

Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var *Vittata*

Yudith García-Ramírez¹, Marisol Freire-Seijo¹, Lillien Fajardo², Marisol Tejeda¹, Maritza Reyes¹ *Autor para correspondencia

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: yudith@ibp.co.cu

²Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal y Medio Ambiente. Universidad de Granma. e. mail: lillien@udg.co.cu

RESUMEN

La micropropagación constituye una alternativa viable para la propagación del bambú, por el potencial que este tipo de planta posee para la construcción, desarrollo de artesanías y protección de suelos. Esta técnica es una alternativa para la propagación eficiente de plantas con alto valor genético y calidad. La presente investigación se desarrolló con el objetivo de lograr el establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *Vittata* a partir de yemas axilares. Para la desinfección de las yemas axilares se emplearon tres concentraciones de Hipoclorito de Sodio (1.0, 2.0 y 3.0 %) y tres tiempos de desinfección (10, 15, 20 minutos). Los mayores porcentajes de yemas establecidas se obtuvieron al emplear Hipoclorito de sodio al 2.0% durante 20 minutos para la desinfección de las yemas. Entre el 86% y el 100% de las yemas brotaron y se obtuvo un 93.7 % de explantes libres de contaminantes microbianos visibles a partir de yemas axilares introducidas en condiciones *in vitro*.

Palabras clave: bambú, desinfección, hipoclorito de sodio

ABSTRACT

Micropropagation is a viable alternative for bamboo propagation due to the potentialities this type of plant has for building, handicrafts confection and soil protection. The technique is an efficient alternative to plants propagation with a high genetic value and quality. The current research was developed focused on the *in vitro* establishing of axillary buds of *Bambusa vulgaris* var. *Vittata*. Three concentrations of sodium hypochlorite (1.0, 2.0 and 3.0%) and three different times (10, 15, 20 minutes) were used for disinfection of axillary buds. The highest rates of established buds were achieved using sodium hypochlorite to 2.0% during 20 minutes for disinfection. Between 86% and 100% buds sprouted, and a 93.7% of explants free of visible microbial contaminants were obtained from axillary buds introduced to *in vitro* conditions.

Keywords: bamboo, disinfection, sodium hypochlorite

INTRODUCCIÓN

El bambú es un recurso natural que ha sido aprovechado por el hombre durante milenios por su rápido crecimiento, gran versatilidad y resistencia. Posee un gran valor ornamental y puede ser usado bajo diferentes aspectos como consolidación del suelo, reforestación, reducción del CO₂, en la fabricación de mobiliario artesanal e industrial, extracción de celulosa, presenta un valor alimenticio a partir del follaje y presenta propiedades medicinales (Barbaro, 1997).

En Cuba, la distribución del Bambú se extiende en todo el territorio nacional mostrando gran adaptabilidad y potencial productivo en las provincias más orientales. Los cultivares de bambú más adaptados son *Dendrocalamus asper*, *Guadua angustifolia* Kuth, *Gigantochloa verticillata* entre otras, pero *Bambusa vulgaris* se conoce como la más adaptada y abundante en el territorio, especialmente en áreas con fuentes permanentes o

temporales de agua. Esta es una especie eficaz en la protección de las aguas, cuando se utiliza como faja forestal hidrorreguladora y en forma de plantones (Anónimo, 2007).

La propagación convencional de bambú se hace por medio de semillas, secciones de culmos o de rizomas. En general, esta forma de propagación tiene varias desventajas entre las cuales se pueden citar una floración impredecible o muy espaciada en el tiempo, así como el alto costo (por mano de obra, espacio y transporte) y la baja eficiencia (número limitado de propágulos y baja tasa de multiplicación) (Gielis *et al.*, 2001). La micropropagación constituye una alternativa viable para la propagación del bambú. La embriogénesis somática y la organogénesis a partir de yemas axilares han sido utilizados en la multiplicación *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *Vittata*. Gielis *et al.* (1995) expresan la importancia del desarrollo de protocolos para la micropropagación de especies de bambú tales como: *Dendrocalamus strictus*, *Dendrocalamus asper* y *Bambusa*

laucescens, con el fin de aprovechar el potencial que estos tipos de plantas poseen. La mayoría de los protocolos conocidos son en especies asiáticas (Saxena, 1990; Prutpongse y Gavinlertvana, 1992; Chang y Hung-Lan, 1995; Saxena y Dhawan, 1999). Son pocos los trabajos que hacen alusión a la multiplicación *in vitro* de las especies americanas (Manzur, 1986; Ramanayake *et al.*, 2001).

La presente investigación se realizó con el objetivo de establecer *in vitro* yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var. *Vittata* como primer paso para desarrollar un protocolo para la propagación *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fase preparativa o Fase 0

Para el establecimiento del banco de plantas donantes rejuvenecidas se colectó material vegetal de plántulas de *Bambusa vulgaris* var. *Vittata*, ubicados en la región oriental de Cuba.

Se estableció un banco de plantas donantes en las casas de cultivo del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Se realizó una fertilización diaria de fórmula completa empleando el fertilizante comercial Bayfolan® Forte (25 ml.l⁻¹). Con un régimen de riego de 81 segundos, cada cinco minutos.

El plan de manejo fitosanitario consistió en la aplicación combinada de fungicidas sistémicos y de contacto distribuidos de la siguiente manera:

1. Silvacurt
2. Mancosef + Cupraflow

La formulación de los productos químicos utilizados se relaciona más ampliamente en la tabla 1.

La aplicación de cada uno de las combinaciones de fungicidas se realizó cada tres días y fue repetido cada quince días.

Fase de establecimiento o fase 1

Influencia de la concentración del Hipoclorito de Sodio

Con objetivo de establecer *in vitro* yemas axilares se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de Hipoclorito de Sodio (NaClO) en su desinfección.

Se emplearon yemas axilares rejuvenecidas de plantas de *Bambusa vulgaris* var. *Vittata*. Para cortar las yemas se empleó una tijera de poda. Se cortó a ambos lados de la yema 1.5cm del tallo. Solamente se tomaron aquellas yemas axilares que estaban bien diferenciadas y se colocaron en un frasco con agua para ser llevadas al laboratorio.

Posteriormente, las yemas fueron lavadas con agua corriente por tres horas, seguidamente, se sumergieron en etanol (70.0%) durante tres minutos. Luego de enjuagarlas tres veces con agua destilada estéril estas fueron colocados en una solución de NaClO a diferentes concentraciones (1.0, 2.0 y 3.0%) durante 20 min, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Al concluir la desinfección se eliminaron los extremos dañados de cada sección de tallo que contenía la yema axilar. Cada explante (yema axilar) se colocó individualmente en tubos de ensayo (20 x 1.5 cm) que contenían 5ml de medio de cultivo compuesto por las sales y vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (1962), con 0.2 mg.l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP), 100 mg.l⁻¹ de mio-inositol, 30 g.l⁻¹ de sacarosa, se empleó como gelificante Gelrite® (SIGMA), en concentración de 2.5 g.l⁻¹.

El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5.7±1 con el uso de HCl y KOH, previo a la esterilización. Se colocaron cinco semillas por frasco de cultivo y cada uno contenía 5ml de medio de cultivo.

Los frascos de cultivo fueron colocados en cámaras de crecimiento de luz solar donde la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) osciló entre 48.0-62.5 μmol.m⁻² s⁻¹ y una temperatura de 27± 2° C.

A los ocho días se realizaron las evaluaciones para determinar la influencia de la concentración del NaClO en los siguientes aspectos:

- Número de yemas libres de contaminantes microbianos (Porcentaje de explantes sin contaminación fúngica y bacteriana visible).
- Número de yemas brotadas (Porcentaje de brotación de las yemas).

Tabla 1. Productos químicos utilizados en el plan de manejo fitosanitario de plántulas de *Bambusa vulgaris* var. *Vittata*

Producto	Concentraciones
Silvacurt	2.0cc. l ⁻¹
Mancosef	4.0g. l ⁻¹
Cupraflow	2.0cc. l ⁻¹

Todo el proceso estadístico fue realizado a través del paquete estadístico computacional Statgraphics 4.1. Se realizaron pruebas de análisis de varianza de clasificación simple, previa comprobación de los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad y las tablas de contingencias (crosstab) con sus respectivos parámetros para las variables de niveles de medición discretos (LSD), comparación de proporciones y prueba de hipótesis.

Influencia del tiempo de desinfección

El objetivo en este experimento fue determinar la influencia en el establecimiento del tiempo de inmersión de los explantes en NaClO.

La selección de yemas y la desinfección, se realizó tal como se describió en el experimento anterior con la concentración de mejores resultados. Se aplicaron tres tiempos de inmersión (10, 15, 20 minutos), posteriormente se enjuagaron tres veces las yemas con agua destilada estéril.

Las evaluaciones y el procesamiento estadísticos fueron realizadas tal como se describió en el experimento anterior.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia de la concentración del Hipoclorito de Sodio

La brotación de las yemas axilares se inició a los cinco días de cultivo. Los resultados de este experimento indicaron que el mayor porcentaje de brotación se alcanzó en el tratamiento donde se empleó NaClO al 1.0% (88.0%) con diferencias estadísticas respecto al resto de los tratamientos. El mayor porcentaje de yemas libres de microorganismos contaminantes visibles (93.7%) se obtuvo en el tratamiento donde se empleó hipoclorito de sodio al 3.0% con diferencias significativas con el resto (Tabla 2).

Este comportamiento pudo estar dado por la utilización de una menor concentración de NaClO, que provocó menor daño de los tejidos de los

explantes durante la desinfección, ya que mayores concentraciones de NaClO, pudieron haber tenido un efecto tóxico.

El hipoclorito de sodio es uno de los desinfectantes más comúnmente utilizados en la desinfección superficial de los tejidos vegetales, y resulta importante determinar la concentración con la cual se garantiza el control de los microorganismos contaminantes y la supervivencia de los tejidos del explante (Castillo *et al.*, 1997).

Influencia del tiempo de desinfección

En cuanto al tiempo de inmersión del material vegetal en la solución de hipoclorito de sodio se observó una disminución de la brotación de yemas en la misma medida que se aumentó el tiempo de desinfección. El mayor porcentaje de brotación de las yemas axilares se alcanzó con la disminución del tiempo de desinfección a diez minutos con un 100% de yemas brotadas, sin diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos. La brotación de las yemas se inició entre los 10 y 20 días de cultivo, en cada explante las yemas se encuentran en óptimas condiciones fisiológicas, para alcanzar la brotación *in vitro* como se muestra en las figuras 1 y 2.

El mayor porcentaje de explantes libres de contaminantes se obtuvo con el tratamiento donde se emplearon 20 minutos de tiempo de desinfección (88.0%) con diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos donde se emplearon 10 y 15 minutos de tiempo de desinfección (Tabla 3).

Los resultados coinciden con los descritos por Nidiye *et al.* (2006) quienes obtuvieron entre un 80–100% de yemas brotadas en diferentes medios de cultivo para *Bambusa vulgaris*. Marulanda *et al.* (2005) para la especie de *Guadua angustifolia* Kuth informaron resultados al emplear HgCl₂ al 0.3% y obtuvieron un 74.0% de yemas brotadas para 10 minutos de tiempo de desinfección y un 52.0% de yemas brotadas para 5 minutos. Además, al emplear NaClO a una concentración del 2.0% alcanzaron un 12.9% y un 11.0% de yemas brotadas.

Tabla 2. Influencia de la concentración del hipoclorito de sodio en el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var *Vittata*

Concentración de Hipoclorito de Sodio (%)	Yemas libres de contaminantes microbianos (%)	Yemas Brotadas (%)
1.0	60.0 b	88.0 a
2.0	80.0 b	80.0 a
3.0	93.7 a	46.6 b

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



Figura 1. Explantes de *Bambusa vulgaris* var Vittata a los 10 días de cultivo

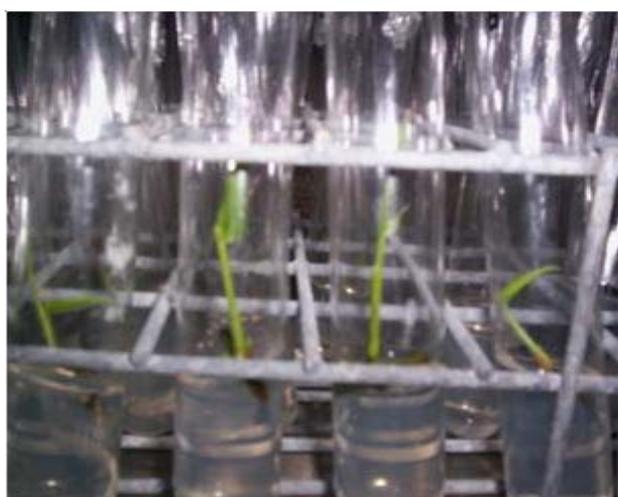


Figura 2. Explantes de *Bambusa vulgaris* var Vittata a los 15 días de cultivo

Tabla 3. Efecto de diferentes tiempos de desinfección con hipoclorito de sodio (2.0%) en el establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var Vittata

Tiempo de inmersión en Hipoclorito de Sodio (min)	Yemas libres de contaminantes microbianos (%)	Yemas Brotadas (%)
10	58.4 b	100 a
15	75.0 ab	86.6 a
20	88.0 a	80.0 a

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

Resultados similares fueron obtenidos por Andrade (1998), quien utilizó como desinfectante NaClO a una concentración de 1.0% durante 10 minutos para la desinfección de yemas axilares de *Guadua angustifolia* Kunth.

En otras especies de bambúes como: *Dendrocalamus strictus*, *Bambusa arundinacea*, *Dendrocalamus asier*, *Phyllostachys edulis*, *Dendrocalamus giganteus* y *Bambusa polymorfa*,

para la desinfección se han obtenido los mejores resultados al emplear hipoclorito de sodio 0.1% durante 5 min, combinándose con inmersión en Bicloruro de mercurio (0.1%), durante 5 min (ICFRE, 2002).

En diferentes especies de bambú se han informado altos porcentajes de establecimiento. Por ejemplo, Ravikumar y Ananthakrishnan (1998) obtuvieron entre un 85-90% de brotes a partir de yemas axilares de

plantas adultas de *Dendrocalamus strictus*. Por su parte, Ramanayake *et al.* (2001) alcanzaron un 77.5% de plantas *in vitro* a partir de yemas axilares de *Dendrocalamus giganteus*.

Nadgaudar *et al.* (1997) obtuvieron un 70% de plantas a partir de yemas axilares de *Bambusa arundinacea* y Das y Pal (2000) obtuvieron una rápida propagación *in vitro* para la especie de *Bambusa vulgaris* empleando medios de cultivo líquido para las diferentes fases.

De igual forma, Arya (2002) obtuvo múltiples brotes de *Dendrocalamus asper* a partir de yemas axilares y Malay y Amita (2005) describieron la formación de brotes múltiples con el empleo de medio de cultivo líquido a partir de yemas axilares de *Bambusa balcooa*.

CONCLUSIONES

Fue posible establecer *in vitro* yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var. *Vittata* con altos porcentajes de yemas establecidas (86.6-100%) al emplear hipoclorito de sodio al 2.0% durante 20 minutos para la desinfección.

REFERENCIAS

- Das, M, A Pal (2005) *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb: Factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. [En línea] En: <http://www.springerlink.com/>. Consulta: 5 de mayo de 2006
- Anónimo (2007) [En línea] En: <http://cubaalamano.net/sitio/client/article.php>. Consulta: 20 de enero de 2006
- Arya, S (2002) Rapid Micropropagation of Edible Bamboo *Dendrocalamus asper*. [En línea] En: <http://www.haworthpress.com/store>. Consulta: 10 de enero de 2006
- Andrade (1998) Investigaciones sobre *Guadua angustifolia* kunth realizadas en Colombia. [En línea] En: <http://www.humboldt.org.co/obio/obioBiocomercio/documentos/>. Consulta: 15 de mayo de 2006
- Barbaro, M (1997) La biónica del bambú <http://www.green-box-design.com/bambu-1.pdf> Consulta: 2 de marzo de 2006
- Castillo, B, Smith DL Madhavi (1997) Interactions of Irradiance level and iron chelate source during shoot tip culture of *Carica papaya* L. HortScience 32 (6): 1120-1123
- Chang, W, T Hung-Lan (1995) Somatic embryogenesis and plant regeneration from roots of bamboo (*Bambusa beecheyana* Munro var *beecheyana*) En: JT Williams, IV Ramanuja Rao, AN Rao (Eds.) Genetic enhancement of bamboo, pp. 115-142. INBAR, New Delhi
- Gielis, J, Everaert I, Goetghbeurand P, Deloose M (1995) Bamboo and Molecular Markers. Proceedings of the 5th International Bamboo Congress. Vol. 2 Biodiversity and Genetic Conservation. Indonesia
- Gielis, J, Peeters H, Gillis K, Oprins J, Debergh PC (2001) Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. Acta Hort. 552:195-203
- ICFRE (2002) Mass Propagation Protocol For Bamboos. Institute of Forest Genetics and Tree Breeding. Indian Council of Forestry Research and Education.12pp.
- Manzur, D (1986) Cultivo de Embriones de *Guadua angustifolia* Kunt *in vitro*. Revista de la Universidad de Caldas 7: 26-33
- Malay, D, Amita P (2005) *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: Factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. [En línea] En: <http://www.ingentaconnect.com/content/klu/ticu>. Consulta: 2 de mayo de 2006
- Marulanda, M, Gutiérrez LG, Márquez M (2005) Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunt. Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal, 27 (82) [En línea] En: <http://matematicas.udea.edu.co/~actubiol/Vol27-82Resumen.htm> [Consulta: 10 diciembre 2005]
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiol Plant, 15: 473 - 497
- Nadgauda, R, John C, Joshi M, Parasharami V, Mascarenhas A (1997) A comparison of *in vitro* with *in vivo* flowering in bamboo: *Bambusa arundinacea*. Plant, Cell, Tissue Organ. Cult. 48: 181-188
- Ndiaye, A, Dame N, Yaye K (2006) *In vitro* regeneration of adult trees of *Bambusa vulgaris*. [En línea] En: <http://www.bioline.org.br/request>. Consulta: 2 de abril de 2006
- Prutpongse, P, Gavinlertvatana P (1992) *In vitro* micropropagation of 54 species from 15 genera of bamboos. HortScience, 27: 453 - 454
- Ramanayake, SM, Wanniarachchi WA, Tennakoon TM (2001) Axillary shoot proliferation and *in vitro* flowering in an adult giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 37: 667 - 671
- Ravikumar, R, G Ananthkrishnan (1998) Viability of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) seeds under four different storage conditions. Seed Research New Delhi 26(1): 43-46. Dep. Biotechnol., Sch. Life Sci., Bharathidasan Univ., Tiruchirappalli-620 024, Tamilnadu, India
- Saxena, S (1990) *In vitro* propagation of bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. Plant Cell Rep. 9:431-434
- Saxena, S, V, Dhawan (1999) Regeneration and large scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 18:438-443