



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS VERACRUZ

POSTGRADO EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES

PROPAGACIÓN *in vitro* DE BAMBÚ: ESTADO DEL ARTE, ESTABLECIMIENTO

DEL CULTIVO ASÉPTICO Y BROTAÇÃO INICIAL DE *Bambusa lako*

APOLONIA ZAMORA CHACÓN

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

TEPETATES, MANLIO FABIO ALTAMIRANO, VERACRUZ.

2015

La presente tesis, Titulada: **Propagación *in vitro* de bambú: Estado del arte, Establecimiento del cultivo aséptico y brotación inicial de *Bambusa lako***, realizada por la alumna: **Apolonia Zamora Chacón**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Alejandro Alonso López

ASESOR



Dr. Nicolás Gutiérrez Rangel

ASESOR



Dr. Jorge Catalino López Collado

ASESOR



Dra. María de Jesús Martínez Hernández

M.F. Altamirano, Veracruz, México, diciembre de 2015.

**PROPAGACIÓN *In vitro* DE BAMBÚ: ESTADO DEL ARTE, ESTABLECIMIENTO
DEL CULTIVO ASÉPTICO Y BROTAÇÃO INICIAL DE *Bambusa lako***

Apolonia Zamora Chacón, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

El bambú es una especie ampliamente distribuida en climas templados y tropicales alrededor del mundo. En México existen diversas especies endémicas y exóticas, su creciente interés agrícola y comercial, ha creado la necesidad del diseño de estrategias para su cultivo. Debido a que el bambú en general, presenta una floración impredecible y su semilla es recalcitrante, las técnicas de propagación convencional no resultan eficientes, por lo que se hace necesario el uso de alternativas, una de ellas es el cultivo *in vitro*. El primer paso para lograr un protocolo eficiente de propagación *in vitro* es la desinfección e inducción; en este sentido, el presente trabajo consta de dos capítulos, el primero es el estado del arte del cultivo *in vitro* de bambú con el objetivo de sistematizar las principales observaciones científicas que existen al respecto, el segundo capítulo consistió en aplicar algunas observaciones en el proceso de desinfección e inducción en el cultivo *in vitro* en *B. lako*. Se determinó el protocolo de desinfección, y se logró obtener los menores porcentajes de contaminación en plantas de invernadero (0-5%) en comparación con las de campo (65-100%) los hongos contaminantes que limitan el establecimiento son: *Fusarium sp.* y *Botriotrichum sp.*, así mismo se identificó la citoquinina más adecuada para la inducción de brotes para *B. lako*, obteniendo el mayor porcentaje de brotación con TDZ 0,7 mg/L (100%).

Palabras clave: Bambú, desinfección, citocininas y hongos.

***In vitro* PROPAGATION OF BAMBOO: STATE OF THE ART, STABLISHMENT OF
ASEPTIC CULTURE AND INITIAL SPROUTING OF *Bambusa lako***

Apolonia Zamora Chacón, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

Bamboo is a species widely distributed in temperate and tropical climates around the world. There are several species endemic and exotic, its growing agricultural and commercial interest in Mexico, it has created a need for the design of strategies for its cultivation. Since bamboo in general, presents an unpredictable flowering and seed it is recalcitrant, the conventional propagation techniques are not efficient, so it becomes necessary the use of alternatives, one of them is growing in vitro. The first step in achieving an efficient in vitro propagation protocol is disinfection and induction; in this sense, this paper is divided into two chapters, the first is the State of the art in vitro cultivation of bamboo in order to systematize the main scientific observations that exist in this regard, the second chapter consisted of applying some observations on the process of disinfection in vitro induction and cultivation in *B. lako*. It was determined the disinfection Protocol and was able to get the lower percentages of pollution in greenhouse plants (0 - 5%) in comparison with the field (65-100%) the fungal contaminants which limit the establishment are: *Fusarium sp.* and *Botriotrichum sp.*, likewise the cytokinin was identified more suitable for induction of buds to *B. lako*, the percentage budding with TDZ 0.7 mg/L (100%).

Keywords: Bamboo, disinfection, cytokinins and fungi.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico y al Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, por permitirme ser un miembro más de esta casa de estudios.

Al Centro de Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS) de la universidad de Costa Rica y de manera muy especial agradezco al Dr. Víctor Jiménez y la MCs. Andrea Holst Sanjuán por su orientación, apoyo incondicional y valiosas recomendaciones para lograr el desarrollo exitoso de esta investigación, por brindarme una excelente pasantía en su institución, de igual manera a: Stefhany Campos, Paúl Solórzano, Dessirée Zerpa, Ester Vargas y Andrés Hernández, así como a los asistentes del CIGRAS, muchas gracias por su apoyo y amistad.

A los miembros del consejo particular, Dr. Alejandro Alonso, Dr. Nicolás Gutiérrez, Dra. María de Jesús Hernández y al Dr. Catalino Collado, mi más sincero agradecimiento por su ayuda y excelentes contribuciones durante la elaboración de la tesis.

A mis compañeros de generación Otoño 2013 “Híbridos”, en especial a mis amigos Jair Canela, Rosalba Loyo y Florencia García por su apoyo y amistad durante este tiempo.

DEDICATORIAS

A Dios y Santo Tomas de Aquino, por darme la sabiduría e inteligencia para poder llegar hasta este momento de mi vida.

A mi madre Aurelia Chacón, por darme la herencia más valiosa que es la preparación académica, gracias por recordarme una y otra vez que para lograr una meta o un sueño se debe trabajar para ello. Con su ejemplo y valiosos consejos hemos logrado culminar una meta más. Con amor y respeto.

A mis hermanos Jonathan y Gaby, por ser mi apoyo de siempre... porque juntos hemos hecho de cada momento recuerdos inolvidables. Los amo.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. HIPÓTESIS.....	4
4. LITERATURA CITADA.....	5
CAPITULO I. ESTADO DEL ARTE DEL CULTIVO <i>in vitro</i> DE BAMBÚ	7
RESUMEN	7
ABSTRACT.....	8
1.1 INTRODUCCIÓN	9
1.2 SELECCIÓN Y MANEJO DEL MATERIAL VEGETAL.....	11
1.3 MEDIOS DE CULTIVO MÁS UTILIZADOS.	12
1.4 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	14
1.5 MULTIPLICACIÓN DE BROTES E INDUCCIÓN DE RAÍCES.....	17
1.6 ACLIMATACIÓN.....	19
1.7 LIMITANTES.....	19
1.8 CONCLUSIONES	21
1.9 LITERATURA CITADA.....	21
CAPITULO II. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO <i>in vitro</i> Y BROTAÇÃO INICIAL DE <i>Bambusa lako</i>	26
RESUMEN	26
ABSTRACT.....	27
2.1 INTRODUCCIÓN	28
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.3 RESULTADOS Y DISCUSION.....	38
2.4 CONCLUSIONES	49
2.5 LITERATURA CITADA.....	50
CONCLUSIONES GENERALES	53

ANEXOS..... 54

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Tratamientos de desinfección de explantes de B. lako provenientes de plantas de campo utilizados en el primer experimento.	33
Cuadro 2. Tratamientos de desinfección de explantes de B. lako provenientes de plantas de campo e invernadero utilizados en el tercer experimento.....	35

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Contaminación de los segmentos nodales de *B. lako* por tratamientos de desinfección aplicados; sin surfactante (T1=testigo, T2= cloro + sonicador, T3=cloro + bomba de vacío, T4= Agri-mycin + Benomil + Sonicador, T5= Agri-mycin + Benomil + bomba de vacío, T6= Agri-mycin + Benomil + cloro+ bomba de vacío, T7= Agri-mycin + Benomil + cloro+ sonicador) y Con surfactante (T8= Testigo, T9= cloro + sonicador, T10=cloro + bomba de vacío, T11= Agri-mycin + Benomil + Sonicador, T12= Agri-mycin + Benomil + bomba de vacío, T13= Agri-mycin + Benomil + cloro+ bomba de vacío, T14= Agri-mycin + Benomil + cloro+ sonicador).39
- Figura 2.** Distribución del porcentaje de contaminación por tratamiento para explantes de *B. lako* sin enterrar. T1=Testigo, T2=Sin Vanodine® + alcohol, T3=Sin Vanodine® + sin alcohol y T4=Vanodine® + alcohol.43
- Figura 3.** Distribución del porcentaje de contaminación por tratamiento utilizando explantes de *B. lako* de plantas de campo (T1=testigo (Cepillo jabón), T2=Cepillo jabón + inmersión alcohol, T3= frotado con alcohol, T4=frotado con alcohol + inmersión alcohol) y plantas de invernadero (T5=testigo (Cepillo jabón), T6=Cepillo jabón + inmersión alcohol, T7= frotado con alcohol, T8=frotado con alcohol + inmersión alcohol).45
- Figura 4.** Distribución del porcentaje de brotación por tratamiento utilizando explantes de *B. lako* de plantas de campo (T1=testigo (Cepillo jabón), T2=Cepillo jabón + inmersión alcohol, T3= frotado con alcohol, T4=frotado con alcohol + inmersión alcohol) y plantas de invernadero (T5=testigo (Cepillo jabón), T6=Cepillo jabón + inmersión alcohol, T7= frotado con alcohol, T8=frotado con alcohol + inmersión alcohol).47
- Figura 5.** Efecto de las citocininas (BAP y TDZ) y sus diferentes concentraciones en la inducción de brotación inicial de *B. lako*. T1=testigo, T2=BAP 0.3 mg/L; T3=BAP 6.0 mg/L; T4=BAP 9.0 mg/L; T5=BAP=12.0 mg/L; T6= TDZ 0.1 mg/L; T7=TDZ 0.3 mg/L; T8=TDZ 0.5 mg/L; T9=TDZ 0.7 mg/L.48

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El aumento acelerado en la deforestación hace indispensable la búsqueda de recursos naturales alternativos, los bambúes son un recurso que puede ayudar a solucionar algunos de los problemas ambientales y sociales ocasionados por la excesiva deforestación debido a sus características biológicas: evita la erosión, es un cultivo perenne, reduce los niveles de dióxido de carbono en la atmósfera, es ligero, flexible y resistente, por lo que además se pueden emplear en la industria de muebles y materiales de construcción (Quintans, 1998; Londoño, 2000).

El creciente interés agrícola y comercial por el bambú en distintas partes del mundo ha creado la necesidad del diseño de estrategias para su cultivo, ya que en general, su aprovechamiento comercial tiene dificultades porque los métodos comunes de propagación son lentos o poco viables (John y Rajanis, 1999).

La propagación por semilla se descarta porque la mayoría de las especies de bambú tienen periodos juveniles de hasta 70 años, su floración es impredecible (Hidalgo, 1974; Ramanayake *et al.*, 2001) y su semilla recalcitrante (Muñoz *et al.*, 1998). En cuanto a la propagación vegetativa, no existen suficientes centros de producción de plántula de buena calidad y en las cantidades requeridas. (Shirin y Rana, 2007); además los métodos convencionales utilizan para su cultivo yemas, segmentos nodales, varetas y rizomas (Godbole *et al.*, 2002), que muchas veces mueren por necrosis y otros problemas (Ndiaye *et al.*, 2006).

Las diferentes metodologías de propagación *in vitro* de bambú reportadas hasta la fecha, presentan deficiencias en el proceso de desinfección que se manifiestan por altos porcentajes de contaminación y escaso número de explantes con yemas brotadas; principalmente durante los periodos con alta precipitación (Gieles y Oprins, 2002). Por ello la propagación *in vitro* del bambú sobre los otros métodos convencionales son permitir su multiplicación masiva (Koshy y Gopakumar, 2005) y reducir el periodo juvenil (Nadgauda *et al.*, 1990; Lin y Chang, 1998). Por tanto, según Judziewiez *et al.* (2008) la micropagación de brotes exilares es una alternativa factible para la producción de plantas de bambú a gran escala. Por lo anterior, es necesario desarrollar metodologías de propagación que permitan restablecer y ampliar las plantaciones que se demandan (Jiménez *et al.*, 2006; Mercedes, 2006).

Con base en lo anterior, es necesario desarrollar una metodología eficiente de propagación *in vitro* de bambú sustentada en la experimentación y en la experiencia generada sobre el tema en distintas partes del mundo. Por tal razón, en el presente trabajo se plantearon los siguientes:

2. OBJETIVOS

2.1. Sistematizar la experiencia generada sobre el cultivo *in vitro* de Bambú para determinar su “estado del arte”, y su posible utilización como base de un protocolo de propagación para *Bambusa lako*.

2.2. Desarrollar una metodología eficiente de desinfección para el establecimiento del cultivo *in vitro* y determinar el efecto de dos citoquinas en la inducción de yemas adventicias de *Bambusa lako*.

3. HIPÓTESIS

3.1 Existe información diversa sobre el cultivo *in vitro* de bambú en el mundo que puede ser sistematizada y servir como base para generar un protocolo tentativo de propagación para *B. lako*.

3.2 La combinación de medios físicos (Sonicador y bomba de vacío) con químicos (surfactante, funguicida, yodo, alcohol, Extran®) hacen más eficiente la desinfección de explantes de bambú y, el uso de citocininas inducen la formación de mayor número de yemas adventicias.

Para alcanzar estos objetivos y probar las hipótesis propuestas este documento consta de dos capítulos, en el primero se trata del estado del arte del cultivo *in vitro* del bambú y en el segundo se describen los procesos y resultados obtenidos sobre el establecimiento del cultivo aséptico, y la inducción de brotes en *B. lako*. Al final se resumen las conclusiones más importantes del trabajo.

4. LITERATURA CITADA

- Gielis, J, Oprins J. /2002/. Micropropagation of temperate and tropical woody bamboos from biotechnological dream to commercial reality. En: Bamboo for sustainable development. Proceedings of the Vth International Bamboo Congress and the Vith International Bamboo Workshop, pp. 333–344. San José, Costa Rica.
- Godbole S, Sood A, Thakur R, Sharma M, Ahuja PS. /2002/. Somatic embryogenesis and its conversion into plantlets in a multipurpose bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn.Ex Munro. Curr Sci 83: 885–889.
- Hidalgo, J. /1974/. Bambú: Su cultivo y aplicación. Estudios Técnicos Colombianos Ltda. Cali, Colombia. 315 p.
- 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.
- John, K., and N. R Rajanis./1999/. Review *in vitro*- induced flowering in bamboo. *In vitro* Cellular and Developmental Biology Plant 35: 309- 315.
- Koshy, K.C and B. Gopakumar. /2005/. An improvised vegetative propagation technique for selfincompatible bamboos. Curr. Sci.89:1474-1476.
- Lin, C. S. and W. C. Chang. 1998. Micropagation of *Bambusa edulis* though nodal explants of field- grown and flowering of regenerated plantlets. Plant Cell Rep 17: 617-620.
- Londoño, X. /2000/. La *Guadua* un gigante dormido. Sociedad Colombiana del Bambú. In: Seminario *Guadua* en la reconstrucción. Memorias. Quindio, Armenia. pp. 1-5.
- Muñoz F., M; E Guevara B. y M. Montiel L. /1998/. Regeneración *in vitro* de Bambú gigante: *Dendrocalamus giganteus* (poaceae).Revista de Biología Tropical (C.R). 46(3):11-18.
- Mercedes J., R. /2006/. Cultivo de Bambú. Guía Técnica. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. CEDAF. Santo Domingo, República Dominicana. 37 p.

Nadgauda, R. S., V. A. Parasharami and A. F. Mascarenhas. 1990. Precocious flowering and seeding behavior in tissue cultured bamboos. *Nature* 344: 335-336.

Ndiaye, A, Mamadou S, Niang D, Gassama-Dia Y. /2006/. *In vitro* regeneration of adult trees of *Bambusa vulgaris* *Biotechnology* 5(13): 1245-1248.

Quintans, K.N. /1998/. Ancient grass, future natural resource. Working paper no. 16. The national bamboo project of Costa Rica: a case study of the role of bamboo in international development. INBAR. Artstock, New Delhi, India. 58 p.

Ramanayake, S, Wanniarachchi W, Tennakoon T. /2001/. Axillary shoot proliferation and *in vitro* flowering in an adult giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro. *In vitro Cell Dev Biol-Plant* 37: 667-67.

Shirin, F. and P. K. Rana. /2007/. *In vitro* plantlet regeneration from nodal explants of field-grown culms in *Bambusa glaucescens* Willd. *Plant Biotechnol Rep* 1:141-147.

CAPITULO I. ESTADO DEL ARTE DEL CULTIVO *in vitro* DE BAMBÚ

RESUMEN

El gran valor económico aunado a la importancia ecológica y social del bambú en el mundo, ha creado la necesidad de diseñar estrategias para propagarlo de manera rápida y confiable. Aunque los problemas asociados a dicho proceso hacen del cultivo *in vitro* una buena alternativa, esta técnica también presenta muchas dificultades para propagar las diferentes especies de bambú, entre ellas la excesiva contaminación, bajas tasas de multiplicación, enraizamiento y supervivencia *ex vitro*, las cuales continúan limitando su multiplicación rápida y a gran escala. Los protocolos correspondientes a las diferentes especies de bambú en cuanto a los medios nutritivos y los reguladores de crecimiento, varían con la especie y son específicos para la parte de la planta que se esté cultivando, así como para la respuesta que se desee obtener. El objetivo de este trabajo fue abordar de manera general las principales observaciones científicas sobre el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos para la propagación *in vitro* de varias especies de bambúes.

Palabras clave: Desinfección, explante y medio de cultivo.

STATE OF THE ART OF THE CULTURE *in vitro* OF BAMBOO

ABSTRACT

Great economic value in addition to the ecological and social importance of bamboo in the world, has created the need to design strategies to propagate it fast and reliably. Although the problems associated with this process do crop *in vitro* a good alternative, this technique also presents many difficulties to spread the different species of bamboo, including excessive pollution, low rates of multiplication, rooting and survival *ex vitro*, with continue limiting its rapid and large scale multiplication. Protocols for different species of bamboo in the nutrient media and regulators of growth vary with the species and are specific to the part of the plant that is growing, as well as for the response that is desired. The objective of this work was addressing generally main scientific observations on the use of the techniques of cultivation of tissues for the propagation *in vitro* of several species of bamboos.

Keywords: Disinfection, explant and culture medium.

1.1 INTRODUCCIÓN

El bambú es una Poaceae ampliamente distribuida tanto en climas templados como tropicales. Su mayor diversidad se encuentra en Asia, principalmente en India, China y Japón. En América se conocen 21 géneros y 345 especies (Mercedes, 2006); en México hay ocho géneros y 35 especies, de las cuales 14 son endémicas (Cortés, 2000), las condiciones fisiológicas y climáticas de México son apropiadas para su propagación y producción a lo largo y ancho del país (Rzedowski, 1981; Gib, 2005; Lárraga, 2011). Tanto los bambúes “leñosos” como los herbáceos pertenecen a la subfamilia Bambusoideae; aunque los primeros son más importantes por su potencial económico alto (Quintans, 1998; Gielis y Oprins, 2002).

El bambú es una de las plantas que crece con mayor rapidez, debido a que posee un rizoma extenso que le sirve de reserva para almacenar gran cantidad de nutrimentos; puede llegar a alcanzar hasta 40 m de altura y 30 cm de diámetro, según la especie (Rao *et al.*, 1992). Se ha empleado como material de construcción para techos, paredes, pisos y estructuras; así como para la construcción de puentes por su fuerza, ligereza y alta flexibilidad (Gutiérrez, 2000). También se utiliza en utensilios de cocina, canastas, alfombras, contenedores, herramientas, escaleras, cañas de pescar; para la elaboración de papel, instrumentos musicales, botes, etc. (Quintans, 1998; Londoño, 2000; Held y Manzano, 2003).

Debido a que el bambú presenta una floración impredecible y muy espaciada en el tiempo, las técnicas convencionales muchas veces no resultan eficientes, por ello es necesaria la búsqueda de alternativas para su reproducción rápida (Ruiz, 1986; Rao *et al.*, 1990; Rao *et al.*, 1992).

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta biotecnológica que involucra diferentes técnicas para la propagación vegetativa rápida y a gran escala de especies de difícil multiplicación por otros métodos, en un medio de cultivo aséptico, nutritivo, y en condiciones controladas; permite obtener plantas uniformes, libres de microorganismos o enfermedades y, ofrece facilidades de transportación así como disponibilidad de plantas durante todo el año (Gielis y Oprins, 2002). Mediante esta técnica es posible propagar plantas leñosas como el bambú, que tiene inconvenientes para su propagación tradicional y que a la vez limita su posible explotación comercial. La propagación tradicional de bambúes se dificulta porque sus periodos juveniles son muy largos (70 años) y porque la disponibilidad de material vegetal para su multiplicación asexual convencional es escasa. Entre otros problemas se pueden citar el alto costo en mano de obra, espacio y transporte de propágulos, así como la baja eficiencia en la tasa de reproducción (Gielis y Oprins, 2002); por tanto se ha sugerido la micropropagación como una alternativa altamente viable.

El mayor reto durante el establecimiento del cultivo *in vitro* del bambú es el control de la excesiva contaminación (Hidalgo, 1978); pero también se le atribuye la baja tasa de multiplicación, de enraizamiento y de la supervivencia *ex vitro*, los cuales continúan limitando su propagación masiva (Ramanayake y Yakandawala, 1997; Bag *et al.*, 2000; Saxena y Dhawan, 2004).

Por ello, la presente revisión se desarrolló con el objetivo de sistematizar las principales observaciones científicas que existen sobre el empleo del cultivo *in vitro* de bambú, para su posible utilización como base de un protocolo de propagación para *Bambusa lako*.

1.2 SELECCIÓN Y MANEJO DEL MATERIAL VEGETAL

De acuerdo con Ruiz (1986), el principal tejido meristemático en el bambú se encuentra en las axilas de tallos en crecimiento, arriba de cada uno de los nudos y en las yemas y primordios radicales latentes. Por ello, en las técnicas de propagación *in vitro* de Bambú es recomendable partir de yemas axilares (Jiménez *et al.*, 2006).

.4 Medios de cultivo más utilizados.

Los requerimientos nutritivos y de reguladores para el desarrollo *in vitro* varían con la especie y son específicos para la parte de la planta que se esté cultivando, así como para la respuesta que se desee obtener (Ramos, 2012).

Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro* (Heller, 1953, 1954; Murashige y Skoog, 1962; Gamborg, 1968 y 1970; Schenk y hildebrandt, 1972; De Fossard, 1976). Estos medios de cultivo constan de sales, minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento.

Los diferentes trabajos coinciden en el uso del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) con las sales minerales al 50 y 100% de concentración (Giraldo y Sabogal 2007).

Autores como Jiménez *et al.*, (2006) hacen referencia a los medios de cultivo utilizando mio-inositol (100 mg L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹), vitaminas MS (0.1 mg L⁻¹) y ácido nicotínico (0.5 mg L⁻¹) y reguladores de crecimiento como auxinas o citocininas. Las auxinas más utilizadas en el establecimiento de los cultivos son: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftilacético

(ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB); en el caso de las citocininas (Roca y Mroginski, 1991) comúnmente se emplean Kinetina (KIN), Benziladenina (BAP), y zeatina (ZEA); aunque algunas ureas substituidas como thidiazuron (TDZ), también tienen actividad como citoquinina, la mayor propiedad de estas citocininas es estimular la división celular (Krikorian, 1995). Las citocininas son capaces de estimular la síntesis de ARN y proteínas (Weaver, 1982). Al parecer, en cultivo de tejidos, las citocininas actúan incrementando la rapidez de la síntesis de proteínas, algunas de las cuales podrían ser enzimas o proteínas estructurales necesarias para la mitosis (Salisbury y Ross, 1994).

Las concentraciones de reguladores varían de acuerdo con la especie, por ejemplo, en *Bambusa balcooa*, Das y Pal (2005a) combinaron kinetina (1.0 mg L⁻¹) y 6 Bencilaminopurina (6-BAP) (2.5 mg L⁻¹). De igual manera, En *Bambusa tulda*, Das y Pal (2005b) emplearon kinetina (1.0 mg L⁻¹) y 6-BAP (2.0 mg L⁻¹). Por su parte, Ramanayake et al., (2006) para *Bambusa vulgaris* var. *vittata* proponen 6-BAP (2.0 mg L⁻¹) mientras que Marulanda et al. (2005) y Jiménez et al. (2006) para *Guadua angustifolia* emplearon 6-BAP (1-3 mg L⁻¹), en tanto que Ramanayake y Yakandawala (1997) para *Dendrocalamus giganteus* combinaron 6-BAP (2.0 mg L⁻¹) y kinetina (0.1 mg L⁻¹).

1.3 MEDIOS DE CULTIVO MÁS UTILIZADOS.

Los requerimientos nutritivos y de reguladores para el desarrollo *in vitro* varían con la especie y son específicos para la parte de la planta que se esté cultivando, así como para la respuesta que se desee obtener (Ramos, 2012).

Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro* (Heller, 1953, 1954; Murashige y Skoog, 1962; Gamborg, 1968 y 1970; Schenk y Hildebrandt, 1972; De Fossard, 1976). Estos medios de cultivo constan de sales, minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento.

Los diferentes trabajos coinciden en el uso del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) con las sales minerales al 50 y 100% de concentración (Giraldo y Sabogal 2007).

Autores como Jiménez *et al.*, (2006) hacen referencia a los medios de cultivo utilizando mio-inositol (100 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}), vitaminas MS (0.1 mg L^{-1}) y ácido nicotínico (0.5 mg L^{-1}) y reguladores de crecimiento como auxinas o citocininas. Las auxinas más utilizadas en el establecimiento de los cultivos son: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftilacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB); en el caso de las citocininas (Roca y Mroginski, 1991) comúnmente se emplean Kinetina (KIN), Benziladenina (BAP), y zeatina (ZEA); aunque algunas ureas substituidas como thidiazuron (TDZ), también tienen actividad como citoquinina, la mayor propiedad de estas citocininas es estimular la división celular (Krikorian, 1995). Las citocininas son capaces de estimular la síntesis de ARN y proteínas (Weaver, 1982). Al parecer, en cultivo de tejidos, las citocininas actúan incrementando la rapidez de la síntesis de proteínas, algunas de las cuales podrían ser enzimas o proteínas estructurales necesarias para la mitosis (Salisbury y Ross, 1994).

Las concentraciones de reguladores varían de acuerdo con la especie, por ejemplo, en *Bambusa balcooa*, Das y Pal (2005a) combinaron kinetina (1.0 mg L^{-1}) y 6-Benzilaminopurina (6-BAP) (2.5

mg L⁻¹). De igual manera, En *Bambusa tulda*, Das y Pal (2005b) emplearon kinetina (1.0 mg L⁻¹) y 6-BAP (2.0 mg L⁻¹). Por su parte, Ramanayake *et al.*, (2006) para *Bambusa vulgaris* var. vittata proponen 6-BAP (2.0 mg L⁻¹) mientras que Marulanda *et al.* (2005) y Jiménez *et al.* (2006) para *Guadua angustifolia* emplearon 6-BAP (1-3 mg L⁻¹), en tanto que Ramanayake y Yakandawala (1997) para *Dendrocalamus giganteus* combinaron 6-BAP (2.0 mg L⁻¹) y kinetina (0.1 mg L⁻¹).

1.4 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Existen pocos trabajos sobre métodos de desinfección de explantes para el cultivo *in vitro* de bambú, debido a que es una técnica reciente en estas especies. Estudios realizados en *Guadua angustifolia*, con diferentes tratamientos de desinfección a base de hipoclorito de sodio (NaClO) en segmentos nodales, indican que la doble desinfección (la segunda, 24 h después de la primera) con 2% de NaClO durante 5 minutos, es la manera más adecuada para establecer *in vitro* explantes primarios de bambú (Borges *et al.*, 2004)

En *B. vulgaris*, primero se trataron las plantas madre con fungicidas y posteriormente se desinfectaron las yemas axilares con NaClO al 2% durante 20 minutos (García *et al.*, 2010). Para este mismo género, se probaron concentraciones y tiempos de inmersión en NaClO (1, 2, y 3% durante 10, 15, y 20 min); los mejores resultados se obtuvieron al 2% durante 20 min (García *et al.*, 2007). En la desinfección de segmentos nodales de *Gynerium sagittatum* con NaClO al 1.25% durante 20 minutos, se obtuvieron altos porcentajes de plantas establecidas y menores índices de contaminación (Suárez *et al.*, 2009); Ramírez (2013), encontró que el mejor tratamiento para desinfección de explantes fue el NaClO al 2% durante 15 min.

Lárraga (2011) reportó que la desinfección con 150 ml L⁻¹ NaClO comercial disminuyó significativamente la contaminación al inicio del cultivo *in vitro* de *Guadua angustifolia*, *Bambusa oldhamii* y *Bambusa vulgaris*, pero alcanzó un 81% de contaminación a los siete días, sus estudios confirman que el bambú coexiste con hongos endófitos que limitan la etapa de establecimiento *in vitro* y el desarrollo de los mismos se modifica sustancialmente con el pH del medio de cultivo y el fungicida usado para su control; sin embargo, los resultados no son concluyentes para desarrollar métodos eficientes de desinfección de explantes y control de agentes contaminantes.

Por otro lado, se han desinfectado yemas axilares con una combinación de fungicidas y bactericidas (estreptomina y oxitetraciclina (Agri-mycin®, Pfizer, Mexico; 2 g/L) en combinación con bencimidazol (Benomil® 50WP, Fulton Industrial Chemical Company, Taiwan; 2 g/L) durante 50 minutos), antes de sumergir los explantes en NaClO al 1.5% durante 10 minutos (Jiménez *et al.*, 2006). La desinfección de segmentos nodales con NaClO al 1% durante 5 minutos también ha resultado efectiva (Freire *et al.*, 2011).

Lárraga (2011) identificó como agentes contaminantes del establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia*, *Bambusa oldhamii* y *Bambusa vulgaris* a los hongos *Alternaria* sp., *Fusarium roseum* y *Fusarium solani*; de acuerdo al mismo autor los mejores productos para el control de *Alternaria* sp. fueron Azoxystrobin, Mancozeb, Sulfato Tribásico de Cobre (Cu) y Clorotalonil; para *Fusarium roseum*, Benomyl y Tiabendazol; y para *Fusarium solani* Tiabendazol, Mancozeb y Benomyl; si bien dichos fungicidas son efectivos cuando son utilizados de manera aislada contra el hongo, no presentan el mismo efecto cuando existe la interacción del hongo con el explante de bambú; como el mismo autor menciona, son hongos endófitos y este factor debe ser tomado en

cuenta durante el establecimiento del cultivo *in vitro* de bambú. Acosta-Suárez *et al.*, (2009) señalan que en las especies leñosas, sus características anatómicas dificultan la desinfección, por lo que se incrementan los porcentajes de contaminación. Lárraga (2011) menciona que la aplicación de fungicidas desde la preparación de las plantas madre, en la desinfección y como parte del medio de cultivo, es una opción para solucionar el problema de la contaminación fúngica en el establecimiento *in vitro* del bambú.

Autores como Jiménez *et al.* (2006) y Yasodha *et al.* (2007) en sus metodologías desarrolladas para propagar especies de bambúes como *G. angustifolia* y *B. nutans*, resaltan la importancia del establecimiento de un banco de plantas donantes en condiciones de invernadero y la aplicación sistemática de fungicidas comerciales, con el fin de disminuir los porcentajes de contaminación microbiana en la fase de establecimiento. Mroginski *et al.* (2004) también proponen que las plantas donadoras de explantes se cultiven preferentemente en invernadero y se traten con productos químicos que eliminen a los patógenos, de modo que disminuya la posibilidad de que el explante sea la principal fuente de inóculo.

En gran medida, la respuesta está relacionada con el tipo de explante, época del año y las atenciones fitosanitarias realizadas al banco de plantas donantes; en períodos de escasa precipitación los porcentajes de contaminantes microbianos visibles se reducen y se incrementa el número de explantes con yemas brotadas (Gieles y Oprins, 2002).

García-Ramírez *et al.* (2010) estudiaron la influencia de la época del año en el establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* y señalaron que de enero a abril y de noviembre a

diciembre es el mejor período para el establecimiento *in vitro* de dicha especie obteniendo el 99% de yemas brotadas y el 98% de explantes libres de contaminantes microbianos visibles, ya que en estos meses del año se presenta menor precipitación y humedad relativa.

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

1.5 MULTIPLICACIÓN DE BROTES E INDUCCIÓN DE RAÍCES

La embriogénesis somática y la organogénesis constituyen los dos métodos más empleados para el cultivo *in vitro* de bambú (Lin *et al.*, 2004; Arshad *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2006; Ramanayake *et al.*, 2006); Giraldo y Sabogal (2007), en *Guadua angustifolia* cultivada *in vitro*, observaron diferenciación celular de los 33 a los 50 días. Otros trabajos se enfocan a la brotación múltiple, al efecto de reguladores del crecimiento e inducción de floración y formación de callo (Santos, 2009).

El proceso de inducción de raíz o enraizamiento es considerada la etapa previa a la climatización, es por ello que diversos estudios se han enfocado en dicho proceso. En este sentido, autores como Bag (2001), Sood *et al.*, (2002) y Arshad *et al.*, (2005) con diferentes concentraciones de AIB lograron el enraizamiento *in vitro* en varias especies de bambúes.

Ramírez *et al.*, (2009), evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP (1.0, 3.0 y 6.0 mg L⁻¹) y ANA (0, 0.5, 1.0 mg L⁻¹) en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*, así mismo, demostraron que es posible multiplicar *Bambusa vulgaris var. vulgaris* en medio de cultivo líquido con BAP y que la combinación de BAP y ANA no fue efectiva para este propósito. Los mismos autores demostraron que tanto el AIB como el TDZ influyeron en el enraizamiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris var vulgaris*. Al adicionar al medio de cultivo TDZ (0.6 mg.L⁻¹) se obtuvieron los mayores porcentajes de formación de raíces (88.2%), las cuales tuvieron geotropismo positivo.

El TDZ a pesar de ser una citoquinina del grupo de las fenilureas, también ha sido empleada en los medios de cultivo para el enraizamiento *in vitro* en *Bambusa atra*, *Dendrocalamus giganteus* y *Dendrocalamus hookeri*, incrementando los porcentajes de enraizamientos en estas especies (Ramanayake *et al.*, 2006; García *et al.*, 2012). Ramanayake *et al.*, (2008) alcanzaron entre 88.9% y 96.7% de enraizamiento en *Bambusa atra*, *Dendrocalamus giganteus* y *Dendrocalamus hookeri* cuando emplearon TDZ como regulador del crecimiento en la primera fase del enraizamiento. De manera general, el empleo de TDZ en la primera etapa, previa al uso de AIB (15 mg L⁻¹) en la segunda etapa, durante el enraizamiento *in vitro* de especies de bambúes ha tenido un efecto positivo para la inducción y emisión de raíces.

Murch y Saxena (2001) destacan la capacidad del TDZ para estimular el movimiento de las auxinas en los tejidos de la planta, para la emisión de raíces *in vitro* en *Bambusa vulgaris var. vulgaris*. Ramanayake *et al.* (2006), obtuvieron 95.0% de enraizamiento *in vitro* cuando emplearon TDZ como regulador del crecimiento en *Bambusa vulgaris var vittata*.

1.6 ACLIMATACIÓN

La etapa de climatización es crítica pues las plantas *in vitro* sufren un cambio brusco del ambiente *in vitro* al *ex vitro*. Las plantas *in vitro* cultivadas en frascos de cultivo, expuestas a un medio de cultivo seleccionado para proveerles condiciones en la multiplicación vegetal y mínimas condiciones de estrés, inducen a la planta *in vitro* a una estructura y fisiología poco desarrolladas. Entre otros aspectos, sus raíces son muy vulnerables al daño físico, la tasa de fotosíntesis es muy baja y su aparato estomático es poco funcional, de cambios en el tamaño, la forma y la densidad de los estomas, con bajos niveles de luz, condiciones asépticas, abundantes azúcares y nutrientes, logran un crecimiento heterotrófico o mixotrófico en una atmósfera con altos niveles de humedad (Nava 2008; Bazaldú-Muñoz *et al.*, 2008).

1.7 LIMITANTES

Las bajas tasas de multiplicación constituyen una de las principales limitantes para la multiplicación *in vitro* de bambúes, lo cual puede estar relacionado con el manejo del explante, los reguladores de crecimiento y el estado físico del medio de cultivo (Saxena, 1990).

El estado físico del medio de cultivo es un factor determinante para la multiplicación *in vitro* de bambúes. Nadgauda *et al.* (1997), hace referencia a la baja proliferación de plantas *in vitro* de *B. arundinacea* en el medio de cultivo semisólido y le atribuyeron como causas, la presencia de fenoles que se acumulan en la base de las plantas; 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.

Autores como Bag *et al.* (2000) Señalaron que el empleo de medio de cultivo en estado líquido brinda la posibilidad a las plantas de absorber los nutrientes del medio con mayor facilidad e incrementar los coeficientes de multiplicación en un gran número de especies de bambúes en comparación con el medio de cultivo semisólido que limita la absorción de los nutrientes a la superficie basal del explante. Sin embargo, diversos autores utilizan el medio semisólido con buenos resultados (García-Ramírez *et al.*, 2010; Muranda *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2006; Bagn *et al.*, 2001).

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

Otra limitante durante la cultivo *in vitro* de Bambú es la oxidación. Hernández y González (2010), encontraron que este problema en plantas leñosas, puede ser controlado por los niveles de irradiación recibidos por las plantas madre, debido a que la actividad de muchos sistemas enzimáticos que participan en la síntesis y oxidación de los fenoles, es inducida por la luz; otro factor que con lleva a la oxidación es la desinfección del material vegetal, por lo que compuestos oxidantes como el cloro puede aumentar este proceso (Sengbusch, 2001); con el fin de contrarrestar los efectos perjudiciales de la oxidación es común el empleo de varios compuestos

químicos, por mencionar algunos se encuentra el carbón activado, PVP, ácido ascórbico y ácido cítrico y cisteína-HCl (Hurtado y Merino 1994).

1.8 CONCLUSIONES

Si bien las condiciones para lograr un protocolo eficiente del cultivo *in vitro* para cualquier especie vegetal están dadas por sus requerimientos específicos, en general se pueden observar para las especies de bambú, ciertos pasos en común en los diferentes protocolos mencionados en la literatura. De acuerdo a la revisión realizada estos serían de forma general: el uso de la yema axilar como explante, preferentemente de plantas de invernadero, eficientiza en gran medida con el hipoclorito de sodio durante la desinfección, medio semisólido con MS y aplicación de hormonas de crecimiento como BAP, ANA, AIA, etc., para inducir brotación en cuanto AIB, y TDZ son hormonas más utilizadas para enraizamiento. Para las condiciones *ex vitro* aún se deben profundizar la investigación al respecto, teniendo en cuenta que para llegar a esta etapa se debe tener un protocolo establecido. Se sugiere la utilización sistematizada de estos pasos para probar si mediante ellos se generar un protocolo viable de cultivo *in vitro* en las especies de bambú, con potencial económico, ecológico y social.

1.9 LITERATURA CITADA

- Acosta-Suárez, M.; Alvarado-Capó, Y.; Cruz-Martín, M.; Leiva-Mora, M.; Sánchez-García, C.; Berkis Roque, E., Maité-Chavez, Q.; Jiménez-Terry, F.; Mariana la O.; Barbón, R.; Collado, R.; Mayelín-Rodríguez, M.; De Feria, Borroto, I. y Pérez, M. 2009. Microbiota de plantas donadoras y hongos filamentosos contaminantes del establecimiento *in vitro* de cinco especies forestales. *Biología Vegetal*. 9:99-103.
- Arshad, S.; Kumar A. y Bhatnagar S. 2005. Micropropagation of *Bambusa wamin* through proliferation of mature nodal explants. *J. Biol. Res.* 3: 59-66.

- Arya, I.; Satsangi R. y Arya S. 2001. Rapid micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus asper*. J. Sus. For. 14: 103–114.
- Bag, N.; Chandra S.; Palni L. y Nandi S. 2000. Micropropagation of Dev-ringal [*Thamnocalamus spathiflorus* (Trin.) Munro] – a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. Plant Sci. 156: 125–135.
- Bag, N. 2001. Mass propagation of tea, maggar bamboo and devringal. Ph. D Thesis, FfNB Garhwal University.
- Bazaldú-Muñoz, C, Ventura-Zapata V, Salcedo-Morales G, Maldonado U, López A (2008) Densidad estomatal y potencial hídrico en plantas de tomate (*Physalis ixocarpa* Brot.), Propagadas por cultivo de meristemos. Revista Chapingo Serie Horticultura 14(2): 147-150.
- Borges, M.; Ros C.; Castellanos Y.; Silvio M. y Velásquez, R. 2004. Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. Biotecnología vegetal Vol. 4 N° 4: 237-242. Cuba.
- Das, M. y Pal, A. 2005a. *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. Plant Cell Tissue Organ Cult. 81:109–112.
- Das, M. y Pal, A. 2005b. *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 81: 109–112.
- De Fossard. 1976. Tissue culture for plant propagators. University of New England, New England. 408 p.
- Cortés, R. G. R. 2000. Los bambúes nativos de México. CONABIO. Biodiversidad. 30: 12-15.
- Freire, M.; García Y.; Hurtado, O.; León, M.; Fajardo, L.; Cruz, M.; Sánchez, C.; Alvarado, Y.; Acosta, M.; Tejada, M.; Roque, B. y Leiva, M. 2011. Combinación de técnicas biotecnológicas y tradicionales para la propagación de diferentes especies de bambú. Biotecnología vegetal Vol. 11, N° 3:163 -168. Cuba.
- García-Ramírez, Y.; Freire, M.; Fajardo, L.; Tejada, M. y Reyes, M. 2007. Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var. vittata. Biotecnología vegetal. 7(3):153-158.
- García-Ramírez, Y.; Freire-Seijo, M.; Pérez, B. y 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):13-119.
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima O. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. EXP. CELL RES. 50: 151-158.

- Gielis, J. y Oprins, J. 2002. Micropropagation of temperate and tropical woody bamboos from biotechnological dream to commercial reality. En: Bamboo for sustainable development. Proceedings of the Vth International Bamboo Congress and the VIth International Bamboo Workshop, pp. 333–344. San José, Costa Rica.
- Giraldo, H. E. y Sabogal, A. 2007. Una alternativa sostenible: la Guadua técnicas de cultivo y manejo. Corporación Autónoma del Quindío C.R.Q. Tercera edición e impreso en Colombia pp: 1-192.
- García-Águila, L.; Alvarado, Y.; Kosky, R.G.; Sarría, Z.; Chong-Pérez, B.; Reyes, M.; Pérez, B.; Concepción, A. y Mollineda, A. 2012. Análisis del contenido de nutrientes minerales durante la formación y maduración de embriones somáticos de FHIA-21 (*Musa AAAB*). Biotecnología Vegetal. 12: 33-39.
- Gutiérrez, J. A. 2000. Structural adequacy of traditional bamboo housing in Latin America. Technical report no. 19. International Network for Bamboo and Rattan (INBAR). 112 p.
- Gib, C. 2005. El Bambú: Su importancia en la ecología y la conservación de las especies nativas. Primer congreso mexicano del bambú 8, 9 y 10 de diciembre del 2005. Xalapa de Enríquez, Veracruz de Ignacio de la Llave México. 112p.
- Hernández, Y. y González, M. 2010. Efectos de la contaminación bacteriana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. Cultivos Tropicales. Volumen 31, N°4. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana. Cuba.
- Hidalgo, D. 1978. Nuevas técnicas de construcción con bambú. Estudios técnicos colombianos LTDA. Centro De Investigación Del Bambú, “CIBAM”, Facultad de artes. Universidad Nacional. Bogotá Colombia, pp: 1-137.
- Hurtado, D. y Merino, M. 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México, DF, México. 232 p.
- Held, C. y Manzano, I. D. 2003. El sector productivo y el mercado regional de la Guadua en el Eje Cafetero Colombiano. Informe del proyecto Guadua-bambú de la Unión Europea no: ICA4-CT-2001-10091. INBAR. Color Max Publishers. 61 p.
- Heller, R. 1953: Reserches sur la nutrition minerale des tissues vegetaux cultives ‘in vitro’. Annales des Sciences Naturelles (Botanique) Biologie Vegetale, 14: 1-223.
- Jiménez, V.M.; Castillo, J.; Tavares, E.; Guevara, E. y 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.
- Lárraga, N.; Gutiérrez, R.; López, H.; Pedraza, M.; Vargas, H.; Santos, G. y Santos, U. 2011. Propagación vegetativa de tres especies de Bambú. Ra Ximhai/Vol. 7, Numero 2. Universidad Autónoma Indígena de México. Mochicahui. El Fuerte, Sinaloa.pp.205-218.

- Lin, C.; Lin, C.C. y Chang, W. 2004. Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and owering of bamboo *Bambusa edulis*. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 76: 75–82.
- Londoño, X. 2000. La Guadua un gigante dormido. Sociedad Colombiana del Bambú. In: Seminario Guadua en la reconstrucción. Memorias. Quindío, Armenia. pp. 1-5.
- Marulanda, M.; Gutiérrez L.G. y Márquez, M. 2005. Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunt. *Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal.* 27(82): 5-15.
- Mroginski, L.; Sansberro, P. y Flaschland, E. 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Parte V. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. En: Echenique, V, Rubinsten C y Mroginski L (Eds). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*, pp. 35-42: Editorial INTA. Buenos Aires.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murch S. y Saxena, P. 2001. Molecular fate of thidiazuron and its effect on auxin transport in hypocotyl tissues of *Pelargonium x hortorum* Bailey. *Plant Growth Regul.* 35: 269-275.
- Marulanda, M.; Gutiérrez, L.; Uribe, M. y Márquez, M. 2005. Micropropagación de *Guadua angustifolia*. *Biotecnología vegetal.* Vol. 6 N° 2. VII Simposio Internacional Disponible:http://revista.ibp.co.cu/component/docman/doc_download/192-b [Acceso: Junio 7, 2010].
- Mercedes, J.R. 2006. Cultivo de Bambú. Guía Técnica. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. CEDAF. Santo Domingo, República Dominicana. 37 p.
- Nava, J (2008) Propagación *in vitro* y establecimiento en invernadero de las orquídeas *Trichocentrum arthagenense* (jacq.) Sw. y *Laelia eyermaniana* rchb. F., para su conservación y potencial aprovechamiento sustentable. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec, Morelos, México.
- Nadgauda, R, John C, Parasharami V, Joshi M, Mascarenhas A (1997) A comparison of *in vitro* with *in vivo* owering in bamboo: *Bambusa arundinacea*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 48:181-188
- Quintans, K. N. 1998. Ancient grass, future natural resource. Working paper no. 16. The national bamboo project of Costa Rica: a case study of the role of bamboo in international development. INBAR. Artstock, New Delhi, India. 58 p.
- Ramanayake, S. y Yakandawala, K. 1997. Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. *Plant Sci.* 129: 213–223.
- Ramanayake, S.; Maddegada, k.; Vitharana, M. y Chaturani, G. 2008. Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities. *Scientia Horticulturae.* 118:2702-73.

- Ramírez, L.; Castaño, S. y López, R. 2009. Identificación de bacterias que afectan el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Guadua angustifolia Kunth*. Revista Investigaciones. Universidad del Quindío N° 19: 151-158 p.
- Rao, I.U; Yusoff, A.; Rao, A. y Sastry, G. 1990. Current status of bamboo cultivation: the necessity for tissue culture based mass propagation. Propagation of bamboo and rattan through tissue culture. IDRC, Bamboo and Rattan Research Network. Tanglia, Singapore. 60 p.
- Rao, I. V. R; Rao, I.U. y Roohi, F., N. 1992. Bamboo propagation through conventional and *in vitro* techniques. In: Rapid propagation of fast-growing wood species (Baker, F.W.G). CAB International Wallingford, Oxfordshire, UK. 1250 p.
- Roca, W. y Mroginski, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro internacional de agricultura tropical. Cali, Colombia.
- Ruiz, A.I. 1986. Efecto de la edad y selección del culmo en la propagación asexual de la *Guadua (Bambusa guadua)* y su respuesta a la cobertura con *Pennisetum purpureum* var. King Grass. Universidad de Costa Rica. Tesis de Licenciatura. Costa Rica. 54 p.
- Salisbury, F. y C. Ross, 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica S.A., México DF. 759 p.
- Santos, G. y Santos, U. I. 2009. Identificación y control químico de hongos contaminantes de cultivo in vitro de Bambú (*Guadua angustifolia*, *Bambusa oldhamii* y *Bambusa vulgaris*). Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo.
- Saxena, S. y Dhawan V. /2004/. Commercialization of bamboo tissue culture: potentials and constraints. En: Singh, H P, Dadlani, NK (Eds.), Abstracts, VIIth World Bamboo Congress. VI Ith World Bamboo Congress, New Delhi, India.
- Saxena, S. 1990. In vitro propagation of bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. Plant Cell Rep. 9:431-434.
- Sengbusch, P. 2001. Phenolic Compounds. Botany on line (http://www.rrz.uni-hamburg.de/biologie/b_online/e20/20d.htm). Consultada 20 de enero de 2015.
- Sood A.; Ahuja, P.; Sharma, O. y Godbole, S. 2002. *In vitro* protocols and field performance of elites of an important bamboo *Dendrocalmus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 71: 55-63.
- Suárez, I.; Araméndiz, H. y Pastrana, I. 2009. Micropropagación de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 62 (2): 5135-5143.
- Schenk, R.U.; Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot 50:199-204.

- Ramírez, L. 2013. Evaluación de tratamientos de desinfección en segmentos nodales de *Guadua angustifolia* para el establecimiento del cultivo *in vitro*. BOGOTÁ, D.C. 2013. Tesis. Especialista en Biotecnología Agraria.
- Ramos J. E., Avances de la Micro propagación *in vitro* de plantas leñosas. 2012. Tesis. Especialización en Biotecnología Agraria Universidad Nacional abierta y a distancia (UNAD). Bogotá.
- Rzedowski, J. 1981. Vegetación de México. Editorial Limusa. México. 432p.
- Yasodha, R.; Kamala, S.; Kumar, A.; Kumar, D. y Kalaiarasi, K. 2007. Effect of glucose on *in vitro* rooting of mature plants of *Bambusa nutans*. *Scientia Horticulturae*. 116: 113-116.

CAPÍTULO II. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *in vitro* Y BROTAÇÃO INICIAL DE *Bambusa lako*

RESUMEN

El gran interés comercial que existe por el bambú ha creado la necesidad de diseñar estrategias para su cultivo a gran escala, los problemas asociados a la propagación de bambú hacen del cultivo *in vitro* una alternativa con alto potencial. Por ende la presente investigación consistió en determinar una metodología de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Bambusa lako* así como evaluar el efecto de las citocininas 6-bencilaminopurina (BAP) y tiazuron (TDZ) en la inducción de brotes. Se manejaron cuatro experimentos, tres de desinfección y uno de brotación: en el primero y segundo se utilizaron plantas de *B. lako* provenientes de campo y consistió en probar 14 tratamientos para el primero (con la combinación de surfactante, sonicador y bomba de vacío) y cuatro para el segundo (Extrán®, Agri-mycin®, Benomil®, NaOCl, tween, y alcohol), el tercer experimento consistió en ocho tratamientos utilizando explantes de *B. lako* de plantas de invernadero y campo; el cuarto experimento se realizó para inducir brotación, con plantas de campo y se probaron concentraciones de BAP (3.0, 6.0, 9.0 y 12.0 mg L⁻¹) y TDZ (0.1, 0.3, 0.5 y 0.7 mg L⁻¹). Los experimentos se condujeron bajo un diseño experimental completamente al azar, con 20 repeticiones. Se evaluó el porcentaje de contaminación y de brotación. A los datos de las últimas mediciones de cada experimento se les realizó la prueba de Chi-cuadrada, con el software estadístico InfoStat /Profesional, versión 1.1, 2014. Los menores porcentajes de contaminación se observaron en los explantes provenientes de plantas de invernadero (0-5%) en comparación con las de campo (65-100%). El mayor porcentaje de brotación (100%) se obtuvo con TDZ (0.7 mg L⁻¹).

Palabras clave: Bambú, Citocininas, Inducción y Metodología de desinfección.

ESTABLISHMENT OF THE CULTURE *in vitro* AND INITIAL SPROUTING OF

Bambusa lako

ABSTRACT

The great commercial interest that exists by the bamboo has created the need to design strategies for its cultivation on a large scale, the problems associated with the propagation of bamboo do crop *in vitro* an alternative with high potential. Therefore this research consisted of determining a methodology for establishing disinfection *in vitro* of *Bambusa lako* as well as assesses the effect of cytokinins 6-benzylaminopurine (BAP) and thidiazuron (TDZ) in the induction of adventitious buds. Were handled four experiments, three of disinfection and one bud: plants were used in the first and second of *B. lako* from field and was test 14 treatments for the first (with the combination of surfactant, sonicator and vacuum pump) and four for the second (Extran ®, Agri - mycin ®, benomyl ®, NaOCl, tween, and alcohol), the third experiment consisted of eight treatments using explants of *B. lako* of plants in greenhouse and field; the fourth experiment was conducted for induce sprouting with field plants and BAP concentrations tested (3.0, 6.0, 9.0 and 12.0 mg L⁻¹) and TDZ (0.1, 0.3, 0.5, and 0.7 mg L⁻¹). Experiments were conducted under an experimental design completely at random, with 20 repetitions. The pollution and sprouting percentage were evaluated. Data from the latest measurements of each experiment was performed the Chi-square test, with the software professional statistician InfoStat, version 1.1, 2014. The lower percentages of pollution were observed in the explants from greenhouse plants (0 - 5%) in comparison with the field (65-100%). The highest percentage of buds (100%) was obtained with TDZ (0.7 mg L⁻¹).

Keywords: Bamboo, cytokinins, induction and disinfection methodology.

2.1 INTRODUCCIÓN

El bambú se clasifica dentro de la familia de las Poaceae subfamilia de los bambúes (Bambusoide); que dentro de las gramíneas es una de las más numerosas y diversas; se han registrado alrededor de 90 géneros y 1500 especies de bambú a nivel mundial (Wang *et al.*, 2008); son originarios de Asia pero tienen una amplia distribución en el mundo desde el continente de origen hasta el Americano (Li, 2006). El género *Bambusa* representa uno de los más grandes recursos naturales renovables, por sus excelentes propiedades físico mecánicas, su resistencia al ataque de insectos, su belleza y por la diversidad de aplicaciones que se le dan; representa una valiosa alternativa económica (García *et al.*, 2011). Desde el punto de vista medio ambiental, evita la erosión y contribuye a eliminar las cárcavas que se forman en los cauces de los ríos a causa del mal uso de los suelos y la deforestación y como fijador de dióxido de carbono (Londoño *et al.*, 2002).

Una de las especies del género de gran interés económico es *Bambusa lako* que es originaria de la isla de Timor en Indonesia por lo que también se le conoce como *Timor black*. Según Roxas (2012), la *B. lako* tiene 5-15 m de altura y 2-8 cm de diámetro, con puntas ligeramente colgantes, los entrenudos son de 9-35 cm de largo, tienen un espesor de pared de 0.04- 0.12 mm, color verde con rayas amarillentas cuando son jóvenes y se vuelven de color púrpura a negro a medida que maduran.

Fue introducida en Australia en 1970 como planta ornamental. También se ha propagado y plantado en diferentes jardines en Filipinas (Roxas, 2012). En México se ha propagado principalmente en Yucatán, Campeche y Veracruz, aunque no debe descartarse su presencia en

otros estados de la república principalmente con climas calientes; se cultiva como una especie ornamental (Bambumex, 2013).

Como todas las especies de bambú, la *B. lako* tiene algunos usos significativos, las cañas se utilizan para elaboración de muebles y acabados de casas, es una especie ornamental de gran valor económico, por su belleza y estética (Roxas, 2012).

La explotación de este recurso se ve limitado por los lentos métodos tradicionales de propagación que presentan en general muchas de las especies de bambú, como lo son la propagación sexual o por semilla, y la propagación vegetativa (John y Rajanis, 1999).

Una alternativa para la propagación del bambú, es el cultivo *in vitro*, una técnica en donde un explante, es decir, una parte separada del vegetal, ya sea un protoplastos, células, tejidos u órganos se cultivan en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Mroginski *et al.*, 2010). La aplicación de esta técnica permite la propagación vegetativa rápida y a gran escala, uniformidad del material obtenido, multiplicación de plantas recalcitrantes a las técnicas convencionales, y facilidades para el intercambio internacional de material vegetal (Salazar, 2010).

La propagación del genero *Bambusa* mediante cultivo *in vitro* se han reportado principalmente las siguientes especies: *B. vulgaris* (Ramanayake y Yakandawala, 1997; Koshy, 2000; Catasús, 2003; Rajneesh y Hyamal, 2009; García, 2007; García-Ramírez *et al.* 2010), *B. odhamii* (Lárraga, 2011). En cuanto a *B. lako* no existen reportes de propagación mediante esta técnica. Como primer paso

para desarrollar una metodología para su propagación *in vitro*, se debe dar respuesta a la problemática de la desinfección en la fase de establecimiento del cultivo aséptico y la determinación de los reguladores de crecimiento. El objetivo fue determinar una metodología de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Bambusa lako* así como evaluar el efecto de las citocininas BAP y TDZ en la inducción de yemas adventicias en el cultivo *in vitro* de *Bambusa lako*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, en el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), ubicado en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica, San Pedro, Montes de Oca.

Origen del material vegetativo

El material vegetativo de bambú (*B. lako*), se obtuvo de dos lugares: plantas cultivadas en el Valle del Guarco (Cartago, Costa Rica), y plantas provenientes de Pérez Zeledón (San José, Costa Rica) las cuales se sembraron en el invernadero del CIGRAS.

Establecimiento del cultivo

1. Desinfección

Las plantas sembradas bajo condiciones de invernadero fueron tratadas con Agri-mycin®, Pfizer, Mexico; 2 g/L) en combinación con bencimidazol (Benomil® 50WP, Fulton Industrial Chemical Company, Taiwan; 2 g/L) una vez por semana, durante 16 semanas, las plantas provenientes de campo no tuvieron ningún tratamiento previo.

Se colectaron segmentos de un solo nudo de aproximadamente 3.0 mm de diámetro y 25-35 mm de longitud de las ramas laterales de *B. lako*, de las plantas de campo y de invernadero, a las cuales se les removió cuidadosamente la vaina de la hoja.

La desinfección base fue tomada de la metodología propuesta por Jiménez *et al.* (2006), descrita a continuación: inmersión en Extrán® (Merck, Darmstadt, Alemania; 0.1%) durante 10 minutos. Inmersión en estreptomicina y oxitetraciclina (Agri-mycin®, Pfizer, Mexico; 2 g L⁻¹) en combinación con bencimidazol (Benomil® 50WP, Fulton Industrial Chemical Company, Taiwan; 2 g L⁻¹) durante 50 min. Se continuó con el hipoclorito de sodio (NaOCl 1,8%) durante 15 min, suplementado con dos gotas de Tween 80 Sigma® por cada 100 ml. Por último, los explantes se lavaron con agua destilada estéril 3-5 veces en cámara de flujo laminar. Se cortaron los extremos de los explantes para eliminar el segmento dañado luego de la desinfección y se colocaron verticalmente con la porción inferior de la yema inmersa en el medio de cultivo.

El medio basal fue el de Murashige y Skoog (1962), suplementado con tiamina-HCl (0.1 mg L^{-1}), piridoxina-HCl (0.5 mg L^{-1}), ácido nicotínico (0.5 mg L^{-1}), glicina (2 mg L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}), PPM® (Plant Cell Technology, Washington DC, USA; 2 ml L^{-1}) y sacarosa (3% p/v).

El pH se ajustó a 5.8 con hidróxido potasio (KOH), y el medio se gelificó con Phytigel® (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos; 2 g L^{-1}), se vertió en tubos de ensayo de 25 x 150 mm, cerrados con tapas plásticas Magenta® y se esterilizó a 1.05 kg/cm^2 durante 20 min.

La técnica de cultivo de tejidos de bambú representa el mayor reto, en cuanto a la excesiva contaminación durante el establecimiento del cultivo aséptico (Hidalgo, 1978). Por ende se realizaron tres experimentos con el fin de ir modificando el protocolo de desinfección hasta lograr el menor porcentaje de contaminación en los tratamientos.

En el primer experimento se probaron 14 tratamientos en explantes provenientes de plantas de campo (Cuadro 1), en un diseño experimental completamente al azar con 20 repeticiones.

Cuadro 1. Tratamientos de desinfección de explantes de *B. lako* provenientes de plantas de campo utilizados en el primer experimento.

Tratamientos		Agri mycin + Benomil		NaOCl	
		Sonicador	Bomba	Sonicador	Bomba
Con surfactante	T1	-	-	-	-
	T2	X	-	-	-
	T3	-	X	-	-
	T4	-	-	X	-
	T5	-	-	-	X
	T6	X	-	X	-
	T7	-	X	-	X
Sin surfactante	T8	-	-	-	-
	T9	X	-	-	-
	T10	-	X	-	-
	T11	-	-	X	-
	T12	-	-	-	X
	T13	X	-	X	-
	T14	-	X	-	X

Se utilizó el protocolo de desinfección ya descrito, con la utilización de un surfactante (Cosmo-In® 27 SL, Cosmoagro S.A, Colombia; 1 ml/L) antes del Agri-mycin y Benomil y además se utilizó bomba de vacío durante 2 minutos o sonicador durante 5 minutos, según el tratamiento correspondiente. Después de la desinfección, los tubos con los explantes se colocaron en

condiciones de oscuridad hasta alcanzar el mayor porcentaje de explantes contaminados (40 días), a 24°C.

En el segundo experimento, se utilizaron explantes de *B. lako* de plantas provenientes de campo y se llevó a cabo la desinfección base descrita al inicio, con diversas modificaciones que generaron los tratamientos siguientes:

- T1: (Testigo): Extrán®, Agri-mycin® + Benomil®, y NaOCl + tween 80.
- T2: Extrán®, Agri-mycin® + Benomil®, inmersión en alcohol al 70% durante 30 segundos y NaOCl + tween 80.
- T3: Extrán®, inmersión en yodo (Vanodine®, Evans Vanodine International PLC, Inglaterra; 3ml/L) durante 10 minutos, (Agri-mycin® + Benomil® y NaOCl + tween 80.
- T4: Extrán®, inmersión en yodo (Vanodine®, Evans Vanodine International PLC, Inglaterra; 3ml/L) durante 10 minutos, (Agri-mycin® + Benomil®, inmersión en alcohol al 70% durante 30 segundos y NaOCl + tween 80.

Se utilizaron 20 repeticiones por tratamiento. Los tubos con los explantes se colocaron en condiciones de oscuridad en un periodo de 14 días, a 24°C.

El tercer experimento consistió en probar ocho tratamientos utilizando explantes provenientes de plantas en invernadero y campo (cuadro 2). Se siguió el mismo protocolo base descrito al inicio pero realizando además un paso de inmersión en alcohol (70%) por 2 minutos antes del NaOCl; y con las siguientes modificaciones:

Cuadro 2. Tratamientos de desinfección de explantes de *B. lako* provenientes de plantas de campo e invernadero utilizados en el tercer experimento.

Tratamientos		Limpieza inicial		Inmersión en alcohol	
		Cepillo y jabón	Frotado con alcohol	CON	SIN
P. Invernadero	T1	X	-	-	X
	T2	X	-	X	-
	T3	-	X	-	X
	T4	-	X	X	-
P. Campo	T5	X	-	-	X
	T6	X	-	X	-
	T7	-	X	-	X
	T8	-	X	X	-

Se utilizaron 20 repeticiones por tratamiento. Los tubos con los explantes se colocaron en condiciones de oscuridad durante 12 días, a 24°C.

Identificación fúngica del cultivo

Se enviaron dos muestras de hongos presentes en el cultivo *in vitro* de *B. lako*, estos fueron identificados en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Costa Rica.

Variables evaluadas y análisis estadístico

Se evaluó el porcentaje (%) de explantes contaminados cada cuatro días por 41 días para el primer experimento, para el segundo a los 4, 8, 12 y 16 días después de la introducción, además del porcentaje brotación y para el tercer experimento cada 4 días por 12 días después de la introducción. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 20 repeticiones. Los datos se analizaron mediante una prueba de Chi- cuadrada con el software estadístico InfoStat /Profesional, versión 1.1, 2014

2. Brotación inicial

Para inducir brotación, se ocuparon explantes de las plantas sembradas bajo condiciones de invernadero, las cuales fueron tratadas con Agri-mycin®, Pfizer, Mexico; 2 g/L) en combinación con bencimidazol (Benomil® 50WP, Fulton Industrial Chemical Company, Taiwan; 2 g/L) una vez por semana, durante 16 semanas.

Se colectaron segmentos de un solo nudo de aproximadamente 3,0 mm de diámetro y 25-35 mm de longitud de las ramas laterales de *B. lako*, a cuales se les removió cuidadosamente la vaina de la hoja. La desinfección fue tomada de la metodología propuesta por Jiménez *et al.* (2006), con las siguientes modificaciones: frotos de alcohol (70%) antes del NaOCl.

Una vez realizado el proceso de desinfección, en cámara de flujo laminar, se recortaron los extremos de cada explante y se colocaron verticalmente en el medio de cultivo. El medio basal fue

el de Murashige y Skoog (1962), suplementado con tiamina-HCl (0,1 mg L⁻¹), piridoxina-HCl (0,5 mg L⁻¹), ácido nicotínico (0,5 mg L⁻¹), glicina (2 mg L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹), PPM® (Plant Cell Technology, Washington DC, USA; 2 ml L⁻¹) y sacarosa (3% p/v). El pH se ajustó a 5,8 con hidróxido potasio (KOH), y el medio se gelificó con Phytigel® (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos; 2 g L⁻¹), se vertió en tubos de ensayo de 25 x 150 mm, cerrados con tapas plásticas Magenta® y se esterilizó a 1,05 kg/cm² durante 20 min.

Los tratamientos resultaron de una combinación del medio base suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP) o thidiazuron (TDZ): T1 (testigo) medio base sin citoquina, T2 BAP 3 mg L⁻¹, T3 BAP 6 mg L⁻¹, T4 6-BAP 9 mg L⁻¹, T5 6-BAP 12 mg L⁻¹, T6 TDZ 0.1 mg L⁻¹, T7 0.3 mg L⁻¹, T8 0.5 mg L⁻¹, T9 0.7 mg L⁻¹. Un total de 9 tratamientos con 20 repeticiones cada uno.

Los explantes se cultivaron inicialmente en la oscuridad a 24°C durante una semana, luego fueron colocados una semana en condiciones de luz indirecta a 2.0 µmol/m²s y finalmente en luz directa a 45 µmol/m²s.

Variables evaluadas y análisis estadístico

Se evaluó cada cuatro días durante 21 días después de introducidas, el porcentaje (%) de yemas brotadas. se analizaron mediante una prueba de Chi-cuadrado en el software estadístico InfoStat /Profesional, versión 1.1, 2014.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSION

1.- Desinfección (contaminación y oxidación)

De acuerdo a los experimentos de desinfección a los cuales fueron sometidos los explantes de *B. lako*, se obtuvieron los siguientes resultados.

En el primer experimento, de acuerdo a la prueba de Chi-cuadrada Pearson (0.4165 con un $\alpha=0.05$), no existen diferencias estadísticas significativas. En la Figura 1, se observa una tendencia creciente en el porcentaje de contaminación similar en todos los tratamientos, culminando con un porcentaje entre 90 y 100% en la última evaluación a los 40 días. De igual manera, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a la oxidación de los explantes, Chi-cuadrada Pearson de 0.6576 con un $\alpha=0.05$, la cual fue entre 0-28 %

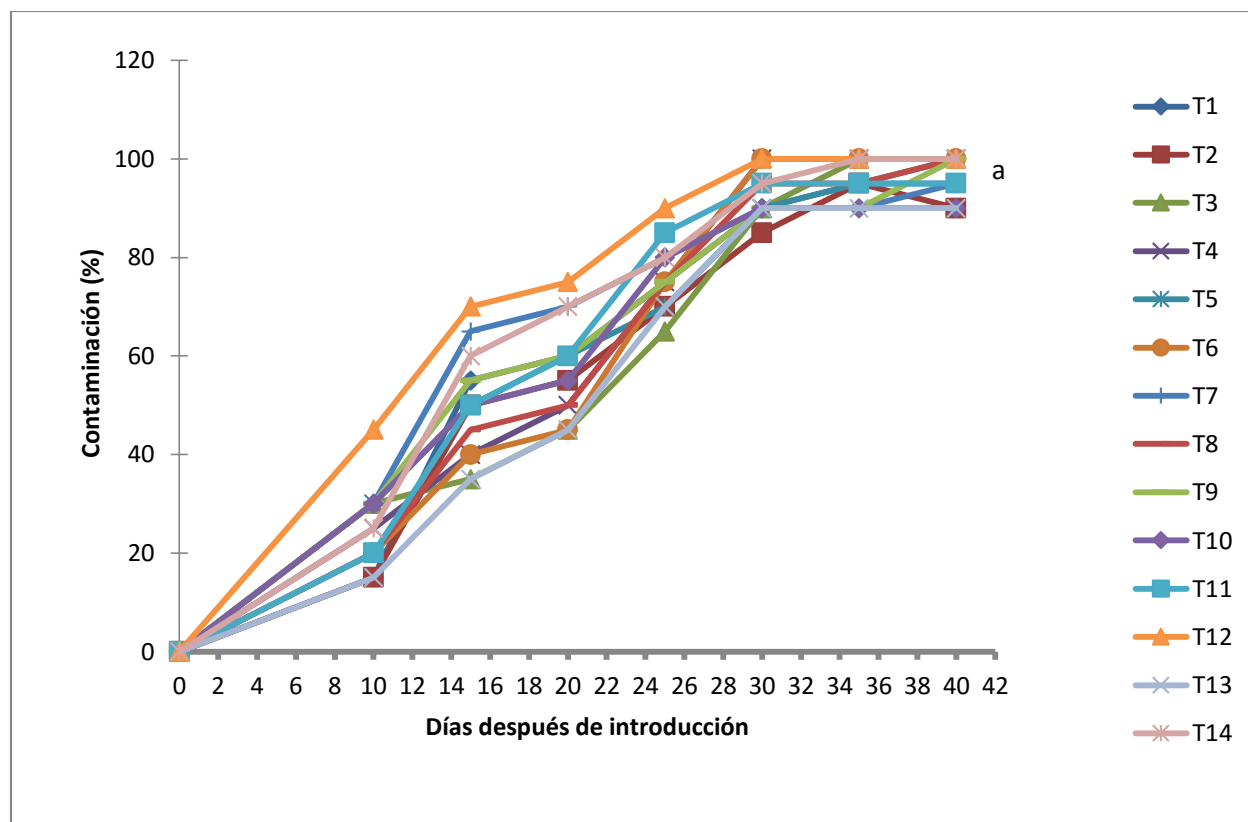


Figura 1. Contaminación de los segmentos nodales de *B. lako* por tratamientos de desinfección aplicados; sin surfactante (T1=testigo, T2= cloro + sonicador, T3=cloro + bomba de vacío, T4= Agri-mycin + Benomil + Sonicador, T5= Agri-mycin + Benomil + bomba de vacío, T6= Agri-mycin + Benomil + cloro+ bomba de vacío, T7= Agri-mycin + Benomil + cloro+ sonicador) y Con surfactante (T8= Testigo, T9= cloro + sonicador, T10=cloro + bomba de vacío, T11= Agri-mycin + Benomil + Sonicador, T12= Agri-mycin + Benomil + bomba de vacío, T13= Agri-mycin + Benomil + cloro+ bomba de vacío, T14= Agri-mycin + Benomil + cloro+ sonicador).

Los bambúes no constituyen una excepción en cuanto a contaminación, los trabajos realizados por Cruz-Martín *et al.* (2007), Acosta- Suárez *et al.* (2008) y García-Ramírez *et al.* (2010a) describen resultados al respecto, comprobando que en las yemas axilares se desarrollaba una microbiota diversa compuesta por hongos filamentosos los cuales se identificaron como contaminantes *in vitro*. De igual manera para el cultivo *in vitro* de *B. lako* el principal problema de contaminación

fue fúngica (Anexo 1) de acuerdo al análisis fitopatológico realizado a la muestra de bambú (*B. lako*) se identificaron los siguientes hongos: *Fusarium sp.* y *Botriotrichum sp.*

Diversos autores como Hernández y Gatica, 2001; Acosta-Suarez *et al.*, 2008; Santos, 2009; Lárraga, 2011, obtuvieron resultados positivos utilizando el fungicida Benomil y el bactericida Agri-mycin, en el cultivo *in vitro* de bambú, con plantas donadoras provenientes de invernadero. De la misma forma Jiménez *et al.* (2006), en su protocolo de desinfección *Guadua angustifolia* Kunth, menciona que los mejores resultados se obtuvieron utilizando explantes de plantas cultivadas en invernadero seguidas de un procedimiento de desinfección que comprendía el uso secuencial de un detergente alcalino, una mezcla del fungicida Benomil y el bactericida Agri-mycin, seguido por inmersión en hipoclorito de sodio (1.5% p/v) durante 10 min.

El Benomil®, es un fungicida sistémico de amplio espectro que actúa contra una gran variedad de hongos (Elanskii *et al.*, 2004), este ha sido ampliamente utilizado en el proceso de desinfección para el cultivo de tejidos vegetales (Gomes y Canhoto, 2003; Pence, 2005; Webster *et al.*, 2006).

El tejido vegetal sufre lesiones durante el proceso de desinfección, los desinfectantes superficiales tienen efectos abrasivos sobre las células (Salisbury y Ross, 1982), es por ello que diversos autores mencionan el uso de bomba de vacío como una alternativa durante la desinfección, sin ser su aplicación el objetivo de sus investigaciones, tal es el caso de Abdelnour y Muñoz, (2005) que hacen referencia al uso de bomba de vacío para la desinfección de *Tecton grandis* L.f. Por otro lado Jones (2006) en el proceso de desinfección de frambuesa menciona la utilización de Hipoclorito de Calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 65 i.a) al 35% producto comercial por 15 minutos en bomba de vacío; de la

misma forma López *et al.*, (2011) hace referencia en su protocolo de desinfección de hojas de genotipos elite de *Coffea* spp., donde el uso de la bomba de vacío es con el fin de evitar que las burbujas de aire atrapadas en los estomas y los tricomas de los tejidos impidan el contacto con la solución (Jones, 2006). El uso de la bomba de vacío, si bien en parte cumple con su propósito en otras especies, no fue así en el caso de bambú; además que presenta el inconveniente de provocar que las células se expandan, permitiendo mayor penetración de las soluciones, he incrementado el riesgo de oxidación (Jones, 2006).

En el caso del sonicador, no hay trabajos reportados en bambú donde utilicen este equipo para la parte de desinfección. La sonicación es el proceso de convertir una señal eléctrica en una vibración física que puede ser dirigida hacia una sustancia, la vibración tiene un efecto muy poderoso en las soluciones, haciendo que sus moléculas se separen y las células se rompan (Fromm *et al.*, 1987) induciendo un cambio en el potencial de la membrana de la célula dando lugar a la aparición de “microporos” que la hacen permeable a moléculas de gran tamaño , incluso en células vegetales provistas de pared celular (Lindsey y Jones, 1990).

Vilchez *et al.*, 2011, utilizando dicho aparato, realizó una doble desinfección más aplicación de 20 minutos de ultrasonido durante la segunda desinfección, para lo cual se procedió de la misma manera que en la desinfección doble, pero durante la aplicación de la segunda desinfección los explantes fueron sonicados por 15 minutos. La aplicación de una corriente eléctrica de 20 voltios durante 5 minutos permitió el menor porcentaje de explantes contaminados (10%).

Debido a las características morfológicas que presentan a la yema axilar recubierta por la vaina de la hoja caulinar y la ligadura (un apéndice membroso o raramente peloso) (Montiel 2006), permite que las esporas fúngicas encuentren condiciones para inocularse dentro del tejido del bambú; que una vez introducido en condiciones *in vitro*, encuentra las condiciones óptimas para su desarrollo, debido a que los agentes desinfectantes no pueden eliminarlos por sus características de acción de contacto. Por lo que la utilización de plantas donadoras provenientes de invernadero es de vital importancia en el establecimiento del cultivo *in vitro* de bambú.

En el segundo experimento se observó que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos llegando a 90 y 100 % de contaminación, de acuerdo a la prueba de Chi-cuadrada Pearson de 0.1090 con un $\alpha = 0.05$ (Figura 2). En cuanto a la oxidación fue de 5- 20% y no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Chi-cuadrada Pearson de 0.5153 con un $\alpha = 0.05$). Igualmente para la brotación fue de 55- 90% y no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Chi-cuadrada Pearson de 0.0606 con un $\alpha = 0.05$).

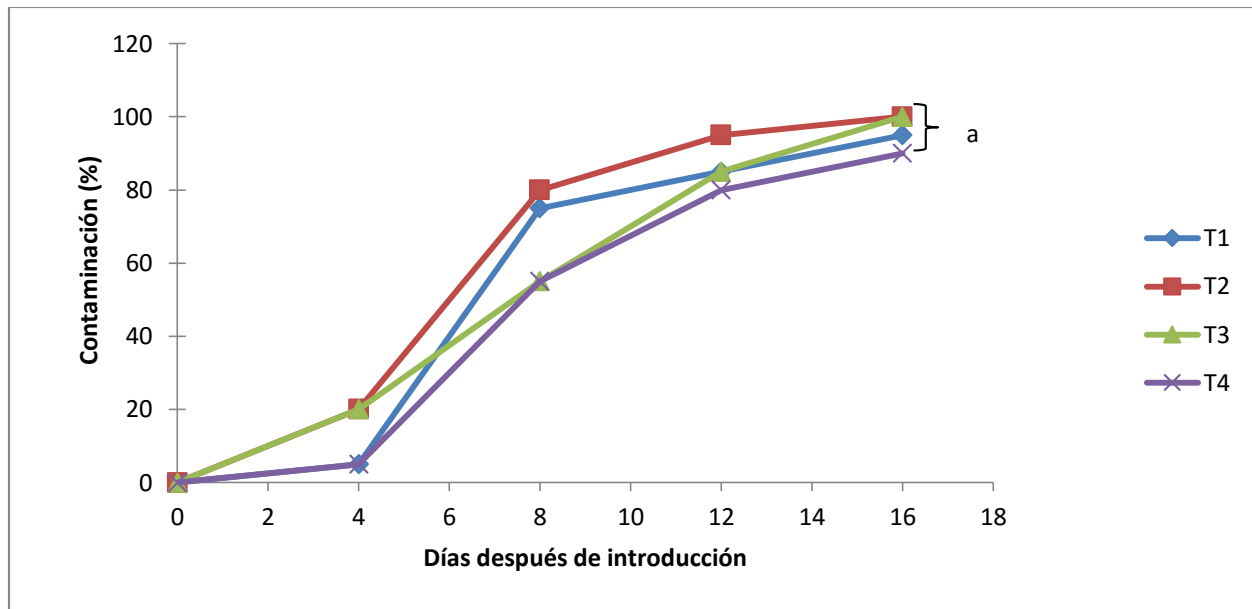


Figura 2. Distribución del porcentaje de contaminación por tratamiento para explantes de *B. lako* sin enterrar. T1=Testigo, T2=Sin Vanodine® + alcohol, T3=Sin Vanodine® + sin alcohol y T4=Vanodine® + alcohol.

Autores como López, 2012 y Hernández y Gatica, 2001 utilizan el alcohol en la desinfección de segmentos nodales de *Guadua* y *Bambusa vulgaris*, respectivamente, pero sin medir su efecto directo, ya que también utilizan fungicidas y bactericidas en dicho proceso; la utilización de alcohol a diferentes concentraciones y tiempo de inmersión es común en los protocolos de desinfección de las distintas especies vegetales.

En general la utilización del alcohol se basa en que posee una rápida acción y amplio espectro de actividad, actuando sobre bacterias, hongos y virus, pero no son esporicidas. (Sánchez *et al.*, 2005). El mecanismo de acción consiste en destruir la membrana celular y desnaturalizar las proteínas. Su eficacia está basada en la presencia de agua, esto se debe a que estos compuestos acuosos penetran mejor en las células y bacterias permitiendo así el daño a la membrana y rápida

desnaturalización de las proteínas con la consiguiente interferencia en el metabolismo y lisis celular. (Sánchez *et al.*, 2005).

El Vanodine® es una solución de un complejo yodo-surfactante que combina la acción microbicida del yodo con efectos sinergisantes del tensioactivo pero, finalmente, la eficacia está dada por la cantidad de yodo libre disponible para atacar los gérmenes. Una vez que el yodo ha sido liberado del surfactante hacia la fase acuosa, tiene la tendencia a disociarse en formas inactivas. I² es la única forma que tiene acción microbicida contra bacterias, virus, hongos y otros microorganismos (Herrera, 2005).

Al igual que en el experimento uno, la adición del alcohol y Vanodine® en el proceso de desinfección no obtuvo respuesta positiva debido posiblemente a las condiciones climáticas en las que se encontraban las plantas de campo.

Como se menciona en materiales y métodos las plantas donadores para el primer y segundo experimentos no se encuentran bajo condiciones de invernadero y tampoco cuentan con algún tipo de manejo preventivo para evitar que el explante sea vector del inoculo. Sin embargo, para el tercer experimento se trabajó con plantas de invernadero y la aplicación sistemática de fungicidas comerciales, con el fin de disminuir los porcentajes de contaminación en la fase de establecimiento. En cuanto a la comparación de plantas de invernadero con plantas de campo, se encontró diferencias significativas (Chi-cuadrada Pearson de 0.0001 con un $\alpha= 0.05$); las plantas de invernadero mostraron menos contaminación que las plantas de campo, no importando el

tratamiento utilizado ya que no hubo diferencia significativa entre tratamientos (Figura 3). No se presentó oxidación de los explantes para ningún tratamiento de desinfección.

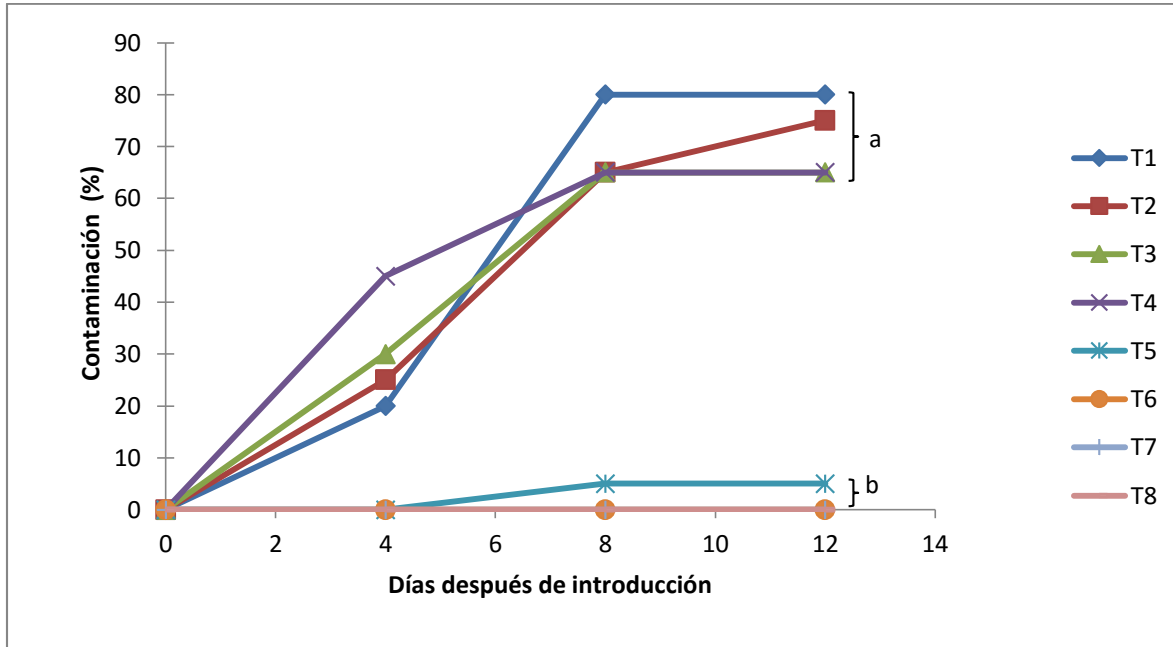


Figura 3. Distribución del porcentaje de contaminación por tratamiento utilizando explantes de B. lako de plantas de campo (T1=testigo (Cepillo jabón), T2=Cepillo jabón + inmersión alcohol, T3= frotado con alcohol, T4=frotado con alcohol + inmersión alcohol) y plantas de invernadero (T5=testigo (Cepillo jabón), T6=Cepillo jabón + inmersión alcohol, T7= frotado con alcohol, T8=frotado con alcohol + inmersión alcohol).

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

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

De igual manera, Ramanayake y Yakandawala (1997) y Arya *et al.* (2001) estudiaron la correlación existente entre las precipitaciones, humedad relativa y temperaturas en el incremento del número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles y el número de explantes con yemas brotadas durante el establecimiento *in vitro* de *D. giganteus* y *D. asper*. Por su parte, García-Ramírez *et al.*, (2010) realizaron un estudio de la influencia de la época del año en el establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* y señalaron los meses de enero-abril y noviembre-diciembre como el mejor período del año para realizar los establecimientos *in vitro* en dicha especie.

En cuanto a la brotación de los explantes según los tratamientos de desinfección se observó diferencias significativas según la proveniencia de los explantes (Chi-cuadrada Pearson de 0,0001 con un $\alpha=0,05$), no así entre los tratamientos de desinfección empleados como se observa en la Figura 4.

El hecho de que las plantas de campo brotaron menos que las de invernadero, se podría deber al estado de la yema, ya que las de campo varía el estado de maduración y las de invernadero se puede manipular con podas, para que las yemas sean más uniformes en su estado de maduración.

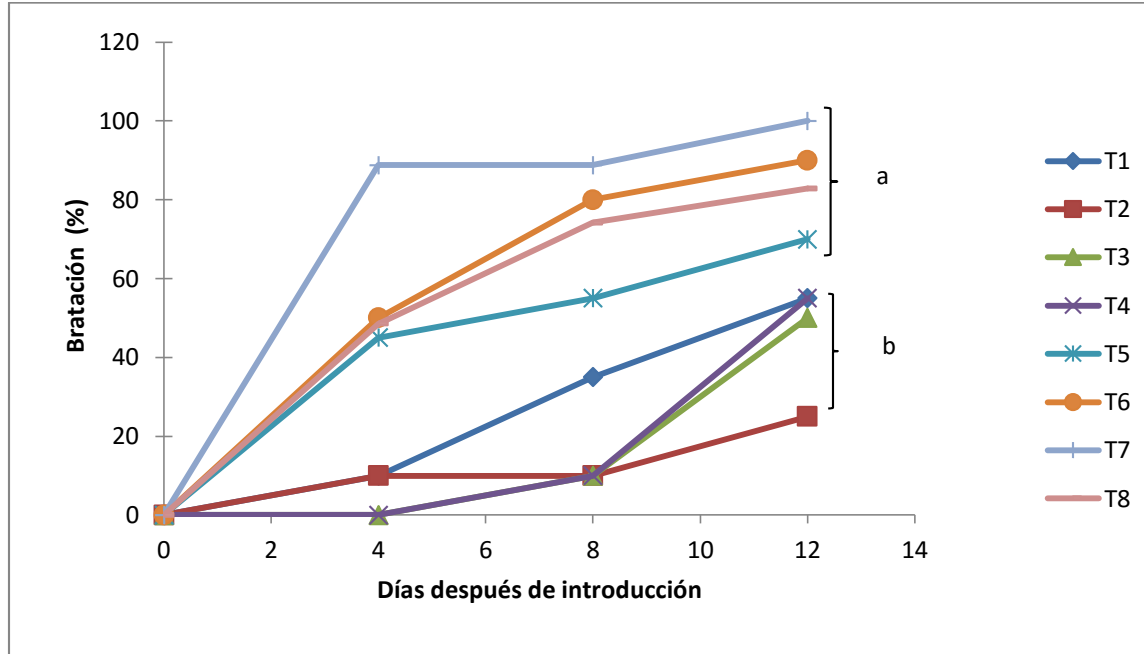


Figura 4. Distribución del porcentaje de brotación por tratamiento utilizando explantes de *B. lako* de plantas de campo (T1=testigo (Cepillo jabón), T2=Cepillo jabón + inmersión alcohol, T3= frotado con alcohol, T4=frotado con alcohol + inmersión alcohol) y plantas de invernadero (T5=testigo (Cepillo jabón), T6=Cepillo jabón + inmersión alcohol, T7= frotado con alcohol, T8=frotado con alcohol + inmersión alcohol).

2.- Brotación inicial

Con relación a la brotación de los segmentos nodales (Anexo 2), en la figura 5 se observa que el mejor tratamiento con el mayor número de segmentos nodales brotados fue TDZ 0.7 con el 100% de brotación a los 14 días después de la introducción. Se encontró diferencia estadística significativa de acuerdo a la prueba de Chi-Cuadrada 0.0001 con $\alpha = 0.005$.

Como se observa en el presente estudio, *B. lako* responde positivamente a ambos reguladores de crecimiento, pero presenta mejor respuesta a TDZ ya que es un compuesto de las fenilureas que

presenta alta actividad citoquina es decir, que son activos por derecho propio (George *et al.*, 2008). De acuerdo con Ramos (2012), los requerimientos nutritivos y reguladores para un crecimiento *in vitro* varían con la especie, son específicos de acuerdo con la parte de la planta que se esté cultivando y la respuesta que se desee obtener.

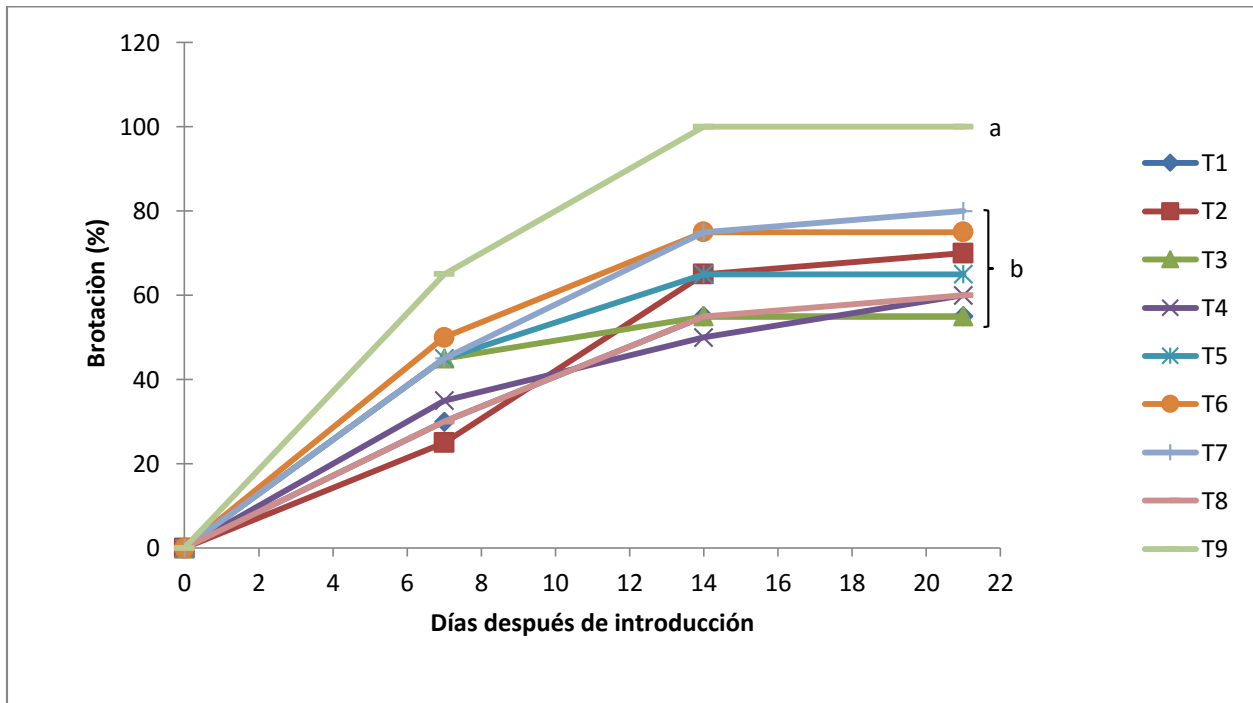


Figura 5. Efecto de las citoquininas (BAP y TDZ) y sus diferentes concentraciones en la inducción de brotación inicial de *B. lako*. T1=testigo, T2=BAP 0.3 mg/L; T3=BAP 6.0 mg/L; T4=BAP 9.0 mg/L; T5=BAP=12.0 mg/L; T6= TDZ 0.1 mg/L; T7=TDZ 0.3 mg/L; T8=TDZ 0.5 mg/L; T9=TDZ 0.7 mg/L.

Diversos autores (Bag *et al.* 2000; Ramanayake *et al.* 2001; Arya *et al.* 2001; Das y Pal 2005; Sanjaya *et al.* 2005; Kapoor y Rao 2006) utilizan 6-BAP en diversas concentraciones y especies tales como *Thamnocalamus spathiflorus*, *Dendrocalamus giganteus*, *Dendrocalamus asper*, *Bambusa tulda*, *Pseudoxytenanthera stocksii*, *Bambusa bambos* var. *Gigantea*, *Bambusa vulgaris* var. *Vittata* y *G. angustifolia*, obteniendo exitosa multiplicación en cada caso; de la misma forma

con TDZ en especies como *Dendrocalamus strictus* y *Bambusa vulgaris var. vittata*, (Singh *et al.*, 2000 y Ramanayake *et al.*, 2006).

2.4 CONCLUSIONES

El gran potencial que tiene México en cuanto a diversidad, el hábitat natural del bambú es bosque mesófilo de montaña o bosque de encino, en barrancas húmedas, a orillas de ríos y arroyos, generalmente prefiere suelos fértiles y bien drenados, a altitudes de 300 a 1750 msnm, por ello es muy probable que especies como la *B. lako* se pueda propagar sin ningún inconveniente. La *B. lako* es una especie que sobresale por su belleza, promisoro e inexplorada cuya reproducción es limitada, este trabajo pretendió dar a conocer esta especie para lo cual, se propagó de manera inicial por cultivo *in vitro*. Se estableció que la desinfección de *B. lako* se logró con la pre-desinfección con plantas de invernadero y la desinfección se logró con los frotos de alcohol (70%) antes del NaOCl; en cuanto a la brotación el TDZ influyó en la inducción de brotes *in vitro* de *B. lako*. Al adicionar al medio de cultivo TDZ (0.7 mg.L⁻¹) se obtuvieron los mayores porcentajes de brotación (100%).

2.5 LITERATURA CITADA

- Acosta-Suárez, M; Y. Alvarado-Capó Y, Cruz-Martín M, Leiva-Mora, C. Sánchez-García, Berkis Roque, E. Quiala, Maité Chavez, F. Jiménez- Terry, Mariana la O, R. Barbón, R. Collado, Mayelín Rodríguez, M. de Feria, Iván Borroto Martha Pérez. /2009/. Microbiota de plantas donadoras y hongos filamentosos contaminantes del establecimiento *in vitro* de cinco especies forestales. *Biocología Vegetal* 9:99-103.
- Arya, I, Satsangi R, Arya S. /2001/. Rapid micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus asper*. *J. Sus. For.* 14: 103–114
- Arya, S, Sharma S, Kaur R, Arya I. /1999/. Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot. Proliferation using seeds. *Plant Cell Rep.* 18: 879–882.
- Bag, N, Chandra S, Palni L, Nandi S. /2000/. Micropropagation of Devringal [*Thamnocalamus spathiflorus* (Trin.) Munro] – a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. *Plant Sci.* 156: 125–135
- Bambumex /2013/. ©Bambumex.org -2013
- Cátasus, L. /2003/. Estudio de los bambúes arborescentes cultivados en Cuba. ACTAF. Cuba.
- Cruz-Martín M, Yudith García-Ramírez, Cynthia Sánchez-García, Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Berkis Roque, Michel Leiva-Mora, Marisol Freire-Seijo /2007/. Identificación y control de *Bacillus* sp., contaminante del establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biocología vegetal* 7 (1): 09-13
- Das, M, Pal A. /2005a/. *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.
- García-Ramírez, Y, Freire M, Fajardo L, Tejeda M, Reyes M. /2007/. Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var. *vittata*. *Biocología vegetal* 7(3):153-158.
- García-Ramírez, Y, M Freire-Seijo, Blanca Rosa Pérez; Ortelio Hurtado /2010b/. Influencia de la época del año en el establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl. *Biocología vegetal* 10 (3): 151-156.
- García-Ramírez, Y, M Freire-Seijo, Blanca Rosa Pérez; Ortelio Hurtado /2010b/. Influencia de la época del año en el establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl. *Biocología vegetal* 10 (3): 151-156
- George E., Hall M., De Klerk G. /2008/. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 1: The Background. 3^{era} edición. *Springer*. pp 412.

- Gómez GD, Agudelo CA. /2003/. Aspectos fenológicos de *Guadua angustifolia*. Revista de Investigaciones Universidad del Quindío, 4(12):9-21.
- Hernández S., A Gatica, M. Guerrero /2001/. Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* (Bambú amarillo). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de investigación de Biotecnología
- Herrera, M. /2005/. Evaluación de dos alternativas agro culturales y dos productos químicos, para reducir las pérdidas provocadas por los hongos (*Verticillium theobromae* (Turconi) E.W. Mason & S.J.Hughes, *Fusarium* sp. y *Deightonella torulosa* (Syd) Ellis.) en los frutos de plátano (*Musa* AAB Tipo Horn), tiquisate, escuintla. Tesis de licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Hidalgo, J. /1974/. Bambú: Su cultivo y aplicación. Estudios Técnicos Colombianos Ltda. Cali, Colombia. 315 p.
- 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
- John C K, N. S. Rajanis /1999/. *In vitro*- Induce flowering in bamboos, *in vitro* cell, Dev, BM.- Plant; 35; 309-315.
- John, K., and N. R Rajanis. /1999/. Review *in vitro*- induced flowering in bamboo. *In vitro* Cellular and Developmental Biology Plant 35: 309- 315.
- Kapoor, P, Rao I. /2006/. *In vitro* rhizome induction and plantlet formation from multiple shoots in *Bambusa bambos* var. *gigantea*. Bennet and Gaur by using growth regulators and sucrose. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 85: 211–217
- Koshy, K, Gopakumar B. /2005/. An improvised vegetative propagation technique for self-incompatible bamboos. Curr. Sci. 89: 1474–1476
- Lárraga N. /2011/. Propagación *in vitro* y convencional de tres especies de Bambú. Puebla, México, 8-12 p. Tesis. Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Posgrado en estrategias para el desarrollo agrícola regional.
- Li, D. /2006/. Taxonomy and biogeography of the Bambuseae (Gramineae: Bambusoideae). [En línea] En:<http://www.ipgri.cgiar.org/publications/HTMLPublication/572/ch11.htm>. Consultado: 6 de septiembre de 2007.
- Londoño, X, Camayo G, Riaño N, López Y. /2002/. Characterization of the anatomy of *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) culms. J. Am. Bamboo Soc. 16:18-31
- López P. /2011/. Variación En La Tolerancia a Desinfectantes de Genotipos Élite de *Coffea* Spp. Cultivados *in vitro*.

- Mroginski, L, Sansberro P, Flaschland E. /2004/. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Parte V Métodos de propagación y conservación de germoplasma. En: Echenique, V, Rubinsten C y Mroginski L (Eds). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal, pp. 35-42: Editorial INTA. Buenos Aires
- Muñoz F., M; E Guevara B. y M. Montiel L. /1998/. Regeneración *in vitro* de Bambú gigante: *Dendrocalamus giganteus* (poaceae). Revista de Biología Tropical (C.R). 46(3):11-18.
- Murashige, T, Skoog F /1962/. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
- 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, Yakandawala K. /1997/. Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. *Plant Sci.* 129: 213–223
- Roxas, C. /2012/ Handbook on Erect Bamboo Species Found in the Philippines
- Sanjaya, T, Ravishankar R. /2005/. Micropropagation of *Pseudoxynanthera stocksii* Munro. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41: 333-337
- Santos, G. Santos U.I. /2009/. Identificación y control químico de hongos contaminantes de cultivo *in vitro* de Bambú (*Guadua angustifolia*, *Bambusa oldhamii* y *Bambusa vulgaris*). Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo
- Singh, M, Jaiswal U, Jaiswal V. S. /2000/. Thidiazuron-induced *in vitro* rooting in *Dendrocalamus strictus* Nees. *Curr. Sci.* 79(11): 1529–1530.
- Yasodha, R, Kamala S, Kumar A, Kumar D, Kalaiarasi K. /2007/. Effect of glucose on *in vitro* rooting of mature plants of *Bambusa nutans*. *Scientia Horticulturae* 116: 113-116.

CONCLUSIONES GENERALES

El estado del arte de bambú favoreció en este trabajo ya que se abordó de manera general las principales observaciones científicas sobre el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos para la propagación *in vitro* de varias especies de bambúes, permitiendo un panorama más amplio para su manejo y control sobre la propagación inicial de *B. lako*

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se concluye que la desinfección para *B. lako* se logró con frotos de alcohol antes de la inmersión en hipoclorito utilizando explantes de plantas tratadas en invernadero.

La respuesta de las diferentes concentraciones de citocininas (BAP y TDZ) para la inducción de brotes de *B. lako* se logró con TDZ a 0.7 mg L^{-1}

ANEXOS



Anexo 1. Contaminación de los explantes durante el establecimiento de cultivo *in vitro* de *B. lako*. Barra = 1 cm.



Anexo 2. Brotación inicial de los explantes durante el establecimiento de cultivo *in vitro* de *B. lako*. Barra = 1 cm.



Anexo 3. Oxidación de los brotes durante el establecimiento de cultivo *in vitro* de *B. lako*. Barra = 1 cm