

## Efecto de la densidad de inóculo sobre la morfología y fisiología de los brotes de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl cultivados en Sistema de Inmersión Temporal

Yudith García-Ramírez<sup>1</sup>, Mallelyn González-González<sup>2</sup>, Sinesio Torres García<sup>2</sup>, Marisol Freire-Seijo<sup>1</sup>, Martha Pérez<sup>1</sup>, Ángel Mollineda Trujillo<sup>3</sup>, Leonardo Rivero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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 54830. e-mail: yudith@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara, Cuba. CP 54830.

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara, Cuba. CP 54830.

### RESUMEN

*Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl es una especie de gran importancia ambiental y desempeña un papel vital en el desarrollo económico de Cuba. El presente trabajo se llevó a cabo con el objetivo de determinar el efecto de la densidad de inóculo sobre la morfología y fisiología de brotes de *B. vulgaris* cultivados en SIT. Se evaluaron variables morfológicas y fisiológicas de plantas cultivadas con diferentes densidades de inóculo (6, 12 y 18 explantes por SIT) durante 30 días. Los resultados mostraron que las densidades estudiadas tuvieron efecto sobre el crecimiento y la fisiología de los brotes durante la multiplicación *in vitro*. Los estudios revelaron que el número de brotes, la longitud del brote principal, el número de hojas y la clorofila aumentaron con la densidad del inóculo de 12 explantes. Sin embargo, con el experimento se demostró que el aumento de la densidad del inóculo disminuyó la acumulación de clorofila total, el contenido de masa seca de los brotes y aumentó el contenido de agua. Estos resultados mostraron una mejor respuesta morfo-fisiológica de los brotes cultivados con 12 explantes. Este estudio proporciona una comprensión inicial de la respuesta de los brotes de *B. vulgaris* al cultivo de condiciones *in vitro*, lo que es importante para aumentar la producción de plantas de bambú.

Palabras clave: bambú, contenido de agua, clorofila, masa fresca, masa seca

## Effect of inoculum density on the morphology and physiology of *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl shoots cultured in Temporary Immersion System

### ABSTRACT

*Bambusa vulgaris* Schrad. Ex Wendl is a species of great environmental importance and plays a vital role in the economic development of Cuba. The present work was carried out with objective of determining effect of inoculum density on morphology and physiology of the shoots of *B. vulgaris* cultivated in SIT. Morphological and physiological parameters of cultivated plants were evaluated at different inoculum densities (6, 12 and 18 explants per SIT) for 30 days. The results showed that densities studied had an effect on growth and physiology of shoots during *in vitro* multiplication. Studies revealed that number of shoots, shoot length, leaf numbers and chlorophyll increased with inoculum density of 12 explants. However, experiment showed that increase in inoculum density decreased accumulation of total chlorophyll, dry mass content of the shoots and water content. These results showed a better morfo-physiological response of shoots cultivated with 12 explants. This study provides an initial understanding of response of *B. vulgaris* shoots to cultivation of *in vitro* conditions, which is important for increasing production of bamboo plants.

Keywords: bamboo, chlorophyll, fresh and dry mass content, water content

### INTRODUCCIÓN

Los bambúes tienen gran importancia práctica a nivel mundial (Pratibha y Sarma, 2014). Sin

embargo, *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl es la especie más extendida y bien adaptada a las condiciones del Caribe. Cuba, en particular tiene enmarcada la reforestación con esta

especie, debido a su impacto ambiental en muchas áreas deforestadas y degradadas (Cordero-Miranda, 2010).

Desarrollar la propagación *in vitro* vía organogénesis sería una alternativa para incrementar el número de plantas de *B. vulgaris* en todo el territorio nacional (Álvarez *et al.*, 2003). En la actualidad la mayoría de los resultados describen protocolos a partir del empleo de los medios de cultivo en estado semisólido principalmente para *Bambusa arundinacea* Retz. Willd (Kalaiarasi *et al.*, 2014; Venkatachalam *et al.*, 2015), *Guadua angustifolia* Kunth (Correa *et al.*, 2015) y *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) (Goyal *et al.*, 2015).

En estudios previos se ha desarrollado la regeneración vía organogénesis de *B. vulgaris* en medio de cultivo líquido estático y se destacan deficiencias como los bajos coeficientes de multiplicación, número de hojas emitidas y la longitud de los brotes (García-Ramírez *et al.*, 2015). Conjuntamente con una pérdida del contenido de clorofilas totales, altos porcentajes de contenido de agua en los tejidos, bajos porcentajes de ligninas y fenoles en las hojas (González-González, 2013). Dicha deficiencia se asocia a una alta humedad relativa, un intercambio gaseoso limitado entre la atmósfera interna de los recipientes de cultivo y su medio ambiente circundante y la acumulación de etileno, condiciones que pueden inducir trastornos fisiológicos (Dewir *et al.*, 2014).

Con el objetivo de mejorar estas limitante se han ensayado diversas alternativas a través del

empleo de sistemas de inmersión temporal (SIT). Estos garantizarían una mayor calidad morfo-fisiológica de las plantas (Aragón *et al.*, 2010) debido a una mejor aireación provocada por la inmersión periódica y la renovación del ambiente interior, lo que resulta en una reducción de la hiperhidricidad (Vidal *et al.*, 2015).

En este sentido, la densidad de inóculo y el volumen de medio de cultivo son factores que pudieran contribuir a incrementar el número y la calidad morfo- fisiológicas de los brotes multiplicados *in vitro* de *B. vulgaris*. Se ha demostrado que el ajuste de estos factores mejora el desarrollo y crecimiento de los brotes, además de la morfología y fisiología con respecto a las plantas obtenidas en los sistemas en medio de cultivo líquido estático y semisólido (Gutiérrez *et al.*, 2016).

Por todo lo antes planteado la presente investigación se desarrolló con el objetivo de determinar el efecto de la densidad del inóculo sobre la respuesta morfológica y fisiológica en la proliferación de brotes de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl. en SIT.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se emplearon brotes de *B. vulgaris* multiplicados *in vitro* (tercer subcultivo) en medio de cultivo líquido estático según el protocolo propuesto por García-Ramírez *et al.* (2010). Cada explante consistió en grupos de 10-12 brotes con hojas expandidas (Figura 1).



Figura 1. Explantes de *Bambusa vulgaris* (grupos de 10-12 brotes) en el tercer subcultivo de multiplicación.

### Procedimientos generales

Para la multiplicación en SIT se empleó el medio de cultivo compuesto por sales inorgánicas MS de Murashige y Skoog (1962), 6-BAP ( $6.0 \text{ mg l}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ) y sacarosa ( $30 \text{ g l}^{-1}$ ). El pH se ajustó a 5.7 con el uso de HCl y KOH antes de la esterilización en autoclave.

Para la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* se emplearon sistemas de inmersión temporal (SIT) según el sistema de funcionamiento descrito por Escalona *et al.* (1999). Cada sistema emplea dos frascos de vidrio de 1500 ml de capacidad, uno como reservorio de medio de cultivo y otro como frasco de cultivo para crecimiento del material vegetal. El tiempo de inmersión fue de dos minutos y la frecuencia de inmersión cada 6 horas (4 inmersiones en 24 horas). En cada tratamiento se utilizaron cuatro SIT, cada frasco con 225 ml de medio de cultivo de multiplicación *in vitro*.

Los frascos de cultivo se colocaron en cámaras de crecimiento de luz solar a  $28 \pm 2.0^\circ\text{C}$ , el flujo de fotones fotosintéticos osciló entre  $38.0\text{-}45.7 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . El fotoperíodo fue de aproximadamente 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad.

### Efecto de la densidad de inóculo

Para determinar el efecto de la densidad de inóculo sobre la respuesta morfológica y fisiológica de los brotes en los SIT se analizaron tres densidades de inóculo: 6, 12 y 18 explantes por SIT.

Posteriormente, se realizaron renovaciones de medio de cultivo, cada 15 días hasta los 30 días de cultivo (Figura 1).

A los 30 días de cultivo, se determinaron indicadores morfológicos y fisiológicos.

**Indicadores morfológicos:** se cuantificó el número de nuevos brotes y hojas expandidas por explante. Además, se midió la longitud del brote principal (cm) desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja.

**Indicadores fisiológicos:** contenido de agua (%) y de pigmentos fotosintéticos (clorofilas a, b y totales).

Para determinar el contenido de agua se tomaron 20 explantes con hojas abiertas por cada tratamiento, que se obtuvieron por multiplicación *in vitro* en los SIT. Se enjuagaron con agua destilada y se secaron con papel de filtro. Se determinó la masa fresca (g) (MF) de los brotes y posteriormente su masa seca (g) (MS). Para esto último se colocaron a  $60^\circ\text{C}$  durante 72 h hasta peso constante. El contenido de agua (%) se calculó mediante la fórmula descrita por Bandyopadhyay *et al.* (2004):  $\text{CA}\% = (\text{MF} - \text{MS}) / \text{MF} * 100$ . Para calcular el área foliar ( $\text{dm}^2$ ) se empleó la fórmula descrita por García-Ramírez *et al.* (2015).

El contenido de pigmentos fotosintéticos se determinó en tejido foliar. A partir del segundo par de hojas de los brotes multiplicados *in vitro*, se tomó una muestra de 100 mg de masa fresca obtenida después de triturar el tejido en nitrógeno líquido, con el empleo de morteros y pistilos preenfriados. Para la cuantificación se utilizó el protocolo descrito por Mahmood *et al.* (2012). Brevemente, 100 mg de tejido vegetal fueron homogenizados con 1.7 ml de acetona al 80%, disuelta con fosfato de sodio  $2.5 \mu\text{M}$  (pH 7.8), se agitó en vortex durante 15 minutos y luego se centrifugó a  $4^\circ\text{C}$  por 15 minutos a 3 000 rpm. Posteriormente, se midió la absorbancia a 663 nm (clorofila a) y 646 nm (clorofila b) contra el blanco (1.0 ml de acetona al 80% en lugar del extracto). Para calcular el contenido de clorofilas totales ( $\mu\text{g ml}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) se emplearon las fórmulas descritas por Porra (2002).

### Procesamiento estadístico

Para el análisis estadístico de los datos experimentales se utilizó el programa SPSS ver. 18.0, para el sistema operativo Windows. Se empleó la prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para todas las variables analizadas, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados demostraron que la densidad de inóculo afectó la morfología y fisiología de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en SIT (Tabla 1).

Los brotes obtenidos en el tratamiento con 12 explantes alcanzaron una mayor longitud del brote principal, número de brotes y hojas

Tabla 1. Efecto de la densidad de inóculo sobre la multiplicación, morfología y fisiología de brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistema de inmersión temporal.

Variables morfo-fisiológicas	Densidad de inóculo/SIT		
	6 explantes	12 explantes	18 explantes
Número de brotes/ explante	4.501 ± 0.351c	9.600 ± 0.489 a	8.300 ± 0.424 b
Longitud del brote princ. (cm)	6.172 ± 0.211c	11.390 ± 0.295 a	7.870 ± 0.257b
Número de hojas/ explante	6.801 ± 0.445 c	17.651 ± 1.182 a	9.650 ± 0.488 b
Área foliar (dm <sup>2</sup> )	0.642 ± 0.029 c	2.934 ± 0.048 a	1.443 ± 0.045 b
Contenido de masa fresca* (g)	0.741 ± 0.026 c	2.184 ± 0.017 a	1.331± 0.041 b
Contenido de masa seca* (g)	0.063 ± 0.002 c	0.177 ± 0.004 a	0.090 ± 0.003 b
Contenido de clorofilas totales (µg ml <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	149.794 ± 0.337 b	165.923 ± 0.499 a	92.852 ± 0.513 c
Contenido de agua (%)	91.423 ± 0.196 b	91.867 ± 0.213 b	93.129 ± 0.263 a

Medias con letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según la prueba de Tukey,  $p < 0.05$ ,  $n=20$ , \* contenido de 20 explantes por frasco

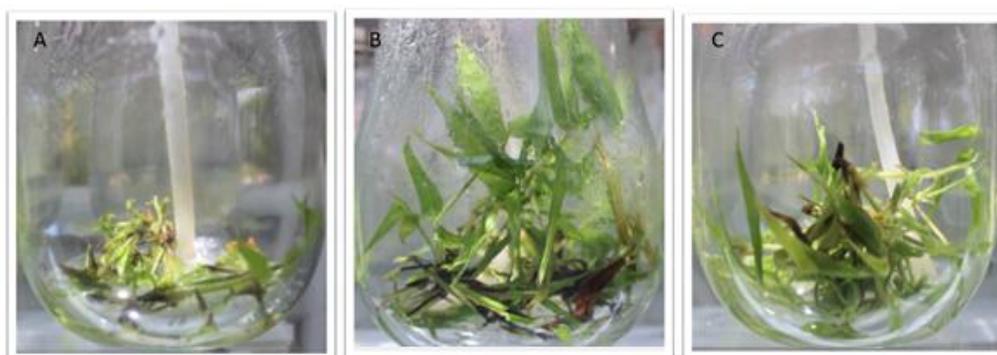


Figura 2. Brotes de *B. vulgaris* a los 30 días de cultivo en sistemas de inmersión temporal con diferentes densidades de inóculo, A: 6 explantes/frasco, B: 12 explantes/frasco, C: 18 explantes/frasco.

expandidas por explante. De igual manera, en este tratamiento se obtuvieron los mayores valores en el área foliar y la masa seca por SIT. Además, el contenido de agua fue menor en los brotes respecto al tratamiento donde se empleó una densidad de inóculo de 18 explantes, sin la presencia de brotes hiperhídricos. Todos estos análisis indicaron una mejor respuesta morfológica de los brotes obtenidos en el tratamiento con 12 explantes, con diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos. Tales hallazgos revelan, que esta densidad de inóculo incrementa y desarrolla el crecimiento de los brotes durante la multiplicación *in vitro* en los SIT, debido posiblemente a una relación óptima entre el explante y el medio de cultivo, así como la aeración en los frascos (Jin *et al.*, 2013).

En el tratamiento con menor densidad de inóculo (6 explantes/SIT) se alcanzaron los menores valores en las variables evaluadas. A los 30 días de cultivo se observaron brotes pequeños, con hojas enrolladas con una coloración de verde clara (código hex: #CCFFCC) a amarillo claro (código hex: #FFFFCC) (Figura 2). Es posible que estas afectaciones morfológicas pudieran estar determinada por la insuficiente densidad de inóculo, influenciado a su vez por el medio de cultivo y el ambiente *in vitro*. En este sentido, Rahman *et al.* (2015) refieren que la densidad de inóculo se encuentra estrechamente relacionada con la cantidad de nutrientes, la cual está influenciada por el volumen de medio de cultivo disponible por explante. Estas variables según Watt (2012), influyen

directamente en la morfología y fisiología de las plantas cultivadas en los SIT.

En el tratamiento con 18 explantes por SIT se incrementó el contenido de agua en los brotes (92.129%), con una reducción significativa en el contenido de clorofilas totales (92.85 mg gMS<sup>-1</sup>) y la masa seca (0.090 g). Además, en este tratamiento los brotes mostraron una coloración verde clara (código hex: #CCFFCC), con hojas poco expandidas (Figura 2c) a diferencia del tratamiento con 12 explantes/SIT donde los brotes desarrollaron hojas expandidas con una coloración verde oscuro (código hex: #00CC33) (Figura 2b). Las variaciones morfo-fisiológicas observadas en los brotes de *B. vulgaris*, pudieran deberse a desórdenes fisiológicos y anatómicos inducidos por el alto contenido de agua en los brotes (van den Dries *et al.*, 2013). Según Derwin *et al.* (2014) a medida que aumenta el contenido de agua en los espacios apoplásticos de los tejidos se induce una alteración fisiológica, lo cual provoca la formación de células deformadas, con ausencia de sistemas membranosos y cloroplastos deformados. Esto pudiera guardar relación con la coloración verde clara mostrada en los brotes con el menor contenido de clorofilas totales y masa seca alcanzado en el tratamiento de mayor densidad.

Al respecto, Cui *et al.* (2014) plantearon que la densidad de inóculo es un parámetro físico importante que influye en el crecimiento de las plantas *in vitro*. En este sentido, estos autores demostraron que las bajas densidades de inóculo podrían resultar en la subutilización de los SIT, mientras que altas podrían causar reducir el área foliar, contenido de masa seca y fresca, además del contenido de clorofila totales, dando como resultado plantas de menor calidad fisiológica.

De igual manera, Polzin *et al.* (2014) informaron un bajo desarrollo y crecimiento de los brotes de *Dioscorea cayenensis-rotundata* en SIT cuando emplearon una densidad de inóculos de 5 explantes/SIT. Al respecto, Pérez-Alonso *et al.* (2015) informaron que las bajas densidades de inóculo en los SIT provocaron una afectación en el desarrollo morfo-fisiológico de las plantas de *Digitalis purpurea* L.

Por otra parte, en los últimos años escasos trabajos científicos (Marulanda *et al.*, 2005;

Holst, 2010) hacen referencia al empleo de SIT para la multiplicación *in vitro* de bambúes, y a pesar de que la densidad de inóculo es una variable básica para establecer métodos de cultivo en SIT, se desconoce su efecto sobre el crecimiento y desarrollo de los brotes de bambú. En este sentido, los resultados de este trabajo permitirán optimizar las condiciones de cultivo *in vitro* y reducir los desórdenes fisiológicos, lo cual conducirá a un perfeccionamiento de los métodos de propagación *in vitro* de este cultivo.

Los resultados hasta aquí descritos permiten seleccionar la densidad de inóculo de 12 explantes/SIT como el mejor tratamiento para la multiplicación de los brotes de *B. vulgaris* en los SIT, con lo cual se logra un incremento del número de brotes (9.60 brote/explante) y la obtención de brotes de adecuada calidad morfo-fisiológica. Los estudios realizados resultan novedosos pues no fueron encontradas referencias en la literatura especializada para especies de bambúes. Esto puede abrir una nueva dimensión de oportunidad para futuras investigaciones y escalado a los laboratorios comerciales, para la propagación *in vitro* de bambúes.

## CONCLUSIONES

La densidad de inóculo influye en la calidad morfo-fisiológica de plantas *in vitro* de *B. vulgaris* multiplicadas en SIT, por ello, debe ser ajustada en aras de optimizar las condiciones de cultivo para la propagación masiva de esta especie.

## REFERENCIAS

- Álvarez M, Miguel B, Jorge L, Juan MM, Félix AA (2003) Tecnología para el manejo sostenible de *Bambusa vulgaris* Schrad. En: ACTAF (ed) Memorias del Primer Taller Nacional del Bambú., programa Desarrollo de alternativas agroecológicas para el uso del bambú en Cuba, pp. 39-51. Agencia de Información y Comunicación para la Agricultura (Agrinfor), La Habana; ISBN: 978-959-246-070-6
- Aragón CE, Escalona M, Rodríguez R, Cañal MJ, Capote I, Pina D, González-Olmedo J (2010) Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 46(1): 89-94; doi: 10.1007/s11627-009-9246-2

- Bandyopadhyay T, Gangopadhyay G, Poddar R, Mukherjee K (2004) Trichomes their diversity, distribution and density in acclimatization of teak (*Tectona grandis* L.) plants grown *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 78 (2):113–121; doi:10.1023/B:TICU.0000022534.03276.c5
- Cordero-Miranda E M (2010) Propuesta para el manejo sostenible de *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland con objetivo protector en diferentes condiciones ecológicas del río Cuyaguatje, Pinar del Río. Tesis en opción al grado científico de doctor en ciencias ecológicas, Universidad de Pinar del Río, Pinar del Río, Cuba
- Correa LAR, Moreno JEG, González NEC (2015) Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para el establecimiento del cultivo *in vitro*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental (RIAA)* 5(1): 155-169
- Cui HY, Murthy HN, Moh SH, Cui YY, Lee EJ, Paek KY (2014) Production of biomass and bioactive compounds in protocorm cultures of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. using balloon type bubble bioreactors. *Industrial Crops and Products* 53 (2): 28-33; doi: 10.1016/j.indcrop.2013.11.049
- Dewir Y, Indoliya Y, Chakrabarty D, Paek K (2014) Biochemical and physiological aspects of hyperhydricity in liquid culture system. *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*, pp. 693-709. Springer, Dordrecht; doi: 10.1007/978-94-017-9223-3\_26
- Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González JL, Desjardins Y, Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep* 18 (9):743–748; doi: 10.1007/s002990050653
- García-Ramírez Y, González-González M, Freire-Seijo M, La O-Cárdenas M, León-Quintana M, Roque-Morales B, Rivero-Quintana L (2015) Effect of morphological and physiological development on the acclimatization of *in vitro* plants of *Bambusa vulgaris* Schrad ex Wendl in Liquid Culture Medium. *Open Access Library Journal* 2(09): 1-6; doi: 10.4236/oalib.1101787
- Georgiev V, Schumann A, Pavlov A, Bley T (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences* 14(6): 607-621; doi: 10.1002/elsc.201300166
- González González M, García-Ramírez Y, Quiala E, Roque B, Mena E, Hurtado O, Freire-Seijo M (2013) Effect of immersion time on *in vitro* multiplication of *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland in RITA® TIS. *Biotecnología Vegetal* 13(1): 33-39
- Goyal AK, Pradhan S, Basistha BC, Sen A (2015) Micropropagation and assessment of genetic fidelity of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) nees using RAPD and ISSR markers. *3 Biotech* 5(4): 473-482; doi: 10.1007/s13205-014-0244-7
- Jin MY, Piao XC, Xiu JR, Park SY, Lian ML (2013) Micropropagation using a bioreactor system and subsequent acclimatization of grape rootstock '5BB'. *Scientia Horticulturae* 164: 35-40; doi: 10.1016/j.scienta.2013.09.004
- Kalaiarasi K, Sangeetha P, Subramaniam S, Venkatachalam P (2014) Development of an efficient protocol for plant regeneration from nodal explants of recalcitrant bamboo (*Bambusa arundinacea* Retz. Willd) and assessment of genetic fidelity by DNA markers. *Agroforestry systems* 88(3): 527-537; doi: 10.1007/s10457-014-9716-3
- Mahmood M, Bidabadi SS, Ghobadi C, Gray DJ (2012) Effects of methyl jasmonate treatment on alleviation of polyethylene glycol-mediated water stress in banana (*Musa acuminata* cv. 'Berangan', AAA) shoot tip cultures. *Plant Growth Regul* 68 (2):161-169; doi: 10.1007/s10725-012-9702-6
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497; doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Pérez-Alonso N, Capote A, Pérez A, Gerth A, Chong-Pérez B, Jiménez E (2015) Efecto de la densidad de inóculo y la renovación de la atmósfera gaseosa en el cultivo de brotes de *Digitalis purpurea* L. en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal* 15(1): 35-45
- Polzin F, Sylvestre I, Déchamp E, Ilbert P, Etienne H, Engelmann F (2014) Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis*-rotundata) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA®). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 50(2): 210-216; doi: 10.1007/s11627-013-9552-6
- Porra RJ (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73 (1): 149–156; doi: 10.1023/A: 1020470224740
- Pratibha S, Sarma K P (2014) *In vitro* propagation of *Bambusa nutan* in commercial scale in assam, India. *Journal of Environmental Research and Development* 9(2): 348

- Rahman M Z, Islam SS, Chowdhury AN, Subramaniam S (2015) Efficient microtuber production of potato in modified nutrient spray bioreactor system. *Scientia Horticulturae* 192: 369-374; doi: 10.1016/j.scienta.2015.06.014
- van den Dries N, Gianni S, Czerednik A, Krens FA, de Klerk GJM (2013) Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity. *Journal of Experimental Botany* 64(16): 5221-5230
- Vidal N, Blanco B, Cuenca B (2015) A temporary immersion system for micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 123(2): 229-243; doi: 10.1007/s11240-015-0827-y
- Venkatachalam P, Kalaiarasi K, Sreeramanan S (2015) Influence of plant growth regulators (PGRs) and various additives on *in vitro* plant propagation of *Bambusa arundinacea* (Retz.) Wild: a recalcitrant bamboo species. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 13(2): 193-200, doi: 10.1016/j.jgeb.2015.09.006
- Watt MP (2012) The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology* 11(76): 14025-14035; doi: 10.5897/AJB12.169

Recibido: 08-09-2016

Aceptado: 20-10-2016