

Efecto de la aplicación de silicio en el medio de cultivo sobre distintos parámetros fisiológicos en explantes de *Dendrocalamus giganteus* Munro

Andrés Hernández Pridybailo

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO
EN INGENIERÍA AGRONÓMICA

ESCUELA DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
2015

Agradecimientos

Primero, a los que no sólo me dieron vida física y espiritual, sino que fomentaron la curiosidad que es mi principal insumo hoy en día: mi padre, Guido Hernández Marín, y mi madre, Galina Pridybailo Chekan.

A mi hermano Antonio Hernández Pridybailo, que como parte de mi familia, ha sido testigo de mis logros y fracasos.

A la persona que inspiró la elección de mi carrera, enseñándome desde pequeño a preparar una cama de siembra y a regalar la cosecha a los que nos rodean: mi *babushka* Rosalia Chekan.

Al Dr. Víctor M. Jiménez, quien desde que fue mi *profe* de fisiología vegetal, ha escuchado cada ocurrencia de parte mía, convirtiéndose en todo un mentor, siendo así hasta la fecha en el comienzo de mi vida profesional.

Al Dr. Eric Guevara Berger, cuya guía en mi camino hacia la docencia e investigación ha sido esencial. Je vous remercie de vos conseils.

A la futura Dra. Isabel Mora, por haber confiado en mí y por haberme aceptado en el CIGRAS sin tener ningún tipo de experiencia en biotecnología.

A Andrea Holst por ofrecerme todo su conocimiento en bambú, imprescindible en el desarrollo de este trabajo.

A Cata, de quien valoro cada acción para hacerme sentir bien siempre que estoy con ella.

A Ester Vargas, Paúl Solórzano, María Viñas, Dessireé Zerpa, por ser parte de un ambiente de trabajo y amistad que, definitivamente, hace las cosas más fáciles, aunque el contexto no lo sea.

A mis hermanos de diferente madre, Jairo, Jose Daniel, Esteban y Felipe, quienes son parte de mi vida desde mi infancia y, junto con los cuales nos alegramos mutuamente de nuestros logros.

Y a cada una de las personas de que una u otra forma, desde lo formal a lo informal, me ayudaron para construir este trabajo.

Efecto de la aplicación de silicio en el medio de cultivo sobre distintos parámetros fisiológicos en explantes de *Dendrocalamus giganteus* Munro

Andrés Hernández Pridybailo

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA



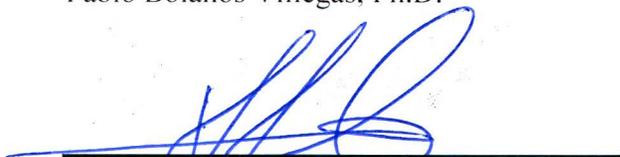
Víctor Jiménez García, Ph.D.

DIRECTOR DE TESIS



Pablo Bolaños Villegas, Ph.D.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Rafael Salas Camacho, Ph.D.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



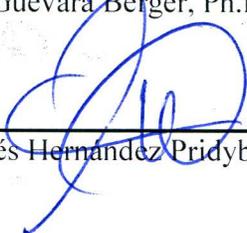
Floria Bertsch Hernández, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Eric Guevara Berger, Ph.D.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Andrés Hernández Pridybailo, B.Sc.

SUSTENTANTE

Resumen

Se ha comprobado que la aplicación de silicio (Si) en distintos cultivos posee efectos beneficiosos, porque cumple distintas funciones de índole tanto estructural como química, desde la perspectiva de la resistencia de la planta a estreses bióticos (i.e. daños por insectos, penetración de patógenos) y abióticos (i.e. oxidación, toxicidad, salinidad, desbalances nutricionales, déficit hídrico, anoxia). *Dendrocalamus giganteus* Munro es una especie de bambú, cuyo género es originario de la India y del sureste asiático, y posee potencial económico como material de construcción y por sus brotes comestibles, principalmente. En general, los distintos géneros y especies de bambú son acumuladores de Si. A pesar de ser considerada una planta acumuladora de Si, no se encontró información en la literatura acerca de la aplicación de Si en el cultivo *in vitro* de ninguna especie de bambú. Numerosos estudios han probado el efecto del Si en campo. Sin embargo, se encontraron pocos reportes en la literatura sobre su uso como nutriente en el cultivo *in vitro*. El presente trabajo determinó el efecto de la aplicación de Si en el medio de cultivo sobre el crecimiento, la peroxidación de lípidos, y la eficiencia fotosintética en *Dendrocalamus giganteus* cultivado *in vitro*. Para la introducción y cultivo *in vitro* de *D. giganteus* se utilizaron plantas provenientes del invernadero del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), y se les disectaron secciones de tallo con una yema cada uno. Luego del proceso de desinfección se cultivaron en un medio MS suplementado con 0,5 mg L⁻¹ de tiazurón (TDZ), gelificado con 2 g L⁻¹ de Phytigel® y dispensado en tubos de cultivo de 150 x 25 mm, y se colocaron en oscuridad por una semana, para ser luego transferidos a un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 12 horas, a 27,1 μmol m⁻² s⁻¹ de luz y a 25±2°C de temperatura ambiental. Debido a la alta contaminación inicial observada (>50%), se decidió continuar utilizando los explantes introducidos anteriormente, pero en la fase de multiplicación, de modo tal que se obtenga la cantidad de material vegetal necesaria para estudiar el efecto del Si adicionado al medio de cultivo en explantes de *D. giganteus*. Para ello, se subcultivaron los explantes en un medio de multiplicación con la misma composición del medio de establecimiento, excepto que contenía el doble de contenido de los macronutrientes del medio MS, y no contenía gelificante (medio líquido). Luego de cinco subcultivos (cada 21-22 días), los brotes obtenidos fueron transferidos a un sistema

de inmersión temporal (RITA®) con 200 ml del mismo medio de multiplicación, con ciclos de inmersión de un minuto cada cuatro horas, y bajo las mismas condiciones lumínicas y de temperatura antes descritas durante dos meses, de modo que se pudo obtener la cantidad de material necesaria para el experimento con Si. Antes de realizar el experimento de aplicación de Si al medio de cultivo, los explantes fueron transferidos del sistema de inmersión temporal a tubos de cultivo de 150 x 25 mm con el medio de multiplicación antes descrito. Los explantes crecieron de bajo un fotoperiodo de 12 horas, con $27,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz y a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, manteniendo estas condiciones durante seis semanas con un subcultivo a las tres semanas.

Para el experimento con Si, se preparó como base el medio de multiplicación MS que se describió anteriormente (con el doble del contenido de macronutrientes), sin gelificante (medio líquido), y suplementado con las diferentes dosis de Si (50 y 100 mg L^{-1} Si) y un testigo (0 mg L^{-1} Si). Los medios fueron dispensados en tubos de cultivo de 150 x 25 mm. Como fuente de Si se utilizó el producto comercial Nutrifol® Silicato de Potasio, el cual muestra en la etiqueta un contenido de SiO_2 de 20,75% (Si = 9,70%) y K_2O de 8,30% (K = 6,89%). Para balancear los iones presentes en los diferentes medios de cultivo, se decidió modificar la concentración de KNO_3 , y ajustar el NO_3^- faltante con HNO_3 en cada uno de los casos. Se tomaron muestras de estos medios de cultivo para el respectivo análisis de su contenido de minerales (después del autoclavado), incluyendo los contenidos de Si. Se subcultivaron brotes de aproximadamente 0,2 - 0,4 g de peso fresco en los distintos tratamientos, y se procedió a cuantificar diferentes parámetros fisiológicos de crecimiento, eficiencia fotosintética y peroxidación de lípidos a los 0, 7, 14 y 23 días después del cultivo en los medios con Si adicional.

Para la cuantificación del crecimiento, se determinó el peso fresco, peso seco, contenido de agua, número de brotes cloróticos, número de brotes necróticos, y el aumento en la brotación a los 0, 7, 14 y 23 días después de inducidos los tratamientos. Por otro lado, para la cuantificación de la eficiencia fotosintética, se utilizó un fluorómetro de clorofila para determinar la eficiencia máxima del fotosistema II (PSII) bajo un flujo constante de fotones (F_v'/F_m'), y bajo oscuridad (F_v/F_m). Para la cuantificación de la peroxidación de lípidos, se determinó colorimétricamente el contenido de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico, principalmente malondialdehído (MDA). Adicionalmente, como parámetro

de oxidación, se evaluó el grado de oscurecimiento del medio de cultivo por medio de una escala visual. Además, se tomaron muestras de brotes para la determinación de los contenidos de Si en los tejidos a los 23 días de cultivo en los tratamientos.

Los datos obtenidos a partir del análisis químico de los medios de cultivo, con 50 y 100 mg L⁻¹ Si, mostraron que los contenidos de Si fueron mayores con respecto a lo que en teoría deberían contener; sin embargo, se observa una tendencia creciente de las concentraciones de Si en cada uno de los medios en concordancia con los valores teóricos. Otros iones también presentaron diferencias en cuanto a su contenido teórico, de los cuales, cabe resaltar el caso del amonio, nitrato, potasio, hierro y sodio. En el caso del nitrato, se obtuvieron contenidos considerablemente mayores en los medios con Si, por lo que no se descarta el posible efecto que esto podría tener sobre las variables evaluadas. En el caso del sodio, si bien los contenidos son considerablemente mayores con respecto al valor teórico en todos los medios de cultivo utilizados, no se encontraron reportes que dichos contenidos sean fitotóxicos. Por otro lado, se considera que la variación obtenida en los demás iones corresponde a rangos normales de variación instrumental. En cuanto a los resultados obtenidos a partir de los análisis de contenidos de Si en los tejidos, se observa una cantidad de Si creciente, en miligramos por kilogramo de tejido, a dosis también crecientes del elemento en el medio de cultivo.

A los 23 días de cultivo, los explantes de *Dendrocalamus giganteus* cultivados con 50 mg L⁻¹ de Si en el medio de cultivo presentaron significativamente mayor peso fresco y seco con respecto al testigo (0 mg L⁻¹ Si; $p < 0,01$) y con la medida inicial (0 días; $p < 0,05$). Por el contrario, los explantes cultivados en ausencia de Si adicional mostraron una reducción significativa en el contenido de agua a partir del día 7, la cual se hizo más pronunciada en la evaluación del día 23. Los explantes de *D. giganteus* que fueron cultivados con ambas concentraciones de Si adicional produjeron una mayor cantidad de brotes por explante que el testigo a los 14 y 23 días de cultivo. En cuanto a la aparición de necrosis en los brotes, únicamente los explantes cultivados con 100 mg L⁻¹ de Si presentaron un porcentaje de brotes necróticos significativamente menor con respecto al testigo en el día 14 ($p < 0,05$) y en el día 23 ($p < 0,01$). Las variables longitud de explante y porcentaje de brotes cloróticos por explante, no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo. El estado general de los brotes no presentó diferencias a nivel visual.

En cuanto a la determinación de la eficiencia fotosintética, los explantes cultivados con Si en el medio de cultivo presentaron mayores eficiencias del PSII, con diferencias más marcadas con respecto al testigo, cuando el PSII fue aclimatado por 30 minutos (Q_A oxidada).

No se detectaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos con Si con respecto al testigo, ni a lo largo del tiempo. Solamente se encontraron casos aislados de hiperhidricidad, que podrían dar indicio de que los explantes sufren un estrés oxidativo. El oscurecimiento del medio tampoco mostró relación con las otras variables. Por lo tanto, es probable que en los explantes de *D. giganteus* utilizados en el experimento, la peroxidación de lípidos no fuese un factor determinante en la eficiencia de su micropropagación, pues no se encontró relación entre los contenidos de MDA en sus tejidos con respecto a las distintas variables medidas.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	9
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES	11
El Si en el ecosistema y su acumulación en plantas	11
Parámetros fisiológicos para la determinación del grado de estrés en plantas	13
El Si y su rol en la mitigación del estrés	15
El estrés fisiológico en la micropropagación de plantas	16
Uso del Si en la micropropagación de plantas	16
La micropropagación de <i>Dendrocalamus giganteus</i> Munro.	17
Justificación del trabajo	19
OBJETIVOS.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Localidad y financiamiento.....	21
Introducción y establecimiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Dendrocalamus giganteus</i>	21
Experimento de aplicación de Si en el medio de cultivo.....	23
Análisis químico de medios de cultivo y tejidos vegetales	24
Evaluación del crecimiento, contenido de agua, necrosis y clorosis	24
Evaluación de la máxima eficiencia fotosintética del PSII bajo luz (F_v'/F_m') y oscuridad (F_v/F_m)	25
Evaluación de la peroxidación de lípidos y oscurecimiento del medio	25
Análisis estadístico de los datos	26
RESULTADOS	27
Análisis químico de medios de cultivo y de tejidos	27
Efecto de la aplicación de Si sobre el crecimiento, contenido de agua, necrosis y clorosis de explantes de <i>Dendrocalamus giganteus</i> cultivados <i>in vitro</i>	29
Efecto de la aplicación de Si sobre la eficiencia máxima del fotosistema II en hojas de explantes bajo luz (F_v'/F_m') y bajo oscuridad (F_v/F_m).	33
Efecto de la aplicación de Si sobre la peroxidación de lípidos y el oscurecimiento del medio	34
DISCUSIÓN.....	35
Análisis químico de medios de cultivo y de tejidos	35

Efecto de la aplicación de Si sobre el crecimiento, contenido de agua, necrosis y clorosis de explantes de <i>Dendrocalamus giganteus</i> cultivados <i>in vitro</i>	36
Efecto de la aplicación de Si sobre la eficiencia máxima del fotosistema II en hojas de explantes bajo luz (Fv'/Fm') y bajo oscuridad (Fv/Fm).....	41
Efecto de la aplicación de Si sobre la peroxidación de lípidos y el oscurecimiento del medio.....	42
LITERATURA CITADA.....	44
ANEXOS.....	50
Anexo 1. Balance de iones calculado para los distintos medios de cultivo con concentraciones crecientes de silicio (0, 50 y 100 mg L ⁻¹ Si), utilizando como fuente de silicio el producto comercial Nutrifol® Silicato de Potasio (Agrotico, Costa Rica).....	50
Anexo 2. Resultados de análisis químicos realizados en el Laboratorio de Suelos y Foliare del Centro para Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, para los medios de cultivo y los tejidos vegetales utilizados en el experimento.....	51
Anexo 3. Análisis estadísticos de las variables estudiadas.....	53
Anexo 4. Variables fisiológicas que no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo	59
Anexo 5. Datos crudos de las distintas variables	60

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Distribución de plantas acumuladoras de silicio en el reino Plantae (tomado de Epstein 1999)	13
Figura 2. Necrosis descendente en explantes de <i>Dendrocalamus giganteus</i> cultivados <i>in vitro</i>	19
Figura 3. Escala visual del grado de oxidación del medio	26
Cuadro 1. Concentración de iones en los distintos medios de cultivo utilizados, y su respectiva diferencia con respecto a los valores teóricos del medio MS con el doble contenido de macronutrientes.	28
Figura 4. Acumulación de silicio en tejidos de explantes de <i>Dendrocalamus giganteus</i> cultivados <i>in vitro</i> con 0, 50 y 100 mg L ⁻¹ de silicio en el medio de cultivo	29
Figura 5. Peso fresco de explantes de <i>Dendrocalamus giganteus</i> a los 0, 7, 14 y 23 días, cultivados <i>in vitro</i> con 0, 50 y 100 mg L ⁻¹ de silicio en el medio de cultivo.....	30
Figura 6. Peso seco de explantes de <i>Dendrocalamus giganteus</i> a los 0, 7, 14 y 23 días, cultivados <i>in vitro</i> con 0, 50 y 100 mg L ⁻¹ de silicio en el medio de cultivo	30
Figura 7. Contenido de agua en explantes de <i>Dendrocalamus giganteus</i> a los 0, 7, 14 y 23 días, cultivados <i>in vitro</i> con 0, 50 y 100 mg L ⁻¹ de silicio en el medio de cultivo	31
Figura 8. Estado general de explantes de <i>Dendrocalamus giganteus</i> a los 0, 7, 14 y 23 días, cultivado <i>in vitro</i> con 0, 50 y 100 mg L ⁻¹ de silicio en el medio de cultivo	31
Figura 9. Aumento en número de brotes por explante de <i>Dendrocalamus giganteus</i> a los 7, 14 y 23 días, cultivado <i>in vitro</i> con 0, 50 y 100 mg L ⁻¹ de silicio en el medio de cultivo.....	32
Figura 10. Brotes necróticos por explante de <i>Dendrocalamus giganteus</i> a los 0, 7, 14 y 23 días, cultivado <i>in vitro</i> con 0, 50 y 100 mg L ⁻¹ de silicio en el medio de cultivo	33
Figura 11. Eficiencia máxima del fotosistema II bajo luz Fv'/Fm'(a) y bajo oscuridad Fv/Fm (b) de hojas de explantes de <i>Dendrocalamus giganteus</i> a los 0, 7, 14 y 23 días, cultivados <i>in vitro</i> con 0, 50 y 100 mg L ⁻¹ de silicio en el medio de cultivo	34

INTRODUCCIÓN

Después del oxígeno, el silicio (Si) es el segundo elemento más abundante en la corteza terrestre (Snyder et al. 2007). El Si se ha visto como un elemento esencial en numerosas especies pertenecientes a las familias Poaceae y Cyperaceae (Shen et al. 2010). Se ha comprobado que la aplicación de Si en distintos cultivos posee efectos beneficiosos, porque cumple distintas funciones de índole tanto estructural como química, desde la perspectiva de la resistencia de la planta a estreses bióticos (i.e. daños por insectos, penetración de patógenos) y abióticos (i.e. oxidación, toxicidad, salinidad, desbalances nutricionales, déficit hídrico, anoxia) (Ma y Yamaji 2008). Factores propios del cultivo *in vitro* de plantas, como la alta concentración de sales, exceso de agua, desbalances de iones, exposición a reguladores de crecimiento, daños mecánicos producto de la manipulación, y exposición a agentes antimicrobianos pueden inducir distintos tipos de estrés fisiológico que pueden afectar la eficiencia y homogeneidad en micropropagación de plantas (Cassells y Curry 2001).

Dendrocalamus giganteus Munro es una especie de bambú, cuyo género es originario de la India y del sureste asiático, y posee potencial económico como material de construcción (Lima et al. 2008) y por sus brotes comestibles (Choudhury et al. 2012) principalmente. En general, los distintos géneros y especies de bambú son acumuladores de silicio (Lux et al. 2003).

Numerosos estudios han probado el efecto del Si en campo (Snyder et al. 2007); sin embargo, se encontraron pocos reportes en la literatura sobre su uso como nutriente en el cultivo *in vitro*. Por ejemplo, se ha utilizado el Si en el medio de cultivo para la micropropagación de *Cattleya loddgesii* (Orquidaceae) (Soares et al. 2011), *Gerbera jamesonii* (Asteraceae) (Silva 2007), *Fragaria x ananassa* (Rosaceae) (Braga et al. 2009), *Cotoneaster wilsonii* (Rosaceae) (Sivanesan et al. 2011) y en *Musa* sp. variedad “Maça” (Asmar et al. 2011), en donde se han obtenido efectos beneficiosos, como aumentos en crecimiento y en otras variables morfológicas y fisiológicas. El presente trabajo busca determinar el efecto de la aplicación de Si en el medio de cultivo sobre distintos parámetros fisiológicos (peroxidación de lípidos, eficiencia fotosintética y crecimiento) en *Dendrocalamus giganteus* en la etapa de establecimiento *in vitro*.

ANTECEDENTES

El Si en el ecosistema y su acumulación en plantas

Después del oxígeno, el Si es el segundo elemento más abundante en la corteza terrestre (Snyder et al. 2007); sin embargo, es un elemento frecuentemente ignorado en tanto a su función en el ecosistema. Cooke y Leishman (2011) señalan que la mayor parte de la información acerca de la función del Si en las plantas proviene de investigaciones en agronomía, bioquímica, geología, arqueología y paleontología; pero que a pesar de la información disponible al respecto, no ha existido un grado de enfoque e integración suficiente en el área de ecología vegetal, para determinar la función de los ciclos biogeoquímicos del Si. No obstante, recientemente Song et al. (2012) concluyen que el ciclo geoquímico del Si se encuentra usualmente acoplado al del carbono en diferentes procesos y escalas de tiempo, por lo que podría jugar un rol importante en la regulación de las concentraciones de dióxido de carbono atmosférico, y por lo tanto podría tener impacto sobre el cambio climático. Por otro lado, Keller et al. (2012), además de concordar con lo mencionado anteriormente, discuten la posibilidad de que la actividad agrícola ha tenido un impacto significativo sobre el ciclo de carbono, no solamente por las emisiones de gases de efecto invernadero, sino que por la reducción del reservorio de fitolitos (i.e. estructuras de Si amorfo formadas durante la asimilación en tejidos vegetales), causada por una extracción más eficiente del Si del suelo por parte de plantas cultivadas, en comparación con la remoción de Si por parte de plantas silvestres.

El Si disponible para las plantas se encuentra en el suelo en forma de ácido silícico $[\text{Si}(\text{OH})_4]$, o en su forma ionizada, $\text{Si}(\text{OH})_3\text{O}^-$ (la cual predomina a $\text{pH} > 9$), y su presencia en las plantas es producto de su absorción en las formas antes mencionadas, y por su polimerización controlada en alguna ubicación final en forma de un gel amorfo ($\text{SiO}_2 \bullet n\text{H}_2\text{O}$), formando fitolitos (Currie y Perry 2007). El Si es absorbido por las plantas de forma activa (i.e. por medio de transportadores), pasiva (i.e. por medio de la absorción de agua y translocado por el flujo de transpiración) o negativa (i.e. rechazándolo), dependiendo de la capacidad de absorción de este elemento que poseen las distintas especies de plantas (Mitani y Ma 2005). Yamaji et al. (2012) mencionan que recientemente se han identificado transportadores específicos de Si en raíces de cebada (*Hordeum*

vulgare), maíz (*Zea mays*), calabaza (*Cucurbita moschata*), arroz (*Oryza sativa*) y trigo (*Triticum aestivum*). El primer transportador se identificó en arroz (Ma et al. 2006), y es llamado *Lsi1* (Low silicon 1). *Lsi1* se encarga del influjo de Si hacia las células, y es una proteína de membrana que pertenece a la subfamilia de proteínas parecidas a las acuaporinas (*aquaporine like proteins* en inglés); se encuentra localizado en las raíces principales y en las laterales, en el extremo distal de las células de la exo y endodermis. El otro transportador, *Lsi2*, posee propiedades parecidas a *Lsi1*, a diferencia de que *Lsi2* se encuentra en el extremo proximal de las células de la exo y endodermis de la raíz, y se encarga el eflujo de Si de las células. Luego del transporte transcelular por medio de *Lsi1* y *Lsi2*, el Si es depositado en el xilema y traslocado por medio del flujo transpiracional (Ma et al. 2011).

El Si se ha visto como un elemento esencial en numerosas especies pertenecientes a las familias Poaceae y Cyperaceae (Shen et al. 2010). Otras familias de plantas, como Cucurbitaceae, Urticaceae y Commelinaceae, presentan acumulaciones intermedias de Si en sus órganos, mientras que otras especies presentan pequeñas cantidades del elemento (figura 1). La acumulación de Si en diferentes especies de bambú se encuentra documentada (Lux et al 2003; Ding et al. 2008; Collin et al. 2011). Específicamente, en *Dendrocalamus giganteus* se reportan contenidos de Si en la base del tallo de 2570 ± 1589 mg kg⁻¹ (0,2570%), en parte distal del tallo de $12152,4 \pm 3505$ mg kg⁻¹ (1,2153%) y en las hojas de $47207,4 \pm 1215$ mg kg⁻¹ (4,7207%) (Collin et al. 2011), por lo que se podría considerar a esta especie como una acumuladora de Si, para la cual, eventualmente podría ser beneficioso aplicar este elemento en medios de cultivo *in vitro* para su micropropagación.

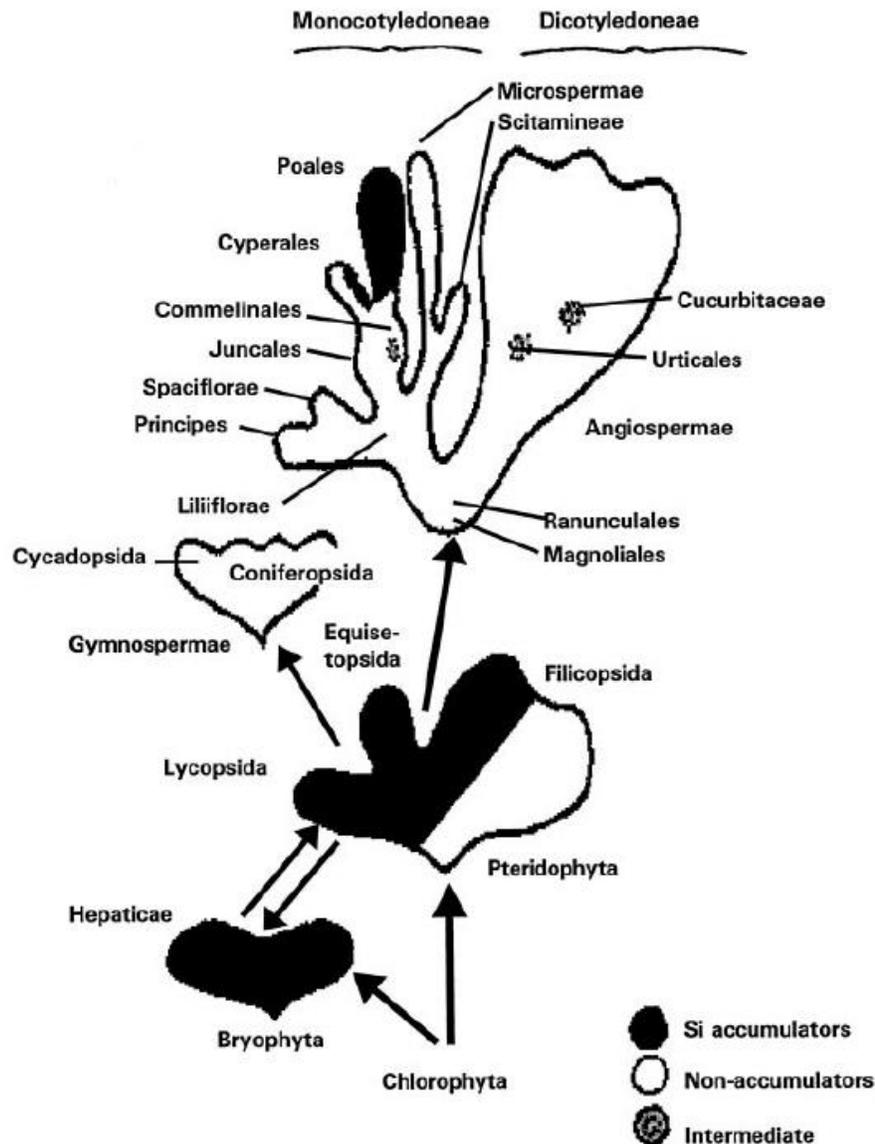


Figura 1. Distribución de plantas acumuladoras de silicio en el reino Plantae (tomado de Epstein 1999).

Parámetros fisiológicos para la determinación del grado de estrés en plantas

La micropropagación de plantas induce diferentes tipos de estrés fisiológico que pueden afectar al organismo vegetal y, por lo tanto, comprometer su crecimiento, desarrollo y homogeneidad (Cassels y Curri 2001). Es importante, entonces, contar con herramientas para poder caracterizar diferentes fenómenos que ocurren durante la micropropagación de plantas.

Por ejemplo, uno de estos fenómenos es el estrés oxidativo, el cual es causado por especies de oxígeno reactivo (llamados también radicales libres, o ROS en inglés *–reactive oxygen species–*). Los radicales libres son producidos de forma natural como parte del metabolismo aeróbico de las plantas, y algunos están presentes en el ambiente (Ahmad et al. 2008). Las principales especies de oxígeno reactivo son el oxígeno (O_2), el radical perhidroxilo ($HO\cdot_2$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el hidroxilo ($OH\cdot$) y el ión óxido (O^{2-}). Estas sustancias son producidas en mayor cantidad en respuesta a distintos tipos de estrés, y funcionan como señales para reacciones de defensa; sin embargo, los radicales libres también reaccionan con distintos componentes celulares, principalmente con proteínas, ácidos grasos insaturados y ADN (Møller et al. 2007), lo cual provoca modificaciones y, de este modo, causan estrés oxidativo. La peroxidación de lípidos es un indicador de estrés oxidativo en tejidos. Dicha peroxidación puede ser determinada por medio del método de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS *thiobarbituric acid reactive substances* en inglés) (Hodges et al. 1999). La principal sustancia producida y, cuyo contenido es posible determinar, es el malondialdehído (MDA), el cual es formado cuando las especies de oxígeno reactivo reaccionan con los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares. El MDA dentro de la planta es tóxico, ya que puede modificar el ADN al reaccionar con la guanina (Møller et al. 2007), y con proteínas y aminoácidos (Shin et al. 2009).

La fluorescencia es un parámetro fisiológico utilizado ampliamente en plantas para analizar principalmente el funcionamiento del fotosistema II (PSII). La luz posee tres vías principales a la hora de ser absorbida por las antenas y dirigida hacia el centro de reacciones: puede ser utilizada para desencadenar las reacciones fotoquímicas, puede ser reflejada en forma de calor o bien, ser reflejada en forma de fluorescencia (Baker 2008). Si el PSII se ve afectado por alguna condición ambiental, es de esperar que menor cantidad de luz pase a ser parte de las reacciones fotoquímicas y, por el contrario, la planta disipe mayor cantidad de luz en forma de fluorescencia (o bien calor). La diferencia entre determinar la razón de F_v'/F_m' y la de F_v/F_m , es que en el primer caso, se determina la reflexión de luz causada por el fotosistema II (PSII) en un estado en el que la quinona A (Q_A , el principal aceptor de electrones provenientes del PSII) se encuentra en su estado máximo de reducción, o cerrado (i.e. saturado con electrones), y en el segundo caso, se

determina la reflexión de luz del PSII cuando la Q_A se encuentra totalmente oxidada, o abierta (i.e. sin flujo de electrones); en sendas situaciones, estas razones dan cuenta de la eficiencia del PSII para recibir luz y procesarla para ser utilizada en las reacciones químicas que dan origen a la fotosíntesis (Baker 2008). Es decir, entre mayor sea el valor de fluorescencia máxima (Fm), significa que mayor es la cantidad de luz que es reflejada, el valor que resulta de dicha razón será más bajo y, a su vez, indicativo del estado de estrés que posee una planta (Baker 2008) por una regulación negativa de la fotosíntesis o fotoinhibición (Öquist et al. 1992).

El Si y su rol en la mitigación del estrés

Se ha reportado que la aplicación de Si en distintos cultivos posee efectos beneficiosos, porque cumple distintas funciones de índole estructural y bioquímica, desde la perspectiva de la resistencia de la planta a estrés biótico (i.e. daños por insectos, penetración de patógenos) y abióticos (i.e. oxidación, toxicidad, salinidad, desbalances nutricionales, déficit hídrico, anoxia) (Ma y Yamaji 2008). Chen *et al.* (2011) encontraron que al aplicar el elemento de forma exógena en arroz bajo condiciones de déficit hídrico, se redujo la fluorescencia máxima. El Si, al ser depositado bajo la cutícula, forma una doble capa silíceica (Ma y Yamaji 2008), que limita la transpiración a través de la misma, lo cual mejora la condición hídrica de la hoja (Gong et al. 2003).

Por otro lado, en cuanto a desbalances nutricionales y toxicidades por metales pesados, en la literatura se encuentra registrado el efecto positivo del Si aplicado de forma exógena en la mitigación de estos tipos de estrés. Marschner et al. (1990) detectaron una mitigación de un desbalance entre el fósforo y el zinc por parte del Si en *Cucumis sativus*. Por otro lado, el Si es principalmente incorporado en las paredes celulares, y en este proceso, puede ocurrir co-precipitación del Si con aluminio y metales pesados en dichas paredes celulares, por lo que se cree que este es el mecanismo por el cual el Si ayuda a mitigar toxicidades con esos elementos (He et al. 2014)

Uno de los efectos estudiados, respecto a la función del Si en la mitigación de la peroxidación de lípidos por causa del daño oxidativo, es el aumento de la actividad de distintas enzimas que capturan especies de oxígeno reactivo, como catalasa, peroxidasa y

superóxido dismutasa; además, el Si promueve la acumulación de antioxidantes no enzimáticos como el ascorbato y la glutatona (Liang et al. 2007).

El estrés fisiológico en la micropropagación de plantas

Existen distintas condiciones propias del cultivo *in vitro* que pueden generar estrés en las plantas y, posteriormente, podrían causar distintas anomalías en el cultivo de tejidos. Factores propios de la micropropagación, como alta concentración de sales, exceso de agua, deficiencias o toxicidades de iones, exposición a reguladores de crecimiento, daños mecánicos por la manipulación de explantes y exposición a agentes antimicrobianos, pueden causar diferentes tipos de efectos, como hiperhidricidad, habituación, necrosis, variación somaclonal (Cassells y Curry 2001) y oscurecimiento de tejidos y medios de cultivo (Azofeifa 2009). Un estudio hecho por Balen et al. (2009) en *Mammillaria gracilis* (Cactaceae) determinó que condiciones, como la alta humedad relativa y cantidad de agua libre en el medio, causan que la planta posea una alta absorción de agua y baja transpiración. Lo anterior crea una condición celular cercana a la anoxia y, a su vez, estrés oxidativo.

Uso del Si en la micropropagación de plantas

Numerosos estudios han probado el efecto del Si en campo (Snyder et al. 2007); sin embargo, también se encontraron varios reportes sobre el uso del Si como nutriente en el cultivo *in vitro* de plantas. En un estudio, Silva (2007) probó distintas fuentes de Si para optimizar el desarrollo y crecimiento *in vitro* de *Gerbera jamesonii*. Los resultados mostraron que el silicato de calcio a una concentración de 1,0 g/l tuvo influencia en un mejor desarrollo de los tejidos *in vitro*; además, el análisis anatómico de las hojas mostró que, en presencia de silicato de potasio y de calcio, estas presentaron un mayor grosor del mesófilo y una relación entre el diámetro polar y el ecuatorial menor (i.e. tendían a ser más anchas que largas) y que la presencia de silicato de sodio promovió la formación de mayor número de estomas. Braga et al. (2009) estudiaron características anatómicas de plántulas de *Fragaria x ananassa* (Rosaceae) cultivadas en medios MS (Murashige y Skoog 1962) a los cuales se les añadió silicatos de potasio, calcio y sodio. Se observó que las plantas a las que se les aplicó silicato de sodio, aumentaron su peso seco; además, en comparación con

el testigo, las hojas de las plantas que crecieron con Si en el medio de cultivo tuvieron mayor cantidad de clorofila, mayor grosor, mayor deposición de cera epicuticular y mayor deposición de Si en sus células. Sivanesan *et al.* (2011) probaron la aplicación de Si en forma de silicato de potasio (K_2SiO_4) en cultivo *in vitro* de *Cotoneaster wilsonii* (Rosaceae). El elemento fue añadido en la etapa de multiplicación, en un medio MS con $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de thidiazuron (TDZ) y $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido 1-naftalenacético (ANA), con tres distintas concentraciones ($0, 50$ y 100 mg L^{-1}) de Si, con el fin de observar el efecto del mismo en la peroxidación de lípidos y en la hiperhidricidad en los explantes causados por estrés oxidativo. Los resultados mostraron una reducción significativa en la producción de MDA y de brotes hiperhídricos, mostrando así el efecto del Si en cuanto a la respuesta de la planta ante las condiciones de estrés abiótico que brinda el cultivo *in vitro*. Posteriormente, diferentes fuentes comerciales de Si disponibles en Brasil fueron aplicadas en medios de cultivo para *Cattleya loddgesii* (Orquidaceae) para observar su efecto sobre diferentes parámetros de crecimiento y multiplicación de la especie (Soares et al. 2011). Los resultados en este caso mostraron mayor altura de los explantes, además de mayor longitud y número de raíces en comparación con el testigo. Por otro lado, en micropropagación de plantas de banano de la variedad “Maçã”, Asmar et al. (2011) aplicaron los mismos silicatos mencionados anteriormente, a un medio MS, en donde los resultados mostraron una mayor cantidad de clorofila a y b en presencia de silicato de calcio, y el silicato de sodio promovió mayor altura, peso fresco y seco en las plántulas.

Otros reportes sobre el uso de Si en cultivo *in vitro* incluyen especies como *Picea abies* (Prabagar et al. 2011), *Phragmites australis* (Máthé et al. 2012), *Salvia splendens* (Soundararajan et al. 2013), *Anthurium* cv. Rubi (Gomes-Dias et al. 2014) y *Ajuga multiflora* (Sivanesan y Jeong 2014). Sin embargo, no se encontró ningún reporte del uso de Si en cultivo *in vitro* de ninguna especie de bambú.

La micropropagación de *Dendrocalamus giganteus* Munro.

D. giganteus Munro es una especie de bambú, cuyo género es originario de la India y del sureste asiático, y posee potencial económico como material de construcción (Lima et al. 2008) y por sus brotes comestibles (Choudhury et al. 2012). Además, dado lo mencionado anteriormente acerca de la importancia del Si en el ciclo geoquímico del

carbono, posiblemente resulte en un componente importante a incluir en distintos agroecosistemas, por ser una especie acumuladora de Si. De hecho, Ding et al. (2008) sugieren la importancia, en general, de las distintas especies de bambú en cuanto a su contribución en el ciclo geoquímico global del Si, y por lo tanto, del carbono. El cultivo *in vitro* de bambú permite la propagación masiva de individuos en un menor tiempo, libres de enfermedades y con mayor homogeneidad. En la literatura se pueden encontrar reportes de casos de cultivo *in vitro* de esta especie a partir de segmentos nodales (Ramanayake y Yakandawala 1997; Ramanayake et al. 2001; Limei 2003), y de callo inducido a partir de tallos, brotes y raíces (Ramanayake y Wanniarachchi 2003).

En el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica se han desarrollado protocolos para la micropropagación de bambú de las especies *Guadua angustifolia* (Jiménez et al. 2006) y *Dendrocalamus giganteus* (A. Holst-Sanjuán, 2014)¹. Sin embargo, se han detectado anomalías en el cultivo *in vitro* de *Dendrocalamus giganteus*, por ejemplo, una necrosis descendente (figura 2), y un crecimiento lento de explantes que reducen la eficiencia de la micropropagación. Estas anomalías fue posible mitigarlas por medio de la duplicación de los macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg) del medio MS (A. Holst-Sanjuán 2012)². Lo anterior da indicios de que las anomalías son producto de un desbalance nutricional, por lo cual, actualmente se está investigando en esta línea (M. Viñas-Meneses 2014)³. Si bien se han obtenido resultados positivos al realizar dicho cambio en la composición de nutrientes, la necrosis y el lento crecimiento continúan siendo un problema en el cultivo *in vitro* de *D. giganteus* en el CIGRAS. Waikhom y Louis (2014) han recomendado realizar experimentos con Si para mejorar la eficiencia para la micropropagación de dos especies de bambú, *Bambusa tulda* y *Melocanna baccifera*.

¹ Holst-Sanjuán, A. 2014. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica. (En proceso de publicación).

² Holst-Sanjuán, A. 2012. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica (Comunicación personal).

³ Viñas-Meneses, M. 2014. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica (Comunicación personal).



Figura 2. Necrosis descendente en explantes de *Dendrocalamus giganteus* cultivados *in vitro*. La fotografía fue tomada a los 21 días de cultivo.

Justificación del trabajo

Dendrocalamus giganteus es una planta con potencial económico y agroecológico. Además, al ser acumuladora de Si, podría contribuir al ciclo de carbono en sitios, por ejemplo, en proceso de regeneración. Es por ello que resulta importante mejorar la eficiencia de los protocolos para su micropropagación, y de este modo, facilitar su incorporación en distintos ecosistemas, incluyendo agro-ecosistemas. Dados los reportes en la literatura acerca de la importancia de este elemento en ciertas especies de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, se deduce la posibilidad de obtener efectos de este elemento sobre explantes de *D. giganteus* cultivados *in vitro*. A pesar de ser considerada una planta acumuladora de Si, no se encontró información en la literatura acerca de la aplicación de Si en el cultivo *in vitro* de ninguna especie de bambú. Por esta razón, el presente trabajo pretende caracterizar por medio de distintos parámetros fisiológicos los efectos de la aplicación de Si, tomando en cuenta que en otras especies monocotiledóneas se han obtenido efectos beneficiosos que, de reproducirse en el cultivo *in vitro* de *Dendrocalamus giganteus*, podrían mejorar la eficiencia de la micropropagación de esta especie. Por otro lado, la información que se obtenga de este trabajo contribuiría a la línea de investigación que se encuentra en desarrollo actualmente en el CIGRAS, en cuanto a la

nutrición mineral de esta especie en condiciones *in vitro*. Este aspecto, en muchas ocasiones, es obviado utilizando un solo medio base para especies con necesidades nutricionales distintas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de la aplicación de Si en el medio de cultivo sobre distintos parámetros fisiológicos en *Dendrocalamus giganteus* en la etapa de establecimiento *in vitro*.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la aplicación de Si en el medio de cultivo sobre el crecimiento y el contenido de agua en explantes de *Dendrocalamus giganteus* en la etapa de establecimiento *in vitro*.
2. Determinar el efecto de la aplicación de Si en el medio de cultivo sobre la eficiencia máxima del fotosistema II (F_v'/F_m') en explantes de *Dendrocalamus giganteus* en la etapa de establecimiento *in vitro*.
3. Determinar el efecto de la aplicación de Si en el medio de cultivo sobre la peroxidación de lípidos en explantes de *Dendrocalamus giganteus* en la etapa de establecimiento *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localidad y financiamiento

El experimento fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica (UCR), en San Pedro de Montes de Oca, San José. Este trabajo se enmarcó dentro del proyecto código 734-A8-147, inscrito en el CIGRAS. Además, se recibió financiamiento por parte de la Vicerrectoría de Investigación de la UCR mediante el Fondo de Apoyo a Trabajos Finales de Graduación de Estudiantes de Grado (Licenciatura). Finalmente, el Laboratorio de Suelos y Foliar del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la UCR financió los análisis químicos de los medios de cultivo y de tejidos vegetales.

Introducción y establecimiento *in vitro* de explantes de *Dendrocalamus giganteus*

Para la introducción y cultivo *in vitro* se utilizaron explantes de *Dendrocalamus giganteus* de plantas provenientes del invernadero del CIGRAS. Se cortaron porciones de tallo (3 cm de longitud, 3-6 mm de diámetro) que contenían una yema, se les removió la vaina y la lígula para exponer la yema, y se colocaron en agua destilada. Posteriormente, se lavaron los explantes cepillándolos suavemente en agua de grifo. Luego, se colocaron en agitación por 10 minutos en Extran® (Merck, Darmstadt, Alemania) al 0,1%. Una vez lavados los explantes, se colocaron en una solución de Vanodine® (yodóforo) (Pfizer, Lancashire, Inglaterra) a una concentración de 3 ml L⁻¹ por 10 minutos en agitación. A continuación, se colocaron en una solución de Agrimycin® (estreptomicina y terramicina) (Pfizer, Toluca, México) y Benomil 50 WP® (benomil) (Cafesa, San José, Costa Rica) cada uno a una concentración de 2 g L⁻¹ por 50 minutos en agitación. Después, se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1,3% con 2 gotas de Tween 20® (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Alemania) por cada 100 ml de solución, por 10 min en agitación. Por último, en cámara de flujo laminar, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril.

El medio de cultivo utilizado para el establecimiento de los explantes estuvo compuesto por las sales y vitaminas del medio MS (Murashige y Skoog 1962),

suplementado con 0,5 mg L⁻¹ de tiazurón (TDZ), y 2 g L⁻¹ de Phytigel® (como agente gelificante) (Sigma-Aldrich, Missouri, E.E.U.U.). Luego de ajustar el pH a 5,8, se dispensó 15 ml de medio en tubos de cultivo de 150 x 25 mm, y se autoclavó por 20 minutos a 121°C y 1,5 kg cm⁻².

A los explantes, una vez desinfectados, se les eliminaron los extremos necrosados con navaja en cámara de flujo laminar, y se introdujeron en los tubos en posición vertical, con la yema en contacto con la superficie del medio de cultivo. Se introdujeron un total de 144 segmentos nodales. Los tubos fueron cerrados con tapa de plástico y sellados con una capa de plástico adhesivo para alimentos. Los explantes permanecieron en oscuridad por una semana. Luego se transfirieron a un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 12 horas, a 27,1 μmol m⁻² s⁻¹ (Sylvania Octron 4100K) de luz y a 25±2°C de temperatura ambiental. Los explantes fueron subcultivados una vez por mes al medio de cultivo antes descrito, durante tres meses. El subcultivo consistió en la remoción de extremos necrosados de los segmentos nodales con navaja, hasta que después de tres subcultivos se eliminaron totalmente los tejidos de la planta madre. Posteriormente, los subcultivos consistieron en la remoción de brotes necróticos, y de un corte en la base de dichos brotes para exponer el xilema al medio de cultivo.

Debido a la alta contaminación inicial observada (>50%), se decidió continuar utilizando los explantes introducidos anteriormente, pero en la fase de multiplicación. Para ello, se indujo la brotación de los segmentos nodales como se indica a continuación. Después de tres meses de establecimiento, se preparó el medio MS descrito anteriormente, pero con el doble de los macronutrientes y sin gelificante (medio líquido); luego de ajustar el pH a 5,8, se dispensó 15 ml de medio en tubos de cultivo de 150 x 25 mm, y se autoclavó por 20 minutos a 121°C y 1,5 kg cm⁻². Los brotes se colocaron en este medio, y se realizaron subcultivos cada 21 días. Se realizó un total de cinco subcultivos. Los tubos fueron cerrados con tapa de plástico, y sellados con plástico adhesivo para alimentos. Los subcultivos consistieron en la remoción de brotes necróticos, y la realización de un corte en la base para exponer el xilema al medio de cultivo. Después del quinto subcultivo, se transfirieron los brotes a un sistema de inmersión temporal (RITA®) con 200 ml del mismo medio de multiplicación, con ciclos de inmersión de un minuto cada cuatro horas, y bajo las mismas condiciones lumínicas y de temperatura antes descritas. Los brotes fueron

transferidos a cada recipiente del sistema de inmersión temporal, aplicando el mismo procedimiento de subcultivo descrito anteriormente. Los brotes permanecieron en estas condiciones durante dos meses.

Experimento de aplicación de Si en el medio de cultivo

Antes de realizar el experimento de aplicación de Si al medio de cultivo, los explantes fueron transferidos del sistema de inmersión temporal a tubos de cultivo de 150 x 25 mm con el medio de multiplicación antes descrito. Los tubos fueron cerrados con tapa de plástico, y sellados con plástico adhesivo para alimentos, y colocados en un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 12 horas, con $27,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Sylvania Octron 4100K) de luz y a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Se mantuvieron estas condiciones durante seis semanas con un subcultivo a las tres semanas. Este consistió en la remoción de brotes necróticos, y la realización de un corte en la base para exponer el xilema al medio de cultivo.

Para el experimento se prepararon tres medios de cultivo, utilizando como base el medio de multiplicación MS que se describió anteriormente (con el doble del contenido de macronutrientes), suplementado con las diferentes dosis de Si (50 y 100 mg L⁻¹ Si) y un testigo (0 mg L⁻¹ Si), y sin gelificante (medio líquido). Como fuente de Si se utilizó el producto comercial Nutrifol® Silicato de Potasio⁴ (Agrotico, Costa Rica), el cual muestra en la etiqueta un contenido de SiO₂ de 20,75% (Si = 9,70%) y K₂O de 8,30% (K = 6,89%). Para balancear los iones presentes en los diferentes medios de cultivo, se decidió modificar la concentración de KNO₃, y ajustar el NO₃⁻ faltante con HNO₃ en cada uno de los casos (anexo 1). El ajuste con HNO₃ además previene la polimerización del Si proveyendo un medio ácido (B.R. Jeong 2014)⁵. Luego de ajustar el pH a 5,8 con NaOH 1M y HCl 1M según el caso, se dispensó 15 ml de medio en tubos de cultivo de 150 x 25 mm, y se autoclavó por 20 minutos a 121°C y 1,5 kg cm⁻². Los explantes fueron subcultivados en cada uno de los medios con las distintas concentraciones de Si; en ese momento se eliminaron los brotes necróticos, se les realizó un corte en la base para exponer el xilema y se colocaron explantes de 0,2 - 0,4 g de peso fresco en cada uno de los tubos de forma aleatoria. Los tubos fueron cerrados con tapa de plástico, y sellados con plástico adhesivo

⁴ Fórmula líquida preparada a partir de sal de potasa (PQ Corporation, E.E.U.U.)

⁵ Jeong, B.R. 2014. Chinju, Corea del Sur, Universidad Nacional de Gyeonsang (Comunicación personal)

para alimentos, y colocados en cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 12 horas, con $27,1 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (Sylvania Octron 4100K) de luz y a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Análisis químico de medios de cultivo y tejidos vegetales

Con el fin de verificar el balance de iones presentes en los diferentes medios de cultivo utilizados en el experimento, se tomaron 25 ml de cada uno después de haber sido autoclavados, y fueron enviados al Laboratorio de Suelos y Foliar del Centro de Investigaciones Agronómicas (LSF-CIA), Universidad de Costa Rica, para la determinación del contenido de nutrientes (anexo 2.1).

Para verificar la cantidad de Si en los tejidos de los explantes, se tomaron los brotes y se lavaron con agua tipo I. Se colocaron en una estufa (Venticell, MMM Group, Alemania) a 60°C por 72 horas, y se enviaron al laboratorio antes mencionado para la respectiva determinación de contenidos de Si en mg de Si por kg de tejido (anexo 2.2).

Por último, las soluciones utilizadas para balancear los contenidos de NO_3^- y K^+ en los distintos medios de cultivo (HNO_3 65% v/v y KNO_3 10% p/v), así como el silicato de potasio, fueron enviados para su respectivo análisis químico al LSF-CIA, y determinar los contenidos NO_3^- , K y Si en cada una (anexo 2.3).

Evaluación del crecimiento, contenido de agua, necrosis y clorosis

Se procedió a cuantificar diferentes parámetros fisiológicos de crecimiento a los 0, 7, 14 y 23 días después de inducidos los tratamientos. Las variables porcentaje de brotación, longitud de brote, porcentaje de brotes cloróticos y necrosados, fueron cuantificadas a partir de los mismos brotes en cada una de las evaluaciones. Las variables de masa seca y fresca, fueron cuantificadas extrayendo cinco brotes de cada tratamiento en cada semana, según el método descrito por Guevara y Jiménez (1998), para determinar tanto el contenido de agua como la biomasa total. En este caso, los explantes fueron colocados en sobres de papel y sometidos a 60°C por 72 horas en una estufa (Venticell, MMM Group, Alemania). El peso seco en gramos fue determinado por medio de una balanza analítica (XA-220/X, Radwag, España).

El contenido de agua (CA) fue calculado del siguiente modo:

$$CA (\%) = \left(\frac{pf - ps}{pf} \right) \times 100$$

En donde *pf* se refiere al peso fresco (g) y *ps* es peso seco (g) del explante.

Evaluación de la máxima eficiencia fotosintética del PSII bajo luz (F_v'/F_m') y oscuridad (F_v/F_m)

Para la determinación de la máxima eficiencia fotosintética del PSII (fotosistema II) bajo un flujo constante de fotones (F_v'/F_m'), se extrajo un explante de cada tratamiento, a los 0, 7, 14 y 23 días después de inducidos los tratamientos, y se determinó la fluorescencia máxima y variable a la hoja más joven completamente expandida, con el fluorómetro de clorofila JUNIOR-PAM (Walz, Alemania) según las especificaciones del fabricante. Para determinar la eficiencia máxima del PSII en hojas bajo oscuridad (F_v/F_m), los mismos explantes anteriormente mencionados, se aclimataron por 30 minutos en un frasco de vidrio (9 x 5 cm) con agua destilada y cubiertos con una bolsa de tela negra. Posteriormente se procedió a determinar la fluorescencia máxima y variable con el mismo equipo.

Evaluación de la peroxidación de lípidos y oscurecimiento del medio

La peroxidación de lípidos se evaluó por medio del método descrito por Gunes et al. (2007) de las sustancias reactivas con el ácido thiobarbitúrico, principalmente malondialdehído (MDA). Se maceró 0,5 g de brotes con 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 0,1% (p/v) con mortero y pistilo. Una vez macerados y homogenizados los brotes, se centrifugó el extracto a 15000 xg por 5 minutos en microcentrífuga Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Por cada alícuota de 1,0 ml del supernatante se agregaron 4,00 ml de TCA al 20% con ácido thiobarbitúrico (TBA) al 0,5% (p/v). Se incubaron las muestras a 95°C en baño maría con agua hirviendo, y se enfriaron rápidamente en un baño de hielo. Luego, se centrifugaron las muestras una vez más a 10000 xg por 10 minutos y al supernatante se le midió la absorbancia a 532 nm con un fotocolorímetro Spectronic® 20 Genesys (Spectronic Instruments, E.E.U.U.) y además se

determinó el valor de absorbancia no específica a 600 nm. El contenido de MDA se calculó de la siguiente forma, utilizando un coeficiente de extinción de 155 mM cm^{-1} :

$$\text{MDA (nmol/ml)} = \left(\frac{(A532 - A600)}{155000} \right) \times 10^6$$

Para evaluar el oscurecimiento del medio, se utilizó la escala visual empleada en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del CIGRAS para explantes de *Dendrocalamus giganteus* cultivados en medio líquido. Dicha escala está compuesta por números del 1-5, en donde 1 representa al medio totalmente translúcido, y 5, es el grado máximo de oscurecimiento (figura 3).



Figura 3. Escala visual del grado de oxidación del medio. De izquierda a derecha: 0, 1, 2, 3, 4 y 5. Fotografía suministrada por C. Acuña-Gutiérrez (Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, UCR)

Análisis estadístico de los datos

El diseño experimental fue irrestricto al azar, y la unidad experimental constó de un explante de *Dendrocalamus giganteus* cultivado de forma independiente en un tubo de cultivo. Los parámetros longitud de brote, porcentaje de brotación, porcentaje de brotes cloróticos y necróticos, y oscurecimiento del medio fueron analizados por medio de un ANOVA para medidas repetidas. Las medias fueron comparadas por medio de una comparación de Diferencias Honestamente Significativas (DHS) de Tukey ($p < 0,05$) para diferentes valores de n ($0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Si} = 7$; $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ Si} = 8$; $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Si} = 9$), pues hubo

pérdida de material durante el experimento. Para disminuir el efecto de datos con valores extremos, las variables de porcentaje de aumento en la cantidad de brotes por explante, y porcentaje de brotes necróticos por explante fueron sometidas a una transformación (\sqrt{y}) para su posterior comparación.

Las variables de eficiencia máxima del fotosistema II (Fv'/Fm' y Fv/Fm), peroxidación de lípidos, peso fresco y seco, y contenido de agua, fueron analizadas por medio de un ANOVA factorial. Las medias, al provenir de muestras independientes (para ensayos destructivos), fueron comparadas por medio de una prueba de Diferencias Mínimas Significativas (DMS) de Fisher ($p < 0,05$; $n=5$).

Se utilizó el programa informático STATISTICA v. 7.0 (StatSoft Inc., E.E.U.U.) para realizar los análisis antes mencionados.

RESULTADOS

Análisis químico de medios de cultivo y de tejidos

Los datos obtenidos a partir del análisis químico de los medios de cultivo con 50 y 100 mg L⁻¹ Si, muestran que los contenidos de Si fueron mayores con respecto a lo que en teoría deberían contener. En el caso del medio con 50 mg L⁻¹ Si, el contenido de este elemento fue un 86% mayor, y en el medio con 100 mg L⁻¹ Si, este fue 76% superior (cuadro 1). Sin embargo, los datos tienen concordancia con dosis crecientes de Si. Otros iones también presentaron diferencias con el contenido teórico, de los cuales, cabe resaltar el caso del amonio, nitrato, potasio, hierro y sodio. El amonio y el nitrato presentaron contenidos menores que las concentraciones teóricas. Además, cabe resaltar que el ion nitrato presentó contenidos considerablemente mayores en los medios con Si adicional con respecto al del testigo. El potasio presentó concentraciones diferentes entre los medios de cultivo, en donde el medio de cultivo del testigo presentó una concentración 2,4% menor que el valor teórico; sin embargo, los medios con 50 y 100 mg L⁻¹ Si mostraron concentraciones 2,0 y 2,4% mayores que la concentración teórica, respectivamente. Por otro lado, los medios testigo y con 50 mg L⁻¹ Si presentaron concentraciones de hierro considerablemente menores (24,0 y 27,2% menor que la concentración teórica, respectivamente), en comparación con el medio con 100 mg L⁻¹ Si (8,4% menor que la

concentración teórica). Por último, el sodio presentó concentraciones considerablemente mayores con respecto a las concentraciones teóricas en todos los casos.

Cuadro 1. Concentración de iones en los distintos medios de cultivo utilizados, y su respectiva diferencia con respecto a los valores teóricos del medio MS con el doble contenido de macronutrientes. Las concentraciones de los medios de cultivo fueron determinadas por el Laboratorio de Suelos y Foliare del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica (anexo 2.1).

Medio de cultivo	Concentración (mg L ⁻¹)												
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	Ca	Mg	K	P	Fe	Zn	Cu	Mn	Na	S	Si
Teórico (MS 2X macros)	743,7	4887,0	239,9	73,0	1567,0	77,4	5,6	2,0	0,006	5,5	0,024	100,4	
MS 2X macros	662	3075	234	79	1529	73	4	2	ND ¹	5,0	3,0	113,0	ND
Diferencia (%)	-11,0	-37,1	-2,5	8,3	-2,4	-5,7	-28,3	0		-8,9	12400	12,5	
MS 2X macros + 50 mg L ⁻¹ Si	668	4061	234	80	1598	72	4	2	ND	5,0	4,0	113,0	93,0
Diferencia (%)	-10,2	-16,9	-2,5	9,6	2,0	-7,0	-28,3	0		-8,9	16566	12,5	86,0
MS 2X macros + 100 mg L ⁻¹ Si	672	4197	230	80	1604	72	5	2	ND	5,0	6,0	112,0	173,0
Diferencia (%)	-9,6	-14,1	-4,2	8,3	2,4	-7,0	-10,4	0		-8,9	24900	11,6	73,0

¹ ND= no determinado

En cuanto a la acumulación de Si en tejidos calculada a partir del peso seco de los explantes en cada tratamiento y, de los análisis de contenidos de Si en los tejidos, se observa una mayor acumulación de Si en los brotes que crecieron con 50 mg L⁻¹ de Si en el medio de cultivo con respecto al testigo, y sin diferencias significativas entre los tratamientos con Si (figura 4, anexo 2.2).

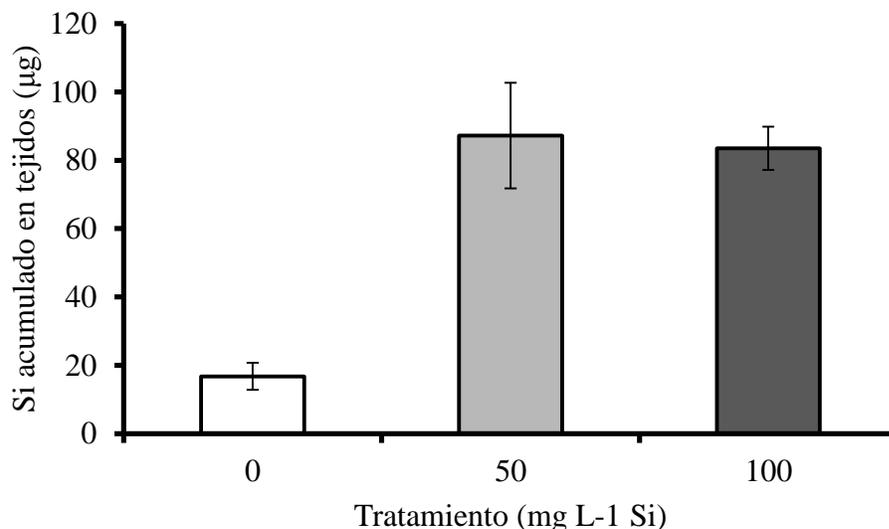


Figura 4. Acumulación de silicio en tejidos de explantes de *Dendrocalamus giganteus* cultivados in vitro con 0, 50 y 100 mg L⁻¹ de silicio en el medio de cultivo, al cabo de 23 días. Los valores fueron calculados por medio de concentraciones de Si obtenidas a partir de un análisis químico realizado en el Laboratorio de Suelos y Foliáres del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica (anexo 2.2), y con base en el peso seco de los brotes en cada tratamiento.

Efecto de la aplicación de Si sobre el crecimiento, contenido de agua, necrosis y clorosis de explantes de *Dendrocalamus giganteus* cultivados in vitro

A los 23 días de cultivo, los explantes de *Dendrocalamus giganteus* cultivados con 50 mg L⁻¹ de Si en el medio de cultivo presentaron significativamente mayor peso fresco (figura 5) y seco (figura 6) con respecto al testigo (0 mg L⁻¹ Si; $p < 0,01$) y con la medida inicial (0 días; $p < 0,05$). Los explantes cultivados en ausencia de Si adicional mostraron una reducción significativa en el contenido de agua a partir del día 7, la cual se hizo más pronunciada en la evaluación del día 23. Este mismo comportamiento se observó para los explantes cultivados con 50 mg L⁻¹ Si, pero sin la disminución adicional al día 23. Por el contrario los explantes en 100 mg L⁻¹ Si mantuvieron a los 7 días contenidos de agua similares a los de los explantes iniciales, pero luego tuvieron un comportamiento similar a los explantes cultivados en medio con 50 mg L⁻¹ de Si adicional (figura 7).

Las variables longitud de explante y porcentaje de brotes cloróticos por explante, no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo (anexo 4). El estado general de los brotes no presentó diferencias a nivel visual (figura 8).

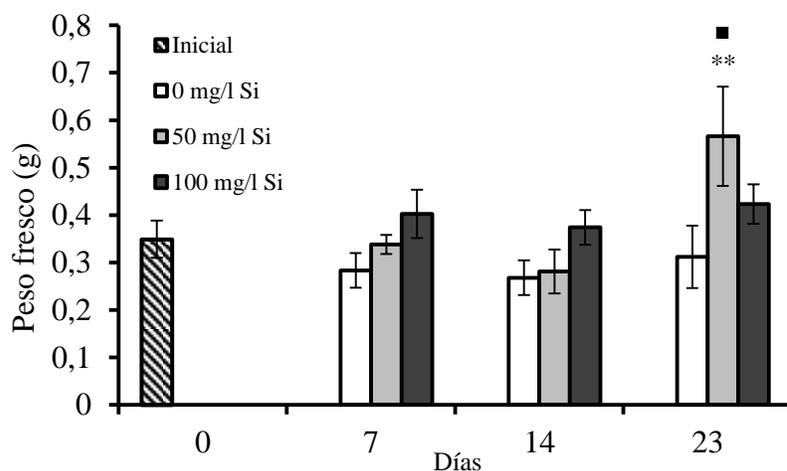


Figura 5. Peso fresco de explantes de *Dendrocalamus giganteus* a los 0, 7, 14 y 23 días, cultivados *in vitro* con 0, 50 y 100 mg L⁻¹ de silicio en el medio de cultivo. Las barras verticales representan el error estándar. Las medias fueron comparadas por una prueba DMS de Fisher. Un cuadrado (■) indica la existencia de diferencias significativas con respecto a la medida inicial (0 días) con $p < 0,05$. Dos asteriscos (**) indican diferencias significativas con respecto al testigo (0 mg L⁻¹ Si) en su respectiva evaluación con $p < 0,01$.

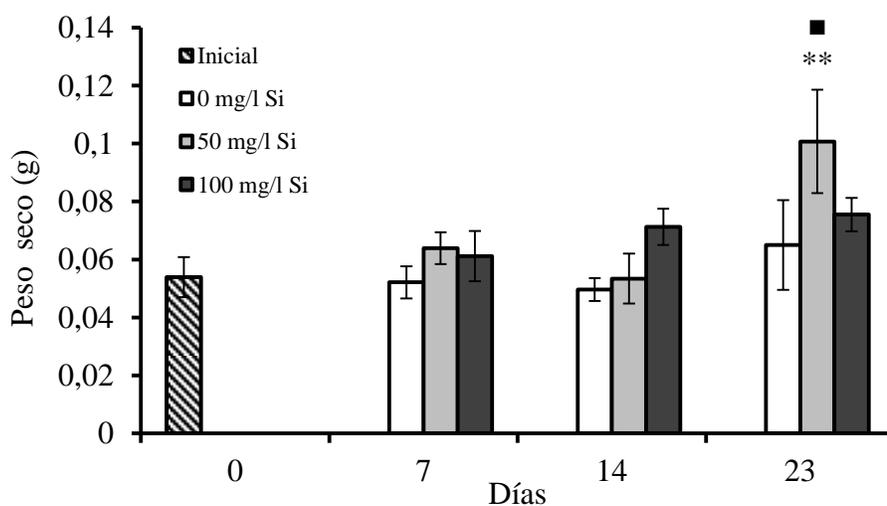


Figura 6. Peso seco de explantes de *Dendrocalamus giganteus* a los 0, 7, 14 y 23 días, cultivados *in vitro* con 0, 50 y 100 mg L⁻¹ de silicio en el medio de cultivo. Las barras verticales representan al error estándar. Las medias fueron comparadas por una prueba DMS de Fisher. Un cuadrado (■) indica la existencia de diferencias significativas con respecto a la medida inicial (0 días) con $p < 0,05$. Dos asteriscos (**) indican diferencias significativas con respecto al testigo (0 mg L⁻¹ Si) en su respectiva evaluación con $p < 0,01$.

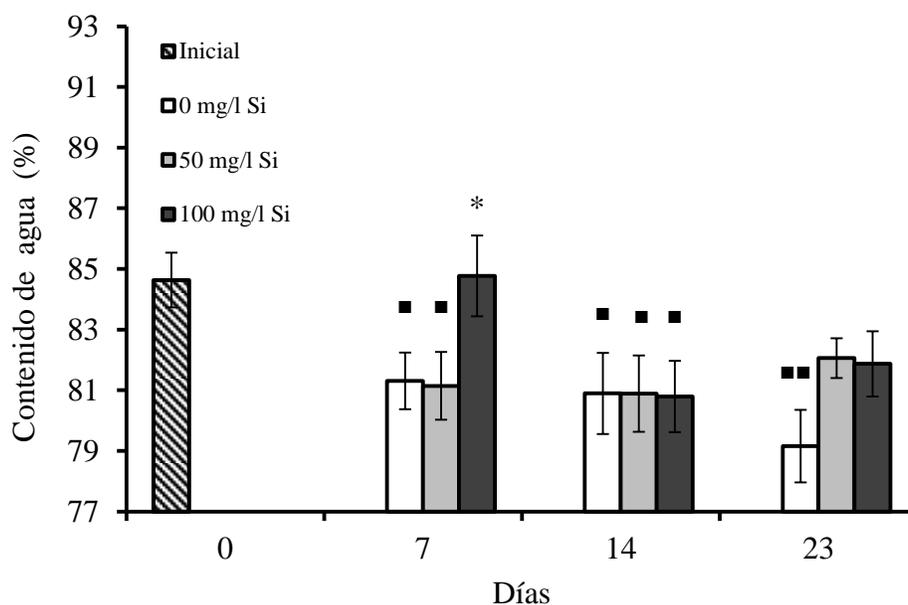


Figura 7. Contenido de agua en explantes de *Dendrocalamus giganteus* a los 0, 7, 14 y 23 días, cultivados *in vitro* con 0, 50 y 100 mg L⁻¹ de silicio en el medio de cultivo. Las barras verticales representan al error estándar. Las medias fueron comparadas por una prueba DMS de Fisher. Un cuadrado (■) indica la existencia de diferencias significativas con respecto a la medida inicial (0 días) con $p < 0,05$. Dos cuadrados (■■) indica la existencia de diferencias significativas con respecto a la medida inicial (0 días) con $p < 0,01$. Un asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto al testigo (0 mg L⁻¹ Si) en su respectiva evaluación con $p < 0,01$.

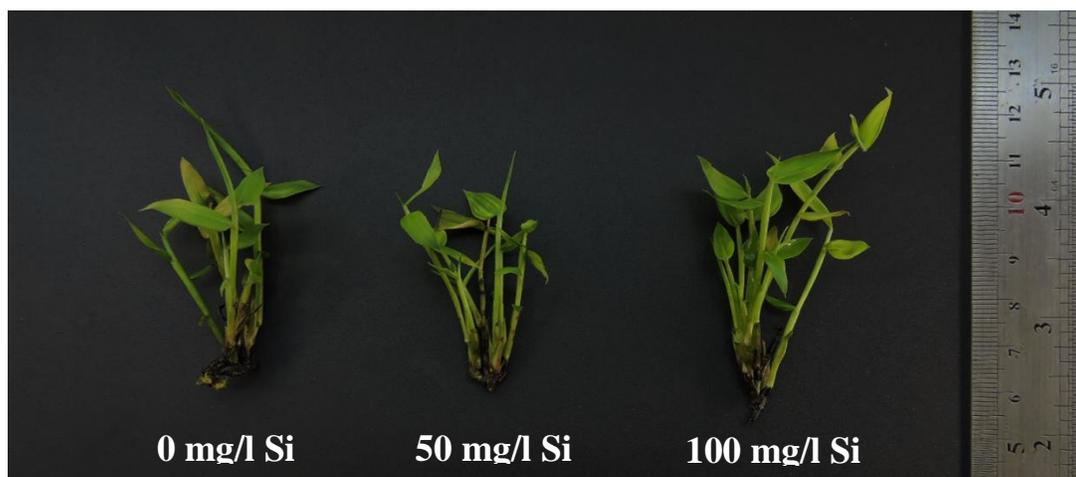


Figura 8. Estado general a los 23 días de explantes de *Dendrocalamus giganteus* cultivado *in vitro* con 0, 50 y 100 mg L⁻¹ de silicio en el medio de cultivo.

Los explantes de *D. giganteus* que fueron cultivados con ambas concentraciones de Si adicional produjeron una mayor cantidad de brotes por explante que el testigo a los 14 y 23 días de cultivo (figura 9). En el día 7, solamente el tratamiento de 50 mg L⁻¹ de Si en el

medio de cultivo produjo mayor cantidad de brotes, significativamente diferente al testigo ($p < 0,01$).

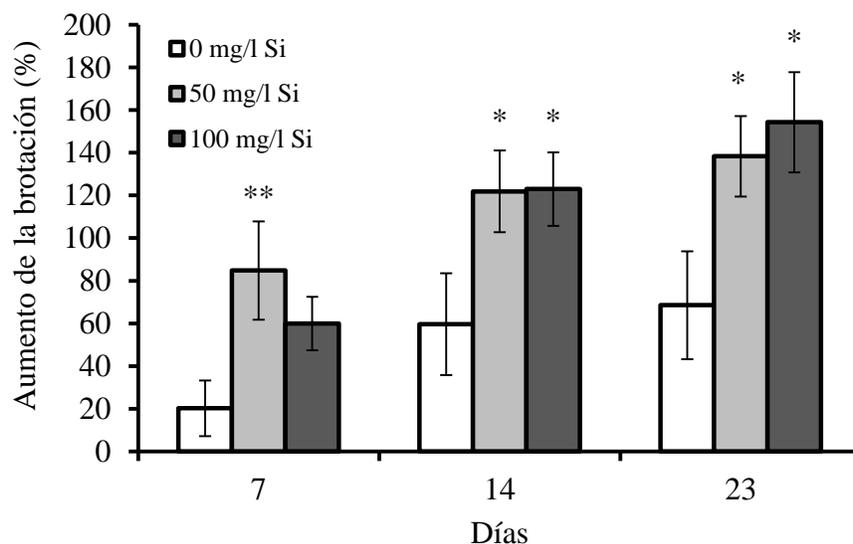


Figura 9. Aumento en número de brotes por explante, con respecto a la evaluación anterior, de *Dendrocalamus giganteus* a los 7, 14 y 23 días, cultivado *in vitro* con 0, 50 y 100 mg L⁻¹ de silicio en el medio de cultivo. Las barras verticales representan al error estándar. Las medias de los datos transformados (\sqrt{y}) fueron comparadas con respecto al testigo (0 mg L⁻¹ Si) por una prueba DHS de Tukey. Un asterisco (*) indica la existencia de diferencias significativas con $p < 0,05$; dos asteriscos (**) indican diferencias significativas con $p < 0,01$.

En cuanto a la aparición de necrosis en los brotes (figura 10), únicamente los explantes cultivados con 100 mg L⁻¹ de Si presentaron un porcentaje de brotes necróticos significativamente menor con respecto al testigo en el día 14 ($p < 0,05$) y en el día 23 ($p < 0,01$).

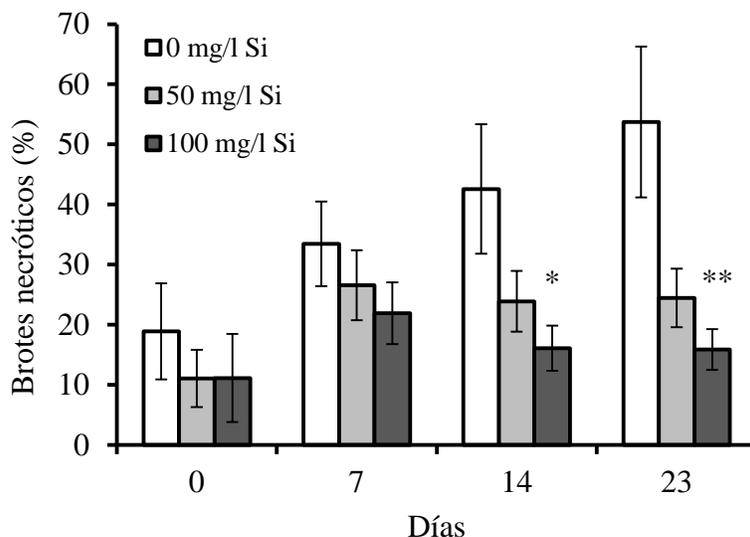


Figura 10. Brotos necróticos por explante de *Dendrocalamus giganteus* a los 0, 7, 14 y 23 días, cultivados *in vitro* con 0, 50 y 100 mg L⁻¹ de silicio en el medio de cultivo. Las barras verticales representan al error estándar. Las medias de los datos transformados (\sqrt{y}) fueron comparadas con respecto al testigo (0 mg L⁻¹ Si) por una prueba DHS de Tukey. Un asterisco (*) indica la existencia de diferencias significativas con $p < 0,05$; dos asteriscos (**) indican diferencias significativas con $p < 0,01$.

Efecto de la aplicación de Si sobre la eficiencia máxima del fotosistema II en hojas de explantes bajo luz (F_v'/F_m') y bajo oscuridad (F_v/F_m).

Para la variable F_v'/F_m' , las hojas de los explantes cultivados sin Si adicional no presentaron diferencias significativas entre las diferentes evaluaciones. Sin embargo, en el día 7, los explantes que fueron cultivados con 50 y 100 mg L⁻¹ Si presentaron una mayor eficiencia del PSII bajo luz con respecto al testigo en esa fecha ($p < 0,01$). Además, a los 7, 14 y 23 días de evaluación, se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la evaluación inicial (día 0) solamente en los explantes con 50 y 100 mg L⁻¹ Si en el medio de cultivo, presentando una mayor eficiencia del PSII bajo luz (figura 11a).

Por otro lado, en cuanto a la variable F_v/F_m , las hojas de los explantes cultivados sin Si adicional no presentaron diferencias significativas en los distintos días de evaluación, a excepción del día 14, en donde se obtuvo una mayor eficiencia del PSII bajo oscuridad con respecto a la medida inicial. No obstante, los explantes cultivados con 50 y 100 mg L⁻¹ Si presentaron diferencias significativas con respecto al testigo y a la medida inicial. Específicamente, a los 14 días de aplicados los tratamientos, los explantes con 100 mg L⁻¹ Si presentaron una mayor eficiencia del PSII con respecto al testigo en esa fecha; a los 23

días, tanto los explantes cultivados con 50 mg L^{-1} Si como los que crecieron con 100 mg L^{-1} Si, presentaron eficiencias mayores con respecto a los que no tenían Si añadido al medio de cultivo. Por otra parte, se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la medida inicial. A los 7 días de cultivo, solamente los explantes con Si en el medio de cultivo presentaron eficiencias mayores. A los 14 días, todos los explantes presentaron valores de F_v/F_m mayores, incluyendo al testigo. Finalmente, a los 23 días de cultivo, los tratamientos con Si mostraron una mayor eficiencia con respecto a la medida inicial (figura 11b).

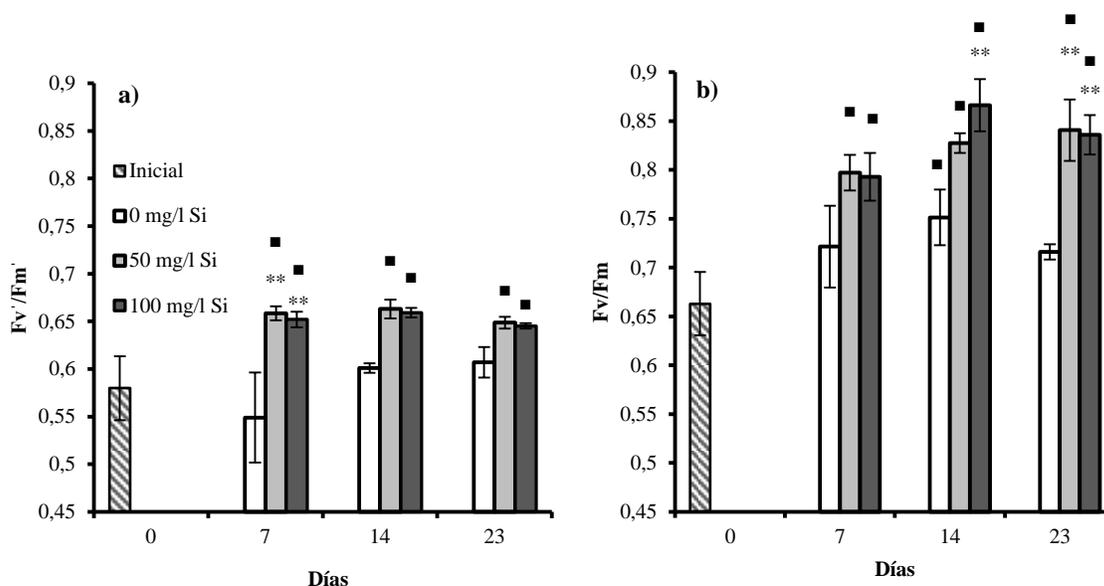


Figura 11. Eficiencia máxima del fotosistema II bajo luz F_v'/F_m' (a) y bajo oscuridad F_v/F_m (b) de hojas de explantes de *Dendrocalamus giganteus* a los 0, 7, 14 y 23 días, cultivados *in vitro* con 0, 50 y 100 mg L^{-1} de silicio en el medio de cultivo. Las barras verticales representan el error estándar. Las medias fueron comparadas por una prueba DMS de Fisher. Un cuadrado (■) indica la existencia de diferencias significativas con respecto a la medida inicial (0 días) con $p < 0,05$. Dos asteriscos (**) indican diferencias significativas con respecto al testigo (0 mg L^{-1} Si) en su respectiva evaluación con $p < 0,01$.

Efecto de la aplicación de Si sobre la peroxidación de lípidos y el oscurecimiento del medio

Ni las variables contenido de MDA en brotes ni el oscurecimiento del medio presentaron diferencias significativas con respecto al testigo (anexo 4).

DISCUSIÓN

Análisis químico de medios de cultivo y de tejidos

Los contenidos de NH_4^+ y NO_3^- en el medio de cultivo, de acuerdo a lo obtenido en el análisis químico (anexo 2.1), fueron considerablemente menores que los valores calculados para cada medio de cultivo. En el caso del ión amonio, se ha visto que temperaturas de hasta 46°C pueden acelerar su volatilización a razón de $20 \text{ mg N} \bullet 100 \text{ cm}^{-2} \bullet 5\text{h}^{-1}$ cuando se encuentra en solución (Vlek y Stumpe 1978). El proceso de autoclavado somete los medios de cultivo a una temperatura de hasta 121°C , por lo que ello puede explicar la disminución de aproximadamente un 10% del valor teórico (cuadro 1). Por otro lado, en el caso del NO_3^- , cabe resaltar el hecho de que en los medios de cultivo con Si adicional poseen contenidos mayores de este ión, respecto al medio testigo. Es por lo anterior, que no se puede descartar el efecto de cantidades adicionales de NO_3^- sobre las variables evaluadas.

En cuanto al potasio, el análisis químico realizado a la fuente de Si (anexo 2.3) muestra contenidos mayores de K_2O que lo reportado en la etiqueta, por lo que esto pudo afectar el cálculo del balance iónico de los diferentes medios de cultivos. Los aumentos en los contenidos de sodio pueden responder a la fuente de Si utilizada, puesto que, la sal de potasa contiene este ión (United States Geological Survey 2008). Sin embargo, cabe resaltar el hecho de que el medio sin Si adicional presentó, asimismo, contenidos considerablemente más altos que el valor teórico del medio MS. Lo anterior es indicativo de que, probablemente, el agua utilizada para la preparación de los medios de cultivo aportó sodio. No se encontraron referencias en la literatura que permitan comparar estos valores con niveles tóxicos de Na en bambú. Sin embargo, Zörb et al. (2004) detectaron que en *Zea mays*, una planta sensible a condiciones de salinidad, se requirió una concentración de 25 mM NaCl ($573 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na}$) adicionado en la solución nutritiva para observar cambios en el proteoma con respecto a las plantas testigo, y que no fue sino hasta una concentración de 100 mM NaCl ($2290 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na}$) en donde se observó una reducción del crecimiento de la parte aérea y la raíz. Por lo tanto, si se toma como referencia lo anterior, los contenidos de Na encontrados en los medios de cultivo utilizados en este estudio probablemente no

causaron un efecto significativo sobre el crecimiento de los explantes, puesto que la mayor concentración de Na encontrada fue considerablemente menor (cuadro 1).

Dados los resultados de los análisis químicos de los medios de cultivo utilizados, los valores de los parámetros fisiológicos evaluados pudieron afectarse por dichas diferencias con respecto a lo calculado (anexo 1). Sin embargo, en la mayoría de los casos, las variaciones podrían responder a la variabilidad instrumental normal. En el caso del NO_3^- , la cantidad de material vegetal no fue suficiente para el análisis de contenidos de este ión en los tejidos, para observar el comportamiento de las cantidades de dicho ión en los mismos, por lo que no se puede descartar su influencia en los datos. Los datos correspondientes a los contenidos de Si en los tejidos de los brotes indican la acumulación del elemento por parte de los explantes, por lo tanto, tampoco es descartable el hecho de la influencia del elemento sobre los distintos parámetros fisiológicos evaluados, tal y como se discutirá a continuación en detalle.

Efecto de la aplicación de Si sobre el crecimiento, contenido de agua, necrosis y clorosis de explantes de *Dendrocalamus giganteus* cultivados *in vitro*

En la literatura se encuentra que las plantas acumuladoras de Si, como lo son las pertenecientes a la familia Poaceae, logran acumular hasta un 10% de Si con respecto a la biomasa total en seco en condiciones de campo (Epstein 1999). El bambú es una de estas plantas acumuladoras de Si (Lux et al. 2003). Específicamente, en *Dendrocalamus giganteus* se ha reportado una acumulación de Si en las hojas de $47207 \pm 1215 \text{ mg kg}^{-1}$ peso seco (4,7%) (Collin et al. 2011). Sin embargo, en este experimento, incluso los explantes que fueron cultivados con Si en el medio de cultivo, presentaron porcentajes considerablemente menores ($50 \text{ mg L}^{-1} \text{ Si} = 0,09\%$; $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Si} = 0,11\%$) respecto a lo que reporta la literatura para esta especie. Para explicar esto, se debe tomar en cuenta los mecanismos por los cuales las plantas absorben y acumulan Si. A los explantes utilizados se les realizó un corte en la base del tallo de forma tal que el xilema se encontraba expuesto al medio de cultivo, y el Si pudiera ser translocado hacia los diferentes órganos. Aparte de los transportadores de influjo y eflujo identificados en raíces de arroz, *Lsi1* y *Lsi2*, sólo se ha identificado un transportador, *Lsi6*, localizado en las células de transferencia del xilema en panículas de arroz, el cual se encarga de direccionar el ácido silícico para su asimilación hacia los diferentes tejidos (Yamaji y Ma 2009). No obstante, la información acerca de

otros transportadores encargados de esta función de transferencia intervascular, y acerca de la regulación de estos genes es limitada (e.g., si es regulado por la expresión de *Lsi1* y *Lsi2*, regulaciones pos-transcripcionales, etc.). Por ejemplo, se sabe que *Lsi1* y *Lsi2* son regulados negativamente por el suministro de Si (Ma et al. 2011). Por lo tanto, se debe tomar en cuenta la regulación a nivel molecular de la acumulación y asimilación de Si, pues los mecanismos pueden variar si se habla de explantes de *D. giganteus* cultivados *in vitro*.

Si bien los resultados de los análisis químicos de tejidos muestran una acumulación de Si en los explantes, cabe resaltar el hecho de que en las diferentes evaluaciones no fue posible registrar un aumento en peso significativo, ni con respecto al testigo, ni con respecto a la medida inicial, a excepción de los explantes que fueron cultivados con 50 mg L⁻¹ de Si. La literatura, en general reporta que el Si aplicado de forma exógena como nutriente promueve el crecimiento de plantas en campo y cultivadas *in vitro*, en diferentes especies monocotiledóneas y dicotiledóneas (ver sección *Antecedentes*). Sin embargo, también hay resultados que concuerdan con lo encontrado. Collin et al. (2013) probaron cuatro concentraciones de Si (10,7; 21,1; 31,7 y 42,1 mg L⁻¹), a partir de metasilicato de potasio (Si(KOH)₂) como nutriente a plantas de bambú del género *Gigantocloa* sp. cv. “Malay Dwarf”, cultivadas hidropónicamente con concentraciones potencialmente tóxicas de cobre en la solución nutritiva; dichos investigadores no encontraron efectos positivos de dosis crecientes de Si en cuanto al el número de hojas y tallos, la longitud de tallos, ni en la biomasa total aunque se haya registrado contenido de Si en hojas de hasta 101893 mg kg⁻¹ de peso seco en plantas que fueron cultivadas con 42,1 mg L⁻¹ Si. Collin et al. (2013) explican estos resultados no concordantes con la literatura citando a Marschner et al. (1990), quienes detectan la mala interpretación de resultados en algunos estudios, precisamente en los de Miyake y Takahashi (1978; 1983). Marschner et al. (1990) evidencian que los síntomas de “deficiencia de Si” en tomate y en pepino que registraron Miyake y Takahashi, incluso en otros estudios posteriores, son causa de un desbalance en el suministro de fósforo y zinc, y que el Si promovió el crecimiento por medio de la mitigación del estrés fisiológico causado por el desbalance, y no por una acumulación *per se* del elemento en los tejidos. De hecho, como se puede observar en la sección de *Antecedentes* del presente trabajo, la mayor parte de los estudios que reportan efectos positivos del Si sobre el crecimiento, son basados en la inducción de diferentes tipos de

estrés abiótico (i.e. salinidad, déficit hídrico, toxicidad por metales pesados) y, probablemente, en esos casos el Si promueve el crecimiento de forma indirecta, mitigando dicho estrés por distintos mecanismos (Collin et al. 2013). El tratamiento con 50 mg L⁻¹ Si que mostró diferencias significativas en cuanto al peso fresco y seco, al no mostrar una tendencia clara respecto a las otras evaluaciones, probablemente responde a efectos metodológicos, pues quizás se requirió un mayor número de repeticiones para las mediciones. Además, al observar el estado general de los explantes, no se observaron diferencias evidentes en cuanto a su crecimiento (figura 8).

Los resultados mostraron un mayor contenido de agua en explantes cultivados con 100 mg L⁻¹ Si a los 7 días con respecto al testigo. El mantenimiento del contenido de agua en plantas gracias a la acumulación de Si en tejidos vegetales, se encuentra reportado en la literatura, sobre todo en plantas cultivadas en campo. Ello es explicado porque el Si, al ser depositado bajo la cutícula, forma una doble capa silíceica (Ma y Yamaji 2008), que limita la transpiración a través de la misma, mejora la condición hídrica de la hoja (Gong et al. 2003). Cabe resaltar que dentro de un tubo de ensayo, como el que se utilizó para cultivar los explantes de *D. giganteus*, las tasas de transpiración son menores por haber un intercambio gaseoso relativamente reducido entre el interior del tubo y el ambiente exterior. Sin embargo, al extraer las plantas para realizar las determinaciones de peso fresco, a los siete días, al parecer los explantes con 100 mg L⁻¹ Si lograron retener mayor cantidad de agua, pues se observa que los explantes mencionados no difirieron con respecto a la medida inicial. Esto podría tener implicaciones en la fase de aclimatación *ex vitro*. Las plantas provenientes de cultivo *in vitro*, al ser sometidas a condiciones *ex vitro*, pueden sufrir altas tasas de transpiración (Guan et al. 2008) y esto puede afectar las probabilidades de supervivencia. En este caso, una mayor capacidad de retención de agua en los tejidos podría ser beneficiosa para explantes de *D. giganteus* en fase de aclimatación. Por otro lado, a los 23 días, el hecho de que los explantes con 50 y 100 mg L⁻¹ de Si en el medio de cultivo no hayan mostrado diferencias con la medida inicial, podría indicar una tendencia a mantener los contenidos de agua cuando son extraídos de las condiciones *in vitro*. Sin embargo, no es posible concluir lo mismo a los 23 días, probablemente porque se requiere de mayor número de repeticiones.

Como se mencionó anteriormente, el cultivo *in vitro* es una técnica que introduce diferentes factores que pueden causar estrés fisiológico (Cassells y Curry 2001). En este caso, el Si aplicado en el medio de cultivo mostró efectos positivos en otras variables fisiológicas, por ejemplo, el porcentaje de aumento de la brotación y el porcentaje de brotes necróticos. En el caso de la brotación, a los 7 días los explantes con 50 mg L^{-1} de Si aumentaron en un $84,8 \pm 23,0\%$ el número de brotes. En este punto, el que los explantes que se encontraban con 100 mg L^{-1} de Si no hayan mostrado diferencias significativas con respecto al testigo probablemente responde a falta de repeticiones, pues a los 14 y 23 días de cultivo, todos los tratamientos con Si tuvieron considerablemente un mayor aumento en la brotación con respecto al testigo (50 mg L^{-1} Si = $138,3 \pm 18,8\%$; 100 mg L^{-1} Si = $154 \pm 23,5\%$). Existe información limitada en cuanto a experimentos en donde se determine el efecto de la aplicación de Si en el medio de cultivo sobre la brotación de especies monocotiledóneas. Por ejemplo, Soares et al. (2011) determinaron una mayor formación de brotes adventicios en orquídeas de la especie *Cattleya loddigesii* cuando se aplicó 5 ml/l de silicato de potasio; sin embargo, en la publicación no se especifica la forma de silicato de potasio que se utilizó, es decir, si la solución madre fue preparada a partir del reactivo sólido K_2SiO_3 , si la preparación líquida proviene de sal de potasa, y si balancearon los demás nutrientes del medio de cultivo para tomar en cuenta la cantidad adicional de potasio aplicado, de forma tal que se pueda comparar con el presente estudio. Por otro lado, en banano de la variedad “Maça”, Asmar et al. (2011) no encontraron diferencias significativas con respecto al testigo en cuanto a número de hojas ni a biomasa en tallos, en plantas cultivadas con 1 g/l de silicato de potasio (K_2SiO_3). Al igual que en el estudio anterior, no se especifica si se hizo un balance de iones en los medios de cultivo utilizados. Otros reportes, en este caso en dicotiledóneas como *Ajuga multiflora* (Sivanesan y Jeong 2014) y *Salvia splendens* (Soundararajan et al. 2013), se registró una mayor proliferación de brotes por causa de la aplicación de Si al medio de cultivo. En estos últimos dos casos los investigadores sí especifican que realizaron el balance de iones por utilizar K_2SiO_3 . De hecho, el balance realizado en este trabajo fue por recomendación de uno de ellos, el Dr. Byoung Ryong Jeong.

Sin embargo, cabe resaltar el hecho de que no parece haber una relación entre la biomasa del explante y su número de brotes u hojas. En este trabajo se observó un aumento

significativo en la brotación sin que haya habido necesariamente un aumento significativo en la biomasa, por lo que es probable que el efecto de aumento en la brotación por haber aplicado Si en el medio de cultivo, bajo las condiciones del experimento, no sea directamente causada por la acumulación de Si en los tejidos, sino que por mecanismos alternos, quizás relacionados con señalización (Collin et al. 2013). Además de que la determinación de biomasa pudo haber sido afectada por la aparición de necrosis en los explantes (figura 10), también es probable que ocurra redistribución de carbono en los explantes. Las referencias que explican la redistribución del carbono en plantas cultivadas *in vitro* son limitadas. Por ejemplo, Amâncio et al. (1999) comprueban que la intensidad lumínica durante el cultivo *in vitro*, y luego durante la aclimatación, es un factor importante en la regulación de la redistribución del carbono en plantas micropropagadas de *Vitis vinifera*. Por lo tanto, además de otros factores, se podría estudiar el papel del Si en la distribución de la biomasa en las especies en las que el Si presenta actividad fisiológica. Aunque, por otro lado, las diferencias encontradas en los contenidos de nitrato también podrían afectar dicha re-distribución (Stitt 1999).

Como se mencionó anteriormente, por las características propias de la técnica, el cultivo *in vitro* puede inducir estrés fisiológico en los explantes. Como se indicó en la sección de *Antecedentes*, durante la micropropagación de *D. giganteus* ocurre una necrosis descendente en los brotes que afecta la eficiencia de la micropropagación, lo cual fue subsanado por medio de la duplicación de la concentración de los macro-nutrientes (N, P, K, Ca, Mg) del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962). En este experimento, el porcentaje de brotes necróticos fue significativamente menor en explantes cultivados con 100 mg L^{-1} Si a los 14 y a los 23 días, reduciéndose hasta obtener un $15,9 \pm 3,4\%$ de brotes necróticos por explante, en relación con el testigo, que presentó un $53,7 \pm 12,6\%$. Si bien la hiperhidricidad no fue un problema ni la causa evidente de la necrosis encontrada, el único reporte encontrado en la literatura sobre el uso de Si en el medio de cultivo para la mitigación de anomalías a nivel de tejidos en cultivo *in vitro*, corresponde al experimento realizado por Sivanesan et al. (2011) en plantas de *Cotoneaster wilsonii*. Estos investigadores lograron reducir la hiperhidricidad, obteniendo un 14% de plantas hiperhídricas al aplicar 100 mg L^{-1} de Si en el medio de cultivo, comparado con el testigo en donde se observó un 78,6%. En dicho estudio, relacionaron la hiperhidricidad con el

contenido de MDA en los tejidos, lo cual es indicativo de la peroxidación de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares, lo cual causa estrés oxidativo y eventualmente necrosis. Sin embargo, en el caso de *D. giganteus* es probable que la necrosis sea consecuencia de un factor diferente, pues las determinaciones de MDA en los tejidos no mostraron correlación con la aparición de la necrosis descendente. Dado esto, y lo anteriormente mencionado con respecto al aumento al doble de macronutrientes del medio de cultivo MS para explantes de *D. giganteus in vitro*, es probable que las anomalías surgidas sean producto de desbalances nutricionales. Es por ello que se encuentra en este momento en investigación la absorción de nutrientes por parte de explantes de *D. giganteus* cultivados *in vitro* (M. Viñas-Meneses 2014)⁶. No se logró relacionar el porcentaje de necrosis ni clorosis con ninguna de las variables evaluadas, en ninguna de las condiciones probadas en el experimento.

Efecto de la aplicación de Si sobre la eficiencia máxima del fotosistema II en hojas de explantes bajo luz (F_v'/F_m') y bajo oscuridad (F_v/F_m).

Los explantes cultivados con Si en el medio de cultivo presentaron mayores eficiencias del PSII, siendo más marcada la diferencia respecto al testigo cuando el PSII (Q_A oxidada) fue aclimatado por 30 minutos en oscuridad para realizar las determinaciones (figura 11). Las plantas cultivadas *in vitro*, si bien desarrollan fotosistemas funcionales, tienen tasas fotosintéticas muy bajas por las condiciones heterotróficas en las cuales crecen (Amâncio et al. 1999). Esto también es de esperar en los explantes de *D. giganteus* cultivados *in vitro*, pues el medio de cultivo utilizado posee una fuente constante de carbono (sacarosa), la cual es utilizada por la planta para su metabolismo primario y, por lo tanto, para la formación de esqueletos de carbono. Aunque estos efectos positivos sobre la eficiencia fotosintética en los explantes cultivados con Si no se relacionan con aumentos en biomasa, potencialmente, esto podría conllevar a mayores probabilidades de sobrevivencia en una fase de aclimatación *ex vitro*. Carvalho et al. (2001) utilizaron plantas cultivadas *in vitro* de *Vitis vinifera* y *Castanea sativa* x *C. crenata* como modelos experimentales para observar el comportamiento de los parámetros F_v'/F_m' y F_v/F_m . Encontraron que, en

⁶ Viñas-Meneses, M. 2014. Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica. (Comunicación personal).

general, al primer día de aclimatación, las plantas mostraron una disminución acelerada en estos valores. Guan et al. (2008), en *Zingiber officinale*, una especie monocotiledónea, encontraron resultados similares a los de Carvalho et al. (2001). Por lo tanto, mayores valores de F_v'/F_m' y F_v/F_m posiblemente pueden contribuir a una compensación en la rápida disminución de la capacidad de la planta para utilizar la luz en el proceso de conversión al autotrofismo.

Cabe destacar el comportamiento de las variables, en donde en algunas de las evaluaciones, los tratamientos con Si adicional se diferenciaron de la medición inicial, y no así del testigo, cuando este último no se diferenció de la medida inicial. Esto probablemente responde a aspectos metodológicos, en donde quizás se requirió de un mayor número de repeticiones. Sin embargo, juzgando con base en lo anterior, y en el error estándar de cada promedio, se puede observar una tendencia de un efecto positivo en la eficiencia del PSII de la aplicación de Si bajo las condiciones de este experimento. Por lo anterior, tal vez aumentando el número de repeticiones o probando concentraciones mayores de Si se podrían ver efectos más claros.

Efecto de la aplicación de Si sobre la peroxidación de lípidos y el oscurecimiento del medio

El estrés oxidativo en especies cultivadas *in vitro* puede causar oscurecimiento de tejidos y de medios de cultivo (Azofeifa 2009). La peroxidación de lípidos se refiere al daño directo de las especies de oxígeno reactivo sobre los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares, lo cual genera como subproducto al MDA, el cual puede ser determinado y dar cuenta del daño que han generado dichas especies de oxígeno (Hodges et al. 1999). En este caso no se detectaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos con Si con respecto al testigo, ni a lo largo del tiempo. Solamente se encontraron casos aislados de hiperhidricidad, que podrían dar indicio de que los explantes sufren un estrés oxidativo (Cassells y Curry 2001). El oscurecimiento del medio tampoco mostró relación con las otras variables. Por lo tanto, es probable que en los explantes de *D. giganteus* utilizados en el experimento, la peroxidación de lípidos no fuese un factor determinante en la eficiencia de su micropropagación, pues no se encontró relación entre los contenidos de MDA en sus tejidos con respecto a las distintas variables medidas.

En resumen, a pesar de que hubo evidencia de acumulación creciente de Si en los tejidos, en concordancia con el aumento en la dosis de este elemento en los medios de cultivo, no se observó cambio en la biomasa de explantes de *Dendrocalamus giganteus* cultivados *in vitro* con respecto al testigo, ni a lo largo de 23 días de evaluación. La aplicación de Si a razón de 100 mg L^{-1} en el medio de cultivo parece que facilitó el mantenimiento del contenido de agua en los explantes de *D. giganteus* a los 7 días de cultivo *in vitro* con respecto al testigo. La aplicación de Si también aumentó el porcentaje de brotación de explantes de *D. giganteus* cultivados *in vitro* con respecto al testigo, lo cual, al no concordar con un aumento en biomasa, probablemente tenga que ver con alguna función del Si en la re-distribución de dicha biomasa en los explantes. La aplicación de Si a razón de 100 mg L^{-1} en el medio de cultivo disminuyó el porcentaje de brotes necróticos por explante a partir de los 14 días. La aplicación de Si en el medio de cultivo mejoró la eficiencia del fotosistema II con respecto al testigo, lo cual fue más marcado el efecto en explantes de *D. giganteus* a los que se les determinó la fluorescencia máxima bajo oscuridad. No se obtuvo diferencias significativas en cuanto al efecto del Si sobre la altura, ni sobre la clorosis en los explantes bajo estudio. No se obtuvo tampoco diferencias en cuanto a la oxidación, en tanto a contenidos de MDA en los tejidos (peroxidación de lípidos) ni oscurecimiento del medio, ni se mostró correlación con las demás variables medidas, lo cual podría indicar que, posiblemente, la oxidación no fue un factor determinante en el experimento bajo estudio. No se puede descartar el efecto de los contenidos de nitrato adicional respecto al contenido de este ión en medio de cultivo del testigo, sobre los resultados obtenidos en este experimento.

LITERATURA CITADA

- Ahmad, P; Sarwat, M; Sharma, S. 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology* 51(3):167-173.
- Amâncio, S; Rebordão, J; Chaves, M. 1999. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: Photosynthetic competence and carbon allocation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58(1):31-37.
- Asmar, SA; Pasqual, M; Rodrigues, FA; Araujo, AGd; Pio, LAS; Silva, SdOe. 2011. Fontes de silício no desenvolvimento de plântulas de bananeira 'Maçã' micropropagadas. *Ciência Rural* 41:1127-1131.
- Azofeifa, Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana* 20(1):153-175.
- Baker, NR. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59(1):89-113.
- Balen, B; Tkalec, M; Pavoković, D; Pevalek-Kozlina, B; Krsnik-Rasol, M. 2009. Growth conditions in in vitro culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues. *Journal of Plant Growth Regulation* 28(1):36-45.
- Braga, FT; Nunes, CF; Favero, AC; Pasqual, M; Carvalho, JGd; Castro, EMd. 2009. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44:128-132.
- Carvalho, L; Leonor Osório, M; Manuela Chaves, M; Amâncio, S. 2001. Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of in vitro grapevine and chestnut plantlets under ex vitro acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67(3):271-280.
- Cassells, A; Curry, R. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64(2):145-157.
- Chen, W; Yao, X; Cai, K; Chen, J. 2011. Silicon alleviates drought stress of rice plants by improving plant water status, photosynthesis and mineral nutrient absorption. *Biological Trace Element Research* 142(1):67-76.
- Choudhury, D; Sahu, J; Sharma, G. 2012. Value addition to bamboo shoots: a review. *Journal of Food Science and Technology* 49(4): 407-414.

- Collin, B; Doelsch, E; Keller, C; Panfili, F; Meunier, J-D. 2013. Effects of silicon and copper on bamboo grown hydroponically. *Environmental Science and Pollution Research* 20(9):6482-6495
- Collin, B; Doelsch, E; Keller, C; Panfili, F; Meunier, J-D. 2011. Distribution and variability of silicon, copper and zinc in different bamboo species. *Plant and Soil*:1-11.
- Cooke, J; Leishman, MR. 2011. Is plant ecology more siliceous than we realise? *Trends in Plant Science* 16(2):61-68.
- Currie, HA; Perry, CC. 2007. Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies. *Annals of Botany* 100(7):1383-1389.
- Ding, TP; Zhou, JX; Wan, DF; Chen, ZY; Wang, CY; Zhang, F. 2008. Silicon isotope fractionation in bamboo and its significance to the biogeochemical cycle of silicon. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72(5):1381-1395.
- Epstein, E. 1999. Silicon. *Annual Review of Plant Biology* 50(1):641-664.
- Gomes-Dias, GdM; Soares, JDR; Pasqual, M; Alves, R. 2014. Photosynthesis and leaf anatomy of *Anthurium* cv. Rubi plantlets cultured in vitro under different silicon (Si) concentrations. *Australian Journal of Crop Science* 8(8):1160-1167.
- Gong, H; Chen, K; Chen, G; Wang, S; Zhang, C. 2003. Effects of silicon on growth of wheat under drought. *Journal of Plant Nutrition* 26(5):1055-1063.
- Guan, QZ; Guo, YH; Sui, XL; Li, W; Zhang, ZX. 2008. Changes in photosynthetic capacity and antioxidant enzymatic systems in micropropagated *Zingiber officinale* plantlets during their acclimation. *Photosynthetica* 46(2):193-201.
- Guevara, E; Jiménez, V. 1998. Principios y aplicaciones de la fisiología vegetal: manual de laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. 225 p.
- Gunes, A; Inal, A; Alpaslan, M; Eraslan, F; Bagci, EG; Cicek, N. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology* 164(6):728-736.
- He, H; Veneklaas, EJ; Kuo, J; Lambers, H. 2014. Physiological and ecological significance of biomineralization in plants. *Trends in Plant Science* 19(3):166-174

- Hodges, DM; DeLong, JM; Forney, CF; Prange, RK. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207(4):604-611.
- Jiménez, VM; 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, Tissue and Organ Culture* 86(3):389-395
- Keller, C; Guntzer, F; Barboni, D; Labreuche, J; Meunier, J-D. 2012. Impact of agriculture on the Si biogeochemical cycle: Input from phytolith studies. *Comptes Rendus Geoscience* 344(11-12):739-746.
- Liang, Y; Sun, W; Zhu, YG; Christie, P. 2007. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review. *Environmental Pollution* 147(2):422-428.
- Lima, H; Willrich, F; Barbosa, N; Rosa, M; Cunha, B. 2008. Durability analysis of bamboo as concrete reinforcement. *Materials and Structures* 41(5):981-989.
- Limei, YBZ. 2003. Tissue Culture of *Dendrocalamus giganteus* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops* 3:82-87.
- Lux, A; Luxová, M; Abe, J; Morita, S; Inanaga, S. 2003. Silicification of bamboo (*Phyllostachys heterocycla* Mitf.) root and leaf. *Plant and Soil* 255(1):85-91.
- Ma, JF; Tamai, K; Yamaji, N; Mitani, N; Konishi, S; Katsuhara, M; Ishiguro, M; Murata, Y; Yano, M. 2006. A silicon transporter in rice. *Nature* 440(7084):688-691.
- Ma, J; Yamaji, N. 2008. Functions and transport of silicon in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(19):3049-3057.
- Ma, JF; Yamaji, N; Mitani-Ueno, N. 2011. Transport of silicon from roots to panicles in plants. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 87(7):377-385.
- Marschner, H; Oberle, H; Cakmak, I; Römheld, V. 1990. Growth enhancement by silicon in cucumber (*Cucumis sativus*) plants depends on imbalance in phosphorus and zinc supply. *Plant and Soil* 124(2):211-219.
- Máthé, C; Mosolygó, Á; Surányi, G; Beke, A; Demeter, Z; Tóth, VR; Beyer, D; Mészáros, I; Hamvas, M. 2012. Genotype and explant-type dependent morphogenesis and

- silicon response of common reed (*Phragmites australis*) tissue cultures. *Aquatic Botany* 97(1):57-63.
- Mitani, N; Ma, JF. 2005. Uptake system of silicon in different plant species. *Journal of Experimental Botany* 56(414):1255-1261.
- Miyake, Y; Takahashi, E. 1978. Silicon deficiency of tomato plant. *Soil Science and Plant Nutrition* 24(2):175–189
- Miyake, Y; Takahashi, E. 1983. Effect of silicon on the growth of solution-cultured cucumber plant. *Soil Science and Plant Nutrition* 29(1):71–83
- Møller, IM; Jensen, PE; Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58:459-481.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473-497.
- Öquist, G; Anderson, JM; McCaffery, S; Chow, WS. 1992. Mechanistic differences in photoinhibition of sun and shade plants. *Planta* 188(3):422-31.
- Prabagar, S; Hodson, MJ; Evans, DE. 2011. Silicon amelioration of aluminium toxicity and cell death in suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Environmental and Experimental Botany* 70(2–3):266-276.
- Ramanayake, S; Wanniarachchi, W. 2003. Organogenesis in callus derived from an adult giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro). *Scientia Horticulturae* 98(2):195-200.
- Ramanayake, SMSD; Wanniarachchi, WAVR; Tennakoon, TMA. 2001. Axillary shoot proliferation and in vitro flowering in an adult giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37(5):667-671
- Ramanayake, S; Yakandawala, K. 1997. Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. *Plant Science* 129(2):213-223.
- Shen, X; Zhou, Y; Duan, L; Li, Z; Eneji, AE; Li, J. 2010. Silicon effects on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedlings under drought and ultraviolet-B radiation. *Journal of Plant Physiology* 167(15):1248-1252.

- Shin, J-H; Kim, S-R; An, G. 2009. Rice Aldehyde dehydrogenase7 is needed for seed maturation and viability. *Plant Physiology* 149(2):905-915.
- Silva, D. 2007. Meios de cultura e fontes de silício no desenvolvimento in vitro de gébera. Tesis maestría. Brasil, Universidade Federal de Lavras. 84 p.
- Sivanesan, I; Jeong, BR. 2014. Silicon promotes adventitious shoot regeneration and enhances salinity tolerance of *Ajuga multiflora* Bunge by altering activity of antioxidant enzyme. *The Scientific World Journal* 2014.
- Sivanesan, I; Song, JY; Hwang, SJ; Jeong, BR. 2011. Micropropagation of *Cotoneaster wilsonii* Nakai—a rare endemic ornamental plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105(1):55-63.
- Snyder, G; Matichenkov, V; Datnoff, L. 2007. Silicon. *Handbook of plant nutrition*. New York: Taylor and Francis:551–568.
- Soares, JDR; Pasqual, M; Rodrigues, FA; Villa, F; Araujo, AGd. 2011. Fontes de silício na micropropagação de orquídea do grupo *Cattleya*. *Acta Scientiarum. Agronomy* 33:503-507.
- Song, Z; Wang, H; Strong, PJ; Li, Z; Jiang, P. 2012. Plant impact on the coupled terrestrial biogeochemical cycles of silicon and carbon: Implications for biogeochemical carbon sequestration. *Earth-Science Reviews* 115(4):319-331.
- Soundararajan, P; Sivanesan, I; Jo, E; Jeong, B. 2013. Silicon promotes shoot proliferation and shoot growth of *Salvia splendens* under salt stress in vitro. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 54(4):311-318.
- Stitt, M. 1999. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology*. 2(3):178-186.
- United States Geological Survey. 2008. *Minerals Yearbook*. E.E.U.U.
- Vlek, PLG; Stumpe, JM. 1978. Effects of solution chemistry and environmental conditions on ammonia volatilization losses from aqueous systems. *Soil Science Society of America Journal* 42(3):416-421.
- Waikhom, SD; Louis, B. 2014. An effective protocol for micropropagation of edible bamboo species (*Bambusa tulda* and *Melocanna baccifera*) through nodal culture. *The Scientific World Journal* 2014:8.

- Yamaji, N; Ma, JF. 2009. A transporter at the node responsible for intervascular transfer of silicon in rice. *Plant Cell* 21(9):2878-2883.
- Yamaji, N; Chiba, Y; Mitani-Ueno, N; Feng Ma, J. 2012. Functional characterization of a silicon transporter gene implicated in silicon distribution in barley. *Plant Physiology* 160(3):1491-1497.
- Zörb, C; Schmitt, S; Neeb, A; Karl, S; Linder, M; Schubert, S. 2004. The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. *Plant Science* 167(1):91-100.

ANEXOS

Anexo 1. Balance de iones calculado para los distintos medios de cultivo con concentraciones crecientes de silicio (0, 50 y 100 mg L⁻¹ Si), utilizando como fuente de silicio el producto comercial Nutrifol® Silicato de Potasio (Agrotico, Costa Rica).

Anexo 1.1. Balance de iones calculado para el medio testigol (0 mg L⁻¹ Si)

Compuesto	MM g/mol	Cn g/L	Cn K ⁺ g/L	Cn NO ₃ ⁻ g/L	Cn Si g/L	Cn mmol/L
NH ₄ NO ₃	80,04	3,3000		2,5562		41,2294
KNO₃	101,10	3,8000	1,4696	2,3304		37,5865
KH ₂ PO ₄	136,09	0,3400	0,0977			2,4983
KI	166,00	0,0008	0,0002			0,0050
HNO₃	63,01					
Producto comercial	154,28					
K ⁺	39,10		1,5675			40,090
NO ₃ ⁻	62,00			4,8866		78,82
Si	28,09					

Anexo 1.2. Balance de iones calculado para el medio con 50 mg L⁻¹ Si

Compuesto	MM g/mol	Cn g/L	Cn K ⁺ g/L	Cn NO ₃ ⁻ g/L	Cn Si g/L	Cn mmol/L
NH ₄ NO ₃	80,04	3,3000		2,5562		41,2294
KNO₃	101,10	3,7082	1,4341	2,2741		36,6785
KH ₂ PO ₄	136,09	0,3400	0,0977			2,4983
KI	166,00	0,0008	0,0002			0,0050
HNO₃	63,01	0,0575		0,0566		
Producto comercial (ml)		0,5155	0,0355			
K ⁺	39,10		1,5675			40,09
NO ₃ ⁻	62,00			4,8869		78,82
Si	28,09				0,0500	1,78

Anexo 1.3. Balance de iones calculado para el medio con 100 mg L⁻¹ Si

Compuesto	MM g/mol	Cn g/L	Cn K ⁺ g/L	Cn NO ₃ ⁻ g/L	Cn Si g/L	Cn mmol/L
NH ₄ NO ₃	80,04	3,3000		2,5562		41,2294
KNO₃	101,10	3,6163	1,3986	2,2177		35,7695
KH ₂ PO ₄	136,09	0,3400	0,0977			2,4983
KI	166,00	0,0008	0,0002			0,0050
HNO₃	63,01	0,1150		0,1132		
Producto comercial		1,0309	0,0710			
K ⁺	39,10		1,5675			40,090
NO ₃ ⁻	62,00			4,8871		78,82
Si	28,09				0,1000	3,56

Anexo 2. Resultados de análisis químicos realizados en el Laboratorio de Suelos y Foliar del Centro para Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, para los medios de cultivo y los tejidos vegetales utilizados en el experimento.

Anexo 2.1. Análisis químico de los medios de cultivo con concentraciones crecientes de silicio (0, 50 y 100 mg L⁻¹ Si) en el medio de cultivo utilizados en el experimento.

LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES																	
REPORTE DE ENSAYO																	
Nº DE REPORTE: 52312																	
USUARIO:	PROYECTO INVESTIGACION LSF																
SUBCLIENTE:	FLORIA BERTSCH-agleto@gmail.com-TESIS																
RESPONSABLE:	ANDRES HERNANDEZ																
TELEFONO:	2511-8203																
PROVINCIA:	SAN JOSE								ANÁLISIS:	Q.C.							
CANTÓN:	MONTES DE OCA								FECHA RECEPCIÓN:	03/11/2014							
LOCALIDAD:	CIGRAS								EMISIÓN DE REPORTE:	18/11/2014							
CULTIVO:	SOLUCIONES NUTRITIVAS								Nº DE MUESTRAS TOTAL:	3							
									PÁGINA:	1/1							
ANÁLISIS QUÍMICO DE AGUAS																	
ID USUARIO	IDLAB	pH	mg/L						mg/L					mg/L		mS/cm	
			N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	Ca	Mg	K	P	Fe	Zn	Cu	Mn	Na	S	Si		CE
SNT: 0 Si	A-14-302	NA	513,6	694	234	79	1529	73	4	2	ND	5	3	113	ND	NA	
SNT: 50 Si	A-14-303	NA	517,8	917	234	80	1598	72	4	2	ND	5	4	113	93	NA	
SNT: 100 Si	A-14-304	NA	520,8	948	230	79	1604	72	5	2	ND	5	6	112	173	NA	
ND= NO DETECTADO.																	
NA= NO APLICA. NO ALCANZÓ PARA REALIZAR ESTOS ANÁLISIS.																	
 Ing. Agr. Floria Bertsch COORDINADORA, LABORATORIO DE SUELOS Y FOLIARES																	

Anexo 3.2. Análisis estadístico de la variable “peso seco”

Univariate Tests of Significance for Pesoseco (Spreadshe Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,237234	1	0,237234	568,6534	0,000000
Tratamiento	0,001843	2	0,000922	2,2091	0,120841
Dias	0,006371	3	0,002124	5,0903	0,003860
Tratamiento*Dias	0,003240	6	0,000540	1,2945	0,277804

LSD test; variable Pesoseco (Spreadsheet9_(Recovered))														
Probabilities for Post Hoc Tests														
Error: Between MS = ,00042, df = 48,000														
Cell No.	Tratamiento	Dias	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
1	0	0	0,05394	0,888547	0,741844	0,396157	1,000000	0,444475	0,968058	0,000702	1,000000	0,578821	0,186807	0,101630
2	0	7	0,888547	0,849773	0,849773	0,323735	0,888547	0,366375	0,920259	0,000456	0,888547	0,487430	0,145378	0,076577
3	0	14	0,741844	0,849773	0,240877	0,741844	0,275810	0,772254	0,000252	0,741844	0,377781	0,101321	0,051141	
4	0	23	0,396157	0,323735	0,240877	0,396157	0,932494	0,374499	0,008018	0,396157	0,767550	0,631258	0,420334	
5	50	0	1,000000	0,888547	0,741844	0,396157	1,000000	0,444475	0,968058	0,000702	1,000000	0,578821	0,186807	0,101630
6	50	7	0,444475	0,366375	0,275810	0,932494	0,444475	0,421214	0,006392	0,444475	0,832921	0,572547	0,373682	
7	50	14	0,968058	0,920259	0,772254	0,374499	0,968058	0,421214	0,000621	0,968058	0,551880	0,174142	0,093864	
8	50	23	0,000702	0,000456	0,000252	0,008018	0,000702	0,006392	0,000621	0,000702	0,003577	0,026859	0,056557	
9	100	0	1,000000	0,888547	0,741844	0,396157	1,000000	0,444475	0,968058	0,000702		0,578821	0,186807	0,101630
10	100	7	0,578821	0,487430	0,377781	0,767550	0,578821	0,832921	0,551880	0,003577	0,578821		0,439041	0,272494
11	100	14	0,186807	0,145378	0,101321	0,631258	0,186807	0,572547	0,174142	0,026859	0,186807	0,439041		0,743006
12	100	23	0,101630	0,076577	0,051141	0,420334	0,101630	0,373682	0,093864	0,056557	0,101630	0,272494	0,743006	

Anexo 3.3. Análisis estadístico de la variable “porcentaje de contenido de agua”

Univariate Tests of Significance for CA (Spreadsheet9 Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	40,57349	1	40,57349	69049,22	0,000000
Tratamiento	0,00232	2	0,00116	1,97	0,149971
Dias	0,01372	3	0,00457	7,78	0,000247
Tratamiento*Dias	0,00453	6	0,00076	1,29	0,281911

LSD test; variable CA (Spreadsheet9_(Recovered))														
Probabilities for Post Hoc Tests														
Error: Between MS = ,00059, df = 48,000														
Cell No.	Tratamiento	Dias	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
1	0	0	84637	81306	80895	79154	84637	81142	80888	82060	84637	84773	80795	81871
2	0	7	0,034816	0,018422	0,000808	0,000808	1,000000	0,027111	0,018206	0,099384	1,000000	0,929556	0,015664	0,077514
3	0	14	0,034816	0,789800	0,166797	0,034816	0,914799	0,786127	0,625124	0,034816	0,028329	0,740128	0,714363	
4	0	23	0,018422	0,789800	0,261680	0,018422	0,873153	0,996188	0,451071	0,018422	0,014777	0,948011	0,527645	
5	50	0	0,000808	0,166797	0,261680	0,000808	0,000808	0,201067	0,263676	0,064038	0,000808	0,000618	0,289858	0,082736
6	50	7	0,000000	0,034816	0,018422	0,000808	0,027111	0,018206	0,099384	1,000000	0,929556	0,015664	0,077514	
7	50	14	0,027111	0,914799	0,873153	0,201067	0,027111	0,869392	0,551777	0,027111	0,021931	0,822117	0,636428	
8	50	23	0,018206	0,786127	0,996188	0,263676	0,018206	0,869392	0,448232	0,018206	0,014600	0,951816	0,524547	
9	100	0	0,099384	0,625124	0,451071	0,064038	0,099384	0,551777	0,448232	0,099384	0,083208	0,413240	0,902151	
10	100	7	1,000000	0,034816	0,018422	0,000808	1,000000	0,027111	0,018206	0,099384		0,929556	0,015664	0,077514
11	100	14	0,929556	0,028329	0,014777	0,000618	0,929556	0,021931	0,014600	0,083208	0,929556		0,012523	0,064418
12	100	23	0,015664	0,740128	0,948011	0,289858	0,015664	0,822117	0,951816	0,413240	0,015664	0,012523		0,486204

Anexo 3.4. Análisis estadístico de la variable “porcentaje de aumento de brotes”

Multivariate Tests of Significance (PORCENTAJE DE AUMENTO EN BROTA Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition						
Effect	Test	Value	F	Effect df	Error df	p
Intercept	Wilks	0,100826	56,48118	3	19	0,000000
Tratamiento	Wilks	0,560166	2,12869	6	38	0,072361

Unequal N HSD; variable Porcentaje de aumento de brotes 7 días (transformado) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 12,721, df = 21,000				
Cell No.	Tratamiento	0	50	100
1	0	2,4036	8,6322	7,1204
2	50	0,00998	0,05509	0,67828
3	100	0,05509	0,67828	

Unequal N HSD; variable Porcentaje de aumento de brotes 14 días (transformado) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 13,422, df = 21,000				
Cell No.	Tratamiento	0	50	100
1	0	5,7250	10,791	10,836
2	50	0,043719	0,041685	0,999710
3	100	0,041685	0,999710	

Unequal N HSD; variable Porcentaje de aumento de brotes 23 días (transformado) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 13,108, df = 21,000				
Cell No.	Tratamiento	0	50	100
1	0	6,6833	11,574	12,088
2	50	0,049437	0,028296	0,956629
3	100	0,028296	0,956629	

Anexo 3.5. Análisis estadístico de la variable “porcentaje de brotes necróticos”

Unequal N HSD; variable Porcentaje de brotes necróticos 0 días (transformado) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 8,7731, df = 21,000				
Cell No.	Tratamiento	0	50	100
1	0	3,1996	0,838694	0,567719
2	50	0,838694		0,875616
3	100	0,567719	0,875616	

Unequal N HSD; variable Porcentaje de brotes necróticos 7 días (transformado) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 4,3014, df = 21,000				
Cell No.	Tratamiento	0	50	100
1	0	5,2962	0,940974	0,621297
2	50	0,940974		0,794604
3	100	0,621297	0,794604	

Unequal N HSD; variable Porcentaje de brotes necróticos 14 días (transformado) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 3,1154, df = 21,000				
Cell No.	Tratamiento	0	50	100
1	0	6,2627	0,231821	0,029213
2	50	0,231821		0,488475
3	100	0,029213	0,488475	

Unequal N HSD; variable Porcentaje de brotes necróticos 23 días (transformado) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 3,1417, df = 21,000				
Cell No.	Tratamiento	0	50	100
1	0	7,0451	0,062022	0,004869
2	50	0,062022		0,438388
3	100	0,004869	0,438388	

Anexo 3.6. Análisis estadístico para la variable “eficiencia máxima del fotosistema II bajo luz (Fv'/Fm')”

Effect	Univariate Tests of Significance $F_{v'}/F_{m'}$ luz				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	22,95748	1	22,95748	8882,012	0,000000
Tratamiento	0,03555	2	0,01777	6,877	0,002366
Dias	0,03355	3	0,01118	4,327	0,008867
Tratamiento*Dias	0,01956	6	0,00326	1,261	0,292877
Error	0,12407	48	0,00258		

LSD test; variable Fv/Fm luz														
Probabilities for Post Hoc Tests														
Error: Between MS = ,00258, df = 48,000														
Cell No.	Tratamiento	Dias	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
			,57980	,54900	,60100	,60700	,57980	,65840	,66300	,64860	,57980	,65200	,65920	,64520
1	0	0		0,342920	0,512838	0,401791	1,000000	0,018229	0,012750	0,037491	1,000000	0,029382	0,017145	0,047503
2	0	7	0,342920		0,112386	0,077538	0,342920	0,001356	0,000886	0,003256	0,342920	0,002414	0,001260	0,004369
3	0	14	0,512838	0,112386		0,852760	0,512838	0,080556	0,059755	0,145309	0,512838	0,119281	0,076553	0,175630
4	0	23	0,401791	0,077538	0,852760		0,401791	0,116483	0,087982	0,201936	0,401791	0,168090	0,111047	0,240667
5	50	0	1,000000	0,342920	0,512838	0,401791		0,018229	0,012750	0,037491	1,000000	0,029382	0,017145	0,047503
6	50	7	0,018229	0,001356	0,080556	0,116483	0,018229		0,886841	0,761850	0,018229	0,843071	0,980254	0,683249
7	50	14	0,012750	0,000886	0,059755	0,087982	0,012750	0,886841		0,656281	0,012750	0,733767	0,906418	0,582433
8	50	23	0,037491	0,003256	0,145309	0,201936	0,037491	0,761850	0,656281		0,037491	0,916229	0,743089	0,916229
9	100	0	1,000000	0,342920	0,512838	0,401791	1,000000	0,018229	0,012750	0,037491		0,029382	0,017145	0,047503
10	100	7	0,029382	0,002414	0,119281	0,168090	0,029382	0,843071	0,733767	0,916229	0,029382		0,823769	0,833407
11	100	14	0,017145	0,001260	0,076553	0,111047	0,017145	0,980254	0,906418	0,743089	0,017145	0,823769		0,665221
12	100	23	0,047503	0,004369	0,175630	0,240667	0,047503	0,683249	0,582433	0,916229	0,047503	0,833407	0,665221	

Anexo 3.7. Análisis estadístico para la variable “eficiencia máxima del fotosistema II bajo oscuridad (Fv/Fm)”

Univariate Tests of Significance for Fv/Fm oscuridad					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	34,79141	1	34,79141	9351,127	0,000000
Tratamiento	0,07137	2	0,03568	9,591	0,000313
Dias	0,20904	3	0,06968	18,729	0,000000
Tratamiento*Dias	0,03088	6	0,00515	1,383	0,240631
Error	0,17859	48	0,00372		

LSD test: variable Fv/Fm Oscuridad														
Probabilities for Post Hoc Tests														
Error: Between MS = ,00372, df = 48,000														
Cell No.	Tratamiento	Dias	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
1		0 0	,66300	0,136625	0,026690	0,175868	1,000000	0,001082	0,000094	0,000031	1,000000	0,001514	0,000003	0,000045
2		0 7	0,136625		0,443623	0,889263	0,136625	0,055231	0,008428	0,003327	0,136625	0,070354	0,000471	0,004631
3		0 14	0,026690	0,443623		0,366093	0,026690	0,238964	0,054006	0,024792	0,026690	0,286267	0,004501	0,032792
4		0 23	0,175868	0,889263	0,366093		0,175868	0,040564	0,005804	0,002238	0,175868	0,052213	0,000305	0,003139
5		50 0	1,000000	0,136625	0,026690	0,175868		0,001082	0,000094	0,000031	1,000000	0,001514	0,000003	0,000045
6		50 7	0,001082	0,055231	0,238964	0,040564	0,001082		0,437567	0,266180	0,001082	0,909669	0,079990	0,319571
7		50 14	0,000094	0,008428	0,054006	0,005804	0,000094	0,437567		0,733718	0,000094	0,374251	0,319571	0,824538
8		50 23	0,000031	0,003327	0,024792	0,002238	0,000031	0,266180	0,733718		0,000031	0,221346	0,510122	0,905582
9		100 0	1,000000	0,136625	0,026690	0,175868	1,000000	0,001082	0,000094	0,000031		0,001514	0,000003	0,000045
10		100 7	0,001514	0,070354	0,286267	0,052213	0,001514	0,909669	0,374251	0,221346	0,001514		0,063092	0,268361
11		100 14	0,000003	0,000471	0,004501	0,000305	0,000003	0,079990	0,319571	0,510122	0,000003	0,063092		0,437567
12		100 23	0,000045	0,004631	0,032792	0,003139	0,000045	0,319571	0,824538	0,905582	0,000045	0,268361	0,437567	

Anexo 4. Variables fisiológicas que no presentaron diferencias significativas con respecto al testigo

Anexo 4.1. Variables de crecimiento, oxidación y efectos fisiológicos determinadas a los 23 días de cultivo en explantes de *Dendrocalamus giganteus* cultivados *in vitro* con 0, 50 y 100 mg L⁻¹ de silicio en el medio de cultivo, y que presentaron un valor $p > 0,05$ en el análisis de varianza general.

Parámetro fisiológico	Concentración de Silicio (mg L ⁻¹)									Valor p ^a			
	0			50			100						
<i>Crecimiento</i>													
Aumento en longitud de explante (cm)^b	0,67	±	0,37^d	a	0,73	±	0,17	a	0,95	±	0,33	a	0,81
<i>Oxidación</i>													
Peroxidación de lípidos (nmol/ml MDA)	5,59	±	0,49	a	5,38	±	0,51	a	4,80	±	0,19	a	0,44
Grado de oscurecimiento del medio	2,43	±	0,37	a	2,50	±	0,19	a	2,33	±	0,17	a	0,57
<i>Efectos fisiológicos</i>													
Clorosis por explante (%)	23,04	±	7,75	a	15,94	±	2,94	a	17,28	±	3,58	a	0,81

^a Valor p obtenido a partir de un análisis de varianza general de todas las evaluaciones para cada variable.

^b Las variables expresadas en negrita corresponden a datos provenientes de medidas repetidas en el tiempo, sus medias fueron comparadas por medio de la prueba DHS de Tukey ($p < 0,05$) para valores n diferentes (0 mg L⁻¹ Si $n = 7$; 50 mg L⁻¹ Si $n = 8$; y 100 mg L⁻¹ Si $n = 9$).

^c Las variables no expresadas en negrita corresponden a medidas independientes en el tiempo (muestras destructivas), sus medias fueron comparadas por medio de la prueba DMS de Fisher ($p < 0,05$).

^d Error estándar de la media

Anexo 5. Datos crudos de las distintas variables

Anexo 5.1. Datos crudos obtenidos en el presente trabajo, correspondientes a las variables de peso fresco, peso seco, contenido de agua, Fv'/Fm' (bajo luz) y Fv/Fm (bajo oscuridad).

Tratamiento	Días	Repetición	Explante	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	CA (%)	Fv/Fm luz	Fv/Fm oscuridad
Inicial	0	1	22	0,3121	0,0575	0,82	0,558	0,578
Inicial	0	2	26	0,3971	0,0551	0,86	0,644	0,745
Inicial	0	3	22	0,4546	0,0734	0,84	0,482	0,595
Inicial	0	4	24	0,3579	0,0536	0,85	0,549	0,696
Inicial	0	5	27	0,2247	0,0301	0,87	0,666	0,701
0	7	1		0,2132	0,0415	0,81	0,452	0,563
0	7	2	7	0,3888	0,0592	0,85	0,575	0,743
0	7	3	12	0,2	0,0402	0,80	0,424	0,737
0	7	4	18	0,2724	0,05	0,82	0,649	0,751
0	7	5	24	0,343	0,0697	0,80	0,645	0,813
50	7	1	2	0,3577	0,0738	0,79	0,643	0,831
50	7	2	7	0,3708	0,0715	0,81	0,674	0,787
50	7	3	23	0,2977	0,0641	0,78	0,641	0,741
50	7	4	33	0,3815	0,067	0,82	0,658	0,843
50	7	5	36	0,282	0,0431	0,85	0,676	0,784
100	7	1	11	0,274	0,0438	0,84	0,655	0,794
100	7	2	18	0,5751	0,0784	0,86	0,65	0,728
100	7	3	21	0,4372	0,0755	0,83	0,681	0,851
100	7	4	31	0,3896	0,0714	0,82	0,641	0,749
100	7	5		0,336	0,0367	0,89	0,633	0,842
0	14	1	1	0,2329	0,0475	0,80	0,597	0,74
0	14	2	8	0,188	0,0368	0,80	0,595	0,811
0	14	3	15	0,2651	0,0485	0,82	0,588	0,699
0	14	4	16	0,2486	0,0564	0,77	0,614	0,823
0	14	5	21	0,4056	0,0591	0,85	0,611	0,683
50	14	1	30	0,435	0,0772	0,82	0,686	0,813
50	14	2	31	0,3156	0,0558	0,82	0,631	0,795
50	14	3	32	0,1936	0,0313	0,84	0,681	0,844
50	14	4	34	0,2851	0,066	0,77	0,654	0,841
50	14	5	35	0,1768	0,0368	0,79	0,663	0,844
100	14	1	14	0,332	0,0708	0,79	0,642	0,777
100	14	2	17	0,5142	0,0849	0,83	0,661	0,919
100	14	3	30	0,3245	0,0576	0,82	0,673	0,851
100	14	4	33	0,3789	0,0858	0,77	0,659	0,923

Continuación anexo 5.1.

Tratamiento	Días	Repetición	Explante	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	CA (%)	Fv/Fm luz	Fv/Fm oscuridad
100	14	5	34	0,3209	0,0571	0,82	0,661	0,861
0	23	1	6	0,2933	0,0537	0,82	0,612	0,718
0	23	2	9	0,2402	0,0458	0,81	0,56	0,688
0	23	3	14	0,4222	0,0818	0,81	0,651	0,714
0	23	4	29	0,1164	0,0276	0,76	0,583	0,724
0	23	5	34	0,4885	0,1161	0,76	0,629	0,736
50	23	1	4	0,5922	0,1192	0,80	0,654	0,793
50	23	2	12	0,6342	0,1064	0,83	0,658	0,907
50	23	3	14	0,4602	0,0778	0,83	0,662	0,921
50	23	4	17	0,2548	0,0478	0,81	0,629	0,762
50	23	5	20	0,8904	0,1525	0,83	0,64	0,82
100	23	1	3	0,3649	0,0741	0,80	0,648	0,85
100	23	2	5	0,3845	0,073	0,81	0,642	0,894
100	23	3	20	0,3228	0,0616	0,81	0,654	0,84
100	23	4	26	0,53	0,0967	0,82	0,637	0,827
100	23	5		0,5141	0,0721	0,86	0,645	0,769

Anexo 5.2. Datos crudos correspondientes a los datos de brotación, obtenidos en el presente trabajo.

Tratamiento	Rep	Explant	Brotos 0	Brotos 7	Brotos 14	Brotos 23	% Brotos 7	% Brotos 14	% Brotos 23
0	1	6	7	7	10	10	0	43	43
0	2	13	4	7	9	9	75	125	125
0	3	14	3	3	7	8	0	133	167
0	4	27	7	7	7	9	0	0	29
0	5	28	4	4	4	4	0	0	0
0	6	29	2	2	2	2	0	0	0
0	7	36	6	10	13	13	67	117	117
50	1	1	4	12	12	13	200	200	225
50	2	3	6	9	10	11	50	67	83
50	3	4	5	13	13	13	160	160	160
50	4	9	4	5	7	9	25	75	125
50	5	12	5	9	14	15	80	180	200
50	6	14	3	4	7	7	33	133	133
50	7	17	3	6	6	6	100	100	100
50	8	20	10	13	16	18	30	60	80
100	1	3	3	6	8	9	100	167	200
100	2	6	6	9	15	17	50	150	183
100	3	7	2	2	3	3	0	50	50
100	4	16	2	3	4	4	50	100	100
100	5	19	4	9	10	14	125	150	250
100	6	20	4	5	6	7	25	50	75
100	7	23	2	3	4	5	50	100	150
100	8	26	5	9	12	12	80	140	140
100	9	36	5	8	15	17	60	200	240

Anexo 5.3. Datos crudos correspondientes a los contenidos brotes necróticos, obtenidos en este trabajo.

Tratamiento	Repetición	Explante	BrotosN.0	BrotosN.7	BrotosN.14	BrotosN.23	BrotosN.0 (%)	BrotosN.7 (%)	BrotosN.14 (%)	BrotosN.23 (%)
0	1	6	1	2	2	3	14,3	28,6	20,0	30,0
0	2	13	0	0	2	2	0,0	0,0	22,2	22,2
0	3	14	0	1	3	3	0,0	33,3	42,9	37,5
0	4	27	3	4	4	5	42,9	57,1	57,1	55,6
0	5	28	1	1	1	4	25,0	25,0	25,0	100,0
0	6	29	1	1	2	2	50,0	50,0	100,0	100,0
0	7	36	0	4	4	4	0,0	40,0	30,8	30,8
50	1	1	0	3	3	3	0,0	25,0	25,0	23,1
50	2	3	0	3	3	3	0,0	33,3	30,0	27,3
50	3	4	1	2	2	2	20,0	15,4	15,4	15,4
50	4	9	1	1	2	3	25,0	20,0	28,6	33,3
50	5	12	0	1	1	1	0,0	11,1	7,1	6,7
50	6	14	0	2	2	2	0,0	50,0	28,6	28,6
50	7	17	1	3	3	3	33,3	50,0	50,0	50,0
50	8	20	1	1	1	2	10,0	7,7	6,3	11,1
100	1	3	0	1	1	1	0,0	16,7	12,5	11,1
100	2	6	0	1	1	1	0,0	11,1	6,7	5,9
100	3	7	1	1	1	1	50,0	50,0	33,3	33,3
100	4	16	1	1	1	1	50,0	7,7	7,1	25,0
100	5	19	0	3	3	3	0,0	33,3	30,0	21,4
100	6	20	0	1	1	1	0,0	20,0	16,7	14,3
100	7	23	0	1	1	1	0,0	33,3	25,0	20,0
100	8	26	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
100	9	36	0	2	2	2	0,0	25,0	13,3	11,8