

Efecto del estado físico del medio de cultivo y el número de subcultivos en la fase de multiplicación *in vitro* de plantas de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*. Schrad. ex Wendl.

Y. García-Ramírez*, M. Freire-Seijo, Blanca Rosa Pérez, Ortelio Hurtado. *Autor para correspondencia

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

RESUMEN

Bambusa vulgaris var. *vulgaris* Schard. ex Wendl. es una especie multipropósito de rápido crecimiento y proporciona beneficios a los cultivos agrícolas y ha sido empleada en plantaciones y sistemas agroforestales. Su propagación *in vitro* se ha efectuado a través de organogénesis a partir de yemas axilares. Sin embargo, los bajos coeficientes de multiplicación y la presencia de fenoles han sido elementos que han afectado la multiplicación *in vitro* en varias especies de bambúes. Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto del estado físico del medio de cultivo y el número de subcultivo en la fase de multiplicación *in vitro* de plantas de *B. vulgaris* var. *vulgaris*. Para ello se empleó un medio de cultivo compuesto por las sales MS, mio-inositol (100 mg l⁻¹), sacarosa (30 g l⁻¹) y 6-BAP (6.0 mg l⁻¹) en estado líquido y en estado semisólido (2.5 g l⁻¹ de Gelrite). Se cuantificó el número de brotes por planta y el número de hojas expandidas por cada explante, además se midió la altura de la planta principal desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja. Los resultados demostraron que el estado físico del medio de cultivo influyó en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris*. El mayor coeficiente de multiplicación (3.0) se logró después de cinco subcultivos de multiplicación en medio de cultivo en estado líquido.

Palabras clave: bambú, coeficiente de multiplicación, organogénesis, yemas axilares

ABSTRACT

Bambusa vulgaris var. *vulgaris*. Scharde ex Wendl. is a fast growing multi-species which provides benefits to agricultural crops. It has been used in plantations and agroforestry systems. *In vitro* propagation of this species has been made by organogenesis from shoot tip. However, the low rates of multiplication and the presence of phenols have affected the *in vitro* multiplication in several species of bamboo. This work was carried out to determine the effect of the culture medium physical state and the number of subcultures in the *in vitro* multiplication of *B. vulgaris* plants var. *vulgaris*. A medium composed of MS salts, myo-inositol (100 mg l⁻¹), sucrose (30 g l⁻¹) and 6-BAP (6.0 mg l⁻¹) in liquid and semisolid (2.5 g l⁻¹ Gelrite) was used. The number of shoots per plant and the number of expanded leaves per explants were quantified. The height of the main plant was also measured from the base to the point of insertion of the first leaf. Results showed that the physical state of the culture medium had influence on *in vitro* multiplication of *B. vulgaris* var. *vulgaris*. The highest multiplication coefficient (3.0) was achieved after five subcultures of multiplication in liquid culture medium.

Key words: axillary buds, bamboo, multiplication coefficient, organogenesis

INTRODUCCIÓN

El estado físico de los medios de cultivo constituye un aspecto importante para el cultivo *in vitro*. Autores como Bag *et al.* (2000) han señalado el efecto positivo del medio de cultivo en estado líquido sobre la multiplicación *in vitro* de varias especies de bambúes.

Sin embargo, aún persisten serias limitantes que afectan la propagación *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* tales como los bajos coeficientes de multiplicación y la presencia de fenoles (Mishraa *et al.*, 2007).

Para elevar los coeficientes de multiplicación en esta especie se han estudiado y puesto en práctica diferentes alternativas. Varios

autores han evaluado la influencia del número de subcultivos y el manejo de los explantes en cada subcultivo (Yashodha *et al.*, 2007). También se ha hecho referencia a la posibilidad de emplear medio de cultivo líquido tal y como fue descrito en la especie *Pseudoxynanthera stocksii* por Sanjaya *et al.* (2005).

Por todo lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto del estado físico del medio de cultivo y el número de subcultivos en la fase de multiplicación *in vitro* de plantas de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal, se emplearon brotes establecidos (20 días de cultivo, 6.0 cm de altura) a partir de yemas axilares según lo descrito por García-Ramírez *et al.* (2007) para *Bambusa vulgaris* var. *vittata* (Figura 1).

El medio de cultivo estuvo compuesto por las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS), mio-inositol (100 mg l^{-1}), sacarosa (30 g l^{-1}) y 6-BAP (6.0 mg l^{-1}). Se establecieron dos tratamientos: el medio de cultivo estado líquido y en estado semisólido, al cual se le agregaron 2.5 g l^{-1} de Gelrite® (SIGMA).

Los frascos de cultivo empleados en cada tratamiento fueron Erlenmeyers (250 ml de volumen). A cada uno se le adicionaron 50 ml de medio de cultivo y en cada frasco se colocaron cinco explantes (se consideró como explante un brote individual o con hasta dos brotes nuevos). Los frascos de cultivo se colocaron en cámaras de crecimiento a $26 \pm 2.0^\circ\text{C}$ y luz solar ($38.0\text{-}45.7 \mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

A los 20 días de cultivo (subcultivo) se cuantificó el número de brotes por planta y el número de hojas expandidas por cada explante. Además, se midió la altura de la planta principal (cm) desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja.

Posteriormente, se realizaron cinco subcultivos de multiplicación. Para ello, se colocaron las plantas en grupos de a tres, sin individualizar (Figura 2). Al final de cada subcultivo (cada 20 días) se calculó el coeficiente de multiplicación (CM) con la siguiente fórmula: $\text{CM} = \text{Número de plantas totales (grupos de a tres) por frasco} / \text{número de plantas inicial (grupos de a tres) por frasco}$.

Los valores obtenidos fueron analizados mediante una prueba de *Mann-Whitney*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.



Figura 1. Explantes de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* a los 20 días de establecidos *in vitro*.



Figura 2. Plantas en grupos de a tres de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* a los 20 días cultivo.



Figura 3. Plantas de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* a los 20 días de cultivo, (a) en medio de cultivo líquido y (b) en medio de cultivo semisólido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estado físico del medio de cultivo influyó en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*. Durante la multiplicación en medio de cultivo líquido, se observó la formación de nuevos brotes a partir de la segunda semana de cultivo. Sin embargo, en el medio de cultivo semisólido se retardó la emisión de nuevos brotes, estos no fueron visibles hasta después de 17 días de cultivo.

Cuando se empleó el medio de cultivo líquido la emisión de nuevos brotes se favoreció, se formaron 4.60 brotes por cada planta, mientras que al emplear medio de cultivo semisólido solamente se formó como promedio un brote por planta (Figura 3). Estos valores difirieron

significativamente ($p < 0.05$, según la prueba de Mann-Whitney).

Sin embargo, el estado físico del medio de cultivo no provocó diferencias significativas entre los tratamientos cuando se analizaron las variables: altura de las plantas, que varió de 5.8 a 5.9 cm y el número de hojas expandidas, que osciló entre 1.9 y 2.0.

Desde el punto de vista cualitativo se pudieron apreciar diferencias en cuanto al color de los brotes. Los brotes desarrollados en medio de cultivo líquido mostraban una coloración verde-intensa. Sin embargo, los brotes formados en medio de cultivo semisólido fueron de color verde claro.

La baja emisión de brotes en el medio de cultivo semisólido pudiera deberse a múltiples causas, una de ellas puede ser la presencia de fenoles en la zona de la base de las plantas. Autores como Nadgauda *et al.* (1997) describieron el crecimiento lento de las plantas pudiera estar asociado a la acumulación de fenoles en la base de las plantas *in vitro* de *B. arundinacea*. Estos mismos autores atribuyeron el crecimiento lento a las barreras físicas que impone el estado semisólido del medio de cultivo.

Resultados similares fueron informados por Ndiaye *et al.* (2006) para *B. vulgaris* var. vittata y Eiman *et al.* (2008) para *Oxytenanthera abyssinica*. Estos autores compararon los valores de formación de brotes obtenidos en medio de cultivo líquido y semisólido. Ellos demostraron que el estado físico del medio de cultivo influyó en la formación de brotes y mencionaron que los valores de este indicador fueron inferiores significativamente en las plantas cultivadas en medio de cultivo semisólido.

Un gran número de artículos científicos relacionados con la multiplicación *in vitro* de los bambúes hacen referencia al empleo del medio de cultivo líquido durante esta fase, debido a los efectos positivos sobre el incremento del número de brotes por planta y en el coeficiente de multiplicación en varias especies (Arya *et al.*, 2001). En el medio de cultivo en estado líquido las plantas se encuentran parcialmente sumergidos, lo que propicia una mejor absorción de los nutrientes

y por ende un mayor crecimiento y desarrollo del explante (Sandal *et al.*, 2001). Además, aumenta la difusión gaseosa dentro y fuera de las células del tejido y el crecimiento se hace más rápido (George *et al.*, 2008).

Autores como Mishra *et al.* (2007) en *B. tulda*; Shirin y Rana (2007) en *B. glaucescens*; Ramanayake *et al.* (2008) en *B. atra*, *D. giganteus* y *Dendrocalamus hookeri*; Sayanika y Sharma (2009) en *Arundinaria callosa* y Rajneesh y Hyamal (2009) en *D. hamiltonii*, han corroborado el incremento del número de brotes por planta al emplear medio de cultivo líquido.

Los resultados demostraron que el medio de cultivo líquido favoreció la emisión de nuevos brotes lo que se relaciona directamente con el incremento en el coeficiente de multiplicación y finalmente en el número de plantas para ser transferidas a fase de enraizamiento.

Es importante señalar, además, que las plantas en medio de cultivo semisólido no sobrevivieron a los siguientes subcultivos. Se observó que los brotes morían una vez que estos eran transferidos a un segundo subcultivo, por ello solo se muestran los resultados en medio de cultivo líquido.

Se comprobó que el número de subcultivos influyó sobre el coeficiente de multiplicación de *B. vulgaris*. Este se incrementó a medida que se aumentó el número de subcultivos. En el quinto subcultivo de multiplicación se obtuvo un coeficiente de multiplicación de 3.0 (Figura 4).

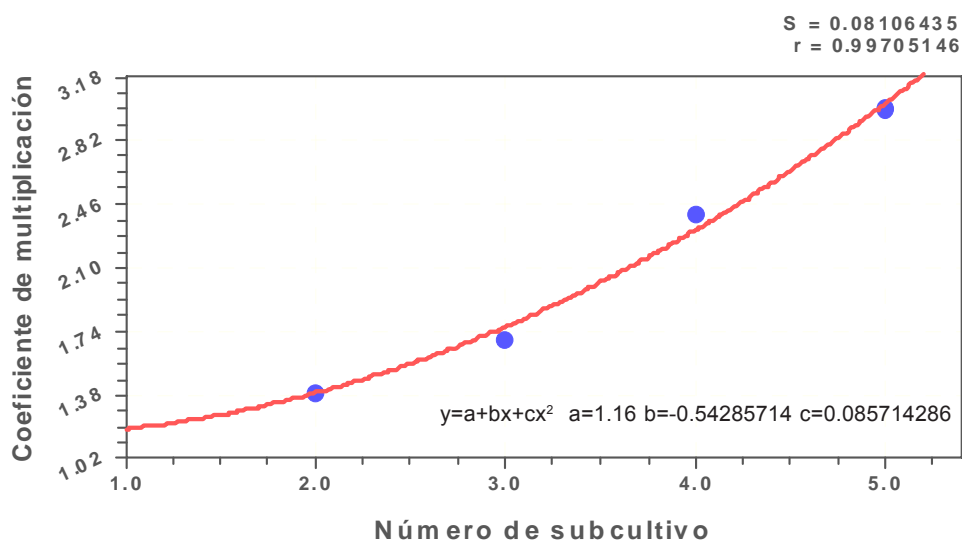


Figura 4. Curva de coeficiente de multiplicación en plantas de *Bambusa vulgaris* en medio de cultivo líquido hasta el quinto subcultivo.

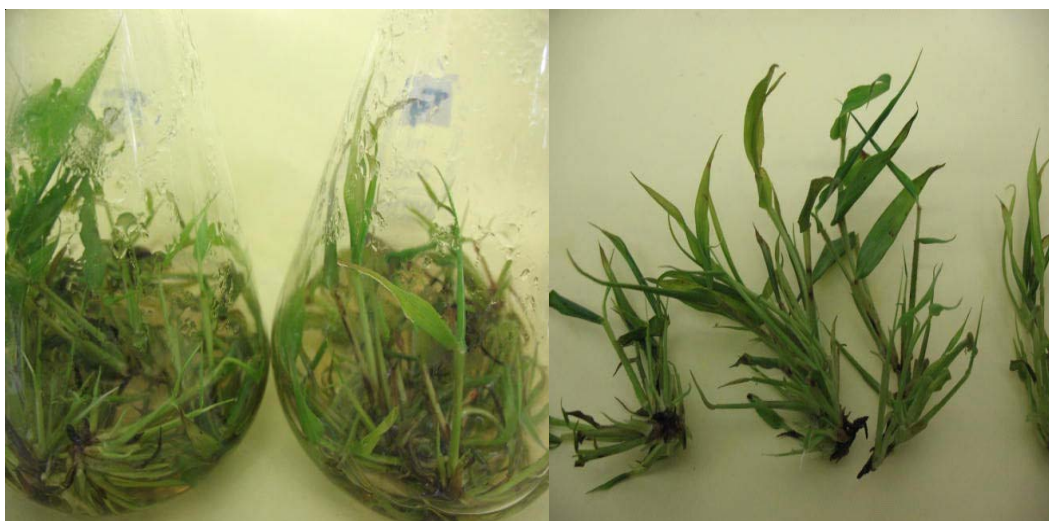


Figura 5. Plantas de *Bambusa vulgaris* en el quinto subcultivo en medio de cultivo líquido.

No se observaron diferencias fenotípicas entre las plantas en los diferentes subcultivos. Además, no fueron visibles síntomas de hiperhidricidad a pesar de que todos los subcultivos se realizaron en medio de cultivo líquido y que esta es una especie leñosa. De manera general, las plantas *in vitro* mantuvieron una coloración verde intenso, característico de *B. vulgaris* (Figura 5).

Otros investigadores también han constatado un incremento del coeficiente de multiplicación con el número de subcultivos. Por ejemplo, Ramanyake *et al.* (2006) en *B. vulgaris* var. *vittata* al extender el número de subcultivos hasta el noveno. Por su parte, Mishra *et al.* (2007) y Shirin y Rana (2007) alcanzaron un coeficiente de multiplicación de 3.2 y 4.0 al quinto subcultivo de multiplicación *in vitro* de *B. tulda* y *B. glaucescens*, respectivamente. Igualmente, Ramanayake *et al.* (2008) en *B. atra*, *D. giganteus* y *D. hookeri* informaron coeficientes de multiplicación de 3.0 y 4.2 al sexto subcultivo de multiplicación *in vitro*. Los valores antes referidos son cercanos a los obtenidos en el presente trabajo para *B. vulgaris*.

El empleo de medios de cultivo líquidos permitió que las yemas axilares presentes en los tallos de las plantas brotaran al ponerse en contacto directo con el medio de cultivo. Este aspecto influyó en el incremento del coeficiente de multiplicación, principalmente a partir del tercer subcultivo de multiplicación. La brotación de estas yemas se tuvo en cuenta para el

manejo de las plantas *in vitro* durante los subcultivos (Figura 3).

Al respecto, Saxena (1990) señaló que los bajos coeficientes de multiplicación constituyen una de las principales limitantes para la multiplicación *in vitro* de bambúes, lo cual puede estar relacionado con el manejo del explante, los reguladores de crecimiento y el estado físico del medio de cultivo. Muchos artículos científicos hacen referencia a la forma en la que deben ser subcultivados los explantes de bambú, todos coinciden en mantener pequeños grupos de plantas al momento de transferirlas. Dicho método contribuye al incremento de los coeficientes de multiplicación y evita la muerte de las plantas (Saxena, 1990; Prutpongse y Gavinlertvatana, 1992; Ramanayake y Yakandawala, 1997; Ravikumar *et al.*, 1998; Ramanayake *et al.*, 2001). Específicamente para *Guadua angustifolia*, Jiménez *et al.* (2006) obtuvieron incrementos en el coeficiente de multiplicación al dividir las plantas en grupos de tres durante la multiplicación *in vitro*.

Autores como Sood *et al.* (1992) y Ramanayake *et al.* (2001) señalaron la importancia del manejo de las plantas para el incremento del coeficiente de multiplicación, ya que se ha demostrado en la mayoría de especies de bambúes la muerte de las plantas una vez que estas se individualizan en el momento del subcultivo. Yasodha *et al.* (2007) incrementaron el coeficiente de multiplicación, al dividir las plantas de *B. nutans* en grupos de

tres y cuatro en medio de cultivo en estado líquido durante la multiplicación *in vitro* de esta especie. Al igual que Dutta y Borthakur (2009) para *B. balcooa* aumentaron su coeficiente de multiplicación a 4.0 al emplear medio de cultivo líquido.

CONCLUSIONES

Los resultados demostraron que durante la fase de multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris* puede ser empleado el medio de cultivo líquido para la multiplicación de las plantas. También se puede afirmar que hasta el quinto subcultivo de multiplicación se producen incrementos en el coeficiente de multiplicación.

Lograr el incremento en el coeficiente de multiplicación en plantas de *B. vulgaris* var. *vulgaris* a través del estudio de la influencia del estado físico del medio de cultivo y el número de subcultivos, resulta de gran interés ya que, además, permite obtener explantes de óptima calidad, para la posterior fase de enraizamiento *in vitro*. Esto le permite dar solución a unas de las principales problemáticas que afectan la propagación *in vitro* en varias especies de bambúes.

REFERENCIAS

- Arshad, S, Kumar A, Bhatnagar S (2005) Micropropagation of *Bambusa wamin* through proliferation of mature nodal explants. J. Biol. Res. 3: 59-66
- Arya, I, Satsangi R, Arya S (2001) Rapid micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus asper*. J. Sus. For. 14: 103–114
- Bag, N, Chandra S, Palni L, Nandi S (2000) Micropropagation of Dev-ringal [*Thamnocalamus spathiflorus* (Trin.) Munro] – a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. Plant Sci. 156: 125–135
- Cátasus, L (2003) Estudio de los bambúes arborescentes cultivados en Cuba. ACTAF. La Habana
- Christanty, L, Kimmins J, Maily D (1997) Without bamboo, the land dies': a conceptual model of the biogeochemical role of bamboo in an Indonesian agroforestry system. Forest Ecol. Manag. 91: 83–91
- Das, M, Pal A (2005) *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. Plant Cell Tissue Organ Cult 81:109–112
- Dutta, M, Borthakur M (2009) *In vitro* micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through nodal explants from field-grown culms and scope for upscaling. Current Science 96 (7): 962-966
- Eiman, E, Diab E, Syadat E (2008) *In vitro* morphogenesis and plant regeneration of bamboos (*Oxytenanthera abyssinica* A. Rich. Munro). Int. J. Sustain. Crop Prod. 6: 72-79
- George, E, Somerset M, Kingdom U, Hall M, Klerk G (2008) Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Volume 1, pp. 115-283. United Kingdom
- Gielis, J, Oprins J (2002) Micropropagation of temperate and tropical woody bamboos from biotechnological dream to commercial reality. En: Bamboo for sustainable development. Proceedings of the Vth International Bamboo Congress and the VIth International Bamboo Workshop, pp. 333–344. San José, Costa Rica.
- Jiménez, V, Castillo J, Tavares E, Guevara E, Montiel M (2006) *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 86: 389–395
- Lin, C, Lin C, Chang W (2004) Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and overing of bamboo *Bambusa edulis*. Plant Cell Tiss Org Cult 76: 75–82
- Mishraa, Y, Kumar P, Suman Y, Shirina F, Ansar S (2007) A micropropagation system for cloning of *Bambusa tulda* Roxb. Scientia Horticulturæ 115: 315-318
- Nadgauda, R, John C, Parasharami V, Joshi M, Mascarenhas A (1997) A comparison of *in vitro* with *in vivo* flowering in bamboo: *Bambusa arundinacea*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 48:181-188
- Ndiaye, A, Mamadou S, Niang D, Gassama-Dia Y (2006) *In vitro* regeneration of adult trees of *Bambusa vulgaris*. African Journal of Biotechnology 5 (13): 1245-1248
- Prutpongse, P, Gavinlertvatana P (1992) *In vitro* propagation of 54 species from 15 genera of bamboo. Hort. Sci. 27: 453–454
- Rajneesh, A, Hyamal N (2009) *In vitro* shoot cut: a high frequency multiplication and rooting method in the bamboo *Dendrocalamus hamiltonii*. Biotechnology 8 (2): 259-263
- Ramanayake, S, Yakandawala K (1997) Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. Plant Sci. 129: 213–223

- Ramanayake, S, Maddegoda K, Vitharana M, Chaturani G (2008) Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities. *Scientia Horticulturae* 118: 270-273
- Ramanayake, S, Meemaduma, V, Weerawardene T (2006) *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* 'Striata'). *Sci. Hort.* 110: 109–113
- Ramanayake, S, Wanniarachchi W, Tennakoon T (2001) Axillary shoot proliferation and *in vitro* overing in an adult giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37: 667–671
- Ravikumar, R, Ananthakrishnan G, Kathiravan K, Ganapathi A (1998) *In vitro* shoot propagation of *Dendrocalamus strictus* Nees. *Plant Cell Tiss Org Cult* 52: 189–192
- Sandal I, Bhattacharya A, Ahuja P (2001) An efficient liquid culture system for tea shoots proliferation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 65: 75-80
- Sanjaya, T, Ravishankar R (2005) Micropropagation of *Pseudoxynanthera stocksii* Munro. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 333-337
- Saxena, S (1990) *In vitro* propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. *Plant Cell Rep.* 9: 431–434
- Sayanika, W, Sharma G (2009) *In vitro* propagation of *Arundinaria callosa* Munro. An edible bamboo from nodal explants of mature plants. *The Open Plant Science Journal* 3: 35-39
- Shirin, F, Rana P (2007) *In vitro* plantlet regeneration from nodal explants of old-grown culms in *Bambusa glaucescens* Willd. *Plant Biotechnology Reports* 1: 141-147
- Sood, A, Ahuja P, Sharma O, Godbole S (2002) *In vitro* protocols and old performance of elites of an important bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. *Plant Cell Tiss Org Cult* 71: 55–63
- Sood, A, Sharma O, Palni L (1992) Improved methods of propagation of Maggar bamboo (*Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. ex Munro) using single node cuttings taken from juvenile culms of elite seedlings. *J Am Bamboo Soc* 9:17–24
- Yasodha, R, Kamala S, Kumar A, Kumar D, Kalaiarasi K (2007) Effect of glucose on *in vitro* rooting of mature plants of *Bambusa nutans*. *Scientia Horticulturae* 116: 113-116