

Efecto de BAP y ANA en la multiplicación *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl.

Yudith García-Ramírez*, Marisol Freire-Seijo, Blanca 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* Schrad. ex Wendl. es una especie de bambú de gran importancia económica. Desarrollar protocolos de propagación vía organogénesis y embriogénesis somática sería una alternativa eficiente para propagar esta especie ya que se adapta bien a las condiciones edafoclimáticas de Cuba. Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar el efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP (1.0, 3.0 y 6.0 mg.l⁻¹) y ANA (0, 0.5, 1.0 mg.l⁻¹) en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*. Se cuantificó el número de brotes y hojas por explante, así como se midió la altura de las plantas a los veinte días de cultivo. Se demostró que es posible multiplicar *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* en medio de cultivo líquido con BAP. La combinación de BAP y ANA en el medio de cultivo no fue efectiva para este propósito. Este resultado contribuye a la solución de una de las limitantes principales de la aplicación de técnicas biotecnológicas en este cultivo.

Palabras clave: bambú, cultivo de tejidos, reguladores de crecimiento

ABSTRACT

Bambusa vulgaris var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl. is a bamboo species of great economic importance. Developing protocols for propagation via organogenesis and somatic embryogenesis would be an efficient alternative to propagate this species since it adapts well to the soil and climatic conditions of Cuba. The aim of this work was to determine the effect of different concentrations of 6-BAP (1.0, 3.0 and 6.0 mg.l⁻¹) and NAA (0, 0.5, 1.0 mg.l⁻¹) on *B. vulgaris* *in vitro* multiplication. Number of shoots and leaves per explant were quantified. Also, height of plants was measured on the twentieth day of culture. Multiplication of *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* in liquid culture medium with BAP was achieved. Combination of BAP and NAA in the culture medium was not effective for this purpose. The result solves one of the main limitations to use biotechnology techniques in this crop.

Keywords: bamboo, tissue culture, growth regulators

INTRODUCCIÓN

Bambusa vulgaris Schrad. ex Wendl es. una especie multipropósito de rápido crecimiento y proporciona beneficios a los cultivos agrícolas. Se adapta bien a las condiciones edafoclimáticas de Cuba y es empleada en plantaciones y sistemas agroforestales, debido a la protección que le brinda a los suelos y el medio ambiente (Christanty *et al.*, 1997).

La regeneración natural de *B. vulgaris* se ve afectada por el ciclo largo de floración y poca viabilidad de las semillas. Además, la propagación vegetativa, a través de la división de rizomas, se dificulta debido a los bajos porcentajes de enraizamiento y la poca disponibilidad de propágulos (Reddy y Yekanthappa, 1989). Estos métodos constituyen una limitante para la propagación masiva de bambúes (Nadgauda *et al.*, 1990; Mukunthakumar *et al.*, 1999; Koshy y Gopakumar, 2005).

Debido al potencial que posee *B. vulgaris*, las técnicas de cultivo de tejidos constituyen una herramienta fundamental para la propagación masiva. La organogénesis y la embriogénesis somática son las técnicas más empleadas para la propagación *in vitro* de diferentes especies de bambúes (Sood *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2004). Aunque se han llevado a cabo varios protocolos de propagación *in vitro* de bambúes, la contaminación interna de los explantes, los bajos coeficientes de multiplicación y de enraizamiento, además de la baja supervivencia *ex vitro* constituyen las principales limitantes para la propagación masiva de varias especies de bambúes.

El uso de 6-bencilaminopurina (BAP), ya sea sola o en combinación con kinetina, o con ácido a-naftalenacético (ANA) en el medio de cultivo ha dado lugar a mayor tasa de multiplicación de brotes en especies de bambú (Bag *et al.*,

2000; Bag *et al.*, 2001; Arshad *et al.*, 2005; Kapoor y Rao, 2006; Ramanayake *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2006).

Por todo lo antes planteado la presente investigación se desarrolló con el objetivo de determinar el efecto de las combinaciones de diferentes concentraciones de BAP y ANA en multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron explantes establecidos *in vitro* de *B. vulgaris* según lo informado por García-Ramírez *et al.* (2007) para *Bambusa vulgaris* var *Vittata* con 20 días de cultivo (Figura 1).

El medio de cultivo estuvo compuesto por sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962), mio-inositol (100 mg.l^{-1}) y sacarosa (30 g.l^{-1}). Se conformaron tratamientos a los que se adicionaron tres concentraciones de BAP (1.0 , 3.0 y 6.0 mg.l^{-1}) y dos concentraciones de ANA (0.5 y 1.0 mg.l^{-1}). Se utilizó, además, un tratamiento control con las concentraciones de BAP sin la presencia de ANA.

El pH del medio de cultivo fue ajustado a 6.0 ± 1 con el uso de HCl y/o KOH, previo a la esterilización. Los frascos de cultivo empleados en cada tratamiento fueron Erlenmeyer (250 ml de volumen). A cada uno se le adicionaron 50 ml de medio de cultivo y en cada frasco se colocaron cinco explantes.

Para el desarrollo de las plantas, los frascos de cultivo se colocaron en cámaras de crecimiento con luz solar, el flujo de fotones fotosintéticos osciló entre 38.0 - $45.7 \mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y la temperatura fue de $26 \pm 2.0^\circ\text{C}$.

A los 20 días de cultivo se cuantificó el número de brotes por planta, además se midió la altura de la

planta principal (cm) desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja y el número de hojas expandidas por cada planta.

Los valores obtenidos fueron analizados mediante una prueba de Kruskal Wallis, previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó que solamente el BAP influyó en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*. La emisión de nuevos brotes por planta se hizo visible a partir de la segunda semana de cultivo. A la tercera semana las nuevas plantas incrementaron su altura y expandieron sus nuevas hojas.

A los 20 días de cultivo se observó que el número de brotes por planta se incrementó significativamente a medida que fue mayor la concentración de BAP en el medio de cultivo sin la presencia del ANA (Figura 2). Los mayores valores en cuanto al número de brotes por planta se alcanzaron cuando se emplearon 3.0 y 6.0 mg.l^{-1} de BAP, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 1).

Estos resultados no difieren de los obtenidos por Saxena y Bhojwani (1993) quienes alcanzaron un incremento en la formación de brotes por planta al emplear 6.0 mg.l^{-1} de BAP durante la multiplicación *in vitro* de *Dendrocalamus longispathus*.

Autores como Arya *et al.* (1999) para *D. asper*, Kapoor y Rao (2006) para *B. bambos*, Ramanayake *et al.* (2006) para *B. vulgaris* y Jiménez *et al.* (2006) para *G. angustifolia*, destacan el papel fundamental que juega el BAP en la proliferación de plantas durante la multiplicación *in vitro*.



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

En cuanto a la altura de los explantes se pudo apreciar que se favoreció en la medida que se fueron incrementando las concentraciones de BAP y ANA en el medio de cultivo, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Esta combinación favoreció el crecimiento de los explantes pero no el número de brotes por planta. No obstante, en algunos casos es necesaria la adición de auxinas para garantizar un balance interno en los tejidos que promueven el crecimiento y diferenciación de los brotes, así como estimule el incremento de las tasas de multiplicación. El número de hojas se favoreció cuando se incrementó la concentración de BAP a 3.0 mg.l⁻¹ con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 1).

Las combinaciones de BAP y ANA se han utilizado para inducir la formación de brotes en numerosas especies (Huang y Huang, 1995). Estas han

demostrado ser efectivas para la formación de brotes por planta (Pérez *et al.*, 1999).

En otras especies de bambúes las combinaciones de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento han tenido un efecto positivo en el incremento del número de brotes y altura por planta durante la multiplicación *in vitro* (Das y Pal, 2005; Arshad *et al.*, 2005; Sanjaya *et al.*, 2005).

Sin embargo, en *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* no tuvieron un efecto positivo las combinaciones de BAP y ANA durante esta etapa. Solo el BAP influyó en el incremento de número de brotes por planta, esto pudiera estar dado ya que los requerimientos en cuanto a tipo y concentraciones de reguladores del crecimiento varían en función de la especie (Marulanda *et al.*, 2002).



Figura 2. Plantas *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* a los 20 días de cultivo al emplear 3.0 y 6.0 mg.l⁻¹ de BAP.

Tabla 1. Efecto del BAP y ANA en la multiplicación *in vitro* de *Bambusa vulgaris*.

Reguladores de crecimiento (mg.l ⁻¹)		Número de brotes/ planta	Número de hojas/ planta	Altura de la planta (cm)
BAP	ANA			
1.0	0	0.86 b	2.10 bc	7.10 c
3.0	0	1.62 a	2.48 b	7.16 c
6.0	0	1.86 a	2.80 a	6.62 c
1.0	0.5	0.43 c	1.99 c	7.14 bc
3.0	0.5	0.38 c	1.97 c	8.04 ab
6.0	0.5	0.29 c	1.94 c	7.61 ab
1.0	1.0	0.33 c	0.90 d	7.99 ab
3.0	1.0	0.47 c	0.98 d	8.38 a
6.0	1.0	0.48 c	2.25 b	7.92 ab

Medias con letras diferentes dentro de una misma columna, difieren ($p < 0.05$) según Kruskal Wallis

CONCLUSIONES

Se demostró que es posible multiplicar *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* en medio de cultivo líquido con BAP. La combinación de BAP y ANA en el medio de cultivo no fue efectiva para este propósito. Este resultado contribuye a la solución de una de las limitantes principales de la aplicación de técnicas biotecnológicas en este cultivo.

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, S, Sharma S, Kaur R, Arya I (1999) Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. *Plant Cell Rep* 18: 879-882
- Bag, N, Chandra S, Palni L, Nandi S (2000) Micropropagation of Devringal *Thamnocalamus spathiflorus* (Trin.) Munro a temperate bamboo and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. *Plant Sci.* 156: 125-135
- Bag, N (2001) Mass propagation of tea, maggar bamboo and dev ringal. Ph.D Thesis, FfNB Garhwal University.
- Christanty, L, Kimmins J, Mailly 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
- Huang L, Huang B (1995) Loss of species distinguishing trait among regenerated *Bambusa ventricosa* McClure plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 42:109-111
- Jiménez, V, Castillo J, Tavares E, Guevara E, Montiel M (2006). *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86: 389-395
- Kapoor, P, y Rao I (2006) *In vitro* rhizome induction and plantlet formation from multiple shoots in *Bambusa bambos* var. *gigantea*. Bennet and Gaur by using growth regulators and sucrose. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 85: 211-217
- Koshy, K, Gopakumar B (2005) An improvised vegetative propagation technique for self-incompatible bamboos. *Curr Sci.* 89: 1474-1476
- Lin, C, Lin C, Chang W (2004) Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 76: 75-82
- Marulanda, M, Carvajalino M, Vargas C, Londoño X (2002) La biotecnología aplicada al estudio y aprovechamiento de la *Guadua*. In Seminario-Taller. Avances en la Investigación sobre *Guadua*, Pereira, Colombia 1-5
- Mukunthakumar, S, Mathur J, Nair P, Mathur S (1999) Micropropagation of *Dendrocalamus brandisii* Kurz. Using *in vitro* nodal explants. *Indian Forester* 12:1239-1243
- Nadgauda, R, Parassharami V, Mascarenhas A (1990) Precocious flowering and seedling behaviour in tissue cultured bamboos. *Nature* 344:335-336
- Pérez, M, Balch E, Ramírez M, Núñez P, Ochoa A (1999) Organogénesis. En introducción al cultivo de tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguas Calientes. México 71: 125-129
- Ramanayake, S, Meemaduma V y 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
- Reddy, Y, Yekanthappa A (1989) Propagation technique of *Oxytenanthera stocksii*. *Myforest* 25:30-32
- Sanjaya, T, Ravishankar R (2005) Micropropagation of *Pseudoxynanthera stocksii* Munro. *In vitro Cell. Dev. Biol.Plant* 41: 333-337
- Saxena, S, Bhojwani S (1993) *In vitro* clonal multiplication of 4-year-old plants of the bamboo, *Dendrocalamus longispathus* Kurz. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 29: 135-142
- Sood, A, Ahuja P, Sharma O, Godbole S (2002) *In vitro* protocols and field performance of elites of an important bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. *Plant Cell Tiss Org Cult* 71: 55-63