

PROPAGACION VEGETATIVA IN VITRO DEL BAMBU

P O R

Dablo Roberto Montalván Solórzano

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PREVIO A LA
OBTENCION DEL TITULO DE

INGENIERO AGRONOMO

| | |
|------------|--------------------|
| MICROFIS: | <i>4003</i> |
| FECHA: | <i>10/01/92</i> |
| ENCARGADO: | <i>[Signature]</i> |

ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA

Abril de 1992

PROPAGACION VEGETATIVA *IN VITRO* DEL BAMBU

Por

FABLO ROBERTO MONTALVAN SOLORZANO

El autor concede a la Escuela Agrícola Panamericana permiso para producir y distribuir copias de este trabajo para los usos que considere necesarios. Para otras personas y otros fines, se reservan los derechos de autor.

FABLO ROBERTO MONTALVAN SOLORZANO

Abril de 1992

RECONOCIMIENTOS

Agradezco al Dr. Juan José Alán, por la orientación y asistencia brindada en la realización y redacción de este trabajo.

A Bessy Martínez, por su colaboración en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la EAP.

Al Arq. Teodoro Albornoz, por el excelente trabajo de fotografía realizado.

A Heidi Bustillo por su ayuda en el mecanografiado de esta obra.

A los amigos en la Quince: David Rodríguez, Rommel Hernández, Esteban Becerra, Reynieri Vargas, Marco y Carlos Granadino, Angel Rodríguez. Un agradecimiento especial a Manuel Granados por su apoyo y amistad.

A todo el personal en el Departamento de Agronomía que de una u otra manera colaboraron en la realización de este trabajo.

INDICE

| | |
|--|------|
| PORTADA | i |
| NOMBRES Y FIRMAS | ii |
| DERECHOS DE AUTOR | iii |
| DEDICATORIA | iv |
| RECONOCIMIENTOS | v |
| INDICE | vi |
| INDICE DE CUADROS | viii |
| INDICE DE FIGURAS | x |
| ABREVIATURAS UTILIZADAS | xi |
| COMPENDIO | xii |
| I. INTRODUCCION | 1 |
| Clasificación Botánica | 1 |
| Taxonomía | 1 |
| Citología | 1 |
| Distribución | 2 |
| Clima | 2 |
| Precipitación | 3 |
| Suelos | 3 |
| Hábito de Crecimiento del Rizoma | 4 |
| Crecimiento | 4 |
| Floración | 5 |
| Importancia Ecológica | 7 |
| Utilidad | 7 |
| Procesamiento químico | 9 |
| Agricultura | 10 |
| Propagación | 10 |
| II. REVISION DE LITERATURA | 12 |
| Propagación Sexual | 12 |
| Propagación Asexual | 12 |
| Medios de Cultivo | 14 |
| Sustancias de Crecimiento | 14 |
| Ambiente Físico | 15 |
| Oxidación | 16 |
| Morfogénesis y Embriogénesis | 16 |
| Nudos y Entrenudos | 17 |
| Yemas | 18 |
| Semillas | 20 |

| | |
|--|----|
| Ubicación | 23 |
| Material Vegetal | 23 |
| Desinfección | 24 |
| Medios de Cultivo | 24 |
| Hormonas | 26 |
| Preparación de Medios de Cultivo | 27 |
| Esterilización | 30 |
| Cristalería e Instrumentos | 30 |
| Obtención de Explantes | 31 |
| Condiciones Ambientales | 32 |
| Metodología | 32 |
| Experimento 1 | 32 |
| Experimento 2 | 33 |
| Experimento 3 | 33 |
| Experimento 4 | 34 |
| Experimento 5 | 35 |
| Experimento 6 | 36 |
| IV. RESULTADOS | 37 |
| Experimento 1 | 37 |
| Experimento 2 | 37 |
| Experimento 3 | 38 |
| Experimento 4 | 45 |
| Experimento 5 | 49 |
| Nudos | 49 |
| Entrenudos | 51 |
| Yemas axilares | 53 |
| Experimento 6 | 54 |
| V. DISCUSION | 57 |
| VI. CONCLUSIONES | 61 |
| VII. RECOMENDACIONES | 62 |
| VIII. LITERATURA CITADA | 63 |
| DATOS BIOGRAFICOS DEL AUTOR | 65 |

INDICE DE CUADROS

| | | |
|-----------|---|----|
| Cuadro 1. | Composición del medio básico de Murashige y Skoog (1962) modificado, utilizado para la propagación <i>in vitro</i> de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, 1990-1992. | 26 |
| Cuadro 2. | Dosis y combinaciones de hormonas utilizadas en los diferentes experimentos para la propagación <i>in vitro</i> de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, 1990-1992. | 27 |
| Cuadro 3. | Porcentajes de oxidaciones en yemas axilares cultivadas por dos semanas en oscuridad y después a la luz, en medio MS modificado con ANA y BAP en la propagación <i>in vitro</i> de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1990-1991. | 38 |
| Cuadro 4. | Porcentajes de oxidación de yemas axilares cultivadas en oscuridad continua en medio MS modificado con 2,4-D y BAP en la propagación <i>in vitro</i> de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991. | 39 |
| Cuadro 5. | Porcentajes de callo de yemas axilares en medio MS suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y BAP en la propagación <i>in vitro</i> de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991. | 39 |
| Cuadro 6. | Porcentajes de oxidación de yemas axilares de <i>Dendrocalamus asper</i> cultivadas en medio MS suplementado con diferentes dosis de AIA y BAP en la propagación <i>in vitro</i> de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991. | 47 |
| Cuadro 7. | Porcentajes de callo en explantes de yemas axilares cultivadas en medio MS suplementado con AIA y BAP en la propagación <i>in vitro</i> de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991. | 47 |
| Cuadro 8. | Porcentajes de oxidación de nudos de <i>Dendrocalamus asper</i> cultivados en oscuridad continua en medio MS suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y BAP en la propagación <i>in vitro</i> de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991. | 49 |

| | |
|---|----|
| Cuadro 9. Porcentajes de nudos de <i>Dendrocalamus asper</i> que no mostraron reacción al cultivarse en oscuridad continua en medio MS suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y BAP en la propagación <i>in vitro</i> de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991. | 50 |
| Cuadro 10. Porcentajes de contaminación en nudos de <i>Dendrocalamus asper</i> cultivados en oscuridad continua en medio MS suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y BAP en la propagación <i>in vitro</i> de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991. | 51 |
| Cuadro 11. Porcentajes de oxidación en entrenudos de <i>Dendrocalamus asper</i> cultivados en oscuridad continua en medio MS suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y BAP en la propagación <i>in vitro</i> de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991. | 51 |
| Cuadro 12. Porcentajes de callo en explantes de nudos cultivados en medio MS suplementado con 2,4-D y BAP en la propagación <i>in vitro</i> de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991. | 52 |
| Cuadro 13. Porcentajes de oxidación de yemas axilares de <i>Dendrocalamus asper</i> cultivadas en medio MS suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y KIN en la propagación <i>in vitro</i> de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991. | 54 |
| Cuadro 14. Porcentajes de callo en explantes de yemas axilares cultivadas en medio MS suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y KIN. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991. | 55 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Procedimiento para desinfectar material vegetal | 25 |
| Figura 2. Procedimiento para colocar puentes de papel en los tubos de cultivo | 29 |
| Figura 3. Porcentajes de callo en yemas axilares cultivadas en medio MS modificado con distintas dosis de 2,4-D y BAP | 40 |
| Figura 4. Brote de <i>Dendrocalamus asper</i> formado a partir de un callo de yema axilar cultivado en medio MS modificado con 5 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BAP. | 42 |
| Figura 5. Callo con yemas adventicias de <i>Dendrocalamus asper</i> formado de una yema axilar cultivada en medio MS modificado con 5 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BAP. | 43 |
| Figura 6. Callo con raíces formado del cultivo de una yema axilar en medio MS modificado con 0,5 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BAP. | 44 |
| Figura 7. Callo oxidado, formado del cultivo de una yema axilar en medio MS modificado con AIA y BAP. | 46 |
| Figura 8. Porcentajes de callo en yemas axilares cultivadas en medio MS modificado con distintas dosis de AIA y BAP. | 48 |
| Figura 9. Porcentajes de callo a partir de entrenudos cultivados en medio MS modificado suplementado con 2,4-D y BAP | 53 |
| Figura 10. Porcentajes de callo en yemas axilares cultivadas en medio MS modificado con diferentes dosis de 2,4-D y KIN. | 55 |

COMPENDIO

El objetivo de esta investigación fue desarrollar una metodología de técnicas *in vitro* que permitieran la propagación de *Dendrocalamus asper*.

Se probaron explantes de yemas axilares, nudos y entrenudos. Se utilizó el medio de Murashige y Skoog (1962) modificado y suplementado con auxinas y citoquininas. Las auxinas que se utilizaron fueron AIA, ANA y 2,4-D, en dosis de 0, 0,5, 1, 2 y 5 mg/L. Las citoquininas fueron KIN y BAP, en dosis de 0, 1, 2 y 5 mg/L.

El mayor problema que se observó fue la oxidación de los explantes en el medio de cultivo.

Los mejores explantes para la propagación *in vitro* fueron las yemas axilares de ramas en crecimiento activo. De estos explantes se logró un mayor porcentaje de formación de callo y regeneración de plantas.

De las auxinas estudiadas, el 2,4-D en dosis de 1 y 2 mg/L es la más eficaz en la producción de callos, mientras que de las citoquininas la BAP produjo los mejores resultados al utilizarla en dosis de 2 y 5 mg/L. Para la formación de callos no es necesaria una combinación de auxinas y citoquininas, aunque sí es necesaria para la regeneración de plantas.

I. INTRODUCCION

Clasificación Botánica

Los bambúes pertenecen al grupo de las Angiospermas, clase Monocotiledónea, orden Poales, familia Poaceae, subfamilia Bambusoideae (Mclure, 1966; Calderón y Soderstrom, 1973, citados por Widmer, 1990a).

Taxonomía

Se han utilizado las estructuras vegetativas para la clasificación, debido a que la floración en los bambúes es errática y poco frecuente (Liese, 1985; Widmer, 1990a).

Dhmburger y Goerrings (1983) (citados por Widmer 1990a) reconocen 111 géneros, de los cuales 85 son leñosos y 26 herbáceos. Entre 880 y 940 especies son leñosas, y de 150 a 160 son herbáceas. En el Neotrópico se encuentran 17 géneros y 100 especies de bambúes.

Citología

La mayoría de las especies son tetraploides, *Dendrocalamus* y algunas especies asiáticas son hexaploides; algunos bambúes herbáceos son diploides (Calderón y

Soderstrom, 1973, citados por Widmer, 1990a). El número cromosómico básico es $x=12$, pero Guang-Zhu (1987) (citado por Widmer, 1990a), propone que existen octoploides con $x=8$ o $x=9$.

Numata (1987) (citado por Widmer, 1990a), asegura que el número cromosómico de los bambúes en zonas templadas es $2n=48$, y el de los tropicales es $2n=72$. Este número varía según el género. Clark (1989) (citado por Widmer, 1990a), informa que el género neotropical *Chusquea* posee $2n=40$ ($x=10$).

Distribución

Crecen en todos los continentes excepto en Europa. Su rango de distribución es amplio, desde la latitud 46°N hasta 47°S . Se distribuyen desde el nivel del mar hasta el límite de las nieves. La mayoría se encuentran en altitudes bajas y medias y son más abundantes en regiones cálidas y tropicales.

Clima

Liese (1985) sostiene que los bambúes en general prefieren climas tropicales o subtropicales con una temperatura media anual entre 20 y 30°C . Las temperaturas altas favorecen el crecimiento. Algunas especies como *Oxythenanthera abyssinica* toleran temperaturas entre 40 y 50°C , mientras que otras (*Phyllostachys mitis*) pueden soportar la nieve o temperaturas invernales tan bajas como -8°C .

(*Arundinaria amabilis*).

Precipitación

Tanto el clima tropical húmedo como el subtropical son apropiados. Algunas especies de bambúes crecen en sabanas de bosque semideciduo con una época seca muy marcada (Liese, 1985). La precipitación requerida varía desde 1000 mm hasta 4050 mm anuales (Yadav, 1963; Numata, 1979, citados por Widmer, 1990a). Liese (1985) informa que *Dendrocalamus strictus* y *Oxytenanthera abyssinica* pueden sobrevivir con 750 mm de lluvias anuales.

Suelos

El bambú puede crecer en muchos tipos de suelo, pero preferiblemente en suelos bien drenados, franco arenosos a franco arcillosos, ricos en minerales y derivados de aluviones de ríos (Liese, 1985).

Liese (1985) y Uchimura (1987) (citados por Widmer, 1990a) y Widmer (1990a) coinciden en que el bambú no soporta suelos alcalinos o salinos y que el rango óptimo de pH varía entre 5.0 y 6.5.

Hábito de Crecimiento del Rizoma

Los bambúes son un sistema ramificado de ejes vegetativos segmentados, diferenciados en rizomas, culmos y ramas. Los ejes están constituidos por una serie de nudos y entrenudos (McLure, 1966, citado por Widmer, 1990a).

Tienen dos hábitos principales: 1) rizoma leptomorfo o monopodial indeterminado y 2) rizoma paquimorfo o simpodial determinado.

Leptomorfos: son de climas templados y templado cálidos, típicamente huecos y crecen de 1 a 6 m por año. Los culmos brotan de yemas laterales, de los cuales germina solamente el 10%.

Paquimorfos: son de regiones tropicales cálidas. No soportan temperaturas muy bajas. Los rizomas son cortos, sólidos y a menudo más gruesos que el culmo que producen (Liese, 1985).

Crecimiento

Hsiung *et al.* (1980) (citados por Liese, 1985), investigaron el crecimiento de *Phyllostachys* spp. Concluyeron que los brotes crecen a partir de la elongación de entrenudos, que empieza en la parte basal del brote y gradualmente avanza hacia el ápice.

Widmer (1990a) indica que la elongación del culmo se debe

al crecimiento en la zona del meristema secundario que se ubica encima de cada nudo. Liese (1985) observa que los brotes emergen del suelo a principios de la época lluviosa, aunque en climas ecuatoriales estos emergen durante todo el año. Se producen de cinco a 10 brotes por cepa por año, dependiendo de la especie.

Floración

Existen tres grupos de bambúes según el tipo de floración:

1) floración continua o estacional anual, sin muerte consecuente; 2) floración esporádica o de intervalos irregulares, por lo general con poca recuperación de la planta madre o en algunos casos muerte completa; 3) floración gregaria periódica con intervalos casi regulares, en ciertos casos con supervivencia parcial de los rizomas debilitados (Watanabe y Hamada, 1981; Campbell, 1985, citados por Widmer, 1990a).

Widmer (1990a) informa que alrededor de un año antes de florecer, la planta no produce más culmos o los produce con dimensiones menores. Seifríz (1950), Seth (1954) y Kondas (1982) (citados por Widmer, 1990a) han observado que la floración gregaria de un bambú en su ambiente natural comienza en un punto de la población y gradualmente se extiende en forma de olas cubriendo el área en un lapso de tres a cuatro

años.

La floración gregaria es la más común en las especies de bambú. En este estado todos los culmos de una especie florecen al mismo tiempo independientemente de su edad, en grandes áreas y a veces hasta en distintos países (Liese, 1985).

Se desconocen las razones por las cuales ocurre la floración repentina, impredecible y simultánea de todas las plantas de una sola especie en áreas grandes, a pesar de su impacto económico y su valor científico. Se informa que un período corto de lluvias seguido de una sequía severa estimula la floración (Liese, 1985).

Kashara (1981) (citado por Widmer, 1990a), afirma que el intervalo del ciclo de floración lo determina un gene, y las cepas de bambú con el mismo gene florecen el mismo año. Asegura que las diferencias de intervalo en una misma especie se deben a mutaciones en el "gene del ciclo de floración", que es heredado a la descendencia.

La duración del ciclo de floración varía con cada especie. El rango está entre 3 y 60 años, pero para muchas especies está entre 30 y 35 años. La floración ocurre entre diciembre y enero y las semillas maduran entre febrero y abril. Las semillas germinan en el suelo dos semanas después de caer de la planta. La viabilidad de la semilla varía hasta dos meses para la mayoría de las especies y un año para otras. Muchas veces la planta muere después de producir semilla. Son pocas las especies en las cuales el rizoma no muere y es capaz

de producir culmos nuevos (Liese, 1985).

Importancia Ecológica

Los bambúes son importantes en la estabilización de suelos por su sistema extendido de rizomas, desarrollado en los primeros 30 a 50 cm de suelo (Vera Gálvez, 1982; Soderstrom y Calderón, 1979, citados por Widmer, 1990a).

Los bambúes protegen el suelo de la erosión provocada por inundaciones o en las pendientes deforestadas por las grandes lluvias (Widmer, 1990a). Para la conservación de suelos, se siembra en las riberas de los ríos para delimitar su cauce y frenar la erosión (Purseglove, 1972; Heiser, 1973; Widmer 1990a). Como especie forestal, el bambú desempeña un papel importante en la conservación de cuencas hidrográficas de los pueblos del continente americano, desde México hasta el Perú (Torre, 1990).

Utilidad

El uso actual de los bambúes en América Latina, se limita a unas pocas especies nativas y exóticas, que están ubicadas en áreas cercanas a las viviendas. Las especies nativas de mayor utilización son de los géneros *Guadua*, *Chusquea*, *Arthrostyloidium*, *Otatea*, *Merostachys* y *Rhipidocladum*. Las especies exóticas establecidas en América Central y las Islas

del Caribe, han sido importadas del sudeste asiático, de China y Japón. Las especies más cosmopolitas son *Bambusa vulgaris* para tejidos artesanales, puntales de banano y pulpa de papel y *Phyllostachys aurea* para muebles; otras especies introducidas son de los géneros *Bambusa*, *Dendrocalamus*, *Gigantochloa*, *Melocanna* y *Phyllostachys* (Widmer, 1990b). Los brotes de bambú son un alimento importante para mucha gente en algunos países asiáticos y el follaje puede servir para la alimentación animal (Furseglove, 1972; Heiser, 1973; Widmer, 1990a).

En todos los países donde crece, el bambú es indispensable para la construcción. En Asia y en América tropical, un sinnúmero de especies son utilizadas en la construcción de casas. El bambú también se utiliza para la construcción de puentes y embarcaciones (Furseglove, 1972; Heiser, 1973; Widmer, 1990a). Apropiadamente tratado con preservantes químicos, tiene gran durabilidad (Gutiérrez, 1990).

Los papeles con base de pulpa de bambú son generalmente gruesos, sólidos y resistentes, utilizados para empaque e impresión, pero también se pueden preparar ciertos papeles finos o puede ser combinada con otros tipos de pulpa, para obtener grados aceptables de cartón y papel absorbente (FAD, 1963, citado por Widmer, 1990a). La parte externa e interna de los culmos se utilizan para fabricar distintos tipos de esteras o paneles tejidos, así como cestas y canastas (Liese,

1985).

Se pueden fabricar muebles de láminas curvas de bambú. El tratamiento de la madera con vapor facilita el doblado de las láminas (Liese, 1985).

Procesamiento químico

La destilación en seco del bambú rinde carbón, alquitrán y vinagre. Del bambú se extraen enzimas y otras sustancias catalizadoras, que se utilizan en la farmacología y cosmetología (McLure, 1945, 1957; Sharma, 1980, citados por Widmer, 1990a; Liese, 1985).

El bambú sirve como una fuente potencial de energía, tiene un alto poder de calorías entre 4,600 y 5,400 cal/kg y una alta capacidad calórica (FAO, 1978, en Sharma, 1987, citado por Widmer, 1990a; Liese 1985).

Thomas Edison utilizó bambú como filamento para su primera lámpara. Existen lámparas especiales que utilizan filamentos carbonizados hechos de fibra de bambú (Liese, 1985).

Yurong *et al.* (1987), citados por Widmer (1990a), elaboraron membranas de ultrafiltración con bambú que son comparables con las que se usan con base de algodón. Las membranas de bambú son superiores en la resistencia a ácidos y bases. La cera de bambú tiene un punto de fusión de 79 a 80°C y se usa como base en betunes para zapatos y papel carbón (Liese, 1985).

Agricultura

En la agricultura, el bambú se utiliza en mangos de herramientas, rastrillos, forraje, barreras rompevientos, cercas vivas, estabilización de ribera de ríos, conductos para agua y drenaje y puntales para banano (Liese, 1985; Widmer, 1990a). También se utiliza para guías o tutores para frijol, tomate, y otras hortalizas.

Propagación

Muchos bambúes no florecen frecuentemente. Sin embargo, si alguna especie llega a florecer y producir semillas, se puede realizar la propagación sexual por semilla (Widmer, 1990a).

Debido a la escasez de semillas, el bambú se propaga generalmente por varios métodos vegetativos. Estos métodos, generalmente, se asocian con un alto grado de fracasos (Liese, 1985).

En cultivo de tejidos, la embriogénesis somática y la micropropagación son los métodos principales de propagación *in vitro*.

Las dificultades encontradas en la propagación del bambú por métodos convencionales hace que se busquen nuevos métodos de propagación que sean más eficaces. Con el cultivo *in vitro* de tejidos de bambú se podría lograr una multiplicación masiva de plántulas, disponibles en cualquier época, sin el daño que

se le causa al rizoma o a las cañas aéreas al fragmentar la planta.

El objetivo principal de esta investigación es desarrollar una metodología de técnicas *in vitro* que puedan permitir propagar exitosamente la especie de bambú *Dendrocalamus asper*, presente en el campus de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP).

Las variables que se analizarán serán las siguientes:

1) Yemas axilares:

- a) proliferación de brotes
- b) tiempo de proliferación de brotes
- c) número de brotes
- d) enraizamiento.

2) Nudos o entrenudos:

- a) número de explantes que forman callo
- b) tiempo para formación de callos
- c) número de callos que producen brotes
- d) número de brotes por callo
- e) tiempo de formación de brotes.

II. REVISION DE LITERATURA

Propagación Sexual

La propagación sexual se realiza por semilla pero la obtención de plántulas es complicada. La vida de la semilla es corta, posee una variabilidad genética muy alta y, por lo general, se obtienen pocas plantas. La propagación de los bambúes se realiza asexualmente, debido a la floración errática de las plantas (Widmer, 1990a).

La semilla se puede sembrar en semillero o directamente en el campo al inicio de la época lluviosa. En semillero es preferible cubrir las semillas con tierra fina y regarlas frecuentemente. El transplante al campo se hace después de dos o tres meses, cuando las plántulas miden de cinco a diez centímetros de altura (Liese, 1985).

Propagación Asexual

Los métodos más comunes para la propagación vegetativa son: a) Fragmentación o división de la cepa, en el cual se usa material de dos a tres años. Consta de un sistema radical con yemas latentes, ramas y follaje los más intactos posibles. b) Sección de rizomas con culmo: consiste en una división de cepa compuesta por la parte inferior del culmo con su eje

basal de rizoma. c) Culmo entero, utilizando culmos de dos a tres años. d) Rizoma con raíces, propagando rizomas de culmos de un año. e) Sección de culmo, preferiblemente usando un pedazo medial de un culmo de dos a tres años, con dos o tres nudos (Widmer, 1990a; Dajun y Shap-Jin, 1987). Calidonio (1991), en Honduras, multiplicó estacas de la parte media de tallos de cinco años de *Dendrocalamus strictus*, obteniendo 92% de enraizamiento, 100% de brotamiento y un promedio de 2.1 brotes por estaca en cinco meses.

El inconveniente es que se necesita disponer de casi toda la planta para obtener pocos propágulos, y cuando se fragmenta la caña, hay que esperar mucho tiempo para que enraice (Widmer, 1990a).

Otros métodos, pero menos utilizados son acodos e injertos, en los cuales se ha experimentado pero no se han obtenido resultados satisfactorios (Uchimura, 1979, citado por Widmer, 1990a).

La investigación en cultivo de tejidos de bambú es reciente excepto por un informe de Alexander y Rao en 1968 (citados por Rao *et al.*, 1989) sobre el cultivo de embriones de bambú y su germinación *in vitro*, y por Tseng *et al.* en 1975 (citados por Rao *et al.*, 1989) del aislamiento de protoplastos de las hojas. La investigación intensiva empezó con el trabajo de Mehta *et al.* en 1982 (citados por Rao *et al.*, 1989) con la producción de plántulas de *Bambusa arundinacea* por medio de embriogénesis somática. Esto fue seguido por varios informes

de un total de 15 especies de siete géneros de bambú.

Con la micropropagación se obtienen duplicados de la planta madre original utilizando explantes de yemas axilares. También se ha experimentado con organogénesis (Mascarenhas *et al.*, 1990).

La embriogénesis somática utiliza los siguientes tipos de explantes: a) Material juvenil: embrión cigótico, embrión inmaduro y partes de la plántula (nudo, entrenudo, hoja caulinar, raíz, rizoma). b) Material de cultivo de tejidos: embrión somático y partes de plántulas regeneradas de embriones somáticos. c) Material adulto: nudo, entrenudo, meristema apical, base de la hoja caulinar y rizoma (Rao y Rao, 1990).

Medios de Cultivo

El medio que más se ha utilizado es el de Murashige y Skoog (MS) (1962) para los distintos tipos de explantes de bambú. En cultivos de embriones de bambú se ha utilizado el medio B₅ (Gamborg *et al.*, 1968) además del MS (Rao *et al.*, 1989).

Sustancias de Crecimiento

Huang y Murashige (1983) afirman que se pueden inducir callos con la adición de las auxinas picloram y ácido 2,4-

diclorofenoxiacético (2,4-D). Con menor éxito se han utilizado las hormonas ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA). Sin embargo la auxina más común y muy efectiva es el 2,4-D (Rao *et al.*, 1989).

Las citokininas más utilizadas han sido bencilaminopurina (BAP), 2-isopenteniladenina (2-ip), kinetina (KIN) y zeatina (ZEA), aunque a bajas concentraciones inhiben el crecimiento de yemas laterales. Las combinaciones de auxinas y citokininas son eficaces en el desarrollo de callos en otros tipos de explantes (Huang y Murashige, 1983).

Ambiente Físico

Se ha encontrado que la incubación en la oscuridad completa y continua es eficaz para la inducción de callos en algunos bambúes (Huang y Murashige, 1983). Yeh y Chang (1986), citados por Rao *et al.* (1989), no encontraron diferencias entre la oscuridad completa continua y un régimen de 16 horas de luz diarias. Vongvijitra (1990) utilizó un régimen día/noche de 12/12h e indujo callos a partir de nudos de *Dendrocalamus membranaceus*.

Mascarenhas *et al.* (1990) obtuvieron resultados positivos al utilizar un régimen día/noche de 16/8h. Rao *et al.* (1985) obtuvieron callos en cultivos sometidos a iluminación constante.

Oxidación

Para prevenir la oxidación de los callos de *Dendrocalamus latiflorus* se utilizaron varios agentes adsorbentes y antioxidantes. El más eficaz fue el carbón activado adicionado al medio y el cultivo en la oscuridad. En esta especie, la oscuridad inhibió el desarrollo de callos, y se requirieron dosis más altas de sustancias de crecimiento para compensar las propiedades de inactivación del carbón activado (Zamora *et al.*, 1988; citados por Rao *et al.*, 1989). Entre los agentes antioxidantes que más se utilizan en cultivo de tejidos están la cisteína, el ácido ascórbico y el ácido cítrico (Bhojwani y Razdan, 1983), además del carbón activado.

Morfogénesis y Embriogénesis

Los diferentes tipos de callos que se producen en cultivos *in vitro* de bambú se pueden agrupar en tres categorías: 1) callos mucilaginosos, 2) callos no embriogénicos suaves y friables, 3) callos compactos, nodulares y de color amarillo pálido a blanco. Los callos mucilaginosos y los compactos tienen el potencial para regenerar embrioides mientras que los callos friables están más propensos a producir raíces (Rao *et al.*, 1989).

A partir de callos la regeneración puede tomar dos vías. La primera es la embriogénesis somática que ocurre en callos

inducidos a partir de embriones, inflorescencias jóvenes y hojas. La segunda vía es la formación de brotes adventicios y raíces provenientes de callos o callos provenientes de raíces, entrenudos, nudos, secciones de rizoma de plantas maduras y yemas terminales y laterales (Rao *et al.*, 1989).

Nudos y Entrenudos

Zamora *et al.* (1991) cultivaron tejidos de entrenudos de *Dendrocalamus latiflorus* cv. Machiku y obtuvieron callos y brotes de los callos. De sus experimentos pudieron cultivar dos plantas en potes a partir de los callos. El mayor problema que enfrentaron fue la oxidación de los explantes. Al trabajar con tejidos del cormo lograron regenerar seis plantas en potes a partir de callos de estos explantes, a pesar de tener problemas de oxidación de los explantes.

Mascarenhas *et al.* (1990) cultivaron segmentos del nudo de 10 a 15 mm de largo con la yema incluida. Utilizaron el medio MS suplementado con KIN, BAP, agua de coco (AC), sacarosa y agar. Las yemas brotaron entre los 20 y 25 días. Posteriormente se trasladaron a un medio MS líquido suplementado con BAP, KIN, AC, caseína hidrolizada (CH) y sacarosa, para obtener elongación y multiplicación de los brotes. La formación de raíces en los brotes estaba en estudio hasta esa fecha. El medio de arranque solamente sirvió para el brotamiento inicial, ya que si hacían subcultivos en este

mismo medio el material se oxidaba.

Cultivando nudos de *Bambusa arundinacea* en medio MS suplementado con AC, BAP y KIN, Nadgir *et al.* (1984), citados por Rao *et al.* (1989) obtuvieron brotes múltiples en sus cultivos. Los resultados fueron similares cuando cultivaron nudos de *Bambusa vulgaris* y *Dendrocalamus strictus* en el mismo medio. Con *Bambusa ventricosa* se obtuvieron brotes al cultivar nudos en medio MS suplementado con 5 mg/L de BAP, entre 0.1 y 10 mg/L de ANA y 0.3% de carbón activado. Se obtuvieron callos al cultivar entrenudos en medio MS suplementado con 5 mg/L de 2,4-D (Dekkers, 1989, citado por Rao *et al.*, 1989). Se ha obtenido crecimiento de brotes y formación de raíces a partir de nudos de *Dendrocalamus strictus*; los cultivos se hicieron en medio MS suplementados con 1 mg/L de ANA, 1 mg/L de AIB, 0.5 mg/L de 2,4-D y Phloroglucinol (Chaturvedy y Sharma, 1988, citados por Rao *et al.*, 1989).

Dekkers (1989), citado por Rao *et al.* (1989) informó de la formación de callos en cultivos de entrenudos de *Schizostachyum brachycladum* en medio MS suplementado con 10 mg/L de 2,4-D. También observó la formación de callos a partir de entrenudos de *Thyrsostachys siamensis* cultivados en el mismo medio.

Yemas

Manzur (1982) cultivó yemas axilares de *Bambusa* spp.

Utilizó el medio de cultivo MS suplementado con 5 mg/L de ANA y 2 mg/L de KIN, obteniendo un 60% de diferenciación organogénica. Los mayores problemas que enfrentó fueron la oxidación del primordio en el medio de cultivo y la contaminación sistémica del material. Rao y Rao (1990) han obtenido brotes a partir de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* y *Dendrocalamus strictus*. Sin embargo, el porcentaje de cultivos que producen raíces es bastante bajo, entre 4 y 10%. No especificaron el medio de cultivo utilizado en sus experimentos. Huang y Murashige (1983) cultivaron yemas apicales de *Bambusa oldhamii*, *Bambusa multiplex*, *Sasa pygmaea* y *Phyllostachis aurea* en un medio conteniendo sales MS, sacarosa, i-inositol, tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, glicina y agar. Obtuvieron callos vigorosos manteniéndolos en la oscuridad a 27°C. Las dos especies de *Bambusa* generaron callos húmedos, friables, suaves y blanco-cremosos. Los callos de *Sasa* y *Phyllostachys* fueron desde amarillo-cremosos hasta café y de textura nodular a granular. Los callos de *Phyllostachys* se volvieron entre rojizos y morados al ser expuestos a la luz, mientras que los demás mantuvieron su coloración.

Se han obtenido brotes múltiples a partir de yemas axilares. Banik (1987) citado por Rao *et al.* (1989) indujo brotes múltiples a partir de yemas del culmo cultivadas en medio MS suplementado con 1 mg/L de BAP. Esta hormona también ha funcionado en el cultivo de yemas de ramas tanto en medio líquido como sólido (Nagir *et al.*, 1984; Prutpongse y

Gavinlertvatana, 1987, citados por Rao *et al.*, 1989).

Semillas

Rao *et al.* (1985) cultivaron semillas de *Dendrocalamus strictus* en un medio de cultivo B₅ suplementado con 2.21 y 6.63 mg/L de 2,4-D y obtuvieron callos que posteriormente se diferenciaron en embrioides. Estos últimos se transfirieron a un medio B₅ suplementado con 0.1 mg/L de ácido indolbutírico (AIB) y 0.018 mg/L de ANA para su germinación, donde un 40% de los embrioides se desarrollaron en plántulas, sin embargo, 35% de estos no germinaron debido a problemas de oxidación.

Zamora *et al.* (1991) trabajaron en el establecimiento de callos y regeneración de plantas a partir de tejidos de semillas de *Dendrocalamus strictus*. En un 93% de sus cultivos obtuvieron callos embriogénicos utilizando el medio MS suplementado con 2,4-D. Para la regeneración de plántulas utilizaron el medio MS sin la adición de 2,4-D. Esta técnica también ha funcionado en la formación de callos de *Schizostachyum lumampao* a partir de embriones, utilizando medio MS suplementado con 2,4-D. Con esta última especie no pudieron podido regenerar plantas.

Vongvijitra (1990) investigó la posibilidad de obtener brotes a partir de semillas de *Dendrocalamus membranaceus* y *Dendrocalamus brandisii*. En ambas especies se logró obtener brotes en medio MS suplementado con 4.5 mg/L de BAP, se

tuvieron problemas de oxidación en alguna etapa del cultivo y se observaron problemas para el establecimiento de raíces. Rao y Rao (1990) trabajaron con *Bambusa arundinacea*, obteniendo brotes...múltiples a partir de semillas en un 58.4% de los cultivos, utilizando medio B₅ suplementado con 2.25 mg/L de BAP.

Rao *et al.* (1987) obtuvieron embriones somáticos al cultivar semillas de *Dendrocalamus strictus* en el medio B₅ suplementado con 6.63 mg/L de 2,4-D y 0.02 mg/L de ABA. En medio suplementado solo con 2,4-D un 60% de los cultivos produjeron callos embriogénicos. El uso del ácido abscísico (ABA) redujo la formación de callos cuando se usaba solo, aunque al usarse junto con 2,4-D su efecto era similar al efecto del 2,4-D solo. Los embriones que se formaron produjeron brote y raíz y se convirtieron en plantas completas. Estas plantas se transplantaron a bolsas de plástico una vez que formaron rizoma. Al suplementar el medio con ácido 2,4,5 tricloro-fenoxiacético (2,4,5-T) y ácido paraclorofenoxiacético (pCPA) no registraron embriogénesis.

Vongvijitra (1990) realizó un estudio para determinar los medios para la inducción de callos a partir de nudos de plántulas asépticas de *Dendrocalamus membranaceus*. Las plántulas germinaron en medio MS a partir de semillas maduras. Siete días después de la germinación, se aislaron segmentos de nudo de 20 a 25 mm y se cultivaron en medio MS suplementado con 2,4-D (entre 2.21 y 3.31 mg/L) y 0.45 mg/L de BAP. Entre

la sexta y octava semanas, se iniciaron callos entre blanco-amarillentos y café-amarillentos de textura granular y nodular. Los callos pudieron mantenerse por medio de subcultivos ilimitados. Con la dosis más alta de 2,4-D los callos se desarrollaron lentamente con masas suaves y color café oscuro.

Nadgauda *et al.* (1990) en Pune, India, informan haber logrado floración en plántulas de dos especies de bambú cultivadas *in vitro*. El sistema que desarrollaron permite inducir la floración y producir semillas viables y fértiles a partir del cultivo *in vitro* de explantes de inflorescencias. El refinamiento futuro de esta técnica puede llevar a la introducción de programas de mejoramiento de bambúes, así como un mejor entendimiento de los procesos fisiológicos que rigen el comportamiento de la floración en esta especie.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Escuela Agrícola Panamericana.

Material Vegetal

Se utilizó la especie *Dendrocalamus asper*, existente en la Escuela Agrícola Panamericana. Se seleccionó por la abundancia de material vegetal que produce durante todo el año.

Para el trabajo de investigación se aislaron los siguientes tipos de explantes:

1. Yemas axilares:

Las yemas axilares se obtuvieron de los nudos de ramas jóvenes. Las yemas se aislaron con algo del tejido circundante para poder realizar la desinfección.

2. Tejidos de nudos y entrenudos:

Se extrajo tejidos de nudos y entrenudos de ramas jóvenes, éstos también con tejido circundante para poder hacer la desinfección.

Desinfección

Las yemas o nudos se introdujeron en una bolsa pequeña hecha de gasa para evitar que se dispersaran. El procedimiento se ilustra en la Fig. 1. La bolsa con el material se introdujo en alcohol etílico al 70% durante veinte segundos para disolver la cera que recubre los tejidos. Una vez lavada con alcohol, la bolsa se introdujo en 80 ml de solución de hipoclorito de sodio al 0.5% de concentración más 1 gota de Tween 80, que se usa como dispersante y detergente, durante quince minutos; manteniéndose en movimiento constante en un agitador magnético. Después de la desinfección, el material se enjuagó tres veces con agua bidestilada estéril, para eliminar los residuos de hipoclorito de sodio. Estos enjuagues se realizaron en la cámara de transferencia puesta a funcionar 30 minutos antes de utilizarla y desinfectada con alcohol inmediatamente antes de iniciar los enjuagues.

Medios de Cultivo

El medio de cultivo que se utilizó fueron las sales de Murashige y Skoog (1962), suplementado con hormonas y otras sustancias orgánicas. La composición del medio se muestra en el Cuadro 1.

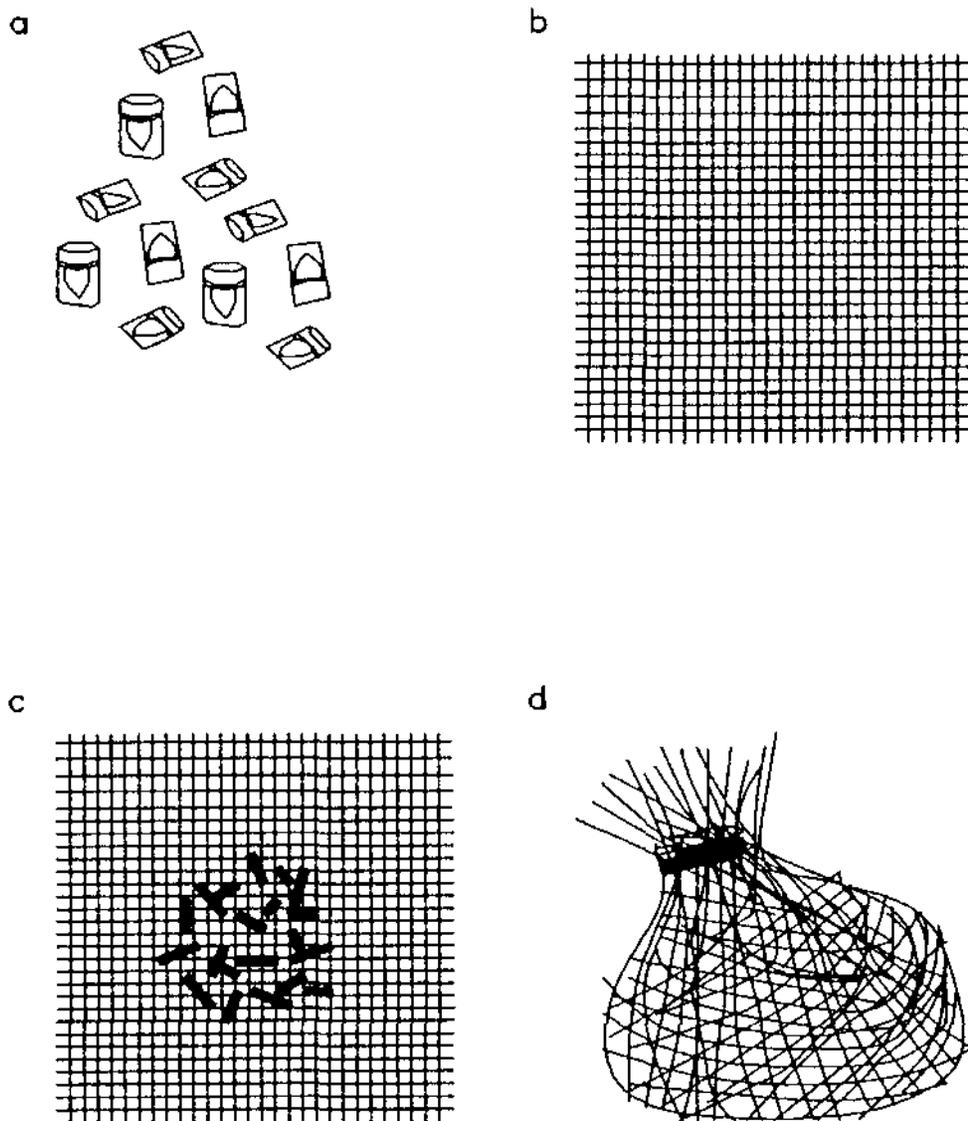


Fig. 1 Procedimiento para desinfectar material vegetal.
a) Tejido del material vegetal para desinfección,
b) gasa de algodón de aproximadamente 6 x 6 cm,
c) colocación del tejido en el centro de la gasa,
d) anudado de la gasa con hilo de la misma, lista para la desinfección.

Cuadro 1. Composición del medio básico de Murashige y Skoog (1962) modificado, utilizado para la propagación *in vitro* de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, 1990-1992.

| Macroelementos | mg/L | Solución madre |
|---|--------|----------------|
| NH ₄ NO ₃ | 1.650 | x 10 |
| KNO ₃ | 1.900 | x 10 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 440 | x 10 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 370 | x 10 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 | x 10 |
| Microelementos | | |
| KI | 0,83 | x 1.000 |
| H ₃ BO ₃ | 6,2 | x 1.000 |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 22,3 | x 1.000 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 8,6 | x 1.000 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0,25 | x 1.000 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,025 | x 1.000 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0,025 | x 1.000 |
| FeNa-EDTA | 37,5 | x 200 |
| Inositol | 100 | |
| Acido nicotínico | 1 | |
| Piridoxina | 1 | |
| Tiamina | 1 | |
| Glicina | 3 | |
| Sacarosa | 30.000 | |
| pH | 5,8 | |

Hormonas

Se usaron tres auxinas y dos citoquininas. Las auxinas fueron el ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). Las citoquininas fueron la kinetina (KIN) y bencilaminopurina (BAP).

El medio de cultivo para cada experimento se preparó utilizando las interacciones de auxina y citoquinina que se

presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Dosis y combinaciones de hormonas utilizadas en los diferentes experimentos para la propagación in vitro de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, 1990-1992.

| Citoquininas (mg/L) | Auxinas (mg/L) | | | | |
|------------------------|----------------|-------|-----|-----|-----|
| | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
| 0 | 0;0 | 0;0,5 | 0;1 | 0;2 | 0;5 |
| 1 | 1;0 | 1;0,5 | 1;1 | 1;2 | 1;5 |
| 2 | 2;0 | 2;0,5 | 2;1 | 2;2 | 2;5 |
| 5 | 5;0 | 5;0,5 | 5;1 | 5;2 | 5;5 |

Preparación de Medios de Cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo se hicieron soluciones madre de los macronutrientes (concentrada 10 veces), micronutrientes (concentrada 1000 veces) y de FeNa-EDTA (concentrada 200 veces). Esto evita la incomodidad de medir cantidades muy pequeñas de algunos reactivos al momento de preparar el medio de cultivo. Para pesar los reactivos sólidos se utilizó una balanza digital con una precisión de 1/10000 de gramo. Para medir volúmenes de reactivos líquidos se utilizaron pipetas de vidrio de 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 ml. En un bocal de 2000 ml se midieron aproximadamente 1200 ml de agua bidestilada manteniéndose en movimiento constante en un agitador magnético. Al bocal se agregó: 100 ml de solución madre de macroelementos, 1 ml de solución madre de microelementos, 5 ml de solución madre de

FeNa-EDTA y el ácido cítrico, inositol, ácido nicotínico, piridoxina, tiamina, glicina y sacarosa según las dosis establecidas en el Cuadro 1. Una vez disueltos los componentes del medio, la solución se vertió en balones aforados de 500 y 1000 ml y utilizando agua bidestilada se aforaron a 500 y 1000 ml respectivamente. Habiéndose completado el volumen final del medio, éste se vertió nuevamente al bocal de 2000 ml. Manteniendo el medio en movimiento constante en el agitador magnético, se ajustó el Ph a 5.8, aumentándolo con una solución 0.1 N de NaOH. Para cada experimento se prepararon 1.5 litros de medio de cultivo básico, el cual se dividió en 4 partes de 375 ml. A cada una de estas partes se le añadió la dosis correspondiente de citoquinina. Posteriormente cada parte se dividió en 5 fracciones de 75 ml y a cada una de éstas se le añadió la dosis correspondiente de auxina. Con este procedimiento se obtuvieron 20 frascos conteniendo 75 ml, uno por cada tratamiento del experimento. El medio de cultivo se transfirió con una jeringa automática a tubos de ensayo de 18 x 150 mm de vidrio con puentes de papel. Se taparon con tapas de plástico. Los tubos habían sido previamente identificados con el número del experimento y del tratamiento. El procedimiento para colocar los puentes de papel en los tubos se ilustra en la Figura 2. De cada tratamiento se obtuvieron 10 tubos con 6 ml de medio de cultivo, considerando a cada tubo como una repetición.

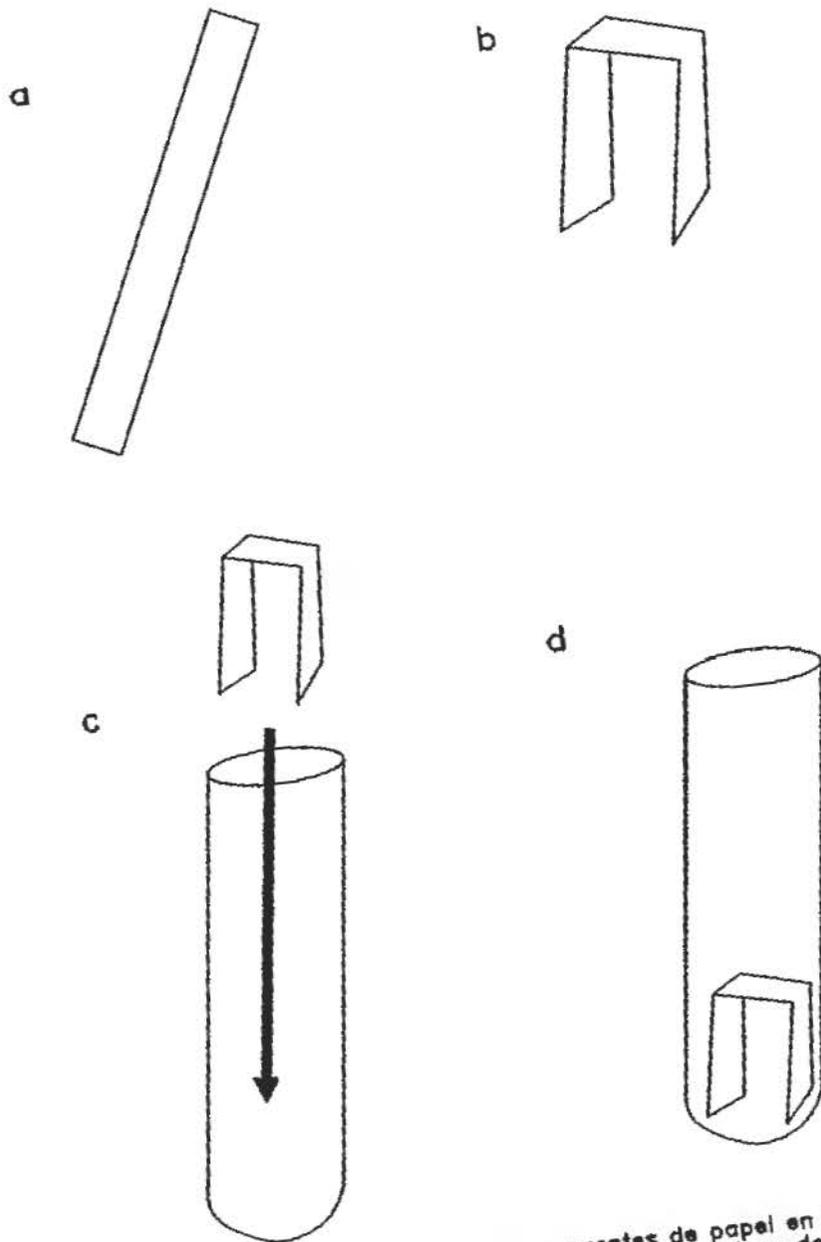


Fig.2 Procedimiento para colocar puentes de papel en los tubos de cultivo: a) papel de filtro sin cenizas de 1 x 7 cm, b) puente de papel elaborado con el papel de filtro sin cenizas, c) colocación del puente de papel en un tubo de 18 x 150 mm, d) tubo con puente listo para utilizarse.

Esterilización

El medio se esterilizó en una autoclave automática a 1.06 kg de presión por cm^2 y 120°C durante 20 minutos. Posteriormente se almacenó en un refrigerador a 4°C .

Cristalería e Instrumentos

Para la preparación de medios se utilizaron bicales de 100, 150, 250, 500, 1000 y 2000 ml; frascos Erlenmeyer de 125 ml; platos de Petri de 11 cm; pipetas de 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 ml; balones volumétricos de 25, 50, 500 y 1000 ml; probetas de 10, 50, 100 250 y 1000 ml; y frascos de 125 ml. Toda la cristalería se lavó con detergente que no deja residuos en el cristal, se enjuagó con agua bidestilada y se secó al aire o en un horno a temperatura constante a 120°C durante 4 horas.

Los instrumentos utilizados fueron pinzas, agujas hipodérmicas, bisturíes y asas de Henley. Las pinzas, bisturíes y asas de Henley se envolvieron en papel de aluminio y se esterilizaron en una autoclave automático a 1.06 kg de presión por cm^2 y 120°C durante 20 minutos. No hubo necesidad de realizar este procedimiento con las agujas hipodérmicas ya que se utilizaron agujas desechables, las cuales se compran esterilizadas y se flamean antes de utilizarlas. Los instrumentos se mantuvieron en la cámara de transferencia sumergidos en alcohol al 95 % en frascos Erlenmeyer de 125 ml. Para utilizar los instrumentos, éstos se flameaban en la llama

de un mechero de alcohol. Antes de utilizarlos, y para no dañar el tejido, los instrumentos se enfriaban en agua bidestilada estéril.

Obtención de Explantes

El tejido esterilizado y enjuagado se disecó en la cámara de transferencia utilizando pinzas, agujas hipodérmicas y bisturíes. La disección se llevó a cabo sobre discos de papel filtro en platos de Petri esterilizados en una autoclave. El uso del papel filtro sobre el plato de Petri facilita el trabajo ya que absorbe el exceso de humedad que se encuentra sobre el tejido que se disecca. La disección se hizo con la ayuda de un estereoscopio desinfectado con alcohol. Por cada plato de Petri se hicieron cuatro o cinco disecciones de yemas y solamente una disección de nudos y entrenudos. A las yemas axilares se les eliminó dos o tres capas de tejido, según el tamaño de la yema. Para aislar explantes de nudos se cortó el nudo dejando 1 mm a cada lado del nudo, el cual se dividió en 4 ó 6 partes iguales, según el diámetro del nudo. Al momento de aislar el nudo, la sección basal del entrenudo también se cortó en secciones de 1 mm para aprovechar el explante que proporcionaba. Cada uno de los explantes se colocó en tubos de ensayo de 18 x 150 mm con medio de cultivo y la tapa se selló con Parafilm®, el cual permite el intercambio de gases entre el interior del tubo y el ambiente

externo, no así la entrada o salida de humedad.

Condiciones Ambientales

Los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 25 más o menos 1°C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz, con una intensidad de 3000 lux.

Metodología

La investigación se llevó a cabo en una serie de experimentos, en los cuales se utilizó el mismo medio de cultivo en combinación con las interacciones de las auxinas y citoquininas. La investigación se orientó hacia las combinaciones hormonales donde se observaron resultados positivos.

Experimento 1

Efecto del ANA y BAP en el cultivo a la luz de yemas axilares de *Dendrocalamus asper* en medio MS modificado.

Se utilizó el medio MS (Cuadro 1) suplementado con 0.8% de agar, la auxina ANA y la citoquinina BAP según las dosis establecidas en el Cuadro 2. Los explantes que se cultivaron fueron yemas axilares de *Dendrocalamus asper*, eliminándoles tres o cuatro brácteas. Los cultivos se colocaron a la luz con

un fotoperíodo de 16 horas.

Experimento 2

Efecto del ANA y BAP en el cultivo por dos semanas en la oscuridad y posteriormente a la luz de yemas axilares de *Dendrocalamus asper* en medio MS modificado.

Como consecuencia de la fuerte oxidación observada en el Experimento 1 se decidió repetirlo, utilizando las mismas sustancias de crecimiento. En el segundo experimento se hizo una modificación al medio de cultivo, añadiendo 150 mg/L de ácido cítrico y utilizando puentes de papel filtro sin cenizas (Fig. 2) en lugar de agar. Los puentes de papel sustituyeron al agar porque el ácido cítrico impide que el agar solidifique el medio de cultivo, además que en un medio de cultivo líquido hay mayor facilidad para la difusión de compuestos fenólicos producidos por la planta.

Los cultivos se incubaron en la oscuridad en la cámara de crecimiento durante las primeras dos semanas y luego se colocaron a la luz.

Experimento 3

Efecto del cultivo de yemas axilares de *Dendrocalamus asper* en oscuridad continua en medio MS modificado con 2,4-D y BAP en la propagación *in vitro* de bambú.

Se utilizó el medio MS suplementado con la auxina 2,4-D y la citoquinina BAP en las dosis establecidas en el Cuadro 2. Este cambio en relación con los experimentos anteriores se debió a los resultados negativos obtenidos, además de alguna indicación en la literatura acerca de la eficacia del 2,4-D y BAP en el cultivo *in vitro* de otras especies de bambú. Se añadió ácido cítrico como agente antioxidante en una dosis de 150 mg/L. Consecuentemente el medio se preparó sin agar utilizando puentes de papel filtro sin cenizas en los tubos. Los explantes que se cultivaron fueron yemas axilares de *Dendrocalamus asper*. Una vez realizados los cultivos, se colocaron en oscuridad continua en la cámara de crecimiento.

Los explantes que formaron callo y que no se oxidaron se transfirieron a medio fresco cuatro meses después de la siembra inicial y se mantuvieron a la luz con un fotoperíodo de 16 horas en la cámara de crecimiento. Los callos grandes se dividieron con el objeto de tener un mayor número de subcultivos.

Experimento 4

Cultivo de yemas axilares de *Dendrocalamus asper* en oscuridad continua en medio MS modificado con AIA y BAP en la propagación *in vitro* de bambú.

El medio de cultivo MS básico se suplementó con 150 mg/L de ácido cítrico y las dosis y combinaciones de ambas hormonas

según el Cuadro 2. El medio se colocó en tubos de ensayo de 18 x 150 mm con puentes de papel filtro sin cenizas. Una vez realizadas las siembras, los cultivos se colocaron en oscuridad continua.

Experimento 5

Cultivo de nudos, entrenudos y yemas axilares de *Dendrocalamus asper* en oscuridad continua en medio MS modificado con 2,4-D y BAP en la propagación *in vitro* de bambú.

En el Experimento 3 se notó que las yemas axilares de *Dendrocalamus asper* generaron callos, algunos de los cuales tenían poca oxidación. Se decidió entonces utilizar el mismo medio de cultivo suplementado con las mismas hormonas, 2,4-D y BAP (Cuadros 1 y 2), para el cultivo de nudos y entrenudos de la misma especie. Al preparar el medio de cultivo se obtuvieron 220 tubos, 11 por cada tratamiento. De los 220 tubos con medio de cultivo, 100 se cultivaron con explantes de nudo, 100 con explantes de entrenudo y los 20 restantes con explantes de yemas axilares. Una vez realizados los cultivos, se colocaron en la cámara de crecimiento en oscuridad continua. Los explantes que formaron callo se transfirieron a medio fresco, eliminándoles la porción oxidada y colocándolos a la luz. Los que no mostraron reacción se transfirieron a medio fresco dos meses después de la siembra inicial.

Experimento 6

Efecto del cultivo de yemas axilares de *Dendrocalamus asper* en oscuridad continua en medio MS modificado con 2,4-D y KIN en la propagación *in vitro* de bambú.

Se utilizó el medio MS suplementado con 150 mg/L de ácido cítrico y las dosis y combinaciones de ambas hormonas según el Cuadro 2. El medio de cultivo se colocó en tubos de 18 x 150 mm con puentes de papel filtro sin cenizas. De cada tratamiento se hicieron 12 repeticiones. Los explantes que se utilizaron fueron yemas axilares de *Dendrocalamus asper*. Las yemas se disecaron sobre platos de Petri con discos de papel filtro remojados en una solución de ácido cítrico al 1%. Este procedimiento se hizo para tratar de evitar la oxidación de los explantes.

Una vez realizadas las siembras, los cultivos se colocaron en la cámara de crecimiento en la oscuridad. Las observaciones se hicieron dos meses después de la siembra inicial.

IV. RESULTADOS

El trabajo siguió un proceso durante el cual cada experimento se basó en los resultados del experimento anterior.

Experimento 1

Cultivo de yemas axilares de *Dendrocalamus asper* a la luz en medio MS modificado con ANA y BAP en la propagación *in vitro* de bambú.

En este experimento un 100% de los explantes se oxidaron en el medio de cultivo. En ninguno de ellos se observó crecimiento. Asimismo, en ninguno de los tratamientos hubo contaminaciones.

Experimento 2

Efecto del ANA y BAP en el cultivo por dos semanas en la oscuridad y posteriormente a la luz de yemas axilares de *Dendrocalamus asper* en medio MS modificado.

Casi todos los cultivos se oxidaron y ninguno formó callo. En el Cuadro 3 se observan los porcentajes de oxidación por tratamiento. Las oxidaciones se presentaron en todos los tratamientos, sin ninguna tendencia que indicara la influencia

de alguna de las sustancias de crecimiento. Los explantes que no se oxidaron se contaminaron con hongos.

Cuadro 3. Porcentajes de oxidaciones en yemas axilares cultivadas por dos semanas en oscuridad y después a la luz, en medio MS modificado con ANA y BAP en la propagación *in vitro* de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1990-1991.

| BAP (mg/L) | ANA (mg/L) | | | | |
|---------------|------------|-----|-----|-----|-----|
| | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
| 0 | 100 | 90 | 90 | 100 | 95 |
| 1 | 95 | 100 | 100 | 95 | 100 |
| 2 | 100 | 100 | 95 | 95 | 95 |
| 5 | 100 | 95 | 100 | 95 | 95 |

Experimento 3

Efecto del cultivo de yemas axilares de *Dendrocalamus asper* en oscuridad continua en medio MS modificado con 2,4-D y BAP en la propagación *in vitro* de bambú.

El grado de oxidación de los explantes fue bastante alto, y se presentaron en todos los tratamientos. En el Cuadro 4 se observa el porcentaje de oxidación de los explantes de cada tratamiento.

Tanto en el 2,4-D solo como en la BAP sola, hubo un alto porcentaje de oxidaciones. En las combinaciones hormonales hubo una leve tendencia a aumentar el porcentaje de oxidación con los aumentos en la concentración del 2,4-D. La mayor parte de los explantes que no se oxidaron se contaminaron con

hongos.

Cuadro 4. Porcentajes de oxidación de yemas axilares cultivadas en oscuridad continua en medio MS modificado con 2,4-D y BAP en la propagación *in vitro* de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991.

| BAP (mg/L) | 2,4-D (mg/L) | | | | |
|---------------|--------------|-----|-----|-----|-----|
| | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
| 0 | 80 | 90 | 100 | 80 | 100 |
| 1 | 100 | 70 | 90 | 70 | 90 |
| 2 | 100 | 70 | 80 | 100 | 80 |
| 5 | 100 | 60 | 60 | 60 | 90 |

En muchos de los tratamientos hubo formación de callos. Estos fueron inicialmente amarillo-cremosos, aunque al poco tiempo de su formación muchos de ellos se oxidaron. En el Cuadro 5 se observan los porcentajes de callos por tratamiento.

Cuadro 5. Porcentajes de callo de yemas axilares en medio MS suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y BAP en la propagación *in vitro* de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991.

| BAP (mg/L) | 2,4-D (mg/L) | | | | |
|---------------|--------------|-----|----|----|----|
| | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
| 0 | 40 | 20 | 50 | 40 | 30 |
| 1 | 80 | 20 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 90 | 40 | 10 | 0 | 10 |
| 5 | 80 | 30 | 40 | 10 | 0 |

En la ausencia de BAP, se formó callo en los tratamientos con las diferentes dosis de 2,4-D. De la misma forma en

ausencia de 2,4-D, se formó callo en todas las dosis de BAP. En las combinaciones de ambas hormonas, algunos tratamientos formaron callo, llegando a 40% en el mejor de los casos, pero otros no formaron. En la Fig. 3 se muestran los efectos de las diferentes dosis de 2,4-D en el desarrollo de callos.

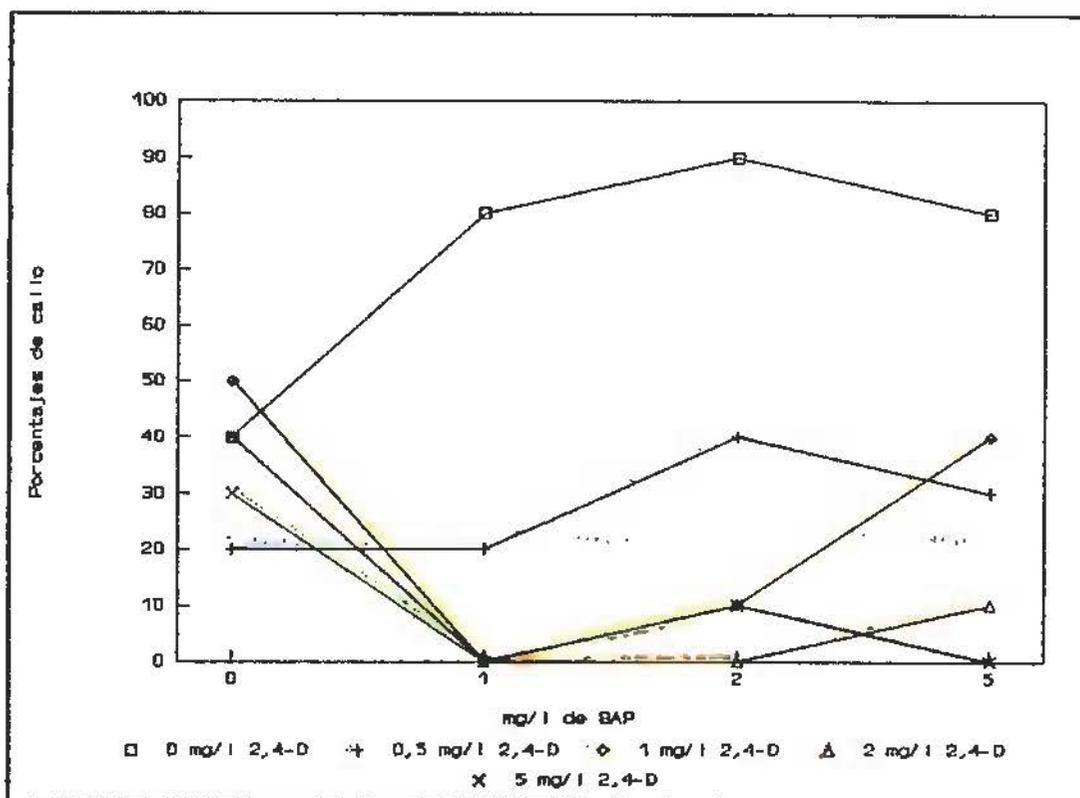


Fig. 3. Porcentajes de callo en yemas axilares cultivadas en medio MS modificado con distintas dosis de 2,4-D y BAP.

El testigo absoluto (0 mg/L de ambos reguladores) formó 40% de callos. Algunos tratamientos superaron este porcentaje, pero otros tratamientos mostraron porcentajes menores o no formaron callos. En ausencia de 2,4-D se notó una tendencia hacia el aumento en el porcentaje de callos con cada

incremento en la dosis de BAP, aunque llegó a declinar con la dosis más alta (5 mg/L de BAP). Con 0,5 mg/L de BAP el porcentaje de callos es bajo, entre 20 y 50%. Las dosis de 1,2 y 5 mg/L de 2,4-D tuvieron respuestas muy similares, produciendo entre 30 y 50% de callos en ausencia de BAP pero disminuyendo al estar presente la citoquinina. Con la dosis más alta de ambos reguladores no hubo formación de callos.

La mayor parte de los subcultivos se oxidaron al exponerse a la luz, pero en algunos casos hubo crecimiento.

En el tratamiento con 5 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BAP sobrevivió un callo de la siembra inicial, el cual se subdividió en dos callos pequeños que se colocaron a la luz. Ambos se multiplicaron y formaron masas friables, amarillo-cremosas y con zonas verdes. A los tres meses del subcultivo emergió un brote de uno de estos callos, y un mes después se observaron yemas adventicias y raíces pequeñas en muchas zonas, aunque no directamente en la base del brote (Fig 4).

El otro callo generó yemas adventicias a los cinco meses del subcultivo, muy similares a la observada en el que generó el brote. Estas yemas se encuentran bajo observación (Fig. 5).

Otro caso específico fue el del tratamiento con 0,5 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BAP, del cual se colocaron tres callos a la luz después de la transferencia a medio fresco. Dos se oxidaron, y uno de ellos formó una masa compacta, amarillo-cremosa. Del callo brotaron raíces a los cuatro meses de la transferencia y se oxidó un mes después (Fig. 6).



Fig. 4. Brota de *Dendrocalamus asper* formada de un callo de vena axilar cultivada en medio MS modificado con 5 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BAP.



Fig. 3. Callus con zonas necróticas de *Senecioideus joppe* formado de una yema axilar cultivada en medio MS suplementado con 5 mg/l. de 2,4-D y 2 mg/l. de BAP.



Fig. 6. Belle con raíces foradas del cultivo de una yema axilar en medio MS enriquecida con 0,5 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BAP. Se puede observar que la oxidación fue total.

En el tratamiento con 1 mg/L de 2,4-D y 5 mg/L de BAP se transfirieron cinco callos a medio fresco (provenientes de cuatro callos de la siembra original). De estos, uno se desarrolló en un callo grande, compacto, de color amarillo-cremoso y con zonas verdes. A los cuatro meses del subcultivo se oxidó.

El crecimiento de raíces se observó en callos cultivados en dosis iguales o superiores a los 2 mg/L de BAP y entre 0,5 y 5 mg/L de 2,4-D. La formación de brotes ocurrió en explantes cultivados con la dosis más alta de 2,4-D (5 mg/L) y con 2 mg/L de BAP.

Experimento 4

Cultivo de yemas axilares de *Dendrocalamus asper* en oscuridad continua en medio MS modificado con AIA y BAP en la propagación *in vitro* de bambú.

El mayor problema que se tuvo en este experimento fue la oxidación de los explantes en el medio de cultivo, a pesar de las medidas que se tomaron tratando de evitarla.

En el Cuadro 6 se observan los porcentajes de oxidación de los diferentes tratamientos.

Las oxidaciones no mostraron ninguna tendencia relacionada con las diferentes dosis y combinaciones de AIA y BAP. A pesar de las oxidaciones, algunos explantes llegaron a formar callos (Fig. 7), pero otros no formaron callo ni se



Fig. 7. Callo oxidado, formado del cultivo de una yema axilar en medio MS modificado con AIA y BAP.

oxidaron. En el Cuadro 7 se observan los porcentajes de formación de callos en los diferentes tratamientos.

Cuadro 6. Porcentajes de oxidación de yemas axilares de *Dendrocalamus asper* cultivadas en medio MS suplementado con diferentes dosis de AIA y BAP en la propagación *in vitro* de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991.

| BAP (mg/L) | AIA (mg/L) | | | | |
|---------------|------------|-----|----|----|----|
| | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
| 0 | 60 | 60 | 90 | 90 | 80 |
| 1 | 40 | 50 | 40 | 80 | 80 |
| 2 | 60 | 60 | 60 | 50 | 50 |
| 5 | 60 | 80 | 60 | 60 | 40 |

Cuadro 7. Porcentajes de callo en explantes de yemas axilares cultivadas en medio MS suplementado con AIA y BAP en la propagación *in vitro* de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991.

| BAP (mg/L) | AIA (mg/L) | | | | |
|---------------|------------|-----|----|----|----|
| | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
| 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 10 | 10 | 10 | 20 | 0 |
| 2 | 10 | 50 | 40 | 40 | 20 |
| 5 | 30 | 20 | 10 | 20 | 20 |

En la ausencia de BAP, las distintas dosis de AIA no formaron callo, excepto por uno en el tratamiento con 0,5 mg/L de AIA, que se oxidó a los pocos días de iniciar su crecimiento. Sin el AIA los cultivos tuvieron un bajo porcentaje de formación de callos, el cual aumentó con los incrementos en la dosis de BAP, llegando a un 30% con la dosis

más alta de BAP, 5 mg/L. En las combinaciones de ambas sustancias de crecimiento el porcentaje de callos fluctuó entre 0 y 50%, y no hubo tendencias en estos porcentajes.

En la Fig. 8 se observan las respuestas en cada nivel de BAP con diferentes dosis de AIA.

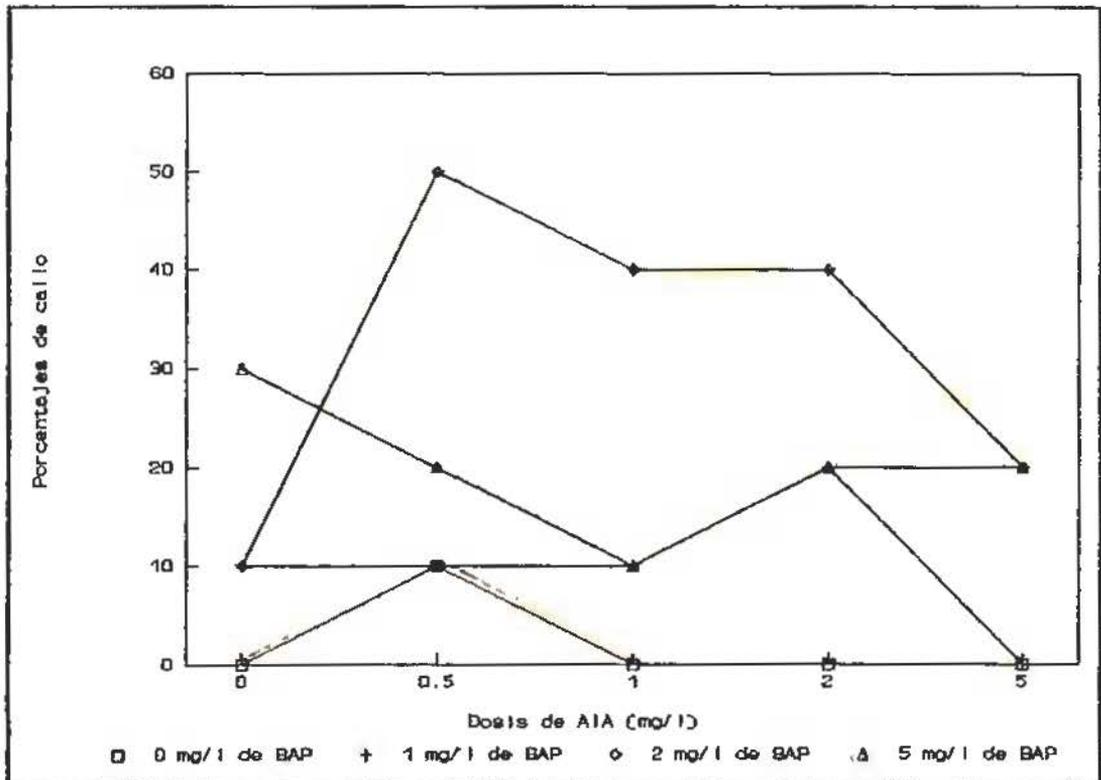


Fig. 8. Porcentajes de callo en yemas axilares cultivadas en medio MS modificado con distintas dosis de AIA y BAP.

En ausencia de BAP no hubo formación de callos, excepto por un caso aislado en la dosis de 0,5 mg/L de BAP. Con 1 mg/L de BAP, los porcentajes de callo fueron bajos con dosis bajas de AIA (0, 0,5 y 1 mg/L), con 2 mg/L de AIA el porcentaje subió a 20%, pero con 5 mg/L no hubo formación de callos. La

mejor respuesta se obtuvo con 2 mg/L de BAP, alcanzando entre 40 y 50% de callos con las dosis de 0,5, 2 y 5 mg/L de AIA. La dosis más alta de AIA produjo pocos callos con las diferentes dosis de BAP, fluctuando entre 10 y 30%. El porcentaje más alto lo produjo en la ausencia de AIA.

Experimento 5

Cultivo de nudos, entrenudos y yemas axilares de *Dendrocalamus asper* en oscuridad continua en medio MS modificado con 2,4-D y BAP en la propagación *in vitro* de bambú.

Nudos

Al cultivar explantes de nudos, no se desarrollaron callos en ningún tratamiento. En todos los tratamientos hubo oxidación de los explantes (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentajes de oxidación de nudos de *Dendrocalamus asper* cultivados en oscuridad continua en medio MS suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y BAP en la propagación *in vitro* de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991.

| BAP (mg/L) | 2,4-D (mg/L) | | | | |
|---------------|--------------|-----|----|-----|----|
| | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
| 0 | 80 | 100 | 80 | 100 | 80 |
| 1 | 80 | 80 | 60 | 60 | 60 |
| 2 | 60 | 60 | 80 | 80 | 80 |
| 5 | 80 | 60 | 60 | 60 | 80 |

Los mayores porcentajes de oxidación se produjeron en

ausencia de BAP, aunque no estuvieron relacionados a la dosis de 2,4-D. En las combinaciones de ambos reguladores, los porcentajes de oxidación fueron similares, variando entre 60 y 80%.

Hubo algunos explantes que no se oxidaron pero que no reaccionaron de manera alguna. Estos no se presentaron en los tratamientos que carecían de BAP, pero sí en varias de las combinaciones de ambas hormonas (Cuadro 9).

Cuadro 9. Porcentajes de nudos de *Dendrocalamus asper* que no mostraron reacción al cultivarse en oscuridad continua en medio MS suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y BAP en la propagación *in vitro* de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991.

| BAP (mg/L) | 2,4-D (mg/L) | | | | |
|---------------|--------------|-----|----|----|----|
| | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| 2 | 20 | 20 | 20 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 40 | 40 | 0 | 20 |

Todos los explantes que no mostraron reacción se oxidaron al transferirse a medio fresco y exponerse a la luz.

En muchos tratamientos hubo contaminación con hongos. En el Cuadro 10 se aprecian los porcentajes de contaminación en los cultivos.

No se nota ninguna tendencia en las contaminaciones con relación a las sustancias de crecimiento. Los explantes contaminados se presentaron en muchos de los tratamientos,

llegando en algunos a 40%.

Cuadro 10. Porcentajes de contaminación en nudos de *Dendrocalamus asper* cultivados en oscuridad continua en medio MS suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y BAP en la propagación *in vitro* de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991.

| BAP (mg/L) | 2,4-D (mg/L) | | | | |
|---------------|--------------|-----|----|----|----|
| | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
| 0 | 20 | 0 | 20 | 0 | 20 |
| 1 | 20 | 0 | 40 | 20 | 20 |
| 2 | 20 | 20 | 0 | 20 | 20 |
| 5 | 0 | 40 | 0 | 40 | 20 |

Entrenudos

Al cultivar entrenudos se desarrollaron callos en algunos tratamientos, aunque el porcentaje de explantes oxidados fue mayor que en el cultivo de nudos. En el Cuadro 11 se presentan los porcentajes de oxidación en cada tratamiento.

Cuadro 11. Porcentajes de oxidación en entrenudos de *Dendrocalamus asper* cultivados en oscuridad continua en medio MS suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y BAP en la propagación *in vitro* de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991.

| BAP (mg/L) | 2,4-D (mg/L) | | | | |
|---------------|--------------|-----|-----|-----|-----|
| | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 80 | 100 |
| 1 | 100 | 100 | 80 | 100 | 100 |
| 2 | 100 | 60 | 100 | 100 | 100 |
| 5 | 100 | 80 | 60 | 100 | 80 |

En muchos de los tratamientos la oxidación fue total, sin

distinción del regulador de crecimiento en el medio de cultivo. Dos tratamientos tuvieron 60% de oxidación, pero la mayoría tuvieron entre 80 y 100%.

En algunos tratamientos se desarrollaron callos en los explantes (Cuadro 12).

Cuadro 12. Porcentajes de callo en explantes de entrenudos cultivados en medio MS suplementado con 2,4-D y BAP en la propagación *in vitro* de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991.

| BAP (mg/L) | 2,4-D (mg/L) | | | | |
|---------------|--------------|-----|----|----|----|
| | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
| 0 | 0 | 0 | 60 | 60 | 80 |
| 1 | 20 | 20 | 20 | 0 | 40 |
| 2 | 40 | 0 | 0 | 40 | 40 |
| 5 | 40 | 60 | 0 | 0 | 20 |

La Fig. 9 muestra las tendencias en el desarrollo de callos con cada dosis de BAP como respuesta a las diferentes dosis de 2,4-D.

En ausencia de 2,4-D se nota una tendencia hacia el aumento en los porcentajes de callo al incrementar la dosis de BAP. En la ausencia de BAP, las diferentes dosis de 2,4-D mostraron una tendencia a aumentar los porcentajes de callo con los aumentos en la dosis del regulador de crecimiento. En las combinaciones de ambas hormonas no hubo tendencia alguna en la formación de callos, aunque si había diferencias entre algunos tratamientos.

obtuvieron entre 4 y 10% de regeneración de plantas. Manzur (1982) trabajó con *Rambusa* spp., obteniendo 60% de diferenciación organogénica. Estos investigadores utilizaron yemas axilares con fragmentos de nudo y entrenudo. Esta diferencia en el tamaño y composición histológica del explante pudo haber sido la causa de la diferencia en la respuesta obtenida en el presente trabajo en relación con los trabajos de Rao y Rao y Manzur.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se podría cultivar yemas axilares en un medio de cultivo que genere un elevado porcentaje de callos, y luego transplantarlos a otro que permita la regeneración de plantas. A pesar del bajo porcentaje de regeneración observado (20%), esta técnica es más eficiente que la propagación vegetativa tradicional mediante estacas, ya que no es necesario fragmentar una caña para obtener propágulos como indican Widmer (1990a), Calidonio (1991) y Dajun y Shap-Jin (1987). Mediante el cultivo de tejidos, la multiplicación de plantas se basaría en la propagación de yemas axilares provenientes de ramas secundarias o terciarias. Con los resultados obtenidos se podría regenerar alrededor de 500 plantas por año, partiendo de una rama terciaria de *Dendrocalamus asper*.

VI. CONCLUSIONES

El bambú *Dendrocalamus asper* se puede propagar mediante técnicas de cultivos *in vitro*.

El cultivo *in vitro* de yemas axilares de *Dendrocalamus asper* es más eficiente que la propagación vegetativa tradicional, ya que el potencial de regeneración es de alrededor de 500 plantas por año partiendo de una rama terciaria, sin necesidad de fragmentar las cañas de la planta.

En *Dendrocalamus asper* los mejores explantes para la propagación *in vitro* son las yemas axilares de ramas en crecimiento activo.

El medio de cultivo de Murashige y Skoog modificado es adecuado para la propagación *in vitro* de *Dendrocalamus asper*.

El 2,4-D es la auxina más eficaz en la producción de callos de *Dendrocalamus asper*.

La citoquinina BAP produce los mejores resultados en el cultivo *in vitro* de *Dendrocalamus asper*.

Para la producción de callos no es necesaria una combinación de auxinas y citoquininas.

Para la regeneración de plantas es necesaria la combinación de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo.

VIII. LITERATURA CITADA

- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Amsterdam, Holanda, Elsevier. p.18.
- CALIDONIO, A. 1991. Estudio de diferentes formas de propagación asexual en el cultivo de bambú *Dendrocalamus strictus*. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. pp. 21-25.
- DAJUN, W.; SHAP-JIN, S. 1987. Bamboos of China. Portland, Oregon, EE.UU. Timber Press. pp. 153-158.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A.; OJIMA, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- GUTIERREZ, J.A. 1990. Industria del bambú: una alternativa para la vivienda y el desarrollo rural integrado, en Costa Rica y el resto de la región. *El Chasqui* 23:2-3.
- HEISER Jr., C.B. 1973. Seed to civilization. The story of man's food. San Francisco, Calif. EE.UU. Freeman. p.71.
- HUANG, L.C.; MURASHIGE, T. 1983. Tissue culture investigations of bamboo. 1. Callus cultures of *Bambusa*, *Phyllostachys* and *Sasa*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 24:31-52.
- LIESE, W. 1985. Bamboos- biology, silvics, properties, utilization. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, Eschborn, W. Germany. 132 p.
- MANZUR, M.D. 1982. Cultivo *in vitro* de *Bambusa* a partir de meristemas axilares. Hojas mimeografiadas. Universidad de Caldas. Manizales, Colombia. 4 p.
- MASCARENHAS, A.F.; NADGIR, A.L.; THENGANES, S.R.; PHADKE, C.H.; KHUSPE, S.S.; SHIRGURKAR, M.V.; PARASHARAMI, V.A.; NADGAUDA, R.S. 1990. Potential application of tissue culture for propagation of *Dendrocalamus strictus*. In International Bamboo Workshop (1988, Cochin, India). Proceedings. India, Kelala Forest Research Institute. p.159-166.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

- NADGAUDA, R.S.; FARASHARAMI, V.A.; MASCARENHAS, A.F. 1990. Precocious flowering and seeding behaviour in tissue-cultured bamboos. *Nature (G.B.)* 344:335-336.
- PURSEGLOVE, J.W. 1972. *Tropical crops: Monocotyledons 1.* Londres, Inglaterra, Longman. pp. 129-132.
- RAO, I.U.; RAO, I.V.R.; NARANG, V. 1985. Somatic embryogenesis and regeneration of plants in the bamboo *Dendrocalamus strictus*. *Plant Cell Reports* 4:191-194.
- _____, I.U.; NARANG, V.; RAO, I.V.R. 1987. Plant regeneration from somatic embryos of bamboo and their transplantation to soil. *In Proc. Symposium on Plant Micropropagation in Horticultural Industries: Preparation, Hardening and Acclimatization Processes, Belgium.* pp 101-107.
- RAO, I.V.R.; YUSOFF, A.M.; RAO, A.N.; SASTRY, C.B. 1989. Propagation of bamboo and rattan through tissue culture. *IDRC Bamboo and Rattan Research Network.* 60 p.
- _____, I.V.R.; RAO, I.U. 1990. Tissue culture approaches to the mass-propagation and genetic improvement of bamboos. *In International Bamboo Workshop (1988, Cochin, India). Proceedings.* India, Kelala Forest Research Institute. p.151-158.
- SCHENK, R.V.; HILDEBRANDT, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50:199-204.
- TORRE, D. 1990. El cultivo de la guadua. *Agricultura de las Américas* 39(3):5-10.
- VONGVIJITRA, R. 1990. Traditional vegetative propagation and tissue culture of some Thai Bamboos. *In International Bamboo Workshop (1988, Cochin, India). Proceedings.* India, Kelala Forest Research Institute. p.148-150.
- WIDMER, I. 1990a. Los bambúes: Biología, cultivo, manejo, usos. *El Chasqui* 23:5-32.
- _____, I. 1990b. Situación del bambú en América Latina, con énfasis en América Central y Costa Rica. *El Chasqui* 24:14-23.
- ZAMORA, A.B. 1991. Bamboo propagation through tissue culture in the Philippines. *American Bamboo Society Newsletter* 12(1):3-4.

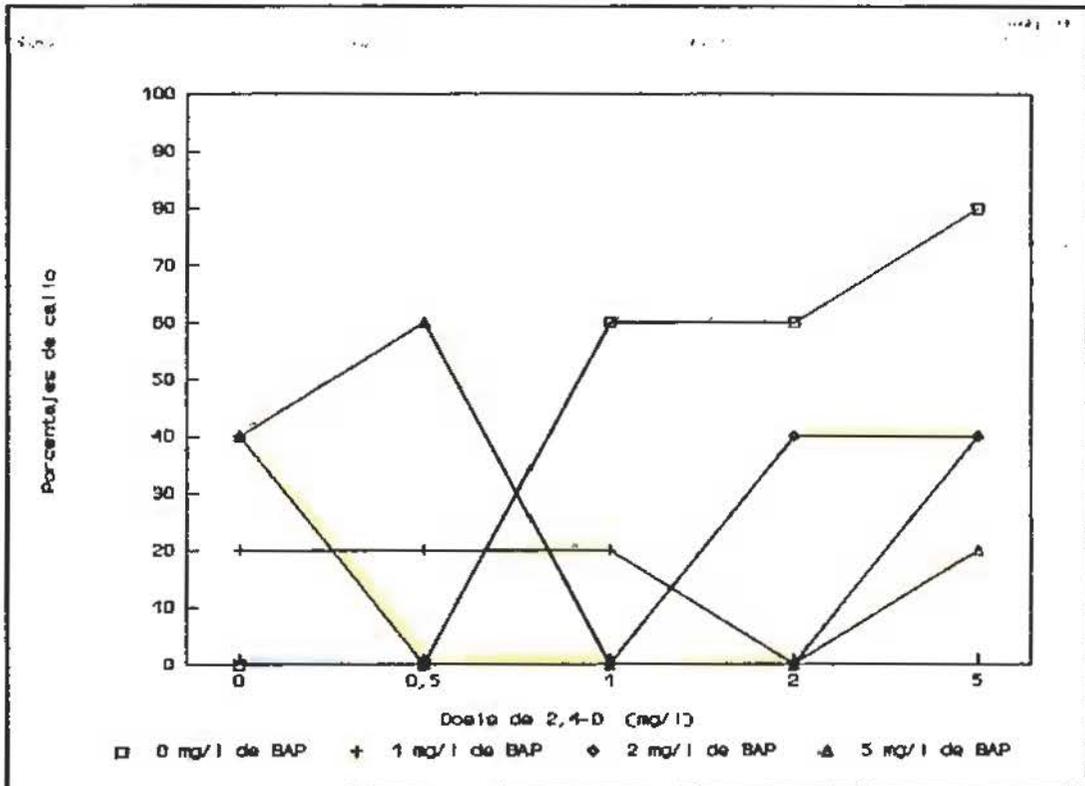


Fig. 9. Porcentajes de callo a partir de entrenudos cultivados en medio MS modificado suplementado con 2,4-D y BAP.

Todos los callos de entrenudo transferidos a medio fresco se oxidaron al ser expuestos a la luz.

El porcentaje de contaminaciones en los tubos fue bajo (5%), considerando que el material proviene del campo.

Yemas axilares

Todos los explantes se oxidaron. Dos explantes formaron callo con raíces, uno con la combinación de 0,5 mg/L de 2,4-D y 2 mg/L de BAP, y el otro con las dosis de 1 mg/L de 2,4-D y 5 mg/L de BAP.

Experimento 6

Efecto del cultivo de yemas axilares de *Dendrocalamus asper* en oscuridad continua en medio MS modificado con 2,4-D y KIN en la propagación *in vitro* de bambú.

En este experimento se trató de probar la eficacia del 2,4-D en combinación con la citoquinina KIN.

Se tuvieron problemas con oxidación de los explantes. En el Cuadro 13 se muestran los porcentajes de oxidación por tratamiento.

Cuadro 13. Porcentajes de oxidación de yemas axilares de *Dendrocalamus asper* cultivadas en medio MS suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y KIN en la propagación *in vitro* de bambú. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991.

| KIN (mg/L) | 2,4-D (mg/L) | | | | |
|---------------|--------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
| 0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 91.7 | 100.0 |
| 1 | 100.0 | 100.0 | 83.3 | 100.0 | 100.0 |
| 2 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| 5 | 84.6 | 91.7 | 83.3 | 75.0 | 91.7 |

Las oxidaciones se presentaron en todos los tratamientos. Con la dosis más alta de KIN, el porcentaje de oxidación de los cultivos fue menor que con las otras dosis, aunque la diferencia fue pequeña.

Algunos tratamientos produjeron callos. En el Cuadro 14 se presentan los porcentajes de callo en los distintos

tratamientos, y en la Fig. 10 se notan las tendencias de las dosis de 2,4-D con los diferentes niveles en la dosis de KIN.

Cuadro 14. Porcentajes de callo en explantes de yemas axilares cultivadas en medio MS suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y KIN. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, 1991.

| KIN (mg/L) | 2,4-D (mg/L) | | | | |
|---------------|--------------|------|------|------|-----|
| | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 5 |
| 0 | 25.0 | 33.3 | 33.3 | 50.0 | 0.0 |
| 1 | 75.0 | 8.3 | 8.3 | 8.3 | 0.0 |
| 2 | 83.3 | 50.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 5 | 84.6 | 33.3 | 8.3 | 0.0 | 8.3 |

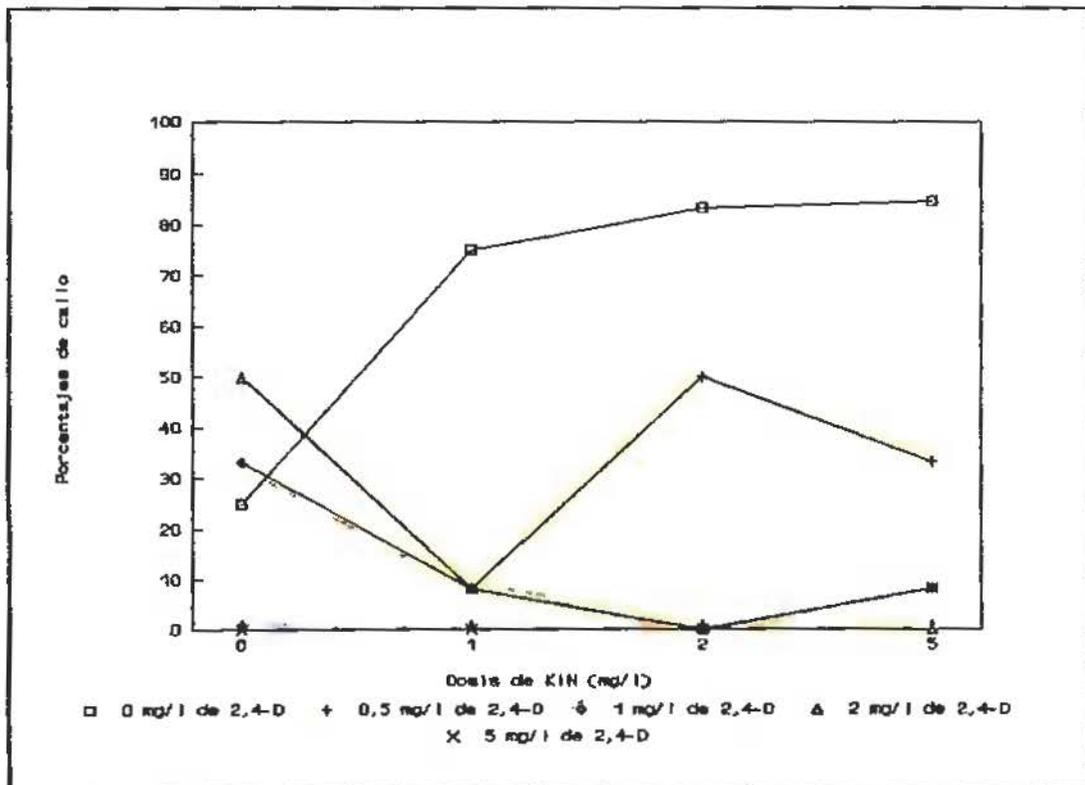


Fig. 10. Porcentajes de callo en yemas axilares cultivadas en medio MS modificado con diferentes dosis de 2,4-D y KIN.

En ausencia del 2,4-D el porcentaje de callo aumentó con la dosis de KIN. Cuando se aplicó 2,4-D solo, también hubo un aumento en el porcentaje de callo hasta la dosis de 2 mg/L. Con la dosis de 5 mg/L de 2,4-D no hubo formación de callo, excepto por uno producido con la dosis de 5 mg/L de KIN.

Hubo rizonogénesis en un callo cultivado sin 2,4-D y con 2 mg/L de KIN. Este callo se oxidó antes de la transferencia a medio fresco.

En este experimento se presentó contaminación con hongos en algunos explantes pero el porcentaje fue bajo (5%).

V. DISCUSION

El mayor problema que se observó durante la investigación fue la oxidación de los explantes en todos los experimentos. Estos resultados son similares a los obtenidos por varios autores (Manzur, 1982; Mascarenhas *et al.*, 1990; Vongvijitra, 1990; Zamora, 1991). Todos ellos informan de porcentajes altos de oxidación en sus trabajos, orientándolos hacia la prevención o reducción de las oxidaciones en los cultivos.

En el Experimento 1 todos los explantes se oxidaron. El exponer los cultivos a la luz influyó en la oxidación de sustancias fenólicas exudadas por el explante. A partir del Experimento 2 se decidió añadir ácido cítrico al medio como componente en los experimentos subsiguientes porque la literatura indica que tiene algún efecto como agente antioxidante (Bhojwani y Razdan, 1983). También se decidió cultivar los explantes durante dos semanas en la oscuridad antes de exponerlos a la luz. Este procedimiento resultó ineficaz, ya que los porcentajes de oxidación fueron cercanos al 100% (Cuadro 3).

En el Experimento 3 se decidió mantener los cultivos en oscuridad continua. Esto redujo las oxidaciones en algunos tratamientos, aunque el porcentaje fue alto (Cuadro 4). Este procedimiento se mantuvo en los Experimentos 4 y 5.

Tanto en el Experimento 4 como en el 5, la mayor parte de

los cultivos se oxidaron (Cuadros 6, 8 y 11). Tratando de contrarrestar este efecto negativo, en el Experimento 6 los explantes se disecaron en una solución débil de ácido cítrico. Los resultados de aplicar esta técnica fueron negativos, ya que los porcentajes de oxidación alcanzaron el 100% en casi todos los tratamientos (Cuadro 13). Los menores porcentajes de oxidación se obtuvieron aplicando la técnica descrita para los Experimentos 3, 4 y 5, aunque resultan inadecuadas para la multiplicación de la especie a gran escala.

De las auxinas, el 2,4-D resultó ser la más eficaz para la inducción de callo en los explantes, en las dosis de 1 y 2 mg/L. No se pudo establecer una comparación con el efecto del ANA en los Experimentos 1 y 2 debido a la oxidación que hubo en ambos. En relación con el AIA, el 2,4-D generó más callo en los experimentos en que se usó (Experimentos 3 y 6) al cultivar el mismo tipo de explante. En el Experimento 3 se observó mayor formación de callo en los explantes que en el Experimento 6. Esto aparentemente tuvo relación con el estado fisiológico de la planta donadora de los explantes. El Experimento 3 se realizó al inicio de la estación lluviosa, que es la época de crecimiento activo para *Dendrocalamus asper*. El Experimento 6 se realizó a mediados de la estación seca cuando el crecimiento activo ha cesado. Esta diferencia fisiológica de la planta probablemente tuvo efecto en la formación de callo en los explantes.

De las citoquininas que se probaron, la BAP resultó mejor

que la KIN para la inducción de callos. Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar las dosis de 2 y 5 mg/L de BAP. En el cultivo de yemas axilares, el uso de BAP en el Experimento 3 generó un mayor porcentaje de callos que usando KIN en el Experimento 6.

El tiempo para la formación de callos fue rápido. Todos los explantes que formaron callos en los distintos experimentos lo hicieron en un período cercano a los 60 días.

Entre los diferentes tipos de explantes, las yemas axilares fueron las que mejor respondieron. Utilizando estos explantes se regeneraron plantas, lo cual no se logró utilizando nudos o entrenudos. En el cultivo de entrenudos se obtuvo mayor producción de callos con dosis altas de 2,4-D. Esto concuerda con lo obtenido por otros investigadores (mencionados por Rao *et al.*, 1989). Al cultivar nudos en el Experimento 5, no se formó callo en ningún tratamiento. Sin embargo, Rao *et al.* (1989) citan a varios investigadores que han obtenido brotes en cultivos de nudos en otras especies de bambú.

En ningún experimento se observó organogénesis directa del explante, sino que los brotes obtenidos se desarrollaron a través de la formación de un callo inicial. En el Experimento 3 se generaron plantas a partir de callo. Estas se desarrollaron tres meses después de un subcultivo y trasplante a medio fresco. Esto representó un 20% de regeneración de plantas. En *D. strictus*, del mismo género, Rao y Rao (1990)