

## Propagación *in vitro* de bambúes

Yudith García- Ramírez\*, Marisol Freire-Seijo, Ortelio Hurtado. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: yudith@ibp.co.cu

### RESUMEN

El género *Bambusa* representa uno de los más grandes recursos naturales renovables. Por sus excelentes propiedades físico-mecánicas, su resistencia al ataque de insectos, su belleza y por la diversidad de aplicaciones que se le dan; representa una valiosa alternativa económica que ha coadyuvado a mitigar la problemática social del campo en Cuba. La propagación tradicional de bambúes se ve afectada por los largos intervalos de florecimiento, la poca disponibilidad del material vegetal, los bajos porcentajes de enraizamiento y la poca disponibilidad de propágulos. Estos elementos constituyen limitantes para la propagación masiva de bambúes. Por estas razones, las técnicas de cultivo de tejidos ofrecen un medio rápido y confiable para la propagación de bambúes a través de la organogénesis y la embriogénesis somática. Sin embargo, aún queda profundizar en las diferentes limitantes que afectan la propagación *in vitro* de bambúes como la contaminación microbiana en la fase de establecimiento, las bajas tasas de multiplicación y enraizamiento, así como los bajos porcentajes de supervivencia *ex vitro*. El objetivo de este trabajo fue abordar de manera general las principales observaciones científicas sobre el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos para la propagación *in vitro* de varias especies de bambúes.

Palabras clave: bambú, propagación, organogénesis, embriogénesis somática

### ABSTRACT

The genus *Bambusa* represents one of the largest renewable natural resources. Due to its excellent physical and mechanical properties, resistance to insect attacks, beauty and diversity of applications It is a valuable economic alternative that has helped to mitigate the social problems of the countryside in Cuba. Traditional bamboo propagation is affected by long intervals of flowering, the limited stock of plant material, the low percentages of rooting and the limited existence of propagules. These elements are handicaps for mass propagation of bamboos. For these reasons, tissue culture techniques are fast and reliable for the propagation of bamboo through organogenesis and somatic embryogenesis. However, there is still gap about the various constraints affecting *in vitro* propagation of bamboos such as microbial contamination in the establishment phase, low multiplication rates and rooting, as well as low rates of *ex vitro* survival. The aim of this study was to state generally the main scientific observations on the use of tissue culture techniques for *in vitro* propagation of several bamboo species.

Key words: bamboo propagation, organogenesis, somatic embryogenesis

### CONTENIDO

#### INTRODUCCIÓN

#### MÉTODO DE PROPAGACIÓN DE BAMBÚ

Métodos Tradicionales

Métodos biotecnológicos

#### LIMITANTES DE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE BAMBÚES

Contaminación microbiana

Baja tasa de multiplicación

Baja tasa de enraizamiento

Bajos porcentajes de supervivencia *ex vitro*

#### INTRODUCCIÓN

Los bambúes son originarios de Asia y presentan diversidad en cuanto a especies y tamaño (Li, 2006). Son Poáceas de amplia

distribución en el mundo desde el continente asiático hasta el americano. De los países asiáticos, China presenta una extensa gama de especies, con un total de 626, le sigue la India con 102, luego Japón con 84, Myanmar

con 75 y Malasia con 50. De los países americanos, Brasil tiene la mayor diversidad con 141 especies de bambúes, le sigue Colombia con 72 especies (24 endémicas). En tercer lugar aparece Venezuela con 60, luego está Ecuador con 44. Le sigue por último Costa Rica y México con 39 especies leñosas (Londoño *et al.*, 2009).

Cuba cuenta dentro de la familia *Bambusoideae* con un grupo de bambúes herbáceos y leñosos con un 50.0% de endemismo. Solo *B. vulgaris* ha sido la especie más adaptada y naturalizada a todo lo largo y ancho del país (Catasús, 2003). Especies como: *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J.C. Wendl, *Bambusa vulgaris* var. *vittata* A. y C. Rivière, *Bambusa bambos* (L.) Voss, *Bambusa oldhamii* Munro, *Bambusa polymorpha* Munro, *Bambusa tuldooides* Munro, *Guadua angustifolia* Kunth, *Dendrocalamus strictus* (Roxburgh) Nees, *Dendrocalamus asper* (Schultes) Backer, sólo se encuentran en los jardines botánicos de Cienfuegos y Holguín, el Banco de Germoplasma de la Asociación de Técnicos Agrícolas y Forestales (ACTAF) de Granma, Villa Clara, Ciudad de La Habana y Topes de Collantes (Catasús, 2000).

Dentro de los bambúes el género *Bambusa* se destaca por su gran importancia desde el punto de medioambiental y tiene especies de gran interés económico como *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J.C. Wendl, conocido como bambú común o simplemente bambú. Es un tipo de bambú alto, sin espinas que forma macizos que comparten rizomas. La especie sobresale dentro del género por sus propiedades físico - mecánicas y por el tamaño de sus culmos; que alcanzan hasta 20 metros de altura y 15 centímetros de diámetro. Originaria del Viejo Mundo, probablemente del Asia tropical. Es el bambú más cultivado en el trópico y en el subtrópico, en la rivera de los ríos y como planta ornamental en las ciudades. En América, *B. vulgaris* se ha adaptado a diversos tipos de suelos y de climas, desde México hasta Uruguay, e Islas del Caribe (Das *et al.*, 2008).

El género *Bambusa* representa uno de los más grandes recursos naturales renovables. Por sus excelentes propiedades físico-mecánicas, su resistencia al ataque de insectos, su belleza y por la diversidad de aplicaciones que se le dan; representa una valiosa alternativa

económica que ha coadyuvado a mitigar la problemática social del campo en Cuba. Desde el punto de vista medio ambiental brinda cobertura al medio en donde crece por la sujeción del suelo que realiza mediante sus raíces y rizomas. Además, evita la erosión y contribuye a eliminar las cárcavas que se forman en los cauces de los ríos a causa del mal uso de los suelos y la deforestación y como fijador de dióxido de carbono (Londoño *et al.*, 2002). Es utilizado como materia prima para la obtención de celulosa y es la fuente principal para la fabricación del papel que se produce en la India (hasta el 70.0 %). Su uso como madera, dado las características propias de la especie y la rápida renovación de sus culmos, lo hacen un elemento de gran importancia (Catasús, 2003).

La propagación tradicional de bambúes se ve afectada por los largos intervalos de florecimiento, la poca disponibilidad del material vegetal, los bajos porcentajes de enraizamiento y la poca disponibilidad de propágulos (Catasús, 2003). Estos elementos constituyen limitantes para la propagación masiva de bambúes (Koshy y Gopakumar, 2005).

Por estas razones, se hace necesaria desarrollar la propagación *in vitro* de bambúes por cultivo de tejidos vía organogénesis mediante el empleo de yemas axilares, segmentos nodales y semillas (Jiménez *et al.*, 2006; Ramanayake *et al.*, 2006) y la embriogénesis somática a partir de inflorescencias inmaduras, semillas, hojas, segmentos nodales y anteras (Godbole *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2009).

Aunque el estudio y la optimización de la organogénesis en bambúes se ha centrado en los últimos tiempos en evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo en varias especies (Ramanayake *et al.*, 2008), aún queda en profundizar en las diferentes limitantes que afectan la propagación *in vitro* de bambúes como la contaminación microbiana en la fase de establecimiento (Acosta-Suárez *et al.*, 2008), las bajas tasas de multiplicación y enraizamiento, así como los bajos porcentajes de supervivencia *ex vitro*. El objetivo de este trabajo fue abordar de manera general las principales observaciones científicas sobre el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos para la propagación *in vitro* de varias especies de bambúes.

## MÉTODOS DE PROPAGACIÓN DE BAMBÚES

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

### Métodos de propagación tradicionales

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

#### *Propagación sexual o gámica*

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

Los porcentajes de germinación varían en función de la especie. Por ejemplo, en *Guadua angustifolia* Kunth oscilan entre 95.0-100.0% y a los 23 días después de la siembra se alcanza la germinación (Giraldo y Sabogal, 1999). Por otra parte, *D. strictus* cuenta con un alto porcentaje de germinación, lo que facilita su distribución por diferentes partes del mundo. En otras especies de bambú de los géneros *Bambusa*, *Gigantochloa* y la especie *Schizostachyum lumampao* se alcanza entre un 50.0-80.0% de germinación al séptimo día de sembradas.

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

#### *Propagación asexual o agámica*

La propagación asexual constituye el método más empleado, debido a que las diferentes especies de bambúes no florecen regularmente y un elevado porcentaje de los frutos pueden ser estériles y tener escasa

viabilidad. Los bambúes se pueden propagar asexualmente por división de rizomas con segmento de tallo, por división de plantones o trasplante directo, por segmentos de culmos y por segmentos de ramas.

*División de rizomas con segmento de tallo:* es efectivo para todas las especies. Permite un 100% de supervivencia. Es un método práctico y ventajoso debido a la disponibilidad de material vegetal y a la facilidad de transportación. En *B. tuldooides* se ha alcanzado un 80.0% de éxito y ha sido ampliamente distribuida en la India para la reforestación. Colombia ha implementado este método para las reforestaciones con *G. angustifolia* (Londoño et al., 2002).

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

*Segmentos de culmos:* es efectivo para propagar bambúes de gran tamaño y pared gruesa tales como *B. vulgaris*, *B. blumeana*, *D. asper* y *D. latiflorus*. Permite dar solución a problemas de escasez y peso del material vegetal para plantar. Se debe utilizar culmos de un año de sembrados y segmentos de culmo con uno o dos nudos por segmento. La siembra es mejor horizontal que vertical u oblicua y se deben enterrar a 20 cm de profundidad, regando dos veces al día. Los nuevos brotes se pueden empezar a observar entre la segunda y cuarta semana. Este método no es ventajoso por su alto costo y por la limitación de material vegetal, los cuales pueden ser usados para otros propósitos (Londoño et al., 2002).

*Segmentos de ramas:* es útil, práctico y efectivo, además de ser fácilmente manejable. En Asia este método es ideal para establecer plantaciones a gran escala. Comúnmente se aplica en la siembra de *Dendrocalamus asper*, especie que se caracteriza por sus raíces aéreas en la base de las ramas laterales. Las ramas gruesas tienen mayor capacidad para enraizar que las delgadas. La eficiencia del enraizamiento varía en cada especie y depende del tamaño

del culmo y del grosor de la pared. Los bambúes de pared gruesa poseen una mayor emisión de brotes y mejor enraizamiento probablemente debido a una mayor reserva de nutrientes.

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

### Métodos biotecnológicos

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

#### *Propagación in vitro* vía organogénesis

La gran mayoría de las especies de bambúes han sido propagadas vía organogénesis utilizando como material vegetal yemas axilares (Sood *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2004; Arshad *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2006; Ramanayake *et al.*, 2006). Las especies *D. hamiltoni*, *G. angustifolia*, *Bambusa vulgaris* var. *vittata*, *B. wamin* y *B. edulis* han sido propagadas mediante esta vía (Rajneesh y Hyamal, 2009).

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

### LIMITANTES DE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE BAMBÚES

#### Contaminación microbiana de los explantes

La contaminación microbiana constituye una limitante para el establecimiento *in vitro* de

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

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

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

Por su parte, García-Ramírez *et al.* (2010) realizaron un estudio de la influencia de la época del año en el establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* y señalaron los meses de enero-abril y noviembre-diciembre como el mejor período del año para realizar los establecimientos *in vitro* en dicha especie.

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

En otras especies de bambúes como: *D. strictus*, *B. arundinacea*, *D. asper*, *P. edulis*, *D. giganteus* y *B. polymorpha*, en la desinfección se han obtenido altos porcentajes de yemas brotadas al emplear hipoclorito de sodio 0,1% durante 5 min, combinándose con inmersión en bicloruro de mercurio (0.1%), durante 5 min (ICFRE, 2002).

Al respecto, Marulanda *et al.* (2005) para la desinfección de yemas axilares de *G. angustifolia* utilizaron una solución de bicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) al 0.3% durante uno a tres minutos con lo que se alcanzaron un 74.0% de yemas brotadas y 52.0% de yemas brotadas para 5 minutos.

Por otra parte, Nidiye *et al.* (2006) obtuvieron entre un 80.0–100.0% de yemas brotadas durante el establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* al emplear  $\text{NaClO}$  al 2.0% durante 20 minutos.

Autores como Jiménez *et al.* (2006) hacen referencia a los medios de cultivo utilizados en esta fase. La mayoría de las especies han sido cultivadas en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al que se ha adicionado mio-inositol ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g l}^{-1}$ ), vitaminas MS ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) y ácido nicotínico ( $0.5 \text{ mg l}^{-1}$ ). Sin embargo, las concentraciones de reguladores de crecimiento varían según las especies. Por ejemplo, para *Bambusa balcooa*, Das y Pal (2005a) combinaron kinetina ( $1.0 \text{ mg l}^{-1}$ ) y 6-Benzilaminopurina (6-BAP) ( $2.5 \text{ mg l}^{-1}$ ). De igual manera, Das y Pal (2005b) para *Bambusa tulda* emplearon kinetina ( $1.0 \text{ mg l}^{-1}$ ) y 6-BAP ( $2.0 \text{ mg l}^{-1}$ ). Por su parte, Ramanayake *et al.* (2006) para *Bambusa vulgaris* var. *vittata* proponen 6-BAP ( $2.0 \text{ mg l}^{-1}$ ) así como Marulanda *et al.* (2005) y Jiménez *et al.* (2006) para *Guadua angustifolia* emplearon 6-BAP ( $1-3 \text{ mg l}^{-1}$ ). Por otra parte, Ramanayake y Yakandawala (1997) para *Dendrocalamus giganteus* combinaron 6-BAP ( $2.0 \text{ mg l}^{-1}$ ) y kinetina ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ).

### Baja tasa de multiplicación

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

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

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

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

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

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

La mayoría de los artículos científicos hacen referencia a la forma en la que deben ser subcultivados los explantes de bambú, todos ellos coinciden en mantener pequeños grupos de plantas al momento de transferirlas. Dicho método contribuye al incremento de los coeficientes de multiplicación y evita la muerte de las plantas (Saxena, 1990; Prutpongse y Gavinlertvatana, 1992; Ramanayake y Yakandawala, 1997; Ravikumar *et al.*, 1998; Ramanayake *et al.*, 2001). Específicamente, para *G. angustifolia* Jiménez *et al.* (2006) obtuvieron incrementos en el coeficiente de multiplicación al dividir las plantas en grupos de tres durante la multiplicación *in vitro* de esta especie.

En general, la respuesta de un tejido al cultivo *in vitro* depende en mayor medida de la interacción entre el nivel hormonal endógeno y

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

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

Al respecto, Bag *et al.* (2000) obtuvieron altos coeficientes de multiplicación al emplear 6-BAP (1.13 mg l<sup>-1</sup>) para *Thamnocalamus spathiflorus*. De igual manera, Ramanayake *et al.* (2001) obtuvieron similares resultados al emplear 6-BAP (6.0 mg l<sup>-1</sup>) para *Dendrocalamus giganteus*.

Por otra parte, Singh *et al.* (2000) para *Dendrocalamus strictus* elevaron la tasa de multiplicación al emplear Thidiazuron (0.5 mg l<sup>-1</sup>). De igual manera, Arya *et al.* (2001) para *Dendrocalamus asper* obtuvieron similares resultados al emplear 6-BAP (3.0 mg l<sup>-1</sup>).

Otros autores como Das y Pal (2005) combinaron ácido indolbutírico (AIB) (3.0 mg l<sup>-1</sup>) y 6-BAP (2 mg l<sup>-1</sup>) para incrementar el coeficiente de multiplicación en *Bambusa tulda*. Igualmente Sanjaya *et al.* (2005) combinan 6-BAP (1.0 mg l<sup>-1</sup>) y ácido naftalenacético (ANA) (0.5 mg l<sup>-1</sup>) para *Pseudoxytenanthera stocksii*, Kapoor y Rao (2006) para *Bambusa bambos* var. *gigantea* obtuvieron altos coeficientes de multiplicación al emplear 6-BAP (0.45 mg l<sup>-1</sup>). De igual manera, Ramanayake *et al.* (2006) para *Bambusa vulgaris* var. *vittata* obtuvieron similares resultados al emplear 6-BAP (4.0 mg l<sup>-1</sup>). Jiménez *et al.* (2006) para

*G. angustifolia* alcanzaron similares resultados al emplear 6-BAP (5.0 mg l<sup>-1</sup>).

### Baja tasa de enraizamiento

Los bajos porcentajes de enraizamiento *in vitro* constituyen unos de los principales problemas durante la organogénesis directa en varias especies de plantas, fundamentalmente en bambúes, la cual puede estar relacionada con la altura del explante, los reguladores de crecimiento y el estado físico del medio de cultivo (Kumar y Divakara, 2001).

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

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

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

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

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

El enraizamiento *in vitro* en bambúes constituye una limitante para la propagación *in vitro* de bambúes. La auxina más empleada ha sido el ácido indol-3-butírico (IBA) para inducir el enraizamiento *in vitro* en muchas especies de bambú como *Dendrocalamus strictus* (Nadgir *et al.*, 1984), *Dendrocalamus giganteus*, *D. strictus* (Ravikumar *et al.*, 1998). *Dendrocalamus brandisii* y *Bambusa arundinacea* (Nadgauda *et al.*, 1997), *Thamnocalamus spathiflorus* (Bag *et al.*, 2000) y *Bambusa balcooa* (Das y Pal, 2005a).

El empleo de IBA en la fase de multiplicación induce espontáneamente raíces en *Bambusa* sp. y *Dendrocalamus strictus* durante la fase (Shirgurkar *et al.*, 1996). Por su parte, Sanjaya *et al.* (2005) informaron para *Pseudoxynthera stocksii* la adición de 6-BAP (0.1 mg l<sup>-1</sup>) y IBA (1.0 mg l<sup>-1</sup>). De igual manera, Kapoor y Rao (2006) para *Bambusa vulgaris* var *gigantea* emplearon ANA (9.3 mg l<sup>-1</sup>), 6-BAP (0.45 mg l<sup>-1</sup>); AG<sub>3</sub> (0.035 mg l<sup>-1</sup>) y sacarosa (50 g l<sup>-1</sup>). Sin embargo, Ramanayake *et al.* (2006) indujeron el enraizamiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vittata* al emplear Thidiazuron (0.3mg l<sup>-1</sup>) en cámaras de luz continua (48umol m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>).

Autores como Arshad *et al.* (2005) y Ramanayake *et al.* (2008) realizaron la fase de enraizamiento *in vitro* en dos etapas. Describieron la presencia de raíces pequeñas durante la primera etapa de enraizamiento *in vitro* de *B. wamin*. Posteriormente, una vez que estas plantas se transfirieron a una segunda etapa a un medio de cultivo MS simple lograron también un incremento en el porcentaje de explantes con raíces y en la longitud de las mismas en 12.54 cm.

Esta etapa es de gran importancia, ya que las plantas adquieren las características y condiciones necesarias, para ser trasplantadas a la fase de aclimatización ya que desarrollan un sistema radical que les permite adaptarse a estas condiciones. La eficiencia

en la aclimatización de las plantas es trascendental para la propagación comercial de cualquier especie y de ella depende el éxito de la siembra en campo. En la literatura científica se hace poca referencia a dicha etapa y constituye unas de las principales limitantes durante la propagación de los bambúes empleando métodos de cultivo de tejidos.

### **Bajos porcentajes de supervivencia ex vitro**

Los principales problemas identificados durante la fase de aclimatización están dados por la pérdida de las plantas debido al estrés que sufren al enfrentarse a las condiciones *ex Vitro*. Dentro de los factores que más influyen en esta fase se encuentran: la calidad de las plantas cultivadas *in vitro*, el sustrato, la temperatura, la humedad y el manejo del material vegetal en esta etapa de aclimatización (Morales *et al.*, 2008).

Las plantas cultivadas *in vitro*, tienen generalmente la cutícula muy poco desarrollada, consecuencia de la alta humedad relativa (90.0% - 100.0%) que presentan los frascos, son delgadas, flácidas y la fotosíntesis es muy baja o nula. Además, presentan las células en empalizada encargadas de utilizar la luz, más pequeñas y en menor cantidad, los estomas son pocos funcionales, originando un estrés hídrico en los primeros días de la aclimatización. Como resultado, cuando se realiza el traslado a condiciones *ex vitro*, las plantas cultivadas *in vitro* produce una transpiración cuticular extra, debido a que la humedad del aire en estas condiciones es más baja (Morán, 2008).

Esta etapa es crítica pues las plantas *in vitro* sufren un cambio brusco del ambiente *in vitro* al *ex vitro*. Las plantas *in vitro* cultivadas en frascos de cultivo, expuestas a un medio de cultivo seleccionado para proveerles condiciones en la multiplicación vegetal y mínimas condiciones de estrés, inducen a la planta *in vitro* a una estructura y fisiología poco desarrolladas. Entre otros aspectos, sus raíces son muy vulnerables al daño físico, la tasa de fotosíntesis es muy baja y su aparato estomático es poco funcional, de cambios en el tamaño, la forma y la densidad de los estomas, con bajos niveles de luz, condiciones asépticas, abundantes azúcares y nutrientes,

logran un crecimiento heterotrófico o mixotrófico en una atmósfera con altos niveles de humedad (Nava 2008; Bazaldú-Muñoz *et al.*, 2008). Con estas características, las plantas propagadas *in vitro* tienen poco éxito de adaptación.

La aclimatización de bambú ha sido poco abordada, los estudios realizados hasta el momento solo reflejan de manera muy breve el tipo de sustrato utilizado y la supervivencia de las plantas en casa de cultivo, específicamente en la especie *B. vulgaris* var. *vulgaris* no se señalan estudios al respecto.

#### *Factores morfológicos que influyen en la aclimatización*

En las plantas cultivadas *in vitro*, la respuesta a la fotosíntesis en condiciones de luz, es semejante a plantas adaptadas a vivir en la sombra, las cuales se caracterizan por tener una tasa fotosintética y de restitución de luz bajas. La anatomía de las hojas, con un parénquima en empalizada más pequeño y en menor cantidad que el de plantas cultivadas en condiciones de campo, es uno de los factores determinantes. Sin embargo, las deficiencias en las estructuras de los cloroplastos, el nivel bioquímico, también contribuyen a limitar la actividad fotosintética. En la aclimatización las radiaciones más altas, puede provocar un estrés de luz, incluyendo la fotoinhibición y la fotooxidación de la clorofila. Este se observa por la presencia de clorosis y manchas secas que aparecen en la hoja. Es esencial para la aclimatización una buena optimización de la luz y así lograr la supervivencia requerida. El estrés del trasplante es fundamentalmente por el estrés hídrico, el cual es combatido por algunas especies de plantas con una buena frecuencia de riego en casas de cultivo, además el poco desarrollo de la cera cuticular y estomático coadyuvan a la deshidratación de las plantas llevadas a fase de aclimatización (Morán, 2008).

Las plantas cuando son llevadas a fase de aclimatización sufren un estrés hídrico debido a la baja humedad relativa, esto debido al pobre desarrollo de la cera cuticular y epicuticular, esta estructura aumenta cuando transcurre entre las dos o tres semanas en casa de cultivo las plantas (Grout *et al.*, 1977;

Moran, 2008). La degradación de la cera epicuticular, es factor importante en el retardo de la deshidratación de la hoja, ésta es reforzada al disminuir la humedad relativa (Ritchie *et al.*, 1991).

Gribaudo *et al.* (2001) observaron en plantas cultivadas *in vitro* que la cantidad de cera en la hoja era baja, mal estructurada y químicamente distintas a la cera de plantas en casas de cultivo. Además, valoraron la presencia de cera epicuticular de la superficie adaxial de la hoja, para verificar que la pérdida de agua estaba influenciada por la cantidad de cera o por deficiencia del cierre estomático y determinaron que la mayoría del agua se perdió a través de la superficie adaxial debido a un cierre estomático deficiente.

Dobrąnszki *et al.* (2010) observaron que la pérdida de agua en las hojas de plantas provenientes de cultivos *in vitro*, ocurrió desde la superficie abaxial, donde se encuentran localizados los estomas. La pérdida de agua está relacionada inversamente con el cierre estomático en plantas cultivadas *in vitro*.

En un corto periodo de tiempo en aclimatización con una humedad relativa (HR) baja, trae consigo un cambio en el funcionamiento estomático, y ocurre en menos de cinco días después de exponerlo a estas condiciones de humedad. Otro tiempo más largo de aclimatización involucra desarrollo de cera y de los cloroplastos, esto ocurre a partir de los 10 días en plantas de manzana (*Malus sylvestris* Mill) (Mohamed *et al.*, 2010).

El equilibrio del agua en tejidos de plantas micropropagadas no solo depende de regular la transpiración, sino de un suministro adecuado de agua a las raíces. Es por esto que las plantas cultivadas *in vitro* tienen pobres conexiones raíz-tallo, la estructura de la raíz alterada, la absorción y transporte del agua es negativo. La captación de agua por parte de las raíces, junto con la pérdida de agua por los ápices, es de importancia primaria para el mantenimiento del equilibrio del agua durante la aclimatización de las plantas cultivadas *in vitro*. Flachowsky *et al.* (2010) mostraron que las raíces de plantas

propagadas *in vitro*, generalmente pierden sus pelos radicales durante la aclimatización, pero estas raíces son todavía importantes porque las nuevas raíces desarrolladas son totalmente funcionales a partir de ellas.

Cabe mencionar que en los estudios de diferentes autores (Lin y Chang, 1998; Marulanda *et al.*, 2005; Dutta y Borthakur, 2009) realizados en *Bambusa edulis*, *Guadua angustifolia* y *Bambusa balcooa* se desarrolla una etapa de endurecimiento *in vitro* para luego transferir las plantas a fase de aclimatización. Esta etapa de endurecimiento favoreció el incremento de los porcentajes de plantas aclimatizadas que oscilaron entre 80.0% y 90.0%. Otros autores como Dutta y Borthakur (2009) también han prestado atención a la relación existente entre la altura de las plantas y su supervivencia durante la fase de aclimatización. Los investigadores antes mencionados obtuvieron en *B. balcooa* una supervivencia del 90% con plantas entre 2.0 y 6.0 cm de altura, y estas fueron capaces de emitir entre uno y cuatro nuevos hijos por planta. Sin embargo, estos autores no realizaron un estudio detallado de la relación o dependencia existente entre las características morfológicas de las plantas cultivadas *in vitro* y su respuesta en fase de aclimatización.

Por otro lado, en la especie *Dendrocalamus strictus*, Saxena *et al.* (1999) obtuvieron una tasa de supervivencia entre 80.0% y 92.0% pero no se refieren a las características de las plantas empleadas. En otras especies, como *Eucalyptus urophylla* y *Eucalyptus grandis* se relaciona la altura de las plantas con el éxito durante la aclimatización de las plantas. Martínez *et al.* (2005) al utilizar plantas cultivadas *in vitro* de 6.0 y 7.0 cm de altura, que poseían como promedio tres raíces y la raíz mayor medía entre 5 y 7 cm de longitud lograron entre 75.0% y 85.0% de supervivencia en fase de aclimatización.

Los artículos científicos consultados no refieren investigaciones profundas sobre el desarrollo de las plantas de bambúes en fase de aclimatización (Gillis *et al.*, 2007; Dutta y Borthakur, 2009; Rajneesh *et al.*, 2009; Sayanika *et al.*, 2009) De manera general, se restringen a la evaluación de la supervivencia sin profundizar en otras variables ni definir la relación

existente entre las características morfológicas de las plantas y su respuesta a las condiciones durante la aclimatización.

## CONCLUSIONES

Las técnicas de cultivo de tejidos ofrece un medio rápido y confiable para la propagación de diferentes especies de bambúes. En el caso de la regeneración de plantas por organogénesis este ha demostrado ser un método eficiente incluso a escala comercial para favorecer la propagación de bambúes. Los resultados incluidos en este trabajo demuestran que en las especies de bambúes los protocolos de regeneración de plantas vía organogénesis pueden ser empleados para este fin.

*Este trabajo fue presentado en el marco de la Primera Conferencia Regional de Bambú: El bambú en el desarrollo local, organizada por la Facultad de Construcciones, el Centro de Investigación y Desarrollo de Estructuras y Materiales (CIDEM) de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, la Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), INBAR y la red ECOSur, del 17-19 de mayo de 2011. Villa Clara, Cuba.*

## REFERENCIAS

- Acosta-Suárez, M, Alvarado-Capó Y, Cruz-Martín M, Roque B, Sánchez-García C, Leiva-Mora M, Freire-Seijo M, García-ramírez Y, Pérez Z, Salabarría T, Tejeda M, González M, Hurtado O (2008) Micobiota de plantas donadoras y contaminantes fúngicos del establecimiento *in vitro* de especies de bambúes. Biotecnología vegetal 8: 57-61
- Agnihotri, K, Ansari, S (2000) Adventitious rhizogenesis in relation to seasonal variation, size of culm branch cuttings and IAA treatment in bamboos. Indian For. 126: 971–984
- Arshad, S, Kumar A, Bhatnagar S (2005) Micropropagation of *Bambusa wamin* through proliferation of mature nodal explants. J. Biol. Res. 3: 59-66
- Arya, I, Satsangi R, Arya S (2001) Rapid micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus asper*. J. Sus. For. 14: 103–114
- Arya, S, Sharma S, Kaur R, Arya I (1999) Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot. proliferation using seeds. Plant Cell Rep. 18: 879–882

- Bag, N, Chandra S, Palni L, Nandi S (2000) Micropropagation of Dev-ringal [*Thamnocalamus spathiflorus* (Trin.) Munro] – a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. *Plant Sci.* 156: 125–135
- Bazaldú-Muñoz, C, Ventura-Zapata V, Salcedo-Morales G, Maldonado U, López A (2008) Densidad estomatal y potencial hídrico en plantas de tomate (*Physalis ixocarpa* Brot.), Propagadas por cultivo de meristemos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(2): 147-150
- Catasús, L (2000) Guía para colecta y determinación de bambúes. Hábitat-Cuba, La Hab, 14 p
- Cátasus, L (2003) Estudio de los bambúes arborescentes cultivados en Cuba. ACTAF. Cuba
- Chambers, S, Heuch J, Pirrie A (1991) Micropropagation and *in vitro* flowering of the bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Munro. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 27: 45–48
- Das, M, Bhattacharya S, Singh P, Figueiras T, Pal A (2008) Bamboo Taxonomy and Diversity in the Era of Molecular Markers. *Advances in Botanical Research.* 47: 225-267
- Das, M, Pal A (2005a) *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 81:109–112
- Das, M, Pal A (2005b) *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 81: 109–112
- Dobránszki, J y Teixeira da Silva, J (2010) Micropropagation of apple *Research review paper* 28, (4): 462-488
- Dutta, M, Borthakur M (2009) *In vitro* micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through nodal explants from field-grown culms and scope for upscaling. *Current Science* 96(7): 962-966
- Flachowsky, H, Hättasch C, Höfer M, Peil A, Hanke, M V (2010) Overexpression of LEAFY in apple leads to a columnar phenotype with shorter internodes. *Planta* 231:251–263
- García-Ramírez, Y, Freire M, Fajardo L, Tejada M, Reyes M (2007) Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var. vittata. *Biotecnología vegetal* 7(3):153-158
- García-Ramírez, Y, M Freire-Seijo, Blanca Rosa Pérez, Ortelio Hurtado (2010a) Efecto del estado físico del medio de cultivo y el número de subcultivos en la fase de multiplicación *in vitro* de plantas de *Bambusa vulgaris* var. vulgaris. *Schrad. ex Wendl. Biotecnología vegetal* 10 (2): 113-119
- García-Ramírez, Y, M Freire-Seijo, Blanca Rosa Pérez; Ortelio Hurtado (2010b) Influencia de la época del año en el establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. vulgaris *Schrad. ex Wendl. Biotecnología vegetal* 10 (3): 151-156
- Gielis J, Peeters H, Gillis K, Oprins J, Debergh P (2001) Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. *Acta Hort* 552:195–203
- Gielis, J, Oprins J (2002) Micropropagation of temperate and tropical woody bamboos from biotechnological dream to commercial reality. En: *Bamboo for sustainable development. Proceedings of the Vth International Bamboo Congress and the VIth International Bamboo Workshop*, pp. 333–344. San José, Costa Rica.
- Gillis, K, Gielis, J, Peeters, H, Dhooghe, E, Oprins, O (2007) Somatic embryogenesis from mature *Bambusa balcooa* Roxburgh as basis for mass production of elite forestry bamboos. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 91:115–123
- Godbole S, Sood A, Thakur R, Sharma M, Ahuja PS (2002) Somatic embryogenesis and its conversion into plantlets in a multipurpose bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. *Ex Munro. Curr Sci* 83: 885–889
- Griboudo, I, Novello V y Restagno M (2001) Improved control of water loss from micropropagated grapevines (*Vitis vinifera* cv. Nebbiolo). *Vitis* 40 (3): 137-140
- Grout, B, Aston, M (1977) Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort. Res.* 17: 1-7
- Hu, C, Wang J (1993) Meristem, shoot tip and bud culture. En: Evans, DA, Ammirato PV, Yameda Y (Eds) *Handbook of Plant Cell.* pp. 256-290. Springer. Dordrecht
- ICFRE (2002) Mass Propagation Protocol For Bamboos. Institute of Forest Genetics and Tree Breeding. Indian Council of Forestry Research and Education. 12p.
- Jiménez, V, Castillo J, Tavares E, Guevara E, Montiel M (2006) *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86: 389–395

- Kapoor, P, Rao I (2006) *In vitro* rhizome induction and plantlet formation from multiple shoots in *Bambusa bambos* var. *gigantea*. Bennet and Gaur by using growth regulators and sucrose. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 85: 211–217
- Koshy, K, Harikumar D (2000) Flowering incidences and breeding system in *Bambusa vulgaris*. Current Science 79: 1650-1652
- Koshy, K, Gopakumar B (2005) An improvised vegetative propagation technique for self-incompatible bamboos. Curr. Sci. 89: 1474–1476
- Kumar, B, Divakara B (2001) Proxi-mity, clump size and root distribution pattern in bamboo: A case study of *Bambusa arundinacea* (Retz.) Willd., *Poaceae*, in the Ultisols of Kerala, India. J. Bamboo and Rattan 1(1): 43-58
- Lane, W (1979). *Physiol. Plant.* 45: 260-264
- Li, D (2006) Taxonomy and biogeography of the *Bambuseae* (*Gramineae: Bambusoideae*). [En línea] En: <http://www.ipgri.cgiar.org/publications/HTMLPublication/572/ch11.htm>. Consultado: 6 de septiembre de 2007
- Lin, C, Chang W (1998) Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of fieldgrown culms and flowering of regenerated plantlets. Plant Cell Rep. 17: 617–620
- Lin, C, Lin C, Chang W (2004) Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and owering of bamboo *Bambusa edulis*. Plant Cell Tiss Org Cult 76: 75–82
- Londoño, X (2009) Aspectos Generales de los Bambúes Americanos. [En línea] En: [http://www.bambumex.org/paginas/ASPECTOS\\_GENERALES.pdf](http://www.bambumex.org/paginas/ASPECTOS_GENERALES.pdf). Consultado: 18 de Septiembre de 2008
- Londoño, X, Camayo G, Riaño N, López Y (2002) Characterization of the anatomy of *Guadua angustifolia* (*Poaceae: Bambusoideae*) culms. J. Am. Bamboo Soc. 16:18-31
- Marulanda, M, Gutiérrez LG, Márquez M (2005) Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunt. Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal 27(82): 5-15
- Martínez, R, Azpíroz, H, Rodríguez J, Cetina M, Gutiérrez, M (2005) Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* *Eucalyptus Urophylla* s. t. Blake *Eucalyptus grandis* Hill ex maiden. Ra ximhai 1 (003): 591-597
- Mcclure, F (1966) The Bamboos-A fresh Perspective. Cambridge: Harvard University Press
- Mohamed, M, Alsadon A (2010) Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. Scientia Horticulturae 123 ( 3, 4): 295-300
- Morales, C, Corbera J, Paneque V y Calaña J (2008) Efecto del sustrato en la aclimatización del cultivo de Anturio (*Anthurium andreaeanum*). Cultivos Tropicales 29 (3): 75-79
- Morán, P (2008) Implementación de técnicas de aclimatización para plantas micropropagadas de Vid (*Vitis vinifera* L.) Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Valparaíso
- Mroginski, L, Sansberro P, Flaschland E (2004) Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Parte V Métodos de propagación y conservación de germoplasma. En: Echenique, V, Rubinsten C y Mroginski L (Eds). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal, pp. 35-42: Editorial INTA. Buenos Aires
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
- Nadgauda, R, John C (1997) A comparison of *in vitro* with *in vivo* flowering in bamboo: *Bambusa arundinacea*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 48(3): 181-188.
- Nadgauda, R, John C, Parasharami V, Joshi M, Mascarenhas A (1997) A comparison of *in vitro* with *in vivo* owering in bamboo: *Bambusa arundinacea*, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 48:181-188
- Nadgauda, R, Parassharami V, Mascarenhas A (1990) Precocious owering and seedling behaviour in tissue cultured bamboos. Nature 344:335–336
- Nadgir, A, Phadke C, Gupta P, Parsharami, V, Nair S, Mascarenhas A (1984) Rapid multiplication of bamboo by tissue culture. *Silvae Genet.* 33: 219–223
- Nava, J (2008) Propagación *in vitro* y establecimiento en invernadero de las orquídeas *Trichocentrum arthagenense* (jacq.) Sw. y *Laelia eyermaniana* rchb. F., para su conservación y potencial aprovechamiento sustentable. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec, Morelos, México
- Ndiaye, A, Mamadou S, Niang D, Gassama-Dia Y (2006) *In vitro* regeneration of adult trees of *Bambusa vulgaris*. African Journal of

Biotechnology 5(13): 1245-1248

Prutpongse P, Gavinlertvatana P (1992) *In vitro* propagation of 54 species from 15 genera of bamboo. Hort. Sci. 27: 453–454

Rajneesh, A, Hyamal N (2009) *In vitro* Shoot Cut: A High Frequency Multiplication and Rooting Method in the Bamboo *Dendrocalamus hamiltonii*. Biotechnology 8(2): 259-263

Ramanayake, S, Maddegoda K, Vitharana M, Chaturani G (2008) Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities. Scientia Horticulturae 118: 270-273

Ramanayake, S, Meemaduma V, Weerawardene T (2006) *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* 'Striata'). Sci. Hort. 110: 109–113

Ramanayake, S, Wanniarachchi W, Tennakoon T (2001) Axillary shoot proliferation and *in vitro* overing in an adult giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37: 667–671

Ramanayake, S, Yakandawala K (1997) Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. Plant Sci. 129: 213–223

Ravikumar, R, Ananthakrishnan G, Kathiravan K, Ganapathi A (1998) *In vitro* shoot propagation of *Dendrocalamus strictus* Nees. Plant Cell Tiss Org Cult 52: 189–192

Ritchie, G, Short K y Davey M (1991) *In vitro* acclimatization of chrysanthemum and sugar beet plantlets by treatment with paclobutrazol and exposure to reduced humidity. Journal of experimental botany 42 (245): 1557-1563

Sanjaya, T, Ravishankar R (2005) Micropropagation of *Pseudoxynanthera stocksii* Munro. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41: 333-337

Saxena, S (1990) *In vitro* propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. Plant Cell Rep. 9: 431–434

Saxena, S, Dhawan V (1999) Regeneration and large-scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. Plant Cell Rep 18: 438–444

Saxena, S, Dhawan V (2004) Commercialization of bamboo tissue culture: potentials and constraints. En: Singh, HP, Dadlani, NK (Eds.), Abstracts, VIIth World Bamboo Congress. VIIth World Bamboo Congress, New Delhi, India

Sayanika, W, Sharma G (2009) *In vitro* Propagation of *Arundinaria callosa* Munro. An Edible Bamboo from Nodal Explants of Mature Plants. The Open Plant Science Journal 3: 35-39

Shirgurkar, M, Thengane S, Poonawala I, Jana M, Nadgauda R, Mascarenhas A (1996) A simple *in vitro* method of propagation and rhizome formation in *Dendrocalamus strictus* Nees. Curr. Sci. 70: 940–943

Singh, M, Jaiswal U, Jaiswal VS (2000) Thidiazuron-induced *in vitro* overing in *Dendrocalamus strictus* Nees. Curr. Sci. 79(11): 1529–1530

Sood A, Ahuja P, Sharma O, Godbole S (2002) *In vitro* protocols and eld performance of elites of an important bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. Plant Cell Tiss Org Cult 71: 55–63

Yasodha, R, Kamala S, Kumar A, Kumar D, Kalaiarasi K (2007) Effect of glucose on *in vitro* rooting of mature plants of *Bambusa nutans*. Scientia Horticulturae 116: 113-116

Yuan JL, Gu XP, Li LB, Yue JJ, Yao N, Guo GP (2009) Induction and plantlet regeneration of *Bambusa multiplex*. Sci Silvae Sin 3:35–40