etienne, 2005).

2.5.1 Sistemas de Inmersión Temporal

En el cultivo de plantas con medio de cultivo líquido, se han diseñado equipos y sistemas de cultivo que posibilitan su utilización en la propagación masiva, en los cuales la intervención de la mano de obra se minimiza. Estos se basan en la inmersión temporal de los explantes en el medio de cultivo (Aitken- Christie, 1991; Alvard *et al.*, 1993; Teison *et al.*, 1994), solo durante unos minutos con determinada frecuencia diaria o mediante burbujeo.

La propagación de plantas en los SIT, permiten la obtención de elevados coeficientes de multiplicación y plantas de mayor calidad en comparación con el empleo de medios de cultivo líquidos estáticos o semisólido, además de la reducción de los costos de producción (Li-Hua *et al.*, 2005, Escalona, 2006; Cabrera, 2009; Pérez-Alonso *et al.*, 2009; Aragón *et al.*, 2010).

Este sistema de cultivo cumple con las condiciones mencionadas por Teisson *et al.*

(1999) entre las que se encuentran: evitan la inmersión continua del material vegetal en el medio de cultivo, proveen una adecuada transferencia de oxígeno, facilitan los cambios secuenciales y automatizados del medio de cultivo, reducen la contaminación microbiana y tienen bajo costo.

La Inmersión Temporal reduce algunos de los problemas que se presentan en los cultivos permanentes en medio de cultivo líquido estático, como son la pobre calidad del propágulo y la necesidad de tener que realizar continuos subcultivo. En este sistema de cultivo la renovación de gases dentro del frasco de cultivo favorece el crecimiento y desarrollo de los brotes (Etienne y Berthouly, 2002; Escalona *et al.*, 2003), así como las plantas cultivadas tienen una mejor relación entre la fotosíntesis y la transpiración, lo cual permite una mayor asimilación de nutrientes del medio de cultivo para su crecimiento (Escalona, 2006).

Las plantas propagadas por inmersión temporal mejoran su comportamiento durante la fase de aclimatización en comparación con el material que se obtiene en medio de cultivo semi-sólido o medio líquido. En condiciones *ex vitro*, se han demostrado altos porcentajes de supervivencia de las plantas (Roels *et al.*, 2005). En la inmersión temporal se logra mayor preparación fisiológica de las plantas para enfrentar las condiciones de estrés al estar expuestas al ambiente *ex vitro* (Aragón *et al.*, 2010).

La estrategia de adaptación de las plantas a las condiciones de los Sistemas de Inmersión Temporal es una combinación de características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas que permiten un uso más eficaz de los recursos del medio interno en el recipiente de cultivo (Escalona, 2006).

Los SIT constituyen una tecnología accesible que permite automatizar de forma parcial algunas etapas del cultivo *in vitro*, aumentando la eficiencia biológica y productiva del material propagado sin los efectos colaterales causados por los medios de cultivo líquido estáticos conocidos como hiperhidricidad e hipoxia (De Fera *et al.*, 2002; Berthouly y Etienne, 2005). El sistema de inmersión temporal provee a todos los explantes de un contacto con el medio de cultivo durante un período de tiempo muy corto, con una

determinada frecuencia diaria. Los explantes retienen una película del medio de cultivo que evita la desecación e incrementa la disponibilidad y asimilación de nutrientes, lo cual se traduce en un incremento más vigoroso y mejor desarrollo (Teisson y Alvard, 1996). Además, estos tipos de sistemas de cultivo en comparación con los biorreactores son de fácil manejo y uso (Escalona, 2006).

En los SIT intervienen una serie de factores físicos, mecánicos y ambientales que posibilitan obtener una mejor respuesta fisiológica y lograr una mayor eficiencia en el cultivo con respecto a los medios de cultivo líquidos estáticos (Escalona *et al.*, 2007). El tiempo y frecuencia de inmersión tienen gran importancia, tanto para la asimilación de los nutrientes por los explantes, como en la renovación de la atmósfera interna del recipiente de cultivo donde se evita la acumulación de gases nocivos como el etileno (que promueve la senescencia de los tejidos), se facilita la regulación de la concentración de CO₂ y se mejora la oxigenación de los tejidos. Un manejo correcto del tiempo y frecuencia de inmersión en los SIT, ha ayudado a controlar la hiperhidricidad que puede aparecer en los explantes desarrollados en inmersión constante con el medio de cultivo líquido estático (Escalona, 2003; McAlister *et al.*, 2005).

La densidad de explantes por frasco de cultivo, así como el volumen de medio de cultivo por explante, son otros de los factores a tener presente para lograr la eficacia con el uso de los SIT (Berthouly y Etienne, 2005; Preil, 2005). El número de explantes que se coloca por cada frasco de cultivo tiene efecto sobre el desarrollo morfofisiológico de los materiales vegetales. El manejo de la densidad de explantes permite definir el aprovechamiento del volumen del frasco de cultivo, así como la capacidad productiva en las cámaras de crecimiento (Jiménez *et al.*, 2006). Los criterios para establecer la densidad han sido tomados a partir de las experiencias prácticas, conociendo el comportamiento de especies afines o simplemente se establece una densidad sobre la base de que el explante disponga de una cantidad de medio de cultivo. En otros casos se considera el diámetro de vaso de cultivo y se maneja la misma densidad para todas las especies (Zeledón, 2006).

El control del medio de cultivo por explante permite establecer un equilibrio entre la

asimilación de nutrientes por el explante y la secreción de compuestos al medio de cultivo provenientes de éstos (Hahn y Paek, 2005). En cada protocolo que se desarrolle con los SIT es necesario ajustar cada uno de estos parámetros, pues pueden variar en dependencia del cultivo, variedad y sistema de regeneración que se emplee (Berthouly y Etienne, 2005).

A partir del principio de la inmersión temporal, han sido desarrollados numerosos sistemas de cultivo, los que se han utilizado con éxito en la regeneración vía organogénesis y embriogénesis somática de numerosas especies de plantas (Berthouly y Etienne, 2005). En ellos ha sido posible multiplicar yemas axilares, segmentos nodales y microestacas, además, se han empleado para la formación de embriones a partir de callos, multiplicar embriones somáticos, así como, para lograr germinación y conversión, en especies forestales como *Eucalyptus grandis* Hill, (Castro *et al.*, 2002), varios clones de *Eucalyptus* spp., (McAlister *et al.*, 2005), *Eucalyptus globulus* L. (González *et al.*, 2011), *Tectona grandis* L., Quiala *et al.* (2012).

Varios autores han realizado la multiplicación *in vitro* en los SIT en *Digitalis purpurea* L. (Pérez-Alonso *et al.*, 2013); *Saccharum officinarum* L. (Aragón *et al.*, 2009), *Discorea alata* L. (Cabrera, 2011), *Camptotheca acuminata* L. (Sankar-Thomas y Lieberei, 2011). Pero en la familia *Poaceae*, se ha empleado en diferentes especies, como *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., (Quiala *et al.*, 2006), *Oryza sativa* L., (Sánchez, 2012), *Saccharum* spp. híbrido, en tres variedades: C86-12, C1051-73 y SP70-1284, (Bernal *et al.*, 2002), *Saccharum* sp. híbrido N41 (Meyer *et al.*, 2009), *Saccharum* spp. híbrido, (Mordocco *et al.*, 2006; Montes de Oca, 2010; Yang *et al.*, 2011; Arencibia *et al.*, 2012). En los bambúes aunque son escasas las referencias en la literatura científica el empleo de este tipo de sistema de cultivo de inmersión temporal se ha trabajado en *Guadua angustifolia* Kunth (Marulanda *et al.*, 2005; Holst, 2010), *Dendrocalamus latiflorus* Munro (Mongkolsook *et al.*, 2005), *Bambusa ventricosa* McClure (Chaille, 2011).

Para el éxito de la multiplicación de varias especies se ha empleado el recipiente para sistemas de inmersión temporal automatizada RITA®. En el laboratorio Biotrop del CIRAD

en Montpellier, Francia, fueron diseñados los recipientes de inmersión temporal denominados comercialmente RITA® (Teisson *et al.*, 1996). Este sistema RITA consta de envases de 250 mL que comprenden dos compartimentos, uno superior con las plantas y uno inferior con el medio. La sobrepresión aplicada en el compartimento más bajo empuja el medio hacia el superior. Las plantas están sumergidas tanto tiempo como la presión es aplicada. Durante el período de inmersión el aire es insuflado a través del medio, agitando los tejidos suavemente y renovando la atmósfera dentro del frasco, con la sobrepresión escapando a través de salidas en la parte superior del aparato. Este sistema fue desarrollado para propagación masiva vía embriogénesis somática (Etienne y Berthouly, 2002).

Estos recipientes de inmersión temporal han resultado ser más útiles para los procesos embriogénicos, pues para la organogénesis se requiere de recipientes de mayor tamaño (Escalona, 2006).

Para la organogénesis, el tamaño de los propágulos puede requerir un volumen más grande y recipientes de menor costo. Para ello el sistema de frascos gemelos puede ser más apropiado (Etienne y Berthouly, 2002).

La propagación *in vitro* constituye una industria con grandes perspectivas (Ziv, 2005), pero su desarrollo dependerá del incremento de nuevos sistemas de regeneración de plantas y técnicas que permitan la automatización de los procesos, además del éxito en la aclimatización de las plantas (Read, 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de propagación, del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), adscrito a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. El trabajo se desarrolló desde enero de 2011 hasta octubre de 2013.

Condiciones generales de cultivo

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave vertical a 121 °C y 1,2 kg.cm⁻² de presión durante 15 minutos. Se utilizaron en el establecimiento *in vitro* de las plantas, tubos de ensayo (20,0 x 1,5 cm) con tapones de goma, en la multiplicación en medio de cultivo líquido estático se emplearon magentas de policarbonato de 250 mL, a las cuales se les añadió vitrofural (compuesto antimicrobiano que posee un amplio espectro de acción contra hongos y bacterias) y en la multiplicación en los SIT, frascos RITA con capacidad de 250 mL.

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 bisturíes) se esterilizó con el empleo de Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 1,0 %.

El material vegetal fue subcultivado en cabina de flujo laminar horizontal (ICEM). Para el desarrollo de las plantas los frascos de cultivo se colocaron en cámaras de crecimiento de luz solar, el flujo de fotones fotosintéticos osciló entre 38,0-45,7 μM.m⁻².s⁻¹. El fotoperíodo fue de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad y una temperatura de 28±2,0°C. En cada experimento se realizaron tres repeticiones.

Procedimientos generales de la investigación

Fase de establecimiento *in vitro* de yemas axilares

El establecimiento *in vitro* de las yemas axilares en medios de cultivo líquido estático se realizó según la metodología descrita por García-Ramírez *et al.* (2010) para *B. vulgaris*. Como describe la metodología se empleó como materia l vegetal yemas axilares (Figura 1b), seleccionadas en el banco de plantas donantes (Figura 1a).

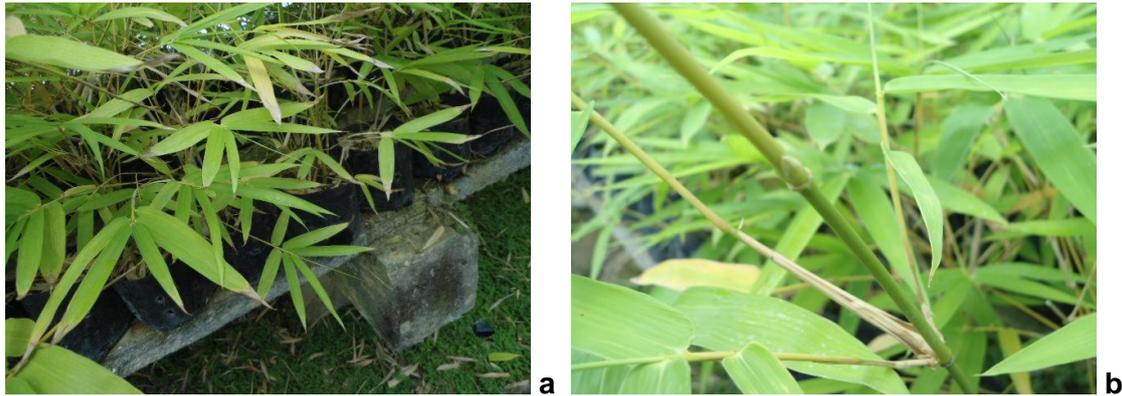


Figura 1. Banco de plantas donantes de *B. vulgaris* en casa de cultivo. a) Plantas donantes, b) Yema axilar.

Fase de multiplicación *in vitro* en medios de cultivo líquido estático

Los explantes procedentes del establecimiento *in vitro*, luego de 20 días de cultivo, fueron transferidos a un medio de cultivo líquido estático de multiplicación, compuesto por sales inorgánicas Murashige y Skoog (1962) (MS), mio-inositol (100 mg.L^{-1}), sacarosa (30 g.L^{-1}); $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP y vitrofural (116 mg.L^{-1}). El pH del medio de cultivo líquido estático se ajustó a $6,0 \pm 0,1$ con el uso de HCl y KOH, previo a la esterilización en autoclave.

A los 20 días de cultivo los brotes multiplicados fueron colocados en los Sistemas de Inmersión Temporal.

Condiciones en la multiplicación de los brotes en los Sistemas de Inmersión Temporal

Para la multiplicación de los brotes de *B. vulgaris* en los sistemas de inmersión temporal fueron empleados frascos RITA descrito por Teisson *et al.* (1996). Este sistema RITA consta de envases de 250 mL de capacidad con dos compartimentos, uno superior en el que se coloca el material vegetal y uno inferior en el que se adiciona el medio de cultivo (Figura 2). Por medio de un temporizador, la presión aplicada en el compartimento inferior empuja el medio de cultivo hacia el superior. El material vegetal se mantiene sumergido en el medio de cultivo líquido durante el tiempo que la presión es aplicada. Durante el período de inmersión el aire es insuflado, a través del medio de cultivo líquido renovando la atmósfera

dentro del frasco de cultivo y la sobrepresión escapa a través de filtros en la parte superior de los frascos RITA.

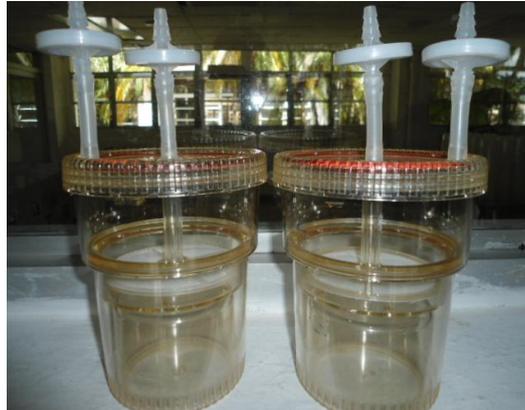


Figura 2. Sistema de inmersión temporal RITA, empleado en la multiplicación de *B. vulgaris*.

Para el desarrollo de todos los experimentos se adicionaron 225 ml de medio de cultivo de multiplicación en el compartimento inferior. En el compartimento superior, se inocularon cuatro explantes (brotes en grupos de a tres), por cada SIT (RITA). La frecuencia y tiempo de inmersión fue definida según los experimentos estudiados.

Procesamiento estadístico

El procesamiento estadístico, se realizó con *Statistic Package for the Social Science* (SPSS) versión 18 para Windows, para cada experimento se especifican los detalles correspondientes.

3.1 Efecto del número de subcultivo sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* en medio de cultivo líquido estático

Con el objetivo de determinar el efecto del número de subcultivo sobre el coeficiente de multiplicación de los brotes en medio de cultivo líquido estático. Se tomó como material vegetal, explantes obtenidos después de 20 días de establecidos *in vitro* (Figura 3). Los frascos de cultivo empleados fueron magentas (250 mL de volumen). A cada magenta se le adicionó 70 mL de medio de cultivo líquido, en cada una se colocaron cuatro explantes.



Figura 3. Explantes de *B. vulgaris* empleados en la multiplicación *in vitro* en medio de cultivo líquido estático.

A los 20 días de cultivo se determinó el número de brotes por explante. Se realizaron nueve subcultivos de multiplicación, con un intervalo de 20 días entre cada uno. Para ello se tomaron los brotes y se subdividieron en grupo de a tres.

Los datos experimentales en la evaluación del número de brotes/ explante en la multiplicación *in vitro* fueron analizados estadísticamente mediante la prueba no paramétrica *Kruskal Wallis*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

3.2 Efecto del 6-BAP sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA)

Con el objetivo de determinar el efecto del 6-BAP sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en SIT (RITA), se estudiaron cuatro tratamientos.

Como material vegetal se emplearon 80 explantes con un subcultivo de multiplicación *in vitro*, en medio de cultivo líquido estático y se colocaron en los frascos RITA, con diferentes tratamientos.

Se establecieron cuatro tratamientos, con diferentes concentraciones de 6-BAP (3,0; 6,0 y 9,0 mg.L⁻¹) y un tratamiento control sin regulador del crecimiento. El tiempo de inmersión fue de un minuto y la frecuencia de inmersión cada 6 horas (4 inmersiones)/24 h.

En cada tratamiento se utilizaron cinco frascos, cada frasco con 225 ml de medio de cultivo de multiplicación *in vitro* y 4 explantes.

Se realizaron renovaciones de medio de cultivo, cada 10 días, basado en resultados preliminares. A los 30 días de cultivo, se cuantificaron los indicadores morfológicos y fisiológicos, descritos en el epígrafe. Se tomaron 20 brotes por tratamiento.

Evaluación de indicadores morfológicos

Se determinó: número de brotes por explante, longitud del brote principal (cm) desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja y el número de hojas expandidas por cada explante. Se determinó el coeficiente de multiplicación, teniendo en cuenta lo descrito en el epígrafe 3.1.

Determinación del contenido de agua (CA)

Como material vegetal se tomaron 20 brotes por tratamiento, obtenidos de la multiplicación *in vitro* en los SIT, se enjuagaron con agua destilada y se secaron con papel de filtro. Se determinó su masa fresca (g) utilizando una balanza analítica Sartorius, fueron colocados en papel de aluminio y se colocaron en una incubadora Sakura a 60 °C durante 72 h, una vez que el peso se mantuvo constante, se determinó su masa seca (g) y se calculó el contenido de agua en %, utilizando la siguiente fórmula descrita por Bandyopadhyay *et al.* (2004):

$$CA\% = (MF - MS) / MF * 100$$

Determinación de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó según procedimiento descrito por Tuberoso *et al.* (2009), con modificaciones. Para determinar el contenido de fenoles totales se empleó el segundo par de hojas de los brotes multiplicados *in vitro*. Las muestras (0.5 g) se homogenizaron en nitrógeno líquido, usando un mortero y pistilo preenfriados, se mezclaron con 5 ml de etanol al 80 %, luego se calentaron a 50°C, por 30 min. El extracto se centrifugó a 8 000 g por 10 min. Se tomó una alícuota de 1,0 mL del sobrenadante y se enrasó hasta 3 mL con agua bidestilada, se agregó 1,0 mL del reactivo de Folin Ciocalteu 1N (Merck, Alemania) y se dejó reposar durante 5 min, posteriormente se le agregó 2,0 mL

de carbonato de sodio al 20 %. Las muestras se calentaron en baño María y luego se enfriaron en agua corriente. La solución se diluyó hasta 10 mL con agua bidestilada y se dejó reposar durante 30 min. La densidad del color azul se midió a 750 nm en espectrofotómetro UV- visible (Genesys 6, Thermo Electron Corporation, USA), contra el blanco (1,0 mL de etanol al 80 % en lugar del extracto).

El contenido de fenoles totales se determinó mediante extrapolación en una curva de calibración empleando ácido gálico como patrón a concentraciones en el rango de 100 a 400 mg y se expresó en mg equivalentes de Ácido gálico (AG) por gramos de masa fresca (mg EAG.gMF^{-1}).

Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba no paramétrica *Kruskall Wallis*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

Determinación del contenido de lignina

El contenido de lignina se determinó según procedimiento descrito por Kirk y Obst (1988). Se colectó el segundo par de hojas de los brotes multiplicados *in vitro* y se tomó una muestra de 100 mg de masa fresca obtenida de la homogenización en nitrógeno líquido, usando un mortero y pistilo preenfriados.

Las muestras se extrajeron en metanol y fueron secadas en campana, proceso que se repitió tres veces. De cada muestra se tomaron 200 mg y se hidrolizaron en 4,0 mL de H_2SO_4 al 72 % (v/v) a 30°C durante 1 hora, posteriormente fue diluido en 112 mL de agua bidestilada y mantenido en autoclave a 121°C y 1,2 atm., durante 1 hora. Cada muestra fue filtrada utilizando papel de filtro y el residuo sólido fue lavado con agua bidestilada y luego secado en campana. Posteriormente se pesó en balanza analítica Sartorius y se determinó el porcentaje de residuos de la pared celular con respecto a los 200 mg para cada muestra. El contenido de lignina se expresó como porcentaje de residuos de la pared celular.

Los valores obtenidos como porcentaje de residuos de la pared celular fueron analizados estadísticamente mediante la prueba no paramétrica *Kruskall Wallis*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

Determinación de pigmentos fotosintéticos

Para las determinaciones del contenido de los pigmentos fotosintéticos se cuantificaron la clorofila a, clorofila b y clorofilas totales. A partir del segundo par de hojas de los brotes multiplicados *in vitro*, se tomó una muestra de 100 mg de masa fresca obtenida de la homogenización en nitrógeno líquido, usando un mortero y pistilo preenfriados.

El contenido de clorofila fue determinado según el protocolo descrito por Mahmood *et al.* (2012): 100 mg de tejido vegetal fue homogenizado con 1,7 mL de acetona al 80%, disuelta con fosfato de sodio 2,5 μ M (pH 7,8), se agitó en vórtex durante 15 minutos y luego se centrifugó a 4 °C por 15 minutos a 3 000 rpm. Posteriormente, se midió la absorbancia a 663 (clorofila a) y 645 nm (clorofila b).

La medición de las concentraciones se realizó en un espectrofotómetro UV- visible (Genesys 6, Thermo Electron Corporation, USA), contra el blanco (1,0 ml de acetona al 80 % en lugar del extracto). Para calcular el contenido de las diferentes clorofilas se emplearon las siguientes fórmulas, según Porra (2002).

Clorofila a: $12,25 (A_{663,6}) - 2,55 (A_{646,6})$

Clorofila b: $20,31 (A_{646,6}) - 4,91 (A_{663,6})$

Clorofilas totales: $17,76 (A_{646,6}) + 7,34 (A_{663,6})$

En cada caso los resultados se expresaron en mg.g de masa fresca. El análisis estadístico en la determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos se realizó mediante la prueba no paramétrica *Kruskall Wallis*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

3.3 Determinación del efecto de la frecuencia de inmersión sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA)

Con el objetivo de determinar el efecto de la frecuencia de inmersión sobre los brotes de *B. vulgaris* cultivados en SIT (RITA), el material vegetal empleado fue similar al descrito en el epígrafe 3.2 y los mismos fueron colocados en los frascos RITA (cuatro por tratamiento), cada uno con 225 ml de medio de cultivo de multiplicación y la mejor concentración de 6-BAP obtenida en el acápite 3.2.

Se estudiaron tres tratamientos con diferentes frecuencias de inmersión cada 4, 6 y 12 horas. El tiempo de inmersión se programó para un minuto.

Se realizaron renovaciones de medio de cultivo de multiplicación, cada 10 días. A los 30 días de cultivo, se cuantificaron los indicadores morfológicos, similar al acápite 3.2.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba no paramétrica *Kruskall Wallis*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

3.4 Determinación del efecto del tiempo de inmersión sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA)

Con el objetivo de determinar el efecto del tiempo de inmersión sobre los brotes de *B. vulgaris* cultivados en SIT (RITA), se siguieron los procedimientos generales descritos en el acápite 3.3, y la frecuencia fue fijada con el mejor resultado obtenido en el acápite 3.3.

Se estudiaron dos tratamientos con diferentes tiempos de inmersión: uno y tres minutos. Se realizaron renovaciones de medio de cultivo de multiplicación, cada 10 días. A los 30 días de cultivo, se cuantificaron los indicadores morfológicos, similar al acápite 3.2.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba no paramétrica *Mann-Whitney*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto del número de subcultivos sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* en medio de cultivo líquido estático

Se determinó que el número de subcultivos tuvo efecto sobre el número de brotes/ explante de *B. vulgaris* en medio de cultivo líquido estático.

Desde el punto de vista cualitativo se observaron variaciones en las características de los brotes. No fueron visibles brotes hiperhídricos a pesar de que todos los subcultivos se realizaron en medio de cultivo líquido estático. De manera general los brotes desarrollados desde el primero hasta el sexto subcultivo mantuvieron una coloración verde claro y hojas bien expandidas, con respecto a la coloración verde-opaca de los obtenidos a partir del sexto subcultivo (Figura 4a). Sin embargo, los brotes desarrollados en el noveno subcultivo mostraban una coloración verde-amarillo pálido, con hojas enrolladas, en forma de cinta y brotes pequeños con menor longitud (Figura 4b).



Figura 4. Brotes de *B. vulgaris*, durante la multiplicación *in vitro* en medio de cultivo líquido estático, a) sexto subcultivo y b) noveno subcultivo.

El número de brotes se incrementó, a medida que aumentó el número de subcultivo hasta llegar al sexto (2,10). A partir del séptimo subcultivo comenzó a decrecer, alcanzando valores de 1,62 en el noveno subcultivo (Figura 5).

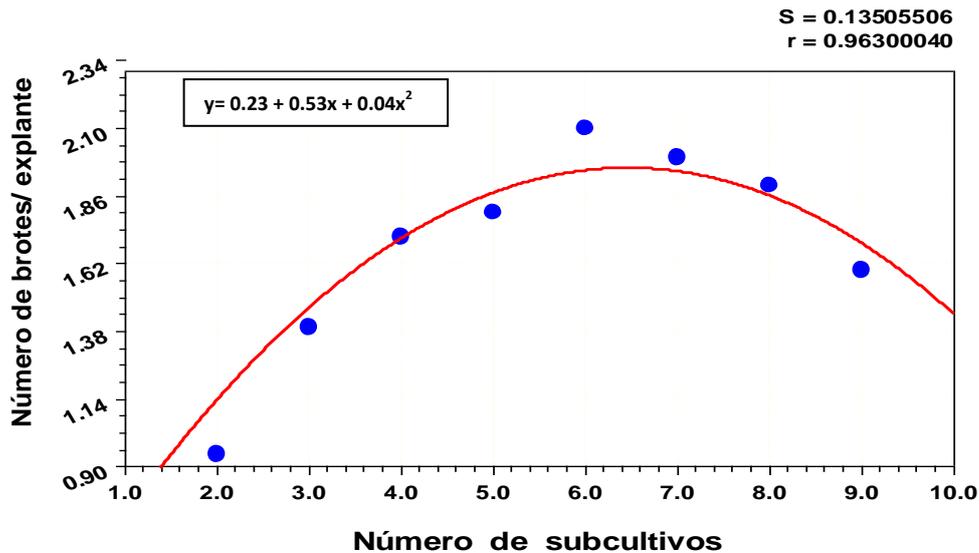


Figura 5. Influencia del número de subcultivos sobre el número de brotes/ explante en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris* en medio de cultivo líquido estático.

Resultados similares, fueron obtenidos por Saxena *et al.* (2006) en *Bambusa vulgaris* var. *vittata* donde alcanzaron un número de brotes/ explante de 2,2. Sin embargo, en otras especies de bambúes, Ramanayake *et al.* (2008) en *Bambusa atra* L. y *Dendrocalamus giganteus* Munro alcanzaron un número de brotes/ explante superior (3,0 y 4,2 respectivamente), específicamente en el sexto subcultivo de multiplicación de los brotes. Los valores antes referidos superan los obtenidos en el presente trabajo para la especie *B. vulgaris*.

Autores como Ramanayake *et al.* (2001) y García-Ramírez *et al.* (2010), señalaron que la disminución en el número de brotes/ explante 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.

El estado físico del medio de cultivo es un factor determinante para la multiplicación *in vitro* de bambúes. Autores como Jiménez *et al.* (2006) hacen referencia a la baja proliferación de plantas *in vitro* de *G. angustifolia* Kunth en el medio de cultivo semisólido y le atribuyeron como una de las causas, la presencia de fenoles que se acumulan en la base de los brotes.

Estos mismos autores señalaron que el lento crecimiento de los brotes pudiera atribuirse a las barreras físicas que impone el estado físico semisólido del medio de cultivo.

García-Ramírez *et al.* (2010) destacaron el efecto que presenta el número de subcultivos durante la multiplicación *in vitro* en el incremento del número de brotes/ explante de *B. vulgaris* cuando se emplean medios de cultivo líquidos. Estos mismos autores señalaron la importancia del manejo de las plantas para el incremento de la proliferación de brotes, ya que se ha demostrado en la mayoría de las especies de bambúes la muerte de las plantas una vez que los brotes se individualizan en el momento del subcultivo.

Los resultados obtenidos en el presente experimento demostraron que al emplear medios de cultivo líquidos estáticos durante la fase de multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris* solamente se deben realizar seis subcultivos, siendo en este último en el que se logran el mayor número de brotes/ explante (2,10).

4.2 Efecto del 6-BAP sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA)

El 6-BAP tuvo efecto sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en SIT (RITA), observándose diferencias entre los tratamientos, luego de transcurridos 30 días de cultivo.

En el tratamiento control, sin regulador del crecimiento (Figura 6a), se observó que las hojas de los brotes de *B. vulgaris* eran poco expandidas y presentaban una coloración verde claro, con manchas de color pardo. En los tratamientos con 3,0 y 6,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP las hojas de los brotes de *B. vulgaris* presentaban hojas bien expandidas con una coloración verde oscuro (Figura 6 b, c). A diferencia del tratamiento con 9,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP las hojas de los brotes mostraban una coloración verde clara, con bordes enrollados y hojas poco expandidas (Figura 6d).

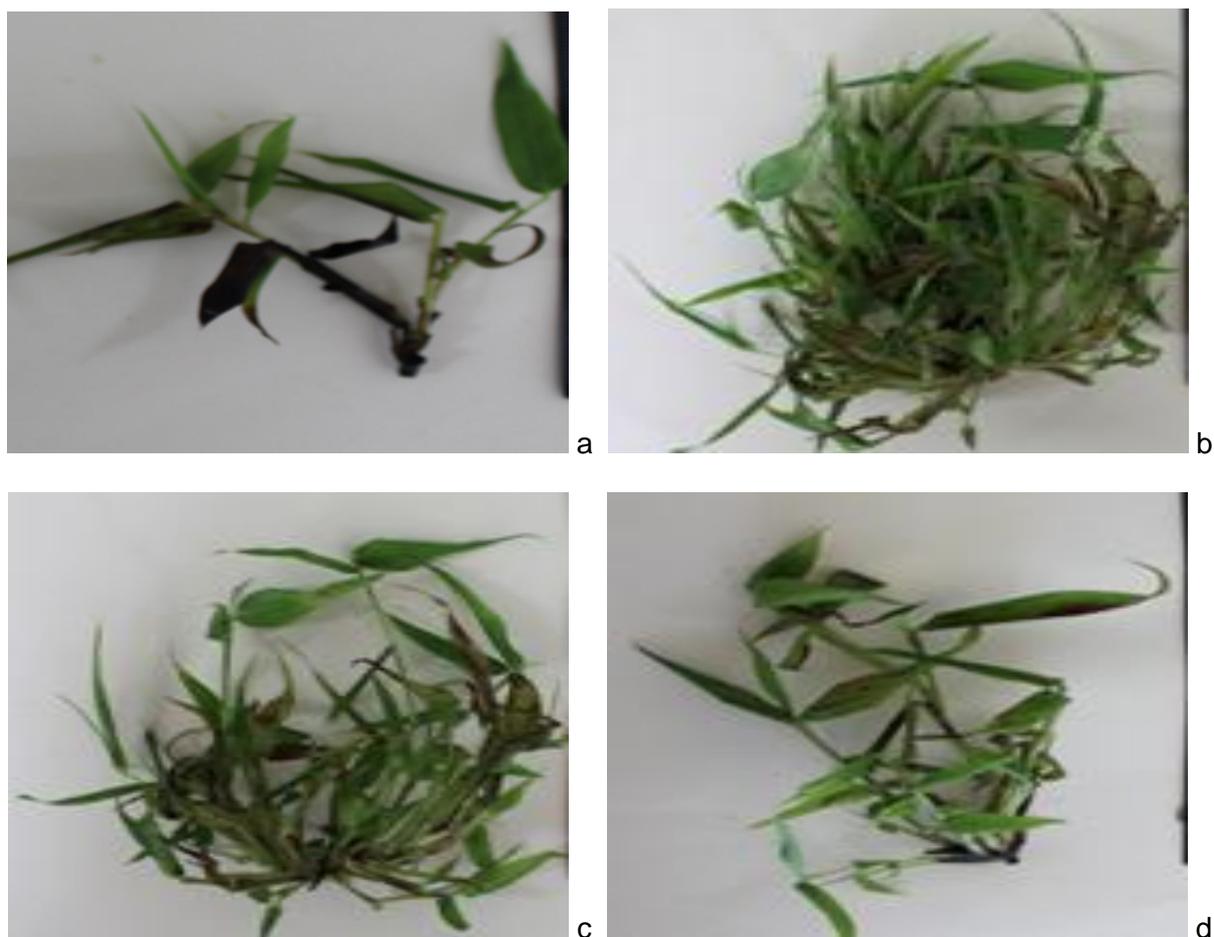


Figura 6. Brotes de *B. vulgaris* obtenidos en los SIT (RITA) con diferentes concentraciones de 6-BAP a los 30 días de cultivo. a) Sin regulador del crecimiento, b) 3,0 mg.L⁻¹, c) 6,0 mg.L⁻¹ y d) 9,0 mg.L⁻¹.

En los tratamientos con 6-BAP, se observó una mayor multiplicación de brotes con respecto a los brotes cultivados en los SIT sin la presencia de citoquinina. Los mayores valores en cuanto al número de brotes (5,1 brotes/explante) se obtuvieron en el tratamiento con 3,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP con diferencias significativas respecto a los demás tratamientos. Aunque en los tratamientos con 6-BAP, el menor número de brotes se alcanzó con 9,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP (2,7 brotes/explante), este fue superior al control sin 6-BAP (2,1 brotes/explante) (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la concentración de 6-BAP en la multiplicación de los brotes *in vitro* de *B. vulgaris* en SIT (RITA).

Indicadores morfológicos	Concentración de 6-BAP (mg.L ⁻¹)							
	0		3,0		6,0		9,0	
	Media	RM	Media	RM	Media	RM	Media	RM
Número de brotes/ Explante	2,1	6,7d	5,1	28,2a	4,5	25,1b	2,7	22,1c
Longitud del brotes inicial (cm)	6,2	8,50d	9,1	32,0a	8,4	24,5b	7,0	16,9c
Número de hojas/ explante	4,8	6,5d	16,0	35,1a	8,1	21,7b	6,9	18,7c

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

En cuanto a las variables número de hojas por explante y longitud de los brotes, los mejores resultados se alcanzaron al emplear 3,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP con diferencias significativas respecto a los demás tratamientos.

Los resultados obtenidos en este experimento coinciden con los descritos por Mongkolsook *et al.* (2005) en *Dendrocalamus latiflorus* Munro. Estos autores refieren que el número de brotes se incrementó proporcionalmente cuando se empleó 4,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP con 1,1 mg.L⁻¹ de ANA durante la fase de multiplicación.

Las condiciones de cultivo en los RITA estimularon la multiplicación de los brotes de *B. vulgaris*, independientemente de la concentración de 6-BAP. Al respecto, Marulanda *et al.* (2005) en *Guadua angustifolia* Kunth, incrementaron el número de brotes por explante al emplear frascos RITA.

Por otro lado, se ha demostrado que el 6-BAP es el regulador del crecimiento más empleado para la multiplicación *in vitro* en bambúes. Sin embargo, se ha demostrado que el empleo de altas concentraciones de 6-BAP en el medio de cultivo, trae consigo una disminución en la formación de nuevos brotes y por consiguiente un decrecimiento en el coeficiente de multiplicación (Ziv, 2005). Estos cambios fisiológicos han sido descritos por Hazarika, (2006) y Quiala *et al.* (2012) en *Tectona grandis* L (Teca).

Al respecto, se ha señalado por varios autores (Moncaleán *et al.*, 2009; Ivanova y Van Staden, 2011; Heinricher, 2012) que las citoquininas inducen cambios morfológicos y fisiológicos tales como la hiperhidricidad en muchas especies, por lo general de una manera dependiente de las concentraciones empleadas o cuando no son optimizadas las condiciones de cultivo.

Por su parte, Bag *et al.* (2001), considera que el empleo de concentraciones de 6-BAP mayores de $7,0 \text{ mg.L}^{-1}$, constituye una limitante en la multiplicación *in vitro* de los bambúes.

En este sentido, Segura, (2008) plantea que esta citoquinina está implicada en la diferenciación celular, estimulando la proliferación de las yemas axilares (ruptura de la dominancia apical) lo cual favorece la emisión de nuevas hojas, pero reduce el desarrollo en altura de las planta e inducen un importante incremento en el tamaño de las células, provocado por un alargamiento celular.

Esto pudiera estar dado, a que cuando se incrementó la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo, se rompe el balance auxina/citoquinina, ocurre el proceso de diferenciación celular, las células comienzan a dividirse y a formar nuevas células. Sin embargo, no existe correlación entre la velocidad de formación de nuevas células y las necesidades de nutrientes en los explantes, esto provoca que se formen células vacías, poco desarrolladas, con ausencia de los sistemas membranosos y toda la estructura interna de la célula. Estas anomalías se expresan en la disminución de nuevos brotes lo cual puede estar influenciado por las altas concentraciones de citoquininas empleadas y al poco desarrollo de sus células. Azcón- Bieto, (2008) refiere que el 6-BAP, además de promover la división celular, ejerce otras funciones reguladoras en el desarrollo de las plantas. Lo cual sugiere que la respuesta de las células al 6-BAP viene determinada tanto por la concentración empleada como por el tipo celular.

Los SIT mejoran la nutrición y la asimilación de nutrientes por toda la superficie de los explantes (Aragón, 2010), no obstante esto pudo ser una limitante cuando se utilizaron

concentraciones de 6-BAP superiores a $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ en los brotes de *B. vulgaris*, ya que disminuyó la formación de nuevos brotes. Sin embargo, con bajas concentraciones ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP) se logró aprovechar las ventajas del medio de cultivo líquido y se obtuvo una proliferación de brotes (5,1 brotes/explante) superior al control, sin la formación de brotes hiperhídricos.

Autores como Marulanda *et al.* (2005) en *Guadua angustifolia* Kunth, atribuyen el incremento en el número de brotes por explante a las condiciones de cultivo creadas en los SIT tipo RITA. Si se toman como referencia los resultados obtenidos en el epígrafe anterior se puede estimar que las condiciones de cultivo en los RITA estimularon la multiplicación de los brotes de *B. vulgaris*.

En esta forma de cultivo se conjugan factores que permiten un contacto intermitente del medio de cultivo con el material vegetal, lo cual posibilita un aporte eficiente de elementos nutritivos y una renovación periódica de la atmósfera interna del frasco de cultivo, lo cual evita la acumulación de gases tóxicos como el etileno (Escalona, 2006). Estudios realizados durante el cultivo en SIT de *Eucalyptus* sp. confirman que en los SIT es posible luego de finalizada cada inmersión, lograr una concentración de dióxido de carbono (CO_2) y oxígeno (O_2) similares a la concentración atmosférica y eliminar la acumulación de etileno del espacio gaseoso del frasco de cultivo (Zobayed, 2005; Roels *et al.*, 2006).

Autores como Arya *et al.* (2001), en *Dendrocalamus asper* Munro, al emplear una concentración de $8,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP, destacan el efecto de este regulador del crecimiento sobre la disminución de la longitud y el grosor de los brotes tal como sucede en los tratamientos del presente experimento.

Autores como Ramanyake *et al.* (2008), hacen referencia a que en la multiplicación *in vitro* de bambúes las concentraciones de 6-BAP varían en dependencia del genotipo en estudio.

Estos mismos autores señalan que cuando se emplean altas concentraciones de 6-BAP (6,0 y 9,0 mg.L⁻¹) en el medio de cultivo disminuye el número de brotes por explante, la longitud de los brotes, así como en el número de hojas por brotes.

Determinación del contenido de agua (CA)

El incremento de la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo, provocó un aumento del contenido de agua en los brotes multiplicados, alcanzando los mayores valores en el tratamiento con 9,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP (Figura 7).

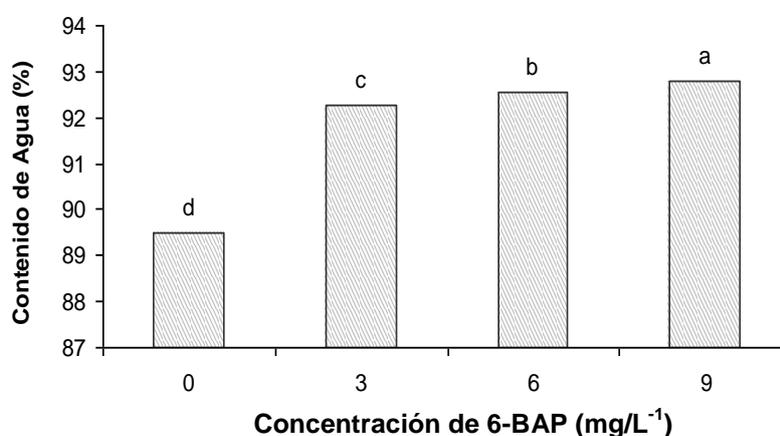


Figura 7. Efecto de la concentración de 6-BAP en relación al contenido de agua de los brotes de *B. vulgaris*, en los SIT, a los 30 días de cultivo.

Los resultados obtenidos, coinciden con los descritos por Moncaleán *et al.* (2009) en *Actinidia deliciosa* L. y Quiala *et al.* (2012), en *Tectona grandis* L., quienes describen que los cambios morfológicos en los brotes, se incrementaron en correspondencia con la concentración de 6-BAP, a partir, de que el mayor tiempo de exposición a concentraciones más altas, indujo una sobreacumulación de citoquininas endógenas en formas activas, lo que coincidió con el mayor contenido de agua en los brotes.

Podemos considerar que una pared celular está formada por polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectinas), que constituyen alrededor del 90 % del peso seco de las paredes primarias. Sánchez-Díaz, (2008) y López, (2013) hacen referencia a que el contenido

hídrico de las plantas se puede estudiar, en términos de porcentaje del peso seco. Donde el rango hídrico varía proporcionalmente a la elasticidad o rigidez de la pared celular, a medida que aumenta el volumen celular, el potencial osmótico aumenta, dado que la presión osmótica se halla relacionada inversamente con el volumen celular. Muchas de las características fisiológicas y morfológicas de los tejidos vegetales, se deben a las propiedades de las paredes celulares. Según Fernández *et al.* (2008), las citoquininas como el 6-BAP influye en el gradiente de potencial electroquímico para protones, es decir afectando a la actividad de la H⁺-ATPasa, y por tanto al potencial de membrana, dando lugar a determinadas respuestas fisiológicas, como cambios morfológicos en los brotes, al aumentar el contenido de agua. De igual manera, puede decirse que influyen las acuoporinas, proteínas de pequeño tamaño que se localizan en la membrana plasmática, las cuales se desempeñan fundamentalmente en el transporte del agua, a través de las células. Segura, (2008) señala que la permeabilidad de las membranas es muy alta y la presencia de estos canales puede facilitar aún más el paso del agua en determinadas circunstancias, por ejemplo ante el incremento de las concentraciones del 6-BAP, como ocurre en los tratamientos de la presente investigación. En este sentido, Sánchez-Díaz, (2008) plantea que la rigidez de las paredes celulares, condiciona el crecimiento de las células vegetales y por tanto, el de todos los órganos de la planta. Durante la elongación la pared celular primaria pierde su rigidez y se expande gracias a la fuerza generada por la presión de turgencia. La entrada de agua concomitante permite que se incremente el volumen celular. La elongación está regulada por diversos factores, entre los que se incluyen el 6-BAP. El factor predominante del proceso es la activación de las expansinas, proteínas presentes en las paredes celulares de los órganos en crecimiento que promueven la pérdida de la rigidez de las paredes celulares, lo cual se traduce en un aumento del contenido de agua en las células, que dan lugar a los nuevos brotes, influenciado por el aumento de las concentraciones de 6-BAP, en los diferentes tratamientos.

Determinación de compuestos fenólicos totales

Se observó una disminución del contenido de compuestos fenólicos totales en los brotes con $9,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP ($22 \text{ mg EAG. g}^{-1} \text{ MS}$) y en el tratamiento control sin regulador del crecimiento ($15 \text{ mg EAG. g}^{-1} \text{ MS}$), no siendo así en el tratamiento donde se empleó $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP, donde se alcanzó el mayor contenido de fenoles totales ($62 \text{ mg EAG.g}^{-1} \text{ MS}$) (Figura 8).

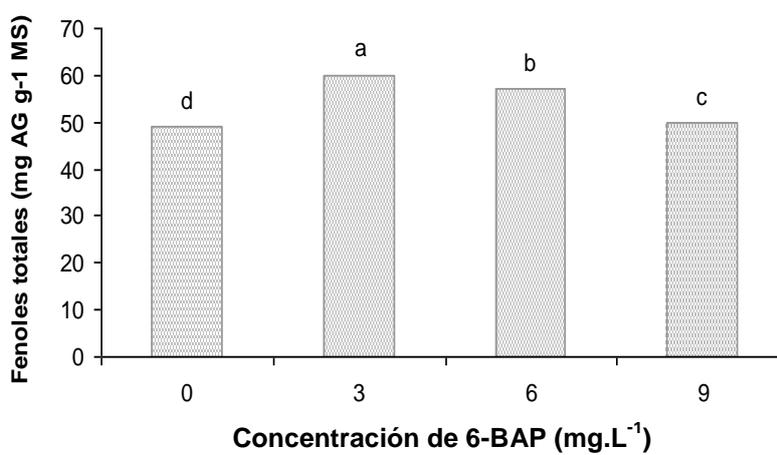


Figura 8. Contenido de compuestos fenólicos totales de brotes de *B. vulgaris*, con diferentes concentraciones de 6-BAP, en los SIT, a los 30 días de cultivo.

Según los resultados obtenidos hubo diferencias significativas, entre los diferentes tratamientos con diferentes concentraciones de 6-BAP y en el tratamiento control, donde el menor contenido de fenoles coincidió con la disminución del número de brotes por explante, el incremento del contenido de agua, así como con la mayor concentración de 6-BAP empleada.

Los compuestos fenólicos forman parte del sistema de defensa antioxidante, debido a su bajo potencial redox, característica esta de todos los tejidos vegetales. Los fenoles se oxidan fácilmente en las plantas, debido a la presencia en sus tejidos de fenolasas, enzimas que catalizan, entre otras, la oxidación de los monofenoles a difenoles, donde los niveles relativos de mono y/o difenoles podrían ejercer un efecto regulador en el crecimiento de los brotes de *B. vulgaris*.

Como consecuencia el menor contenido de compuestos fenólicos totales en los brotes de *B. vulgaris*, sugiere una disminución de la capacidad antioxidante en este tipo de brotes, donde los cambios morfológicos en los brotes estuvieron asociados a una disminución del contenido de compuestos fenólicos, lo cual relaciona que la pérdida de la calidad morfológica de los brotes podría estar asociado con una disminución de la capacidad antioxidante de los mismos.

Resultados similares fueron obtenidos por Quiala *et al.* (2012) en Teca, donde los menores valores en los compuestos fenólicos, estuvieron asociados a brotes con cambios morfológicos.

Determinación del contenido de lignina

Se observó una disminución del contenido de lignina en los brotes que se desarrollaron en los medios de cultivo líquidos, con concentraciones de 6,0 y 9,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP y en el tratamiento control sin regulador del crecimiento (Figura 9). No siendo así en el tratamiento con 3,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP, donde se obtuvo el mayor contenido de lignina.

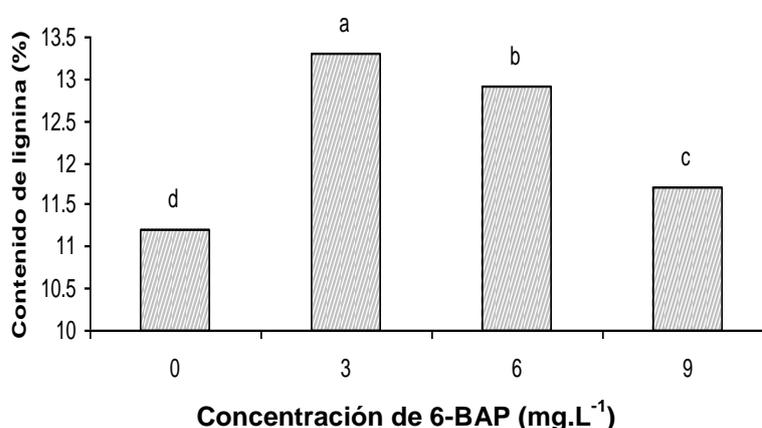


Figura 9. Influencia de las concentraciones de 6-BAP en el contenido de lignina total de brotes de *B. vulgaris* obtenidos en los SIT a los 30 días de cultivo.

Los valores acumulados en el tratamiento con 3,0 mg.L⁻¹ (13,3% de ligninas totales) fueron los más elevados, respecto a los tratamientos con 6,0; 9,0 y el control (12,7%; 11,8% y 11,0% de ligninas totales, respectivamente).

A medida que se incrementó la concentración de 6-BAP en los tratamientos con 6,0 y 9,0 mg.L⁻¹, se obtuvo menor porcentaje de lignina en los brotes, siendo el tratamiento control sin 6-BAP el de menor resultado (11,0%). Esto pudiera atribuirse al empleo de diferentes concentraciones de 6-BAP, observándose cambios morfológicos en los brotes, causados por la existencia de un tejido vascular poco desarrollado y poco eficiente, para conducir el agua y los nutrientes, además de la presencia de bajos porcentajes de lignina, provocados por la carencia de la pared secundaria en los brotes.

La lignificación se relaciona con la formación de fenoles, donde su formación puede estar provocada por un estrés ambiental, como las altas concentraciones de 6-BAP. Por ejemplo, la baja calidad en los brotes obtenidos, en los tratamientos con 6,0; 9,0 y el control sin 6-BAP. Este proceso de lignificación se produce luego de un desarrollo diferenciado de las células, donde las ligninas son los polímeros fenólicos más importantes en la naturaleza, puesto que proporcionan fuerza y rigidez estructural a la pared celular. Las ligninas pueden representar una proporción importante (35 %) en la pared celular.

Autores como, Hazarika, (2006) y Sreedhar *et al.* (2009), consideran que la hipolignificación, es uno de los síntomas de cambios morfológicos en los brotes, observándose en los mismos, una menor longitud, menor número de brotes y hojas por explante. La escasa presencia de lignina pudiera haber influido en las paredes celulares de las células de los tejidos vasculares, en que fueran menos hidrofóbicas y más permeables al agua, favoreciendo el aumento del contenido de agua en los brotes, lo cual se relaciona con los valores obtenidos en el contenido de lignina.

Resultados similares, han sido obtenidos por autores como Hu *et al.* (2011) en *Dendrocalamus farinosus* L. y Quiala *et al.* (2012) en Teca, cuando se aumentan las concentraciones de 6-BAP.

Los resultados obtenidos indican, que las plantas de *B. vulgaris* procedentes de los tratamientos con 6,0 y 9,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP y mayormente las de este último tratamiento, las cuales tenían un bajo contenido de compuestos fenólicos y lignina, podrían ser más susceptibles a la deshidratación y al ataque de patógenos, que las plantas procedentes del

tratamiento con $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP. Si a esto se añade el mayor contenido de agua y las anomalías de las hojas, lo cual se detectó en estos brotes cultivados con altas concentraciones de 6-BAP, entonces se puede predecir que estas plantas tendrán menos probabilidades de sobrevivir durante la aclimatización.

Determinación de pigmentos fotosintéticos

La concentración de 6-BAP, influyó en el contenido de clorofilas totales y esta varió significativamente entre los tratamientos con 6-BAP y el control (Figura 10).

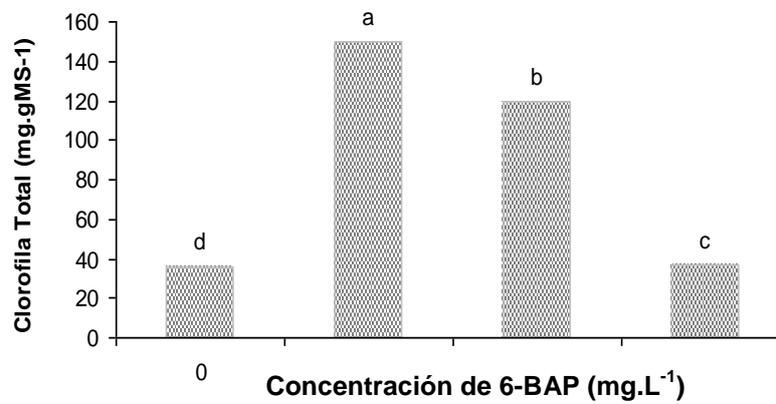


Figura 10. Contenido de clorofilas totales en *B. vulgaris* en los SIT, al cabo de los 30 días de cultivo.

El mayor contenido de clorofilas totales se alcanzó en los brotes obtenidos en el tratamiento con $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (150 mg.g MS^{-1}) de 6-BAP; mientras que el menor contenido (38 mg.g MS^{-1}) se obtuvo en el tratamiento control que no tenía regulador del crecimiento. De Manera general el contenido de clorofilas totales disminuyó a medida que aumentó la concentración de 6-BAP.

En el tratamiento control la disminución del contenido de clorofilas, está relacionado con un incremento significativo del contenido de agua, menor contenido de fenoles y de ligninas totales.

Los cambios que se producen en el contenido de pigmentos de las hojas (clorofila y carotenoides) en los tratamientos, son indicadores de perturbaciones en las plantas causadas por factores externos, los cuales pueden estar relacionados con la acción del 6-BAP y su concentración en los diferentes tratamientos. Esto se explica si se considera que el 6-BAP influye en la síntesis de pigmentos y la síntesis de algunos de los constituyentes de los cloroplastos. (Azcón–Bieto, 2008).

Las variaciones en el contenido de clorofilas totales en los brotes, pudieran ser atribuido a síntomas tempranos de la inducción de una respuesta hiperhídrica en los brotes de *B. vulgaris*, relacionados con las concentraciones de 6-BAP. La aparición de una coloración verde clara de los brotes se asoció a los tratamientos con menor contenido de clorofilas (tratamiento control y con 9.0 mg.L⁻¹ 6-BAP). Sin embargo todo lo contrario ocurrió en el tratamiento con 3.0 mg.L⁻¹ cuyos brotes desarrollaron una coloración verde intensa característica de la especie.

En otras especies vegetales como *Dioscorea alata* L. (Hazarika, 2006 y Cabrera, 2010) y *T. grandis* L. (Quiala *et al.*, 2012) obtuvieron resultados similares a los mostrados en el presente experimento y refieren, especialmente, la importancia de los pigmentos fotosintéticos en la calidad morfológica de los brotes cultivados en SIT.

La composición y el contenido de los pigmentos fotosintéticos son fundamentales en la fotosíntesis, pueden ser modificados por factores internos en el desarrollo del cultivo *in vitro*, además influyen en las características fisiológicas de los explantes (Vicas *et al.*, 2010).

Todo lo anterior permitió relacionar que los brotes con mayor contenido de clorofilas son los de mejores resultados en otros indicadores morfológicos como longitud de la planta, número de brotes por explante, menor contenido de agua, mayor peso seco, mayor contenido de fenoles y lignina.

Los resultados obtenidos resultan novedosos pues no fueron encontradas referencias sobre la extracción y cuantificación de clorofilas totales, en condiciones de cultivo *in vitro*, en *B. vulgaris*.

A partir de los resultados obtenidos, se logró definir la concentración de 3,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP como la más adecuada para la multiplicación de los brotes de *B. vulgaris* en los SIT, teniendo en cuenta que con esta concentración, se logra alcanzar un número de brotes (5,1 brotes/explante), superior al control sin 6-BAP (2,1 brotes/explante) y al resto de los tratamientos, una longitud mayor (9,15 cm) en los brotes, superior a todos los tratamientos, al igual que un mayor número de hojas por explantes (16,0 hojas/explante). Con esta concentración, se alcanzan los mejores resultados, en cuanto a contenido de agua (92,5 %), mayor cantidad de fenoles totales (62 mg AG.g⁻¹ MS), mayor contenido de lignina (13,3 %) y mayor contenido de clorofilas totales (150 mg.g MS⁻¹).

La concentración de 3,0 mg.L⁻¹ es la más apropiada a emplear en los SIT para la proliferación de los brotes, los resultados obtenidos fueron superiores (5,1 brotes/explante, al cabo de 30 días) a los obtenidos en medio de cultivo líquido estático (2,1 brotes/explante al cabo de 120 días).

4.3. Determinación del efecto de la frecuencia de inmersión sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA)

Se determinó que la frecuencia de inmersión tuvo efecto en la multiplicación de los brotes de *B. vulgaris*, observándose marcadas diferencias entre los tratamientos.

En el tratamiento uno los brotes que fueron sometidos a una frecuencia de inmersión cada 4 horas (Figura 11a), se observaron con un color verde claro, con hojas poco expandidas y bordes enrollados, en el tratamiento dos, los brotes sometidos a una frecuencia de inmersión cada 6 horas (Figura 11b), presentaron una coloración verde oscura, con hojas anchas y abiertas, sin embargo en el tratamiento tres los brotes sometidos a una frecuencia

de inmersión cada 12 horas (Figura 11c), se observaron de color verde claro, bordes enrollados, con poca formación de nuevos brotes y hojas poco expandidas.

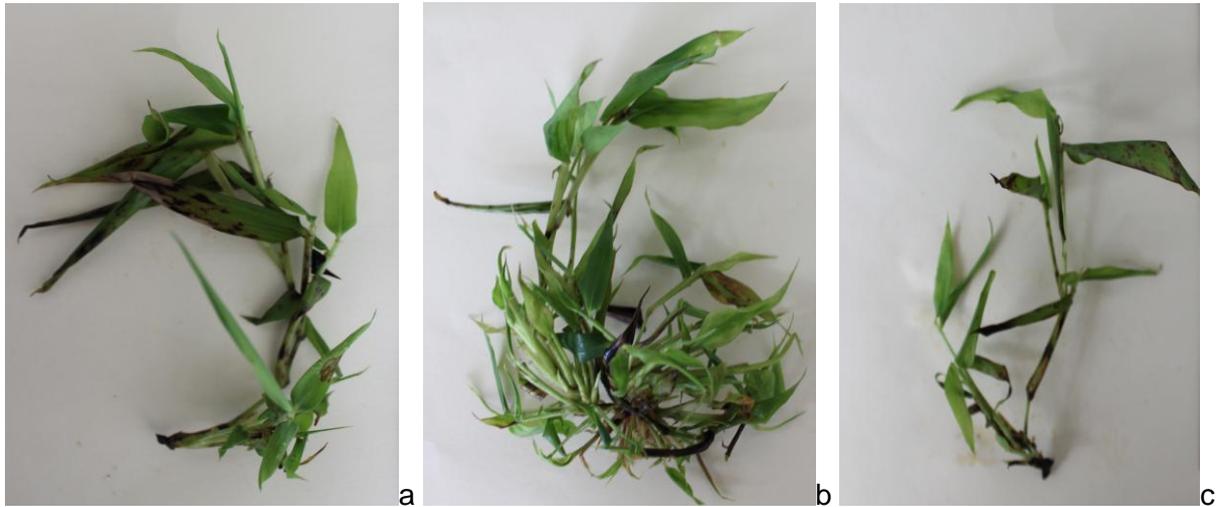


Figura 11. Efecto de la frecuencia de inmersión en la multiplicación de los brotes de *B. vulgaris* a los 30 días de cultivo en los sistemas de inmersión temporal. a) Cada 4 horas, b) 6 horas y c) 12 horas.

A los 30 días de cultivo, se comprobó que existían diferencias significativas, entre los tratamientos con una frecuencia de inmersión cada 6 h y 12 h. Los primeros alcanzaron el triple del número de brotes (6,5 brotes/explante), mayor longitud (8,3 cm), así como, mayor número de hojas por explante (11,0 hojas/explante), mientras los que fueron sometidos a una frecuencia de inmersión cada 12 h formaron menor número de brotes (2,7 brotes/explante) y menor longitud (6,4 cm) (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la frecuencia de inmersión en la multiplicación de los brotes de *B.vulgaris* a los 30 días de cultivo en los sistemas de inmersión temporal.

Indicadores morfológicos	Frecuencias de Inmersión					
	4 horas		6 horas		12 horas	
	Media	RM	Media	RM	Media	RM
Número de brotes/explante	4,7	25,10b	6,5	32,7a	2,7	14,6c
Longitud del brotes inicial (cm)	7,0	25,5ab	8,3	30,6a	6,4	20b
Número de hojas/ explante	8,1	22,10b	11,0	32,25a	7,7	20,5b

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

Esto probablemente se deba a que intervalos mayores a 6 horas afectaron la multiplicación de los brotes, ya que al ser un intervalo de tiempo entre inmersiones, demasiado largo, no permite lograr una nutrición adecuada de los brotes y conjuntamente con una menor asimilación de los nutrientes lo cual impide una proliferación adecuada. Resultados similares fueron obtenidos por Sánchez, (2012).

Los resultados obtenidos con la frecuencia de inmersión cada 6 horas (4 inmersiones/24 h) en la multiplicación de los brotes pudieron estar dados, a que se logró una mejor renovación en la composición de los gases que conforman la atmósfera interna del frasco de cultivo en comparación con una frecuencia de inmersión cada 12 horas, además de una mayor asimilación de nutrientes. Autores como Marulanda *et al.*, 2005 y Holst, (2010), obtuvieron resultados similares en *Guadua angustifolia* Kunth, Mongkolsook *et al.* (2005) en *Dendrocalamus latiflorus*, Chaille, (2011) en *Bambusa ventricosa* McClure, así como Yang *et al.* (2011) en *Sacharum* spp. híbrido.

Las frecuentes renovaciones de la atmósfera interna cada cuatro horas (seis inmersiones en el día), quizás provocaron un aumento en la concentración de oxígeno en el interior del recipiente, lo cual pudo haber ocasionado un incremento en la fotorespiración de los brotes limitando su crecimiento en los frascos RITA. A diferencia de la frecuencia de inmersión cada 12 horas (dos inmersiones en el día), en la cual tal vez se restringió la disponibilidad de oxígeno probablemente por un alto estrés hídrico que no fue compensado con la duración de la inmersión o con la tolerancia natural de las células o tejidos.

En relación con la masa fresca, masa seca y el contenido de agua, se pudo determinar que el contenido de agua aumentó en los brotes, cuando se emplearon mayores frecuencia de inmersión (horas), lo cual está relacionado con el contenido de masa seca obtenido en los mismos (Figura 12).

Teniendo en cuenta los resultados en el tratamiento tres se evidenció el mayor porcentaje de agua en los brotes lo cual influyó en la calidad morfológica de los brotes, siendo el tratamiento dos el de mejores características morfológicas, expresada en los brotes.

La frecuencia de inmersión influye en los SIT, evidenciándose en la proliferación de los brotes y en el contenido de agua. Según, Jackson, (2003) esto puede estar dado por la formación de una película acuosa en el tejido, lo que podría interferir en el intercambio gaseoso entre el tejido exterior o superficie celular, donde el intercambio gaseoso en la fotosíntesis y respiración con altas frecuencias de inmersión, es reducido.

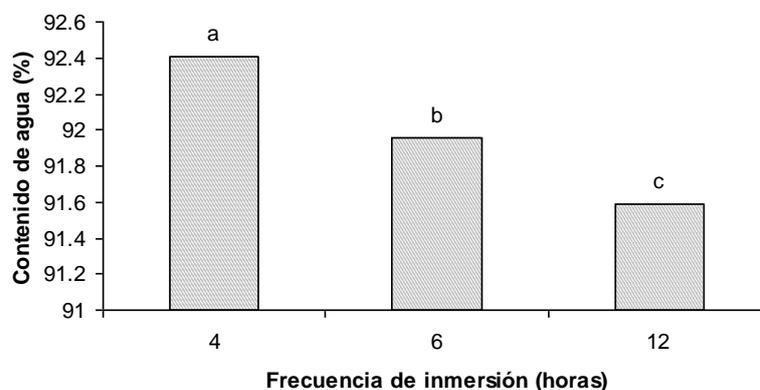


Figura 12. Efecto de la frecuencia de inmersión en el contenido de agua de los brotes de *B. vulgaris*, en los SIT, a los 30 días de cultivo.

Lo anterior sugiere la importancia, de evitar tiempos prolongados de exposición del 6-BAP en los brotes, provocado por la frecuencia de inmersión, el cual puede producir un agotamiento fisiológico de los brotes, al aumentar el contenido de agua en los mismos y esto repercute en la disminución del crecimiento de los brotes en subcultivos continuos. Estos efectos también fueron obtenidos por Quiala *et al.* (2006) en *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. y González *et al.* (2011) en *E. globulus* Hill.

4.4. Determinación del efecto del tiempo de inmersión sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA)

Se determinó que el tiempo de inmersión influyó en la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris*, cultivados en los SIT, durante los 30 días. Los brotes obtenidos en el tratamiento con un minuto de inmersión del medio de cultivo (Figura 13a) se observaron con una coloración verde oscuro y hojas expandidas, con numerosos brotes, sin embargo en los brotes obtenidos en el tratamiento con tres minutos de inmersión del medio de cultivo (Figura 13b), se observó un cambio en la coloración, a partir del séptimo día de cultivo, los cuales comenzaron a perder la coloración verde en sus hojas, mostrando síntomas de oscurecimiento en los brotes con la presencia de un color carmelita o café, posteriormente, al cabo de los 30 días de multiplicación en el medio de cultivo en los SIT, los brotes estaban necrosados.



Figura 13. Efecto del tiempo de inmersión sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA), al cabo de los 30 días. a) un minuto de inmersión y b) tres minutos de inmersión.

Entre los dos tiempos de inmersión empleado uno y tres minutos se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los brotes multiplicados al cabo de los 30 días (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del tiempo de inmersión sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA).

Indicadores morfológicos	Tiempo de Inmersión (minutos)			
	1		3	
	Media	RM	Media	RM
Número de brotes/explante	5,0	13,50 a	3,6	7,50b
Longitud de los brotes (cm)	10,1	14,95a	7,8	6,05b
Número de hojas/brote	18,5	15,5a	5,5	5,50b

Rango Medios (RM) con letras diferentes dentro de una misma fila, difieren significativamente ($p < 0,05$) según Mann-Whitney.

Observándose que en el tratamiento uno con la inmersión del medio de cultivo en los SIT, durante un minuto, permitió un aumento en el número de los brotes (5,0 brotes/explante),

mayor longitud en los brotes (10,14 cm) y número de hojas (18,50 hojas/brote), a diferencia de lo resultados obtenidos, en los brotes del tratamiento dos, con una inmersión de tres minutos, se obtuvieron los menores valores en cuanto al número de brotes (3,60 brotes/explante), menor longitud en los brotes (7,84 cm), así como menor número de hojas por brote (5,50 hojas/brote).

Resultados similares fueron obtenidos en *Dendrocalamus latiflorus* (Mongkolsook *et al.*, 2005) y *Bambusa ventricosa* McClure (Chaille, 2011), independientemente de las diferencias entre los genotipos al realizar las inmersiones durante un minuto alcanzaron los mejores resultados en la multiplicación de los brotes. Aunque, según Salazar y Hoyos (2008) el efecto del tiempo de inmersión sobre el tejido que se utilice en los frascos RITA®, también puede variar considerablemente dependiendo de la especie, del tipo de tejido y del medio de cultivo empleado.

Según Vilchez *et al.* (2007) y Sánchez, (2012) puede deberse a que tiempos de inmersión muy largos afectan el intercambio gaseoso y por ende el desarrollo de los explantes, ya que aumenta la posibilidad de hiperhidratación.

Cuando se varían los tiempos de inmersión se induce una respuesta morfogénica de tejidos la cual puede deberse a la influencia de factores como las relaciones hídricas, el intercambio gaseoso y el incremento en la toma de nutrientes mediante esta forma de cultivo de inmersión temporal (Escalona *et al.* 1999); los cuales son aspectos que inciden de alguna manera en el crecimiento y desarrollo del material vegetal. Según Salazar y Hoyos (2008) el efecto del tiempo de inmersión sobre el tejido que se utilice en los frascos RITA® también puede variar considerablemente dependiendo de la especie, del tipo de tejido y del medio de cultivo empleado.

La disminución del número de brote por explante está muy relacionado con los cambios morfológicos y fisiológicos en los brotes, los cuales se evidencian, a medida que el agua se acumula en los tejidos, sin que exista una manifestación típica en la morfología de

los brotes como la apariencia turgente, translúcidos, sin embargo el aumento del contenido de agua en los tejidos como resultado de un mayor tiempo de inmersión y contacto de los mismos con el medio de cultivo, pudiera limitar la disponibilidad del O₂ y el CO₂.

Según, se aumentó el tiempo de inmersión en los brotes multiplicados en los SIT, para uno y tres minutos, el contenido de agua se incrementó, lo cual está relacionado con un menor contenido de masa seca. Los mayores valores se alcanzaron en el tratamiento de tres minutos de inmersión con 93,9 % (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto del tiempo de inmersión sobre la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA), atendiendo a indicadores fisiológicos.

Indicadores fisiológicos	Tiempo de Inmersión (minutos)			
	1		3	
	Media	RM	Media	RM
Contenido de agua (%)	92,1	5.50b	93,9	35,50a
Fenoles totales (mg GAE.g ⁻¹ MS)	49,1	35,5a	19,4	15,5b
Contenido de lignina (%)	13,1	35,5a	11,0	15,5b

Rango Medios (RM) con letras diferentes dentro de una misma fila, difieren significativamente ($p < 0,05$) según Mann-Whitney

Como ya se explicó, en el tratamiento con tres minutos de inmersión se evidenció un oscurecimiento en los brotes transcurridos 30 días, a diferencia del tratamiento con un minuto donde los brotes permanecieron de color verde.

Esto sugiere que los brotes, al estar expuestos a un estrés abiótico, provocado por el tiempo de inmersión pudo haber disminuido la concentración de O₂ en el frasco, provocando condiciones primeramente de hipoxia y después condiciones de anoxia (carencia de oxígeno). La falta de oxígeno bloquea la actividad del ciclo de los ácidos tricarbónicos y de la respiración, con lo que la producción de ATP y la regeneración de NAD⁺, NADP⁺ se

detienen y el estado energético de las células se reduce. La falta de ATP inhibe el transporte activo de H⁺ hacia la vacuola, ya que la actividad ATPasa de tonoplasto se bloquea y el citoplasma se acidifica irreversiblemente, causado por el aumento del CO₂ en los frascos, dado por el tiempo prolongado de inmersión y como consecuencia, se detiene el metabolismo de las células y por tanto el transporte de los nutrientes. Esta deficiencia de oxígeno, provoca la paralización del crecimiento, la epinastía de las hojas, el cierre de los estomas y bloqueo de la fotosíntesis y la respiración.

El oscurecimiento de los tejidos, puede estar relacionado con un estrés oxidativo de los brotes, debido a que el tiempo de inmersión pudo afectar la tasa de respiración del tejido, es decir, la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y la peroxidación de lípidos pudo aumentar con la duración de la inmersión, de tal manera que prolongados períodos de inmersión afectan el desarrollo del material vegetal lo cual puede inducir hiperhidricidad y estrés oxidativo (Martre *et al.*, 2001).

La acumulación de compuestos fenólicos totales interfirió en el crecimiento de las células, los cuales provocan un incremento en la permeabilidad de las membranas, la respiración y la producción de etileno, los cuales son cambios que provocan la coloración café oscura (Vega 1999). Los mayores valores se alcanzaron para el tiempo de un minuto (49,1 mg GAE. g⁻¹ MS) (Tabla 4). Resultados similares fueron obtenidos por Sánchez, (2012) en *Oryza sativa* L., cuando aumento el tiempo de inmersión superior a un minuto.

El oscurecimiento de los explantes puede ser relacionado también, con el efecto del 6-BAP, el cual previene o retrasa la degradación de la clorofila (Costa *et al.* 2005, Zavaleta-Mancera *et al.*, 2007), donde su incorporación al medio de cultivo líquido se ha asociado con decoloraciones y oscurecimiento del explante. En *Phyllostachis nigra* (6-BAP a 1,0-16 mg.L⁻¹), causó un fuerte oscurecimiento de tejidos (Ogita, 2005).

Aparte del oscurecimiento de explantes, el estrés oxidativo se ha relacionado con el desencadenamiento de otros desórdenes fisiológicos, morfológicos, epigenéticos y

genéticos que ocurren en los explantes cultivados, tales como recalcitrancia, hiperhidricidad y variación somaclonal (Cassells y Curry 2001, Van Staden *et al.* 2006). También puede influir el potencial osmótico del medio de cultivo, el cual puede aumentar o inhibir la biosíntesis de compuestos fenólicos, su difusión y oxidación (Azofeifa, 2009).

La oxidación del tejido y el grado de inhibición del crecimiento en el explante son muy dependientes del genotipo. Muchas veces se encuentran diferencias entre especies del mismo género (Huang *et al.* 2002) e incluso cultivares de una misma especie.

Con un tiempo de tres minutos, se observó que el contenido de lignina en los brotes, también decreció, a medida que se aumentó el tiempo de inmersión, para tres minutos, lo cual influyó en los cambios morfológicos antes mencionados (Tabla 4).

Resultados similares fueron obtenidos por Sánchez, (2012); Quiala *et al.* (2012), donde relaciona la pérdida del contenido de lignina a cambios morfológicos en los brotes y a la hiperhidricidad, lo cual puede estar influenciado por el tiempo de exposición al medio de cultivo líquido o por condiciones de hipoxia en los tejidos, causado por el tiempo de inmersión.

Las condiciones de cultivo en SIT pueden afectar el crecimiento de las plantas *in vitro* y su estado fisiológico, a través de cambios en el medio ambiente *in vitro* durante todo el período de cultivo, debido a las interacciones entre cada componente de las condiciones de cultivo y el crecimiento de las plantas (Kozai y Smith, 1995).

Lo anterior demuestra la necesidad de determinar el tiempo de inmersión para cada una de las especies y fases de cultivo en la micropropagación, pues del ajuste del tiempo de inmersión depende en gran medida la eficiencia del empleo de los SIT (Berthouly y Etienne, 2005; Escalona, 2006).

Por lo que se considera que el tiempo de inmersión de un minuto es el adecuado para lograr la multiplicación de los brotes de *B. vulgaris* en los SIT y así disminuir el daño oxidativo de los explantes.

En la Figura 14, se refleja el esquema de trabajo para la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* en medios de cultivos líquidos. El cual permite la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* en los SIT, empleando $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 6-BAP, incrementando el número de brotes por explantes (5,1) al cabo de 30 días. Posibilitando este método de propagación, en los SIT RITA, aprovechar las condiciones de los medios de cultivos líquidos, el cual incrementó el número de brotes, en menor tiempo de subcultivo, se favorecieron las condiciones de cultivos por frecuentes renovaciones de la atmósfera interna (cada 6 horas) lo cual favoreció el crecimiento y desarrollo de los brotes, para un tiempo de un minuto. Se logró además, minimizar los costos de reactivos al emplear la mitad de la concentración de 6-BAP, así como se reduce la mano de obra. Los brotes obtenidos presentaron mayor calidad morfo-fisiológica en relación a los obtenidos en medio de cultivo líquido estático. En los SIT se logró obtener a partir de un explante cinco explantes al cabo de 30 días, sin embargo en el medio de cultivo líquido estático se obtienen dos explantes luego de transcurridos 120 días. Lo cual evidencia la eficacia de los SIT como modelo de propagación en la multiplicación de los bambúes. Luego de culminar la presente investigación se puede concluir que es posible emplear los SIT tipo RITA para la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris*. Además por primera vez, se realizan estudios en los SIT basados en la caracterización morfológica y fisiológica de *B. vulgaris*, partiendo de la determinación del contenido de agua, fenoles, lignina y clorofilas totales, empleando los SIT.



Banco de plantas donantes de *B. vulgaris*



Yemas axilares de *B. vulgaris*



Establecimiento *in vitro* de *B. vulgaris*



Brotos de *B. vulgaris* en medio de cultivo líquido estático (MCLE)



Brotos de *B. vulgaris* en SIT (RITA)



Brotos de *B. vulgaris* a los 120 días de cultivo de multiplicación *in vitro* en MCLE



Brotos de *B. vulgaris* a los 30 días de cultivo de multiplicación en SIT (RITA)

Figura 14. Esquema de trabajo para la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* en SIT RITA.

CONCLUSIONES

- ❖ Se determinó que solamente es posible realizar seis subcultivos de multiplicación *in vitro* (2.1 brotes/explante) de los brotes de *B. vulgaris* con el empleo de medios de cultivo líquido estático.
- ❖ Al realizar la multiplicación de los brotes en los SIT tipo RITA se definió que la concentración de 6-BAP, la frecuencia y tiempo de inmersión influyeron en la emisión de nuevos brotes así como en las características morfológicas y fisiológicas de estos.
- ❖ Para la multiplicación de *B. vulgaris* la adición de 3.0 mg.L⁻¹ de 6-BAP combinado con las inmersiones en los SIT tipo RITA cada seis horas, durante un minuto; favoreció la formación de brotes con menor contenido de agua, mayor cantidad de lignina, fenoles totales y clorofila total.
- ❖ Las condiciones de cultivo en los sistemas de inmersión temporal tipo RITA favorecieron la emisión de brotes con calidad morfológica y fisiológica, siendo estos resultados más favorables que los obtenidos en condiciones de multiplicación en medios de cultivo líquido estático.

RECOMENDACIONES

- ❖ Se propone el empleo de los SIT para la multiplicación in vitro de brotes de *B. vulgaris* con una concentración de 3,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP, una frecuencia de inmersión cada 6 horas y un tiempo de inmersión de un minuto.
- ❖ Se recomienda el estudio de las variables morfo-fisiológicas en otro tipo de frasco mayor a 1,0 L.
- ❖ Se recomienda estudiar la posibilidad del enraizamiento ex vitro de los brotes de *B. vulgaris* obtenidos en los SIT y con ello acortar el tiempo de propagación de esta especie.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken-Christie, J. (1991). Automation. In: Debergh PC & Zimmerman R J (eds) Micropropagation: Technology and Application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 363-388
- Alvard, D., Cote, F. y Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effect of temporary immersion of explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32: 55-60.
- Aragón, C., Carvalho, L., González, J., Escalona, M. y Amancio, S. (2009). Sugarcane (*Saccharum* sp. hybrid) propagated in headspace renovating systems shows autotrophic characteristics and develops improved anti-oxidative response. Trop Plant Biol 2:38–50.
- Aragón, C., Carvalho, L., González, J., Escalona, M. y Amancio S. (2010). *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. Biol Plant 54:237–244.
- [Arencibia](#), A., [Bernal](#), A. y [Cortegaza](#) R. (2012). Regulating Gene Expression in High-scale Plants Micropropagation. Journal of Plant Sciences, 6: 213-224.
- 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, Satsangi R, Arya S. (2001). Rapid micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus asper*. J. Sus. For. 14: 103–114.
- Azcón-Bieto, J. y Tolón, M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal 2^{da} edición Mc Graw Hill Interamericana de España S.A.U. Madrid.
- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía Mesoamericana. 20:153-175.
- Bag N. (2001). Mass propagation of tea, maggar bamboo and dev ringal. Ph.D Thesis, FfNB Garhwal University.

- Bandyopadhyay T, Gangopadhyay G, Poddar R, Mukherjee K. (2004). Trichomes their diversity, distribution and density in acclimatization of Teak (*Tectona grandis* L.) plants grown in vitro. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 78:113–121
- Bernal A, Occeguera Z, Jiménez M, Rivera O, García L, de Feria M. (2002). Use of the Temporary Immersion Systems for sugar cañe vitroplants' production. *Biotechnología Vegetal* 2(4): 201-206.
- Berthouly M, H Etienne. (2005). Temporary immersion system: A new concept for use liquid medium in mass propagation. In Hvoslef-Eide A, W Preil eds. *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Dordrecht, Netherlands. Springer-Verlag. p. 165-196.
- Billard C y Lallana V. (2005). Multiplicación *in vitro* de *Eucaliptus dunnii*. *Ciencia, Docencia y Tecnología* 16 (30): 192-216.
- Brar J, Anand M, Sood A. (2013). *In vitro* germination of economical important edible bamboo *Dendrocalamus membranaceus* Munro. *Indian Journal of Experimental Biology* 51: 88-96.
- Cabrera M., Kosky R., Rayas A., De Feria M., López J., Basail M., & Medero V. (2009). Protocolo para la formación de microtubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) en Sistema de Inmersión Temporal. *Rev Colomb Biotecnol* XI (2), 19-30.
- Cabrera M., Kosky RG., & Espinosa E. (2011). Effect of liquid media culture systems on yam plant growth (*Dioscorea alata* L. „Pacala Duclos”) *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 15(4), 6.
- Cassells AC y Curry RF. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and geneticengineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 145–157.
- Castro D, J González. (2002). Eucalyptus (*Eucalyptus grandis* Hill. ex Maiden.) en el sistema de inmersión temporal. *Agricultura Técnica* 62(1): 68-78.

- Cátasus, L. (2003). Estudio de los bambúes arborescentes cultivados en Cuba. ACTAF. Cuba.
- Costa, M, Vello C, Cháves, A, Martínez, G. (2005). Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20 °.
- Chaille, Lee C. (2011). Optimizacion of tissue culture protocols for cost-effective production of Dracaena, Bamboo, and succulent plants.
- Das, M, 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, Bhattacharya S, Singh P, Figueiras T, Pal A. (2008). Bamboo Taxonomy and Diversity in the Era of Molecular Markers. Advances in Botanical Research. 47: 225-267.
- Das D and Chatuverdi. (2006). *Bambusa* bamboos (L.). voss plantation in eastern India : I. culm recruitment dry matter dynamics and carbon flux I. Bamboo rattan 5 :47-49.
- Daquinta M, Obregon A, Cid M. (2007). Formación de callos e inducción de brotes a partir del tejido intercalar de ramas de plantas adultas de *Guadua angustifolia* Kunth. Biotecnología Vegetal 7 :119-122.
- De Feria M, Jiménez E, Chávez M. (2002). Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Saccharum* spp. var. IBP 89-112. Biotecnología vegetal Vol. 2, No. 3: 143-147, julio-septiembre.
- Dutta, M, 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.

- Embaye K, Weih M, Ledin S. (2005). Biomass and nutrient distribution in a highland bamboo forest in Southwest Ethiopia : implications for management. For. Ecol. Manag 204 : 159-169.
- Escalona M. (2003). Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. In Vitro Cell Dev Biol Plant 39:651–656.
- Escalona, M. (2006). Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. Prophyta annual: 48-50.
- Escalona M. (2007). Physiology of effects of temporary immersion bioreactor (TIB) on micropropagated plantlets. Acta Hort. 748: 95-101.
- Etienne H, M Berthouly. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69(3): 215-231.
- Fernández J, García-Sánchez M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal 2^{da} edición Mc Graw Hill Interamericana de España S.A.U. Madrid.
- Franquis F., Infante, A. (2003). Perspectivas del bambú en América Latina y en Venezuela. For. Lat. 33: 1-10.
- Freire-Seijo M, García-Ramírez Y, Hurtado O, León M, Fajardo Rosabal L, Cruz-Martín M, Sánchez-García C, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Tejeda M, Roque B, Leiva-Mora M.
- (2011). Combinación de técnicas biotecnológicas y tradicionales para la propagación de diferentes especies de bambú. Biotecnología Vegetal Vol. 11, No. 3: 163 – 168.
- García-Ramírez Y., Freire-Seijo M., Pérez B., Hurtado O. (2010). Efecto del estado físico del medio de cultivo y el número de subcultivos en la fase de multiplicación in vitro de plantas de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*. Schrad. ex Wendl. Biotecnología Vegetal. 10 (2):113-119.
- García-Ramírez Y., Freire-Seijo M., Pérez B., Hurtado O. (2011). Propagación in vitro de bambúes. Biotecnología Vegetal. 11(3):131 – 142.

- García Ramírez Y., Freire-Seijo M, Pérez Mederos B, Hurtado Rivalta O. (2012). Efecto del AIB y el TDZ en el enraizamiento *in vitro* de plantas de *Bambusa vulgaris* var *vulgaris* Schrad. ex Wendl Rev. Colomb. Biotecnol. (XIV)1: 200-207.
- 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.
- González D, L.S.J. (2011). Plan rector el comité sistema producto bambú Puebla Asociación Civil. 47p.
- González R, Ríos D, Avilés F (2007). *In vitro* multiplication of *Eucalyptus globulus* by temporary immersion system. *BOSQUE* 32(2): 147-154.
- González-Anasco N, López-Martell A, Catanares-Landrave C, Gutierrez-Urgellés E. (2011). Importancia práctica y económica de la propagación agámica de bambú y su relación con el programa de desarrollo hasta el 2015. 5to. Congreso Forestal de Cuba.
- Hahn, JE y Paek YE. (2005). Multiplication of *Chrysanthemum* shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 81(3): 301-306.
- Hazarika BN. (2006). Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci Hortic* 108:105–120.
- Heinricher J. R. (2012). Compositions and methods for bamboo pulping. (i9) United States (12) Patent Application Publication.
- Holst, A. (2010). Efecto del sistema de inmersión temporal (RITA®) sobre el desarrollo de plántulas *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae: Bambusoideae) y su posterior aclimatación. Tesis presentada para optar por el grado académico de Licenciado en Ingeniería Agronómica. Universidad de Costa Rica, San José. 52p.
- Hu Shang-lian, Jian-ying Zhou, Ying Cao, Xue-qin Lu, Ning Duan, Peng Ren and Ke Chen. (2011). *In vitro* callus induction and plant regeneration from mature seed embryo

- and young shoots in a giant sympodial bamboo, *Dendrocalamus farinosus* (Keng et Keng f.) Chia et H.L. Fung. African Journal of Biotechnology Vol. 10(16), pp. 3210-3215.
- Huang, LC; Lee YL; Huang BL; Kuo CI y Shaw JF. (2002). High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in bamboo tissue culture. [In Vitro Cellular and Development Biology - Plant](#), 38 (4): 358 - 365.
 - Hurtado Ribalta O, Freire-Seijo M, Leiva-Mora M, García-Ramírez Y. (2012) Caracterización morfológica y anatomía foliar de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* en fase de aclimatización. Biotecnología Vegetal Vol. 12, No. 3: 165 – 171.
 - Ivanova M, Van Staden J. (2011). Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. Plant Cell Tiss Organ Cult 104:13-21.
 - Jackson MB. (2003). Aeration stress in plant tissue cultures. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* Special Issue.96-105.
 - 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.
 - Jiménez, E. (2009). Conferencia sobre propagación vía organogénesis. Novena edición de la Maestría en Biotecnología Vegetal, santa Clara, Cuba.
 - Kim EK, Hahn EJ, Murthy HN & Paek KY. (2005). Enhanced shoot and bulblet proliferation of garlic (*Allium sativum* L.) in bioreactor systems. Journal of Horticulture Science & Biotechnology. 79 (5): 818-822.
 - Kirk T and Obst J. (1988) Lignin determination. Methods Enzymol. (161): 87-101.
 - Kapoor P., Usha-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, Tissue and Organ Culture. 85(2): 211-217. DOI: 10.1007/s11240-005-9074.
 - Koshy, K, Gopakumar B. (2005). An improvised vegetative propagation technique for selfincompatible bamboos. Curr. Sci. 89: 1474–1476.

- Kozai T., & Smith M. A. L. (1995). Environmental control in plant tissue culture. General introduction and overview. En: Aitken-Christie J., Kozai T., Smith M. A. L. (eds) *Automation and environmental control in plant tissue cultures*. (pp. 301–318). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Kumar, T., Dhakal D., Gurung, S., Sharma, N. y D. G. (2013). Shrestha Bamboo Diversity, Distribution Pattern and its uses in Sikkim (India) Himalaya. *International Journal of Scientific and Research Publications*, Volume 3, Issue 2.
- Lárraga-Sánchez, N. (2011). Propagación *in vitro* y convencional de tres especies de Bambú.
- Li, D. (2006). Taxonomy and biogeography of the Bambuseae (Gramineae: Bambusoideae).[En línea] En:[http://www.ipgri.cgiar.org/publications/ HTMLPublication /572/ch11.htm](http://www.ipgri.cgiar.org/publications/HTMLPublication/572/ch11.htm). Consultado: 6 de septiembre de 2012.
- Li-Hua, Z., Xue-Yuan, L. y Welander, M. (2005). Optimization of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. In: A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, 253–261.
- Lin CS, Lin CC, Chang WC. (2004). Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 76:75–82 *Biotechnology* 5(13): 1245-1248.
- Londoño, X. (2009). Aspectos Generales de los Bambúes Americanos. [En línea] En: <http://www.bambumex.org/paginas/ASPECTOS> GENERALES.pdf. Consultado: 18 de Septiembre de 2012.
- López, Y. (2013). Elementos de Fisiología Vegetal Tropical. Colombia. Reg: 10-205-225.
- Marulanda M, Gutiérrez LG, Márquez M. (2005). Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunt. *Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal* 27(82):5-15.
- Mahmood M, Bidabadi S, Ghobadi C, Gray D. (2012) Effects of methy jasmanate treatment on alleviation of polyethylene glycol-mediated water stress in banana

- (*Musa acuminata* cv. 'Berangan', AAA) shoot tip cultures. *Plant Growth Regul*,(68): 161-169.
- Martre P, Lacan D, Just D, Teisson C. (2001). Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 67:25–35.
 - McAlister B, J Finnie, MP Watt, F Blakeway. (2005). Use of temporary immersion bioreactor system (RITA ®) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forest (SA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81(3): 347-358.
 - [Meyer M.](#) [Banasiak M.](#) [Ntoyi T.](#) (2009) Sugarcane plants from temporary immersion culture: acclimating for commercial production. [Acta Horticulturae](#) 812: 323-32.
 - Mongkolsook Y, Tanasom M, Sumkaew R, Likitthammanit P, Wongwean P. (2005). Temporary Immersion System (TIS) for Micropropagation of *Dendrocalamus latiflorus* in Commercial Production. Kasetart Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.
 - Montes de Oca, Suárez JL., Jiménez González E. (2010). Incremento de la eficiencia en la propagación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum spp. híbrido*) en sistemas de inmersión temporal.
 - Mordocco A y Brumbley J. (2006). Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). The Society for *In vitro* Biology. *In vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*. DOI 10.1007/s11627-008-9173-7.
 - Murashige T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
 - Nadgouda R, John C, Parasharami V, Joshi M, Mascarenhas A. (1997). A comparison of *in vitro* with *in vivo* overing in bamboo: *Bambusa arundinacea*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 48:181-188.
 - Nath A.J, Das A. (2008). Bamboo resources in the homegardens of Assam: A case study from Barak Valley. *J Trop. Agric.*, 46:58_61.

- 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.
- Ogita S. (2005). Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. *Plant Biotechnology* 22: 119–125.
- Oramas, E. (2010). Impacto ambiental del bambú (*Bambusa vulgaris var. vulgaris*. Schard) en comparación con otras coberturas forestales sobre un suelo Pardo Ócrico sin Carbonato. Tesis en opción al título en Máster en Ciencias en Agricultura sostenible. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UCLV.
- Pardos, AJ. (2010). El carbono en los ecosistemas terrestres. En: INIA (ed) Los ecosistemas forestales y el secuestro de carbono ante el calentamiento global. pp. 25-35.
- Pérez-Alonso N, Wilken D, Gerth A, Annett J, Nitzsche HM, Kerns G, Capote-Perez A, Jiménez E. (2009). Cardiogenic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 99:151–156.
- Pérez Alonso N. (2013). Sistemas de inmersión temporal, elicitación y transformación genética en *Digitalis purpurea* L. Tesis de doctorado. Instituto de biotecnología de las plantas.
- Porra RJ. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73: 149–156.
- Preil W. (2005). General introduction a personal reflection on the use of liquid media for in vitro cultura (pp. 1-20). En: A. Hvoslef-Eide y W. Preil. *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Dordrecht: The Netherland Springer.
- Quiala E, Barbón R, Jiménez E, de Fera M, Chávez M, Capote A, Pérez N. (2006). Biomass production of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, a medicinal plant, in temporary immersion system. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 298–300.

- Quiala E, Cañal MJ, Meijón M, Rodríguez R, Chávez M, Valledor L, de Feria M, Barbón R. (2012). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109:223-234
- Quintanilla K. (2007). Establecimiento *in vitro* de Loroco (*Fernaldia pandurata* W) *Revista Agronomía Mesoamericana* 18: 75-84.
- Ramanayake S, Wanniarachchi W, Tennakoon T. (2001). Axillary shoot proliferation and *in vitro* rooting in an adult giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37: 667–671.
- Ramanayake S, Meemaduma V, 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, Chaturani G. (2008). Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities. *Scientia Horticulturae* 118: 270-273.
- 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.
- Read P. (2007). Micropropagation: Past, present and future. *Acta Hort.* 748: 17-28.
- Ríos D, Avilés F, Sánchez-Olante M, Escobar R, Pereira G. (2005). Variación de la tasa de enraizamiento asociada al número de subcultivo y diámetro de microtallos de castaño (*Castanea sativa* Mill.). *Agricultura Técnica* 65(3): 258-264.
- Roels S, Noceda C, Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodríguez R, Debergh P. (2006). The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 84: 155–163.
- Sánchez Cordero L. (2012). Multiplicación de callos embriogénicos de arroz (*Oryza sativa* L.) subespecie indica mediante un sistema de cultivo por inmersión temporal

automatizado (RITA®). Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética y Biotecnología..

- Sánchez-Díaz M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal 2^{da} edición Mc Graw Hill Interamericana de España S.A.U. Madrid, 25 pp.
- Sanjaya T, Rathore S, Ravishankar-Rai V. (2005). Micropropagation of *Pseudoxytenanthera stocksii* Munro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant.* 41 (3): 333-337.
- Sankar-Thomas YD, Lieberei R. (2011). Camptothecin accumulation in various organ cultures of *Camptotheca acuminata* Decne grown in different culture systems. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 106:445–454.
- Satya S, Lalit M, Poonam S, Naik S.N. (2010). Bamboo shoot processing: food quality and safety aspect (a review). *Trends in Food Science & Technology* 21: 181e189.
- Sayanika, W, 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.
- Segura J. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal 2^{da} edición Mc Graw Hill Interamericana de España S.A.U. Madrid, 421pp.
- Sreedhar RV, Venkatachalam, Neelwarne B. (2009). Hyperhydricity-Related Morphologic and Biochemical Changes in *Vanilla planifolia* L.). *J Plant Growth Regul* 28: 46–57.
- Teisson C, E Alvard, D Francois, X Cote, M Berthouly, M Lartaud. (1994). *In vitro* culture by temporary inmersión. *In vitro* culture of tropical plants. (CIRAD). pp. 7-11.
- Teisson C, Alvard D, Berthouly M, Cote F, Escalant J, Etienne H & Lartand M. (1996). Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. *Acta Hort.* 440: 521-526.
- Teisson C & Alvard D. (1999). *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato Research* 42: 499-504.

- Torres M. (2010). Bambú. SDR, Puebla. México.
- Tuberoso G, Montorob P, Piacenteb S, Coronac G. (2009). Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. J. Pharm. Biomed. Anal. 50: 440-448.
- Van Staden J, Fennell CW, Taylor NJ. (2004). Plant Stress *in vitro*: The Role of Phytohormones. ISHS Acta Horticulturae 725: V International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding.
- Vicas S, Laslo V, Pantea S, Bandici G. (2010). Chlorophyll and carotenoids pigments from mistletoe (*Viscum album*) leaves using different solvents. XVII, 2: 213-218.
- Vilchez, J., Ramírez, E., Villasmil, M., Albany, N., León de Sierralta, S. y Molina, M. (2007). Aclimatización de vitroplantas de zábila (*Aloe vera* (L.) Burm. f): efectos del sustrato. Rev. Fav. Agron. (LUZ). 24 Supl. 1: 57-61.
- Vogtländer, J, Van Der LP, Brezet H. (2010). The sustainability of bamboo products for local and Western European applications. LCAs and land-use. Journal of Cleaner Production 18(13): 1260-1269.
- Wang, G, Innes JL, Dai S, He G. (2008). Achieving sustainable rural development in Southern China: the contribution of bamboo forestry 15(5): 484-495
- Yan H, Liang C, Li Y. (2011). Axillary shoot proliferation and tuberization of *Discorea forii* Prain et Burk. Plant Cell Tiss Organ Cult 104:93–198.
- Yuang, L., Y. Zambrano, C.J. Hu, Carmona E.R., Bernal A. (2009). Sugarcane metabolites produced in CO₂-rich temporary immersion bioreactors (TIBs) induce tomato (*Solanum lycopersicum*) resistance against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 46: 558-568.
- Yasodha R, Sumathi R, Gurumurthi (2004) Micropropagation for quality propagule production forestry. Indian Journal of Biotechnology 3:159-170.
- Zavaleta-Mancera, H; López-Delgado, H; Loza-Tavera, H; Mora-Herrera, M; Trevilla-García, C; Vargas-Suárez, M; Ougham, H. (2007). Cytokinin promotes catalase and

ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of Plant Physiology* 164: 1572-1582.

- Zeledón, M. (2006). Organogénesis directa y embriogénesis indirecta en el cultivo *in vitro* de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott), cultivar blanco. Managua, Nicaragua. Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía. Trabajo de diploma.
- Zhang Ning, Wei Fang, Yan Shi, Qianqian Liu, Haiyun Yang, Renyi Gui, Xinchun Lin, (2010). Somatic embryogenesis and organogénesis in *Dendrocalamus hamiltonii*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* DOI 10.1007/s11240-010-9783-8.
- Ziv M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81(3): 277-285.
- Zobayed SMA (2005) Ventilation in micropropagation. In: Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system (Springer Eds.) by T. Kozai, F. Afreen, SMA. Zobayed: 143-182.