

**Instituto Tecnológico de Costa Rica
Vicerrectoría de Investigación y Extensión
de Dirección de Proyectos**



TEC

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Centro de Investigación en Biotecnología

***Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris*
(Bambú amarillo)***

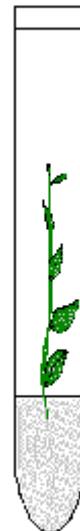
Alejandro Hernández Soto

Andrés Gatica Arias

Estudiantes De Ingeniería en Biotecnología

Profesora Maritza Guerrero

Profesor Asesor



2001



Un sincero agradecimiento

Profesora Maritza Guerrero, coordinadora de este proyecto, por su conducción y consejo en cada una de las etapas del estudio.

M.Sc Ana Abdelnour, Directora del Centro de Investigación en Biotecnología, por su gentileza y sugerencias que permitieron enriquecer el presente trabajo.

Lic. *Vicente Gómez*, Director de Proyectos y la secretaria *Kathya Calderón* por su cortesía, confianza y apoyo en este proyecto.

Tabla de contenidos

| | |
|-----------------------------------------------|-----------|
| RESUMEN | 4 |
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 6 |
| MERISTEMOS APICALES | 6 |
| MERISTEMOS OBTENIDOS A PARTIR DE RIZOMA | 7 |
| ENTRENUDOS | 8 |
| RESULTADOS | 9 |
| MERISTEMOS APICALES DE TALLO | 9 |
| MERISTEMOS OBTENIDOS A PARTIR DE RIZOMA | 11 |
| ENTRENUDOS | 14 |
| DISCUSIÓN | 15 |
| CITAS BIBLIOGRÁFICAS | 19 |
| FOTOS DE INTRODUCCIONES | 24 |

Resumen

La especie *Bambusa vulgaris* (bambú) representa un recurso de suma importancia para la industria del papel, la artesanía y la construcción, sin embargo las técnicas tradicionales de propagación no permiten la multiplicación en corto tiempo. El cultivo de tejidos representa una opción para la propagación de *B. vulgaris*. En la presente investigación tiene como objetivo el establecimiento aséptico *in vitro* de la especie mencionada. Para ello se realizaron ensayos con tres diferentes explantes: meristemos de tallo, meristemos de rizoma y entrenudos; se aplicaron múltiples tratamientos de desinfección con cloro, alcohol, antibióticos, fungicidas y bactericidas en medios de cultivo MS (1962), a pH 5,7 sin antioxidante, con PVP o carbón activado, en estado sólido o líquido, 20 % de sacarosa. Los meristemos de rizoma respondieron mejor a la desinfección y condiciones *in vitro*, presentando una oxidación controlable al utilizar medio líquido complementado con Carbón activado (1g/L). Los meristemos apicales se oxidaron en su totalidad. Los entrenudos presentaron una contaminación total por hongos pero no oxidación. El tratamiento que resultó efectivo para la desinfección y control de la oxidación fue aquel en el que se empleó 1 hora mixto Amoxicilina (100mg/L), Ampicilina (100mg/L) y Kilol y Kasumin 1:1 (2 ml/l), 10 minutos en alcohol al 70%, 3 lavados en cámara en medio líquido MS a la mitad complementado con carbón activado.

Palabras clave: Bambú, *Bambusa vulgaris*, *in vitro*, cultivo de tejidos.

Introducción

El bambú se clasifica dentro de la familia de las Poaceae, subfamilia Bambusoide (Calderón y Soderstrom, 1976, citado por Murillo y Montiel, 1998), es una especie perenne, de crecimiento continuo, herbácea o leñosa, generalmente hueca, pero muy sólida en los nudos, es por estas características que son objeto de aprovechamiento por el hombre. (Flores *et al*, 1998)

El uso de esta especie tiene sus orígenes desde los comienzos de la Humanidad con el fin de satisfacer necesidades básicas de caza y pesca, instrumentos musicales y todo tipo de utensilios, pasando por el arte, la decoración, la alimentación y la jardinería (Ruíz, 1989; Montiel y Murillo, 1998.). El bambú es actualmente un recurso fácilmente renovable de uso potencial como fuente de energía y reemplazo de madera de algunos árboles (Muñoz *et al*, 1998).

La explotación de este recurso se ve limitado por los lentos métodos tradicionales de propagación de esta especie, como lo son la propagación sexual o por semilla, y la propagación vegetativa (John y Rajanis, 1999). La propagación por semilla es poco utilizada debido a que el bambú es una especie que entra esporádicamente y con muchos años de intervalo al estado de floración (alrededor de 70 años) según Hidalgo (1974), a esto se le une el que la semilla no se pueda almacenar por ser recalcitrante (Muñoz *et al*, 1998).

La propagación vegetativa tradicional, se realiza por cultivo de yemas y rizoma, sin embargo, la semilla vegetativa es lenta, muchas veces muere en el proceso (Montiel, 1998), y la mayoría de las cañas carecen de yemas en sus nudos (Banik, 1987, citado por Muñoz *et al*, 1998). Las dificultades anteriormente mencionadas en ambos métodos de propagación exigen que se encuentre un método alternativo y eficiente para dicho proceso.

Una alternativa de la propagación vegetativa es la regeneración y multiplicación de plantas *in vitro* (Roca y Mroginsky, 1991), mediante esta técnica se pueden obtener copias idénticas de una especie en un tiempo corto, generando un gran número de plántulas para su cultivo (Abdelnour y Escalant, 1994). Es por ello importante iniciar el estudio y lograr el establecimiento de esta especie como primer paso en el desarrollo de esta técnica y como base para poder introducir otras especies de importancia económica y ecológica.

El objetivo del presente trabajo fue lograr el establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* (Bambú).

Material y Métodos

La investigación fue realizada en los laboratorios del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, durante el primer semestre del año 2001. Se utilizaron tres diferentes tipos de explantes: de la parte aérea: los meristemos (laterales y apicales), así como entrenudos; y del rizoma los meristemos (apicales y laterales) (Fig. 1) de la especie *Bambusa vulgaris* (Bambú amarillo). El material fue suministrado por la colección de bambú del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Cartago.

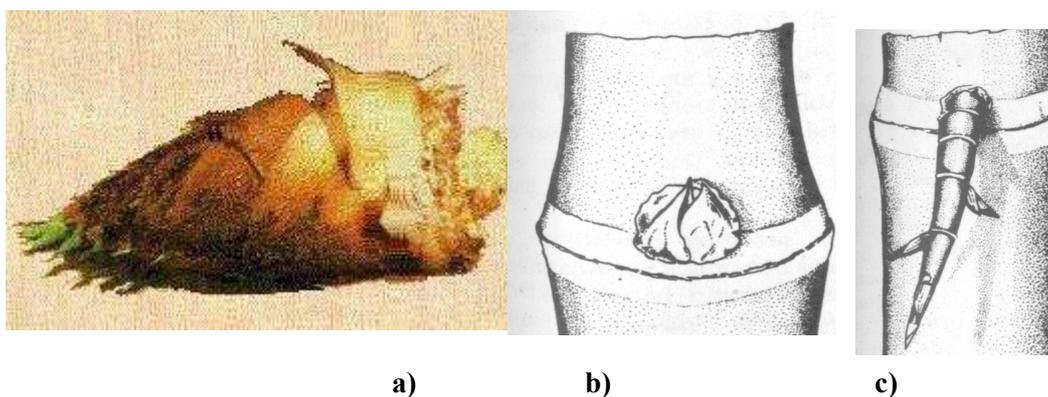


Figura 1. Explantes utilizados para el establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* (bambú amarillo):
a) Rizoma, b) entrenudos, c) meristemos laterales

Para la introducción del material se efectuaron diferentes metodologías de desinfección, según el tipo de explante utilizado, con el fin de obtener un producto libre de hongos y bacterias.

Meristemos apicales

Para la desinfección de los meristemos apicales se utilizaron antibióticos como amoxiciclina y ampicilina, y cloro en diferentes concentraciones. En algunos casos se utilizó como antioxidantes Vitamina C y ácido cítrico a concentraciones de 1 mg/ml y 5 mg/l respectivamente. Además, el cultivo se realizó en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con una concentración de macroelementos y microelementos en un 50%, y se suplementó en algunos casos con PVP a concentraciones 1 mg/l como antioxidante (cuadro 1).

Cuadro 1. Metodologías de desinfección para meristemos apicales y laterales aéreos de ramas secundarias, aplicadas para la introducción *in vitro* de *Bambusa vulgaris* (Bambú)

| Tratamientos | Jabón (tiempo) | Amoxicilina (tiempo) | Ampicilina (tiempo) | Vit C-Ac. Cítrico. | Cloro | | Alcohol 70 % | Medio de Cultivo |
|--------------|----------------|----------------------|---------------------|--------------------|---------------|--------|--------------|------------------|
| | | | | | Concentración | Tiempo | | |
| 1 | 10 min. | - | - | - | 60/ 40 | 10 m | 10 min. | MS/2 Sólido |
| 2 | 10 min. | - | - | - | 40/ 60 | 15 m | 10 min. | MS/2 Sólido |
| 3 | 10 min. | 10 min. (juntos) | | 10 min. | 35/ 65 | 18 m | 10 min. | MS/2 Sólido |
| 4 | 10 min. | 10 min. | 10 min. | 10 min. | 35/ 65 | 15 m | 10 min. | MS/2 Sólido |
| 5 | 10 min. | 30 min. | 30 min. | 10 min. | 35/ 65 | 15 m | 10 min. | MS/2 Sólido |
| 6 | 10 min. | 30 min. | 30 min. | 10 min. | 25/ 75 | 15 m | 10 min. | MS/2 Sólido |
| 7 | 10 min. | - | - | - | 50/ 50 | 5 m | 10 min. | MS/2 líquido PVP |
| 8 | 10 min. | 30 | 30 | - | 10/ 90 | 5 m | 10 min. | MS/2 líquido PVP |

* En todos los tratamientos, la concentración de amoxicilina y ampicilina fue 2 g/l. En el tratamiento 3 la concentración fue de 2 g/l cada uno (juntos)

Meristemos obtenidos a partir de rizoma

Para la desinfección de los meristemos obtenidos a partir de rizoma (apicales y laterales) se utilizaron antibióticos como amoxicilina y ampicilina, fungicidas como Kilol y Kasumin, y algunas veces se utilizó cloro en diferentes concentraciones y antioxidantes Vitamina C y ácido cítrico a concentraciones de 1 mg/ml y 5 mg/l respectivamente. Además, el cultivo se realizó en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a la mitad, en estado semisólido o líquido, y se suplementó en algunos casos con PVP ó Carbón activado a concentraciones 1 mg/l como antioxidante (cuadro 2).

Cuadro 2. Metodologías de desinfección aplicadas para la introducción *in vitro* de meristemos de rizoma de *Bambusa vulgaris* (Bambú)

| Tratamiento | Jabón (tiempo) | Amoxicilina (tiempo) | Ampicilina (tiempo) | Kilol Kasumin | Vit C-Ac. Cítrico. | Cl% | Cl (tiempo) | EtOH 70 % | Medio de Cultivo |
|-------------|----------------|-------------------------------------|---------------------|---------------|--------------------|-------|-------------|-----------|-------------------------|
| 1ª | 10 min. | 30 min. | 30 min. | - | 10 min. | 25/75 | 15 m | 10 min. | MS/2 Sólido |
| 2ª | 10 min. | 1 hora+(KK)* | 1 hora+(KK)* | - | - | 15/85 | 5 m | 10 min. | MS/2 líquido PVP/carbón |
| 3ª | 10 min. | 1 hora mixto (Amox-Ampi- Kil-Kasum) | | | - | - | - | 10 min. | MS/2 líquido PVP/carbón |
| 4ª | 10 min. | 1:40 mixto (Amox-Ampi- Kil-Kasum) | | | - | - | - | 10 min. | MS/2 líquido Carbón |

* Se utilizó Kilol Kasumin 1:1 en concentraciones 2 ml/l en combinación con Amoxilina y luego con ampicilina por 1 hora cada uno

Se realizaron para este tipo de explantes (rizoma) tratamientos los antibióticos Ampicilina y Agrimicin a concentraciones 2 g/l, y fungicidas como Benlate y Vitavax a concentraciones de 1 mg/ml cada uno (cuadro 3).

Cuadro 3. Metodologías de desinfección aplicadas para la introducción *in vitro* de meristemos de rizoma de *Bambusa vulgaris* (Bambú)

| Tratamiento | Jabón (tiempo) | Ac. Cítrico. | Agrimicin-Benlate (tiempo) | Vitavax (tiempo) | Amoxicilina (tiempo) | Ampicilina (tiempo) | EtOH 70 % | Medio de Cultivo |
|-------------|----------------|--------------|----------------------------|------------------|----------------------|---------------------|-----------|------------------|
| 11ª | 10 min. | 10 min. | 25 min. | 30 min. | 10 m | - | 10 min. | MS/2 líq. Carbón |
| 12ª | 10 min. | 10 min. | 25 min. | 30 min. | - | 10 min. | 10 min. | MS/2 líq. Carbón |

EtOH= etanol, alcohol

Entrenudos

Para la desinfección de entrenudos se realizaron diferentes tratamientos, se utilizó ácido cítrico en concentraciones de 2g/L, Agrimicin y Benlate en concentraciones 1 g/ml cada uno y Vitavax 1mg/ml; así como amoxicilina y ampicilina a concentraciones de 1 g/l , alcohol al 70% y cloro al 100%; se utilizó medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a la mitad con PVP 1mg/l. Los diferentes tratamientos utilizados se detallan en el siguiente cuadro

Cuadro 4. Metodologías de desinfección aplicadas para la introducción *in vitro* de entrenudos de *Bambusa vulgaris* (Bambú)

| Tratamiento | Jabón (tiempo) | Ac. Cítrico. | Agrimicin-Benlate (tiempo) | Ampicilina-Amoxicilina (tiempo) | Vitavax (tiempo) | EtOH 70 % | Cloro 100 % | Medio de Cultivo |
|-------------|----------------|--------------|----------------------------|---------------------------------|------------------|-----------|-------------|------------------|
| 1 | 10 min. | 10 min. | 25 min. | 10 m | 40 min. | 5 min. | 30 min. | MS/2 líq. PVP |
| 2 | 10 min. | - | 24 horas | - | - | 5 min. | 30 min. | MS/2 líq. PVP |
| 3 | 10 min. | - | 24 horas | - | - | 5 min. | 30 min. | MS/2 líq. PVP |

Los explantes se transfirieron a un cuarto de crecimiento a una temperatura promedio de 24 ± 2 °C y 2000 lux de intensidad lumínica, con un fotoperíodo de 16 horas luz.

Resultados

Meristemos apicales de tallo

En la aplicación de desinfecciones (cuadro 1) para la obtención de explantes libres de patógenos de meristemos apicales de tallo, se observó una menor contaminación por bacterias en los tratamientos 1, 5, 8 y 4 (cuadro 5). Por otro lado, el tratamiento 7 presentó una mayor contaminación por bacterias y diferencia significativa entre los demás tratamientos (cuadro 5).

Cuadro 5 .Proporciones de contaminación por bacterias observadas en los resultados de las desinfecciones (cuadro 1), prueba Tukey.

| TRATAMIENTO | MEDIA | DE | |
|-------------|---------------|----------------|----------|
| 7 | 0.70 | ±0.0141 | a |
| 3 | 0.585 | ±0.0495 | b |
| 6 | 0.58 | ±0.849 | b |
| 2 | 0.545 | ±0.0354 | b |
| 4 | 0.375 | ±0.1758 | c |
| 8 | 0.285 | ±0.05 | c |
| 5 | 0.125 | ±0.0636 | c |
| 1 | 0.1212 | ±0.056 | c |

DE= Desviación Estándar μ = Media proporcional

En este mismo aspecto, pero con respecto a la contaminación por hongos, se demostró que el tratamiento 8 presentó la mayor contaminación diferente significativamente con respecto a los demás tratamientos (cuadro 6). Los demás tratamientos no mostraron diferencias entre sí, sin embargo se puede destacar que los tratamientos 5, 6 y 7 evidenciaron la menor media porcentual para contaminación por hongos.

Cuadro 6 .Proporciones de contaminación por hongos observadas en los resultados de las desinfecciones (cuadro 1), prueba Tukey

| TRATAMIENTO | μ | DE | |
|-------------|--------------|--------------|----------|
| 8 | 0.70 | ±0.9 | a |
| 4 | 0.125 | ±0.017 | b |
| 3 | 0.118 | ±0.7 | b |
| 1 | 0.04 | ±0 | b |
| 2 | 0.025 | ±0.25 | b |
| 5 | 0 | ±0 | b |
| 6 | 0 | ±0 | b |
| 7 | 0 | ±0 | b |

DE= Desviación Estándar μ = Media proporcional

El análisis estadístico (prueba Tukey) de las medias proporcionales de los tratamientos utilizados y su para la contaminación con hongos y bacterias, nos indican que los tratamientos 1 y 5 mostraron una menor contaminación tanto por hongos como bacterias y no presentaron diferencias significativa entre sí. El tratamiento 8, mostró la

mayor contaminación con hongos, a pesar de ser uno de los tratamientos con menor contaminación con bacterias, mientras que los tratamientos 6 y 7 mostraron la menor presencia de hongos pero no así de bacterias (figura 2)

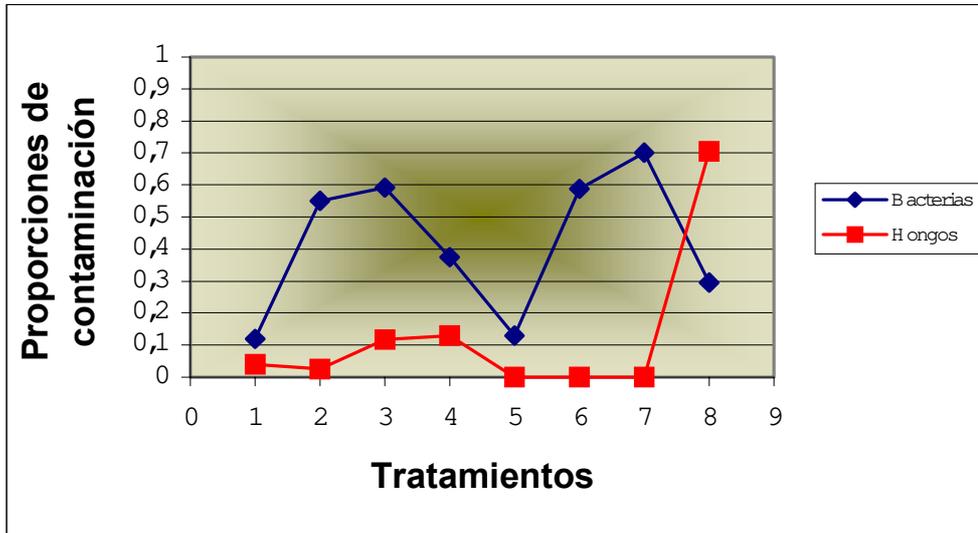


Figura 2. Gráfica de las medias proporcionales de contaminación por hongos y bacterias de meristemos apicales presentadas en los tratamientos (cuadro 1).

La totalidad de los explantes presentaron muerte, tornándose café y oscureciendo el medio de cultivo después de una semana de haber introducido el material *in vitro*. El uso de antioxidantes durante la desinfección y en el medio de cultivo (cuadro 1) no contrarrestó la oxidación en ninguno de los tratamientos.

Sin embargo, al emplear la metodología del tratamiento 4 utilizada en la desinfección de rizomas (cuadro 2), en meristemos laterales de tallo de bambú se obtuvo una desinfección del 80% de efectividad, dándose la presencia de hongos en un 10%, bacterias en 10% y ausencia de oxidación al utilizar como antioxidante el carbón activado en medio líquido (figura 3).



Figura 3. Meristemo lateral aéreo de *Bambusa vulgaris* (bambú) en medio MS a la mitad con 1g/l de carbón activado, 2 mg/l BAP y 0,5 mg/l AIB

Meristemos obtenidos a partir de rizoma

En la aplicación de los tratamientos para la desinfección del rizoma, planteados en la metodología (cuadro 2 y 3) para su posterior introducción al cultivo *in vitro*, se observó una menor contaminación por bacterias en los tratamientos 4, 3 y 1, siendo el tratamiento 4 el de menor media proporcional con respecto a la contaminación con bacterias (cuadro 7). Por otro lado, los tratamientos 6, 5 y 2 evidenciaron una mayor contaminación con respecto a los antes mencionados (1,3 y 4), siendo el tratamiento 6 el que presenta la mayor media proporcional de contaminación por bacterias de todos los tratamientos (cuadro 7).

Cuadro 7. Proporciones de contaminación por bacterias observadas en los resultados de las desinfecciones de rizoma (cuadro 1), prueba Tukey

| TRATAMIENTO | μ | DE | |
|-------------|-------|------------|---|
| 6 | 0.63 | ± 0 | A |
| 5 | 0.53 | ± 0 | A |
| 2 | 0.50 | ± 0 | A |
| 1 | 0.35 | ± 0.04 | B |
| 3 | 0.30 | ± 0.08 | B |
| 4 | 0.13 | ± 0.04 | B |

DE= Desviación Estándar μ = Media proporcional

Todos tratamientos aplicados lograron eliminar los hongos en su mayoría, solamente presentaron contaminación por hongos los tratamientos 3 y 4, sin embargo, esto no fue significativamente diferente según la prueba de Tukey con el resto de los tratamientos (cuadro 8).

Cuadro 8. Proporciones de contaminación por hongos observadas en los resultados de las desinfecciones de rizoma (cuadro 1), prueba Tukey

| TRATAMIENTO | μ | DE | |
|-------------|-------|------------|---|
| 3 | 0.11 | ± 0.15 | A |
| 4 | 0.05 | ± 0.07 | A |
| 1 | 0.00 | ± 0.00 | A |
| 2 | 0.00 | ± 0.00 | A |
| 5 | 0.00 | ± 0.00 | A |
| 6 | 0.00 | ± 0.00 | A |

DE= Desviación Estándar μ = Media proporcional

Al evaluar ambas variables (contaminación por hongos y bacterias), se puede determinar que los tratamientos 1, 3 y 4 resultaron efectivos contra las bacterias y hongos; siendo los tratamientos 3 y 4 los que muestran la menor contaminación debida a bacterias (Figura 4).

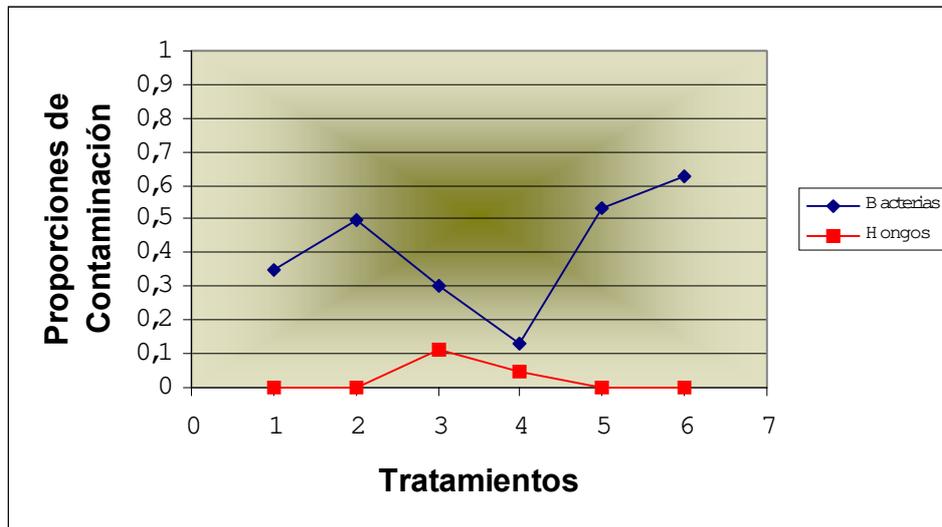


Figura 4. Gráfica de los porcentajes de contaminación por hongos y bacterias de rizoma presentados en los tratamientos (cuadro 2 y 3).

La oxidación presentada en los explantes presentó variaciones con respecto al tipo de medio y antioxidante utilizado, de tal manera que al utilizar medio sólido complementado con PVP o carbón activado la totalidad de los explantes murieron después de 2 semanas de su introducción. Al utilizar medio líquido complementado con PVP, se tornó de color amarillo, lo cual disminuyó gradualmente al transferir los explantes a un nuevo medio de cultivo durante ciclos de 4 a 5 subcultivos (Figura 5).



Figura 5. Meristemas de *Bambusa vulgaris* (Bambú amarillo), después de tres semanas de introducción en medio líquido MS/2 con PVP 1mg/l , después de cuatro subcultivos.

Por último, al utilizar medio líquido complementado con carbón activado, los explantes mostraron un menor grado de ennegrecimiento y senescencia en comparación con los medios anteriormente mencionados después de dos semanas de su introducción(figura 6).

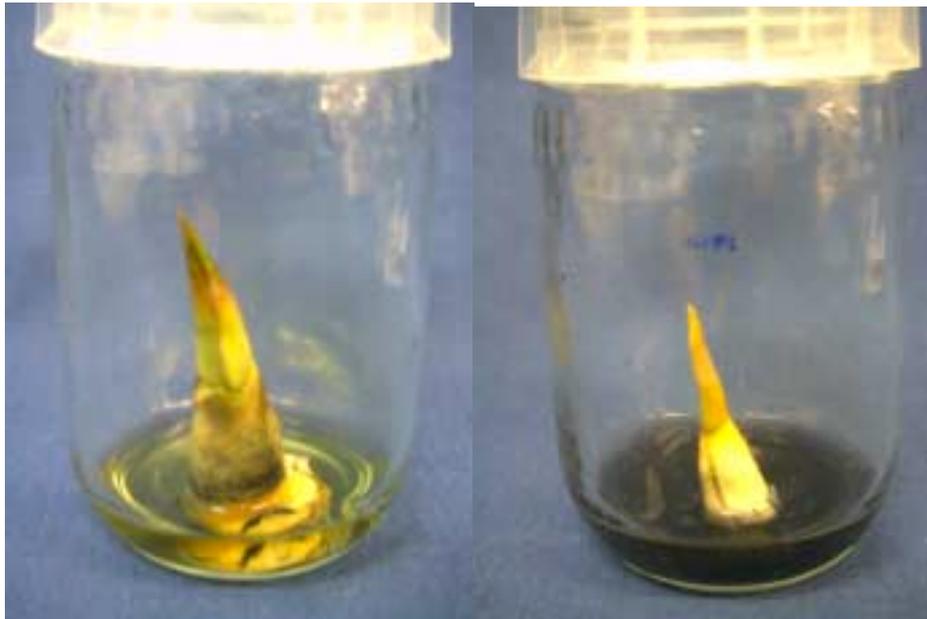


Figura 6. Meristemos apicales de rizoma de *Bambusa vulgaris* (Bambú amarillo), en medio líquido con 1g/l de carbón activado.

Los explantes menores de 0.5 cm², permanecieron de color blanco, mientras que los explantes de mayor tamaño en un principio de color blanco, se tornaron verdes. Por otro lado, los meristemos apicales muy elongados (5 centímetros de altura) y delgados (menores de 0.5 de ancho), fueron susceptibles a la oxidación después de una semana de la introducción.

Entrenudos

En la evaluación de los tratamientos aplicados a los explantes provenientes de entrenudos (cuadro 4), se puede apreciar una contaminación por hongos (posibles levaduras) en su mayoría en un 100%, mientras que no presentaron en ninguno de los casos contaminación por bacterias (cuadro 9)

Cuadro 9. Resultados obtenidos de la desinfección según los tratamientos establecidos en el cuadro 4

| Tratamiento | Meristemos Cultivados | Bacterias | | Hongos | |
|-------------|-----------------------|-----------|-------------------------|----------|-------------------------|
| | | Cantidad | (%) del total cultivado | Cantidad | (%) del total cultivado |
| 1 | 30 | - | 0 | 30 | 100 |
| 2 | 30 | - | 0 | 30 | 100 |
| 3 | 30 | - | 0 | 29 | 96 |

Se observó que los explantes provenientes de meristemos aéreos, y como los explantes provenientes de rizoma presentan una mayor oxidación con respecto a los explantes provenientes de entrenudos, además de ser, estos últimos, más resistentes a la desinfección con cloro.

Se determinó que en los tratamientos de desinfección tanto para meristemos como para rizomas en los que se utilizó cloro, se evidenció una mayor oxidación, no así en los tratamientos con ausencia de cloro.

Discusión

El objetivo de esta investigación fue el establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* (bambú). Se determinó que la desinfección con Amoxicilina, Ampicilina 2g/l cada uno, Kilol y Kasumin 2 ml/l cada uno por una hora (cuadro 2, tratamiento 3 y 4) fue efectivo para la introducción de meristemos apicales y de rizomas, en un medio líquido MS con un 50% de macroelementos y microelementos y carbón activado. Esto se puede deber a la ausencia de oxidantes fuertes como el cloro y la acción de adsorción del carbón de compuestos fenólicos oxidantes, y una acción adecuada antifúngica y antibacteriana de los químicos (Kilol-Kasumin) y antibióticos (Ampicilina-amoxicilina) el material pudo introducirse con éxito.

Para el establecimiento aséptico *in vitro* es de suma importancia los métodos utilizados para la desinfección superficial de los explantes, así, como el explante utilizado (Abdelnour y Escalant, 1994). La baja contaminación observada en los tratamientos en los tratamientos 1, 5, 8 y 4, se debió a la alta concentración de antibióticos, cloro y alcohol, así, y tiempos de exposición. Es así como en el tratamiento 1 una concentración del 60% de cloro (cuadro 1) puede ser la razón de su efectividad, la concentración de cloro al 35% en suma con el efecto de los antibióticos por 10 minutos cada uno parece ser la razón del tratamiento 4, mientras que la mayor exposición al antibiótico con la misma concentración de cloro demostró ser aún mejor en el tratamiento 5. El accionar del cloro como un desinfectante efectivo se puede cerciorar al observar que en el tratamiento 8 fue menos efectivo con respecto al 5, en donde la única variable fue una concentración de cloro de 10%.

La desinfección del material proveniente de campo es un proceso que está ligado a factores incontrolables dadas por el ambiente heterogéneo en el que se desarrolla el explante, es por ello que se desconoce en términos teóricos cuál es la desinfectante más efectivo para eliminar la totalidad de contaminantes en todos los materiales provenientes de campo. Lo que sí se conoce es que una alta concentración de cloro es efectiva para las desinfecciones del material vegetal (Abdelnour y Escalant, 1994), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el tratamiento 1. Se conoce también que la exposición del material vegetal o explante a antibióticos de amplio espectro, como la ampicilina y la amoxicilina, contrarresta la contaminación causada por bacterias (Falkiner, 1990), su uso a diferentes concentraciones y tiempos de exposición esta relacionada directamente con su acción bactericida (Leifert *et al*, 1991), en suma con la actividad del cloro son las razones por la cual los tratamientos 4, 5 y 8 (Cuadro 1 y 5) fueron efectivos contra bacterias.

Los tratamientos que resultaron efectivos contra las bacterias en el caso de los rizomas fueron los tratamientos 4, 3 y 1 esto puede ser consecuencia del uso de antibióticos, cloro y bactericidas (Leifert *et al*, 1991) a diferentes tiempos de exposición, en donde el tratamiento 1 debido al uso de cloro complementado con los antibióticos resultó efectivo, mientras que en el tratamiento 3 y 4, a pesar, de la no utilización de cloro, el uso de antibióticos (ampicilina y la amoxicilina), así como

bactericidas (Kasumin y Kilol) contrarrestó la contaminación según lo esperado debido a la actividad reconocida de los mismos (Abdelnour y Escalant, 1994).

La contaminación por bacterias no representó un mayor problema en el caso de los entrenudos, lo cual se debió a la prolongada exposición del material vegetal a bactericidas y fungicidas (Agrimycin y Benlate, respectivamente), así, como la alta concentración de cloro utilizado, según su reconocida actividad desinfectante (Roca y Mroginski, 1991).

La razón de la baja contaminación causada por hongos en los meristemos puede deberse al empleo de altas concentraciones de cloro, ya que, como se mencionó anteriormente, es común y efectivo el empleo de hipoclorito de sodio o cloro comercial (NaOCl) en la desinfección del material vegetal (Abdelnour y Escalant, 1994). Esto concuerda también con los resultados obtenidos del tratamiento 8, en donde la contaminación por hongo fue mayor como consecuencia del uso de una menor concentración de cloro (cuadro 1).

En conjunto, los tratamientos 1 y 5 para la desinfección de los meristemos, contrarrestaron la contaminación causada tanto para bacterias como para hongos, esto debido a la alta concentración de cloro para el tratamiento 1, a la alta exposición a antibiótico y al uso de cloro en el tratamiento 5, según lo mencionado por Abdelnour y Escalant (1994).

La mínima contaminación causada por hongos en rizomas, puede deberse, a los desinfectantes químicos utilizados (cloro, Kilol, Kasumin) (Roca y Mroginski, 1991). Así como a la anatomía del rizoma, puesto que los explantes utilizados están recubiertos por capas superpuestas de hojas, las cuales lo protegen de las esporas de los hongos.

La desinfección del material vegetal (entrenudos) fue ineficaz, en donde la contaminación total por hongos (posibles levaduras) hizo imposible la introducción de este material a condiciones *in vitro*. La razón de la contaminación puede deberse a la presencia de microorganismos endógenos, la alta exposición del material de campo a microorganismos superficiales y microorganismos resistentes a la desinfección (Leifert *et al*, 1991).

En el proceso de desinfección superficial de los explantes es necesario tomar en cuenta el desinfectante a utilizar, ya que este debe eliminar a los microorganismos causando el menor daño posible al explante (Abdelnour y Escalant, 1994). Es por ello que debido a la oxidación presente como consecuencia del uso de cloro en la desinfección de los explantes, tanto rizomas como meristemos, los tratamientos que hacen uso del mismo resultan contraproducentes, pues, a pesar de ser efectivos en la desinfección provocan un gran daño al explante.

La alta oxidación es producto de compuesto fenólicos que normalmente son almacenados en vacuolas, peroxisomas y vesículas, que son secretados como un mecanismo de defensa al haber ruptura de las células (Klerk et al, 1999) y compuestos oxidantes como el cloro puede aumentar este proceso (Sengbusch, 2001). Estos compuestos se disuelven con los plastidos y otras organelas, donde son oxidados, una vez oxidados los compuestos causan la inactivación de enzimas que causan las necrosidades y la muerte del tejido (Klerk et al, 1999).

La oxidación presentada en los explantes utilizados para el establecimiento *in vitro* de la especie *Bambusa vulgaris* (bambú), es un factor limitante. Sin embargo, la oxidación en explantes de rizoma es controlable mediante el uso carbón activado, no así la oxidación en explantes pequeños de meristemos de tallo, mientras la oxidación no representa un problema grave en los explantes provenientes de los entrenudos. Esto se puede atribuir a la anatomía del explante, debido a que el entrenudo presenta un crecimiento secundario, menos susceptible a daños mecánicos y por agentes oxidantes (Flores-Vindas, 1998).

Con el fin de contrarrestar los efectos perjudiciales de la oxidación es común el empleo de varios compuestos químicos tanto a la hora de la desinfección como a la hora del cultivo *in vitro*, como carbón activado, PVP, ácido ascórbico y ácido cítrico y cisteína-HCl (Hurtado y Merino 1994). La oxidación presentada en los explantes utilizados para el establecimiento *in vitro* de la especie *Bambusa vulgaris* (bambú), es un factor limitante. Sin embargo, la oxidación en explantes de rizoma es controlable mediante el uso carbón activado, no así la oxidación en explantes pequeños de meristemos de tallo, mientras la oxidación no representa un problema grave en los explantes provenientes de los entrenudos. Esto se puede atribuir a la anatomía del explante, debido a que el entrenudo presenta un crecimiento secundario, menos susceptible a daños mecánicos y por agentes oxidantes (Flores-Vindas, 1998).

El hecho de que el medio complementado con de PVP y carbón en medio sólido para disminuir la oxidación no fue eficiente aún en tratamientos sin utilizar cloro, puede deberse a que el estado físico del medio impide el contacto del antioxidante con la totalidad del explante, lo que trae como consecuencia la acumulación de compuestos fenólicos y por ende la oxidación (Krikorian, 1991).

Por otro lado, la menor oxidación presentada en los explantes cultivados en un medio MS a la mitad líquido con PVP y carbón (1mg/l) puede deberse al mayor contacto superficial del explante con el antioxidante presente en el medio y la mayor disolución de compuestos fenólicos (Hurtado y Merino 1994).

El carbón activado se utiliza para limitar los problemas de oxidación asociados al cultivo de tejidos. El mismo adsorbe las sustancias químicas en general, limitando así su intervención con el tejido cultivado. (Abdelnour y Escalant, 1994). La razón por la cual el medio de cultivo líquido complementado con carbón activado resultó ser más efectivo contra la oxidación con respecto a aquellos medios líquidos complementados con PVP, puede ser atribuida al modo de acción del mismo, en donde el carbón no interviene con

el metabolismo del explante, mientras que el PVP reduce los compuestos oxidantes como los son los fenoles (Hurtado y Merino 1994).. Otra posible razón a la diferencia en el modo de acción y respuesta de los explante al antioxidante utilizado, podría ser debido a que el PVP presenta la desventaja de que puede resultar fitotóxico (Krikorian, 1991).

No se puede pretender instaurar un protocolo de desinfección que resulte eficiente en su totalidad para material proveniente de campo, debido a que su respuesta está influenciada por la fisiología, origen, condiciones ambientales y factores no controlables los cuales proveen una fuente de variación en el comportamiento de los explantes al introducirlos.

En este caso, el tratamiento que resultó ser el más efectivo fue el tratamiento 4 para la desinfección de rizoma, en el cual la ausencia de cloro y el uso de carbón activado en medio líquido contribuyó a una menor oxidación, mientras que la desinfección con fungicidas y bactericidas, resultó en una baja contaminación de hongos y bacterias. A pesar de ello, se recomienda el tratamiento 3, puesto que la exposición de los explantes a los desinfectantes químicos es menor y por ende las posibles consecuencias secundarias a largo plazo que esto conlleve son menores. Los explantes provenientes de entrenudos son una potencial fuente de explantes para el establecimiento y regeneración *in vitro* de *Bambusa vulgaris*, sin embargo, se requiere de un mayor manejo y control fitosanitario de la planta madre, que permita la disminución de la contaminación provocada principalmente por hongos.

Citas Bibliográficas

- Abdelnour, A y Escalant, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Cartago, Costa Rica. Editorial del CATIE. 38 p.
- Chang, W y Yeh, M. 1987. Plant regeneration via somatic embryogenesis in mature embryo-derived callus culture of *Sinocalamus latiflora* (Munro). *Plant Science*. (5) 93-96.
- Falkiner, Fr. 1990. The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. Newsletter. International association for plant tissue culture. (60): 13-26.
- Flores *et al*, 1998. Propagación y desarrollo de cuatro variedades de bambú en condiciones de campo. *Revista de Biología Tropical (C.R)*. 46(3):36-40.
- Flores-Vindas, E. 1998. La planta: Estructura y función. 2da edición. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 501 p.
- Hidalgo, J. 1974. Bambú: Su cultivo y aplicación. Estudios Técnicos Colombianos Ltda. Cali, Colombia. 315 p.
- Hurtado, D. y Merino, M. 1994. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México, DF, México. 232 p.
- John, K y Rajanis, NR. 1999. Review *in vitro*-induced flowering in bamboos. *In vitro Cell Development Biology of Plants*. (35) 309–315.
- Klerk, G et al. 1999. The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *In vitro Plant*. Vol. 35: may-Jun. 189-199
- Leifert, C *et al*. 1991. Contaminants of plan-tissue and cell cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 7: 452-469
- Leifert, C *et al*. 1990. Contaminants of plant tissue culture. Newsletter. International association for plant tissue culture. (60): 1-13.
- Lies, w. Anatomy of Bamboo. Separata A-3666. Biblioteca del Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Lloyd G. Y Mac Cown D. 1981. Commercially Seasydle micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by used of shoot culture. *INT. Plant Prop. Soc. Porc*. 30: 421-427.
- Montiel, M y García, R. 1985. Bambú, análisis de una estrategia de desarrollo. San José. Editorial Universidad de Costa Rica. 16p.

- Montiel, M y Murillo, L. 1998. Historia ecológica y aprovechamiento del bambú. *Revista de Biología Tropical (C.R)*. 46(3):11-18.
- Muñoz *et al*, 1998. Regeneración *in vitro* de Bambú gigante: *Dendrocalamus giganteus* (poaceae). *Revista de Biología Tropical (C.R)*. 46(3):11-18
- Murillo, L y Montiel, M. 1998. Efecto de la edad y la posición de las yemas en el culmo, en la reproducción vegetativa de *Bambusa vulgaris* y *Gigantochla apus*. *Revista de Biología Tropical (C.R)*. 46(3):28-35.
- Murashige, T. And Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-497.
- Nicht C. & J.P. 1967. The induction of flowering *in vitro* stem segments of *Plumbago indica* the productive buds. *Planta* 72: 371-384.
- Roca, W y Mroginsky, L. 1991. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de Tejidos vegetales, **En**: Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pp: 1-19
- Ruíz, I. 1989. Bambú: Un cultivo prometedor. Separata A-8624. Biblioteca del Instituto Tecnológico de Costa Rica
- Salisbury, F. B. Y Ross, C. 1994. Fisiología Vegetal. Traducido por Virgilio González Velásquez. 4 ed. México D.F., México. Grupo Editorial Iberoamericano. 759 p.
- Sengbusch, P. 2001. Phenolic Compounds. Botany on line (http://www.rrz.uni-hamburg.de/biologie/b_online/e20/20d.htm).

Anexo

Los tratamientos fueron probados como trabajo complementario en la especie *Dendrocalamus giganteus*, mostrando resultados idénticos a los de *Bambusa vulgaris*. A continuación se presentan figuras de explantes introducidos *in vitro* de dicha especie.

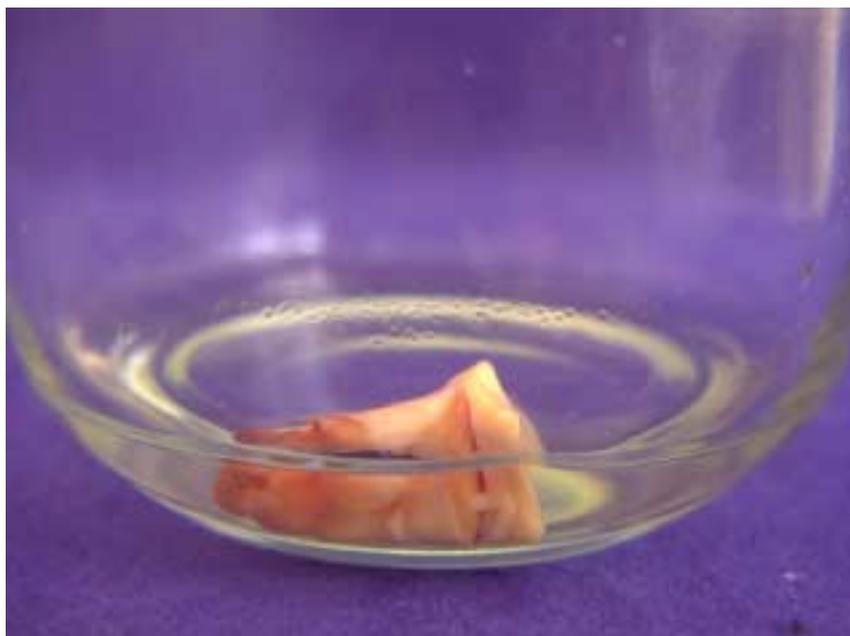


Figura A1. Meristemo de *Dendrocalamus giganteus*, después de dos semanas de introducción en medio líquido MS/2 con PVP 1mg/l y BAP 1 mg/ml.



Figura A2. Meristemo de *Dendrocalamus giganteus* (Bambú gigante), en medio sólido con 2mg/ml de PVP, 2mg/ml de AIB y 0,5 mg/l de AIA proveniente de en medio líquido con dos semanas de introducción MS/2 con PVP 1mg/l y BAP 1 mg/ml

A continuación se expone los datos utilizados para el análisis estadístico, según los resultados obtenidos con respecto al comportamiento de los meristemos apicales (estacas):

Cuadro 5. Resultados obtenidos de la desinfección según los tratamientos establecidos en el cuadro 1.

| Tratamiento | Repeticiones | Meristemos Cultivados | Bacterias | | Hongos | |
|-------------|--------------|-----------------------|-----------|------------|----------|-------------------------|
| | | | Cantidad | Proporción | Cantidad | (%) del total cultivado |
| 1 | 1 | 25 | 2 | 0,08 | 1 | 0,04 |
| | 2 | 25 | 4 | 0,16 | 1 | 0,04 |
| 2 | 1 | 40 | 21 | 0,525 | 1 | 0,025 |
| | 2 | 40 | 23 | 0,575 | 1 | 0,025 |
| 3 | 1 | 27 | 15 | 0,55555556 | 2 | 0,07407407 |
| | 2 | 27 | 17 | 0,62962963 | 4 | 0,14814815 |
| 4 | 1 | 8 | 2 | 0,25 | 1 | 0,125 |
| | 2 | 20 | 10 | 0,5 | 5 | 0,25 |
| 5 | 1 | 23 | 2 | 0,08695652 | 0 | 0 |
| | 2 | 23 | 4 | 0,17391304 | 0 | 0 |
| 6 | 1 | 17 | 9 | 0,52941177 | 0 | 0 |
| | 2 | 17 | 11 | 0,64705882 | 0 | 0 |
| 7 | 1 | 10 | 7 | 0,7 | 0 | 0 |
| | 2 | 10 | 7 | 0,7 | 0 | 0 |
| 8 | 1 | 17 | 4 | 0,23529412 | 11 | 0,64705882 |
| | 2 | 17 | 6 | 0,35294118 | 13 | 0,76470588 |

Cuadro 6. Resultados obtenidos de la desinfección según los tratamientos establecidos en el cuadro 2 y 3

| Tratamiento | Repeticiones | Meristemos Cultivados | Bacterias | | Hongos | |
|-------------|--------------|-----------------------|-----------|------------|----------|-------------------------|
| | | | Cantidad | Proporción | Cantidad | (%) del total cultivado |
| 1ª | 1 | 25 | 8 | 0,32 | 0 | 0,00 |
| | 2 | 16 | 6 | 0,38 | 0 | 0,00 |
| 2ª | 1 | 30 | 15 | 0,50 | 0 | 0,00 |
| 3ª | 1 | 9 | 2 | 0,22 | 0 | 0,00 |
| | 2 | 14 | 3 | 0,21 | 0 | 0,00 |
| | 3 | 19 | 6 | 0,32 | 5 | 0,26 |
| | 4 | 7 | 3 | 0,43 | 2 | 0,29 |
| | 5 | 16 | 5 | 0,31 | 0 | 0,00 |
| 4ª | 1 | 20 | 2 | 0,10 | 2 | 0,10 |
| | 2 | 20 | 3 | 0,15 | 0 | 0,00 |
| 5ª | 1 | 15 | 8 | 0,53 | 0 | 0,00 |
| 6ª | 1 | 19 | 12 | 0,63 | 0 | 0,00 |

Cuadro A1. Composición del medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962).

| Componentes | Concentración (mg/l) |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Macroelementos | |
| NH ₄ NO ₃ | 1650.00 |
| KNO ₃ | 1900.00 |
| CaCl ₂ * 2 H ₂ O | 440.00 |
| MgSO ₄ | 370.00 |
| KH ₂ PO ₄ | 170.00 |
| Microelementos | |
| Fe-EDTA | 43.00 |
| FeSO ₄ * 7 H ₂ O | 27.00 |
| H ₃ BO ₃ | 6.20 |
| MnSO ₄ * 4 H ₂ O | 22.30 |
| ZnSO ₄ * 4 H ₂ O | 8.60 |
| KI | 0.83 |
| Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O | 0.25 |
| CuSO ₄ * 5 H ₂ O | 0.025 |
| CoCl ₂ * 6 H ₂ O | 0.025 |
| Compuestos Orgánicos | |
| MYO-inositol | 100.00 |
| Ácido nicotínico | 0.50 |
| Piridoxina | 0.50 |
| Tiamina | 0.10 |
| Glicina | 2.00 |

Fotos de introducciones

A continuación se muestran meristemos laterales de rizoma introducidos en medio líquido MS a la mitad con carbón activado 1 g/l

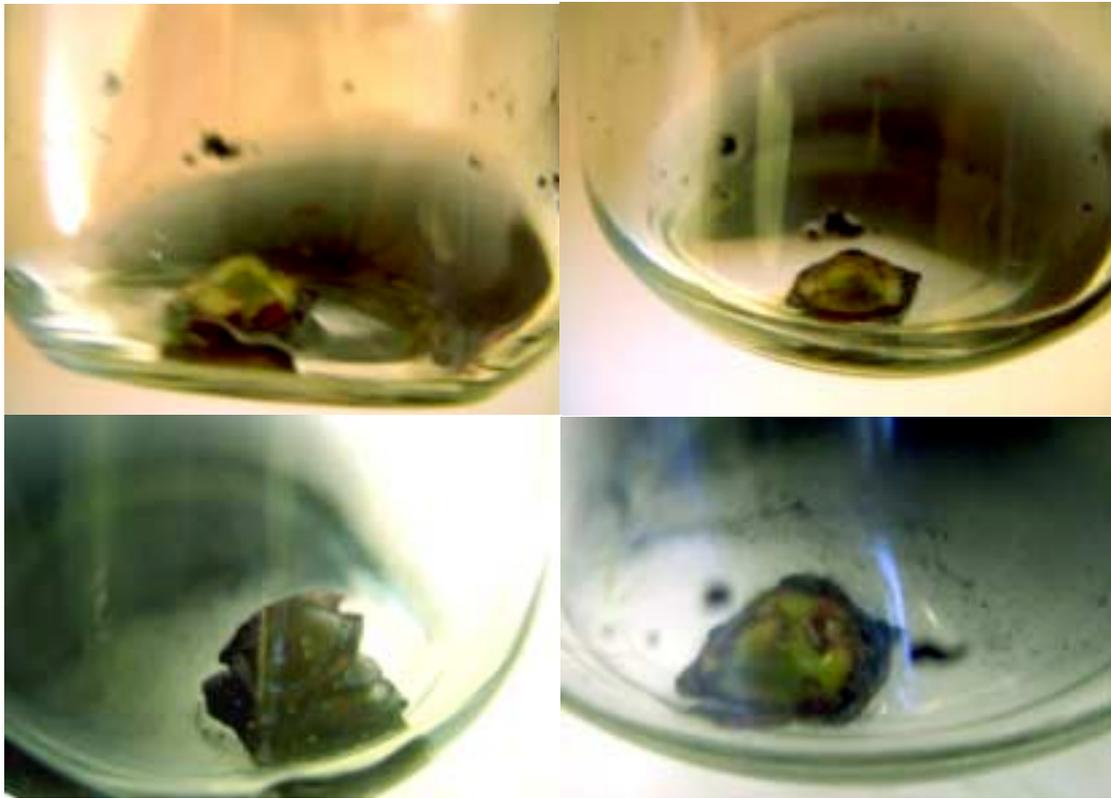


Figura A3. Meristemos de *Bambusa vulgaris* (Bambú amarillo), en medio líquido con 1 g/l de carbón activado, 2mg/ml de BAP y 0,5 mg/l de AIB

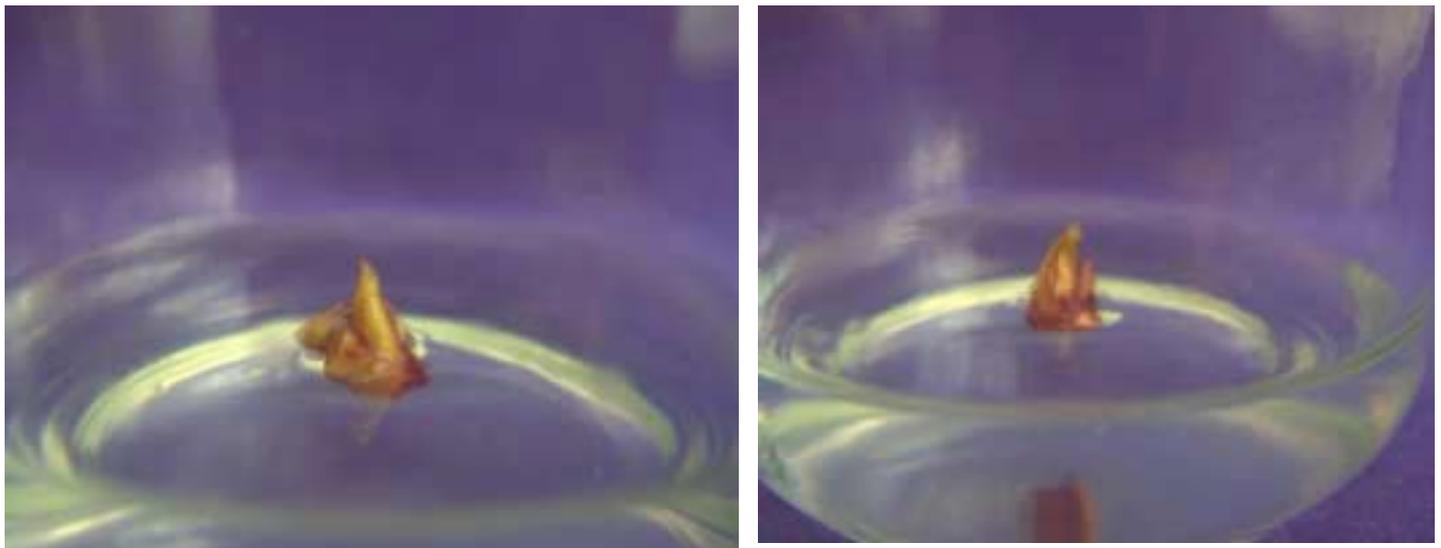


Figura 5. Meristemos de *Bambusa vulgaris* (Bambú amarillo), en medio sólido con 2g/l de PVP, 2mg/ml de BAP y 0,5 mg/l de AIB proveniente de en medio líquido con tres semanas de introducción MS/2 con PVP 1mg/l y BAP 1 mg/ml