Revista Semilla del Este

Vol. 3 (2) abril – septiembre 2023, pp. 145-158, ISSN-L 2710-7469

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE MULTIPLICACIÓN DE BAMBÚ *GUADUA ANGUSTIFOLIA* USANDO BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL BITS, CON FINES DE REFORESTACIÓN

DEVELOPMENT OF A BAMBU *GUADUA ANGUSTIFOLIA* MULTIPLICATION PROTOCOL USING TEMPORARY IMMERSION BIOREACTORS TIBS, FOR REFORESTATION PURPOSES

Heidi M. Hernández I[1]; Ismael Núñez C[2]; Luz E. Juárez[3]; Prudencia E. Guevara[4]; Angela M. Fuentes[5]; Silvia Lopez[6]; Yumelis A. Saavedra[7]; Iroel Rodriguez D.[8]; Abby S. Guerra M.[9]

[1]Compañía Azucarera La Estrella S. A. (CALESA). Gerencia de Operaciones Agrícolas. Departamento de Agronomía, Sección de Biotecnología. Panamá. heidi.hernandez@grupocalesa.com.

[2]Compañía Azucarera La Estrella S. A. (CALESA). Gerencia de Operaciones Agrícolas. Departamento de Agronomía, Sección de Biotecnología. Panamá. ismael.nez@yahoo.com

[3]Compañía Azucarera La Estrella S. A. (CALESA). Gerencia de Operaciones Agrícolas. Departamento de Agronomía, Sección de Biotecnología. Panamá. luzejuarez01@gmail.com

[4]Compañía Azucarera La Estrella S. A. (CALESA). Gerencia de Operaciones Agrícolas. Departamento de Agronomía, Sección de Biotecnología. Panamá. prudencia.guevara@grupocalesa.com

[5]Compañía Azucarera La Estrella S. A. (CALESA). Gerencia de Operaciones Agrícolas. Departamento de Agronomía, Sección de Biotecnología. Panamá. angela.fuentes@grupocalesa.com

[6]Compañía Azucarera La Estrella S. A. (CALESA). Gerencia de Operaciones Agrícolas. Departamento de Agronomía, Sección de Biotecnología. Panamá. silvia.lopez@grupocalesa.com.

[7]Compañía Azucarera La Estrella S. A. (CALESA). Gerencia de Operaciones Agrícolas. Departamento de Agronomía, Sección de Biotecnología. Panamá. yumelis.saavedra@grupocalesa.com

[8]Compañía Azucarera La Estrella S. A. (CALESA). Gerencia de Operaciones Agrícolas. Departamento de Agronomía, Sección de Biotecnología. Panamá. iroel.rodriguez@grupocalesa.com

[9]Compañía Azucarera La Estrella S. A. (CALESA). Gerencia de Operaciones Agrícolas. Departamento de Agronomía, Sección de Biotecnología. Panamá. abby.guerra@grupocalesa.com https://orcid.org/0000-0001-8854-5926

Recepción: 6 de febrero de 2022 **Aprobación: 13 de abril de 2023**

RESUMEN

El Bambú *Guadua angustifolia* posee gran importancia económica y ambiental, pero sus métodos tradicionales de propagación son ineficientes. El objetivo del estudio fue desarrollar un eficiente protocolo de micropropagación para *Guadua*, utilizando Biorreactores de Inmersión Temporal BITs. Para el establecimiento se utilizaron segmentos nodales desinfectados y medio Murashige & Skoog MS + 2 mg L^{-1} de bencilaminopurina BAP. Para la micropropagación se ensayaron 5 dosis de BAP 2, 3, 4, 5 y 6 mg L^{-1}. En fase de multiplicación en BITS se utilizó MS con 3 dosis de BAP 3, 4, 5 mg L^{-1} y frecuencias de inmersión cada 3, 6 y 8 horas. Para enraizamiento en BITs se utilizó MS + 2.5 mg L^{-1} de sulfato de adenina. Los resultados mostraron que usando 2 mg L^{-1} de BAP, se obtuvo un brote por explante, mientras que con 3, 4, 5 y 6 mg L^{-1} de BAP se obtuvieron 2 brotes. En multiplicación BIT se obtuvieron 3.5, 7.5 y 10.4 brotes por explante con dosis de 3, 4 y 5 mg L^{-1} de BAP, respectivamente. Usando frecuencias de inmersión cada 3, 6 y 8 horas, se obtuvieron 7.5, 8.7 y 13.6 brotes por plantas, respectivamente. El número de raíces fue de 11.3, 4.0 y 4.3 con frecuencias de inmersiones de 3, 6 y 8 horas. Los mejores resultados en BITs se obtuvieron usando 3 mg L^{-1} de BAP y frecuencia de inmersión cada 3 horas. Los resultados muestran avances significativos en micropropagación de bambú y aplicable a otras especies.

Palabras clave: Bambú, BAP, biorreactor de inmersión temporal, Guadua, micropropagación.

ABSTRACT

The Bamboo *Guadua angustifolia* has great economic and environmental importance, but its traditional methods of propagation are inefficient. The objective of the study was to develop an efficient micropropagation protocol for *Guadua*, using Temporary Immersion Bioreactors BITs. For the establishment, disinfected nodal segments and Murashige & Skoog MS medium + 2 mg L^{-1} of benzylaminopurine BAP were used. For micropropagation, 5 doses of BAP 2, 3, 4, 5 and 6 mg L^{-1} were tested. In the multiplication phase in BITs, MS was used with 3 doses of BAP 3, 4, 5 mg L^{-1} and immersion frequencies every 3, 6 and 8 hours. For rooting in BITs, MS + 2.5 mg L^{-1} of adenine sulfate was used. The results showed that using 2 mg L^{-1} of BAP, one shoot per explant was obtained, while with 3, 4, 5 and 6 mg L^{-1} of BAP, 2 shoots were obtained. In BIT multiplication, 3.5, 7.5 and 10.4 shoots per explant were

obtained with doses of 3, 4 and 5 mg L^{-1} of BAP, respectively. Using immersion frequencies every 3, 6, and 8 hours, 7.5, 8.7, and 13.6 shoots per plant were obtained, respectively. The number of roots was 11.3, 4.0 and 4.3 with immersion frequencies of 3, 6 and 8 hours. The best results in BITs were obtained using 3 mg L^{-1} of BAP and immersion frequency every 3 hours The results show significant advances in bamboo micropropagation and applicable to other species.
Keywords: Bamboo, BAP, Temporary Immersion Bioreactors, Guadua, micropropagation.

INTRODUCCIÓN

El género *Guadua* es un bambú americano y reúne más de 30 especies, de los cuales el *Guadua angustifolia* es la especie de bambúes más grande y económicamente importante de América Tropical (Judziewics et al., 1999).

En Panamá, se encuentra de forma natural en la provincia de Chiriquí, pero se encuentra bastante deterioradas debido a mal manejo, desconocimiento de su uso, alcance e importancia. http://www.panamaagro.com/noticias/actualidad/2047-el-cultivo-de-bambu-frente-a-los-efectos-negativos-del-cambio-climatico-y-de-sus-perspectivas-en-el-pais.html.

La especie Guadua brinda múltiples beneficios, económicos, ambientales y culturales. Es utilizado para la elaboración de artesanías, construcciones. En aspecto medio ambiental, provee una gran fuente de biomasa, lo que contribuye a la mejora de la textura y estructura del suelo, mejorando los niveles de erosión y anclaje (Giraldo et al., 2007).

La Propagación de *G. angustifolia* se realiza de manera asexual, puesto que la formación de semilla para la propagación sexual es escasa e irregular, por lo tanto, este no es un método regularmente utilizado, además las semillas tienen un periodo de viabilidad o capacidad de germinación muy corto (Luis F. Botero C. 2001). Por lo anterior, este método de reproducción no es económicamente viable para la *G. angustifolia.* De manera asexual el bambú puede ser propagado a partir de diversas partes de la planta. Los métodos más usados y con mayor éxito son la siembra de rizomas o raíces, de secciones de tallo y el cultivo de “chusquines” o brotes pequeños del rizoma (Luis F. Botero C. 2001). Lo anterior limita su propagación a gran escala por lo que se han realizado diversos estudios sobre metodologías de micropropagación con muy buenos resultados. Algunas especies de bambú han sido propagadas por Sistemas de

Inmersión Temporal (TIS, igual que BITs), como *Dendrocalamus latiflorus* (Mongkolsook *et al.*, 2005), *Bambusa ventricosa y Dracaena deremensis* (Chaille *et al.*, 2011), *Bambusa vulgaris* (García Ramírez *et al.*, 2014) y *Guadua Angustifolia* Kunt (Holst, 2010, Gonzaga *et al*., 2016).

El objetivo de este estudio fue desarrollar un protocolo viable y económico para la micropropagación de Guadua, utilizando Biorreactores de Inmersión Temporal BITs, como alternativa a la producción masiva de plantas.

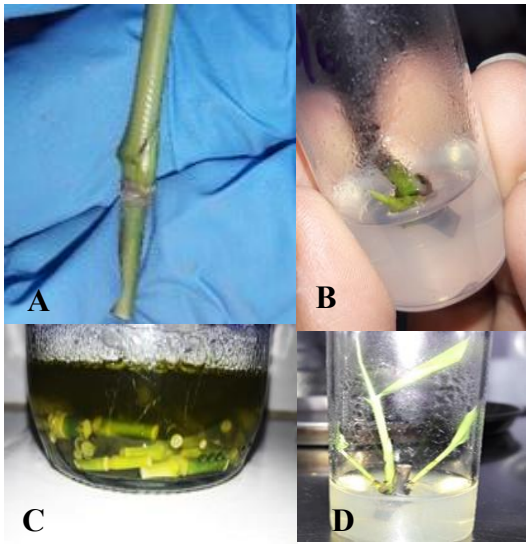
MATERIALES Y MÉTODOS

Para el establecimiento in vitro de *G. angustifolia*, se seleccionaron segmentos nodales, según Muthukumaran. *et al*., 2018, de rodales cercanos a CALESA con características de *Guadua angustifolia* (Figura 1), los cual fueron identificadas previamente (Rodolfo Flores, 2020). La desinfección consistió en una exposición previa con 0.5% de hipoclorito de sodio por1 h, detergente 5g en 250 ml por 5 min, 3% hipoclorio de sodio + 2 gotas tween 20 por 10 min, luego 48 h en Benomil 5g L^{-1} + Phyton 5 ml + 3 lavados con agua destilada y estéril. El medio de cultivo utilizado para la fase de establecimiento fue Murashige y Skoog (1962) o MS, + 2 mg L^{-1} de BAP, con pH ajustado a 5.70, sacarosa 30 g L^{-1}, gelificado con agar (7 g L^{-1}) e incubados a 25°C con luz constante (1800 luxes). Los implantes en esta etapa fueron observados y se evaluó la presencia de hongos y bacterias a los 8, 15 y 22 días después de incubados. Para seleccionar el mejor explante, se seleccionaron explantes de la parte basal, intermedia y final del tallo y se evaluó su respuesta de brotación y de presencia contaminantes tipo hongos y bacterias.

Para la etapa de multiplicación convencional y en BITs, se utilizó material vegetal previamente establecido (Figura 2). Para multiplicación convencional se ensayaron 5 concentraciones de BAP 2, 3, 4, 5 y 6 mg L^{-1}, según referencia de Marulanda *et al*., 2005. En fase de multiplicación en BITS se utilizó MS con 3 concentraciones de BAP 3, 4, 5 mg L^{-1} y 3 frecuencias de inmersión (3, 6 y 8 horas). Para el enraizamiento en BITs se utilizó MS + 2.5 mg L^{-1} de sulfato de adenina.

Figura 1.

Proceso de establecimiento in vitro de G. angustifolia: A) segmentos nodales; B) Brotación de segmento nodal; C) Desinfección de explantes; D. Planta desarrolla a partir de segmento nodales.

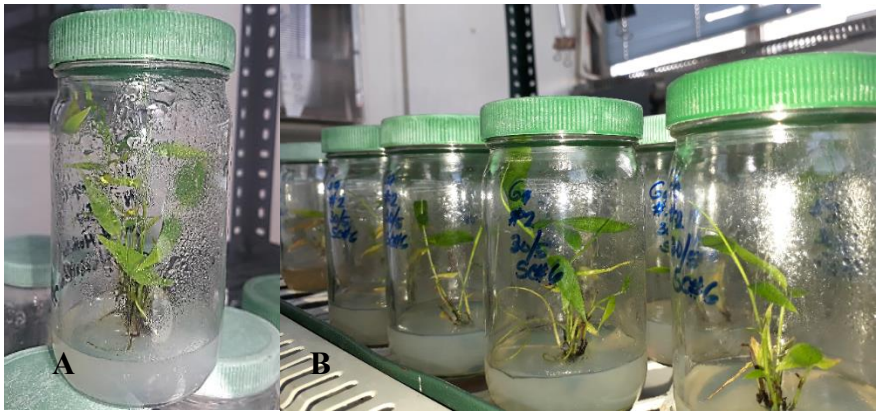


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el establecimiento in vitro, utilizando fungicidas y bactericidas, muy similar al protocolo de Jiménez *et al*., 2006, se obtuvo 67.4% de explantes con contaminantes, 14.3% de explantes muertos y 18.4% de explantes vivos. Para el establecimiento in vitro se utilizaron segmentos nodales de la parte basal, media y apical (Figura 1). Los segmentos nodales de la parte hacia el ápice resultaron con menor incidencia de contaminantes, y coinciden con aquellos resultados de Marulanda, *et al*., 2002.

Figura 2.

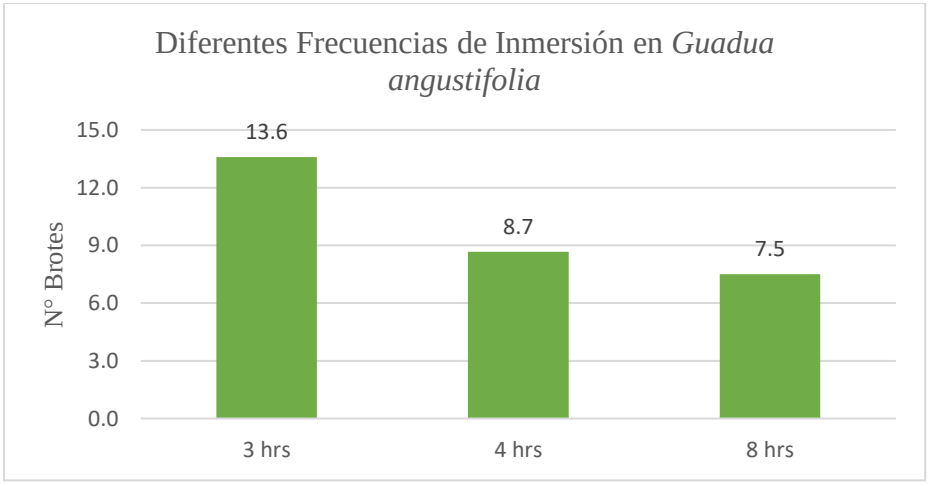
Plántulas de G. angustifolia en micropropagación convencional: A) plantas con 30 días en MS + 3 mg L^{-1} BAP; B) Plántulas en etapas iniciales de multiplicación convencional.



Para la fase de multiplicación convencional en frascos, los mejores coeficientes de multiplicación se obtuvieron utilizando 4 y 5 mg L^{-1} de BAP (2 brotes por explante), a los 15 días después de colocados en medios fresco; seguido del medio con BAP en dosis de 3mg L^{-1} a los 22 días. Los resultados concuerdan con aquellos resultados de Jiménez, *et al*., 2006, para *G. angustifolia*. Igual, estos resultados son similares con el reporte de Freire, *et al*., 2008, para los géneros *Bambusa vulgaris* var. vittata A. & C. Riviere y *Dendrocalamus strictus* (Roxburgh), donde la máxima producción de brotes ocurrió con dosis superiores a 3 mg L^{-1}.

Figura 3.

Respuesta de G. angustifolia a diferentes frecuencias de inmersión en BITs.



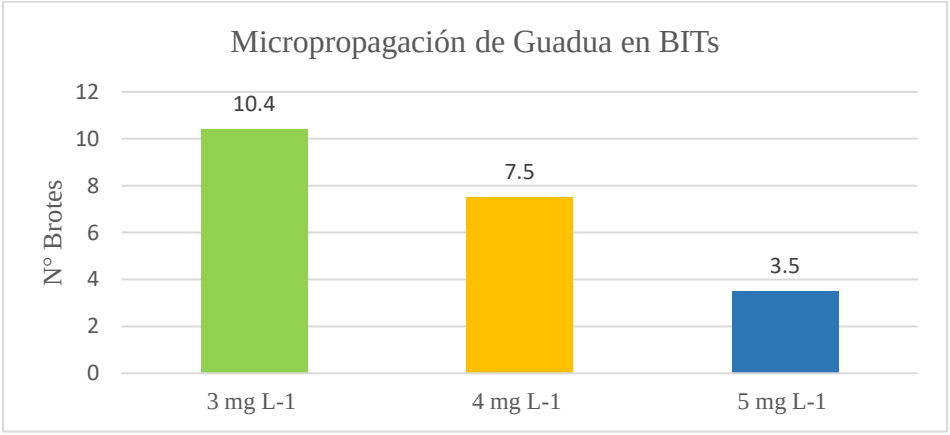
Para evaluar el efecto de frecuencia de la inmersión de los explantes en medios líquidos (BITs), se establecieron 3 frecuencias de inmersión, partiendo de inmersiones cada 3 horas, basados en experiencia propia con vitroplantas de caña de azúcar en BITs (datos no publicados aun). Como promedio se obtuvo un total 13.6 brotes por explante para la frecuencia de inmersión cada 3 horas, y fue la mejor respuesta comparada con los intervalos de 4 y 8 horas en donde solo se obtuvieron 8.7 y 7.5 brotes por explante, respectivamente (Figura 3). Cada explante consistía de un clúster con 3 plantas aproximadamente.

Figura 4.

Respuesta de Explantes 22 días después de inoculados en BITs: A) 3 mg L^{-1} de BAP; B) 4 mg L^{-1} de BAP; C) 5 mg L^{-1} de BAP.

Figura 5.

Número de brotes por explante con diferentes concentraciones de BAP (mg L^{-1}), utilizando BITs.



Una vez se determinó la mejor respuesta de los explantes (clúster de plantas) a intervalos o frecuencia de inmersión, se evaluaron diferentes concentraciones de citoquinina BAP desde 3 hasta 5 mg L^{-1}, en el mismo medio Basal MS, suplementado con una fuente de carbono (sacarosa), similar a los estudios de Jiménez, *et al.,* 2006, a nivel de multiplicación convencional.

Usando una concentración de 3 mg L^{-1} de BAP en medio de cultivo MS, se obtuvieron los mejores coeficientes de multiplicación en BITs. A partir de 4 mg L^{-1} se observó fenolización y muerte de tejidos (Figura 4 y 5). Probablemente el medio de cultivo requiera la adición de antioxidantes (ácido cítrico, carbón activado u otro), para contrarrestar los niveles de fenolización (Figura 6). Un aspecto importante al momento de seleccionar plantas para BITs es, tener mucho cuidado con la presencia de contaminantes de microorganismos endófitos, que puedan proliferar en el paso hacia BITs.

Figura 6.

Respuesta de los explantes (22 días de edad), en BITs, con diferentes frecuencias de inmersión: A) 3 horas; B) 4 horas; C y D) Cada 8 horas.

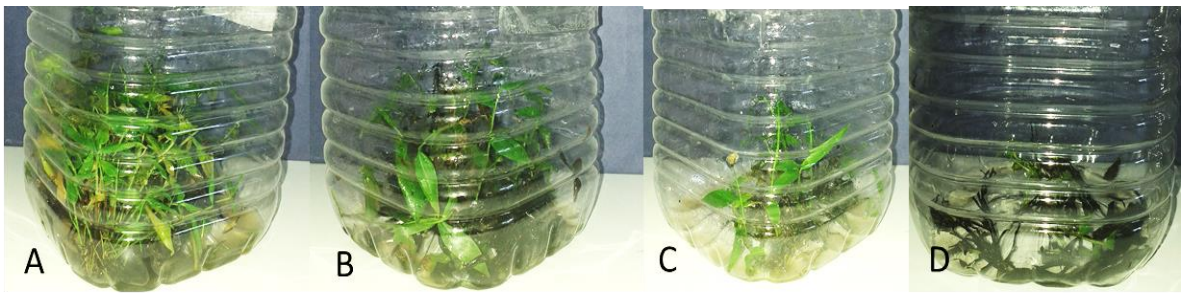
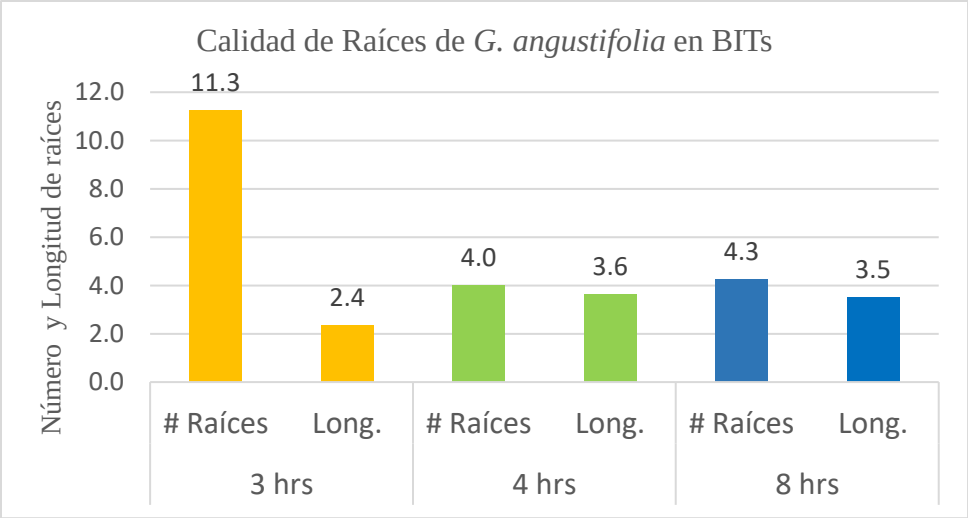


Figura 7.

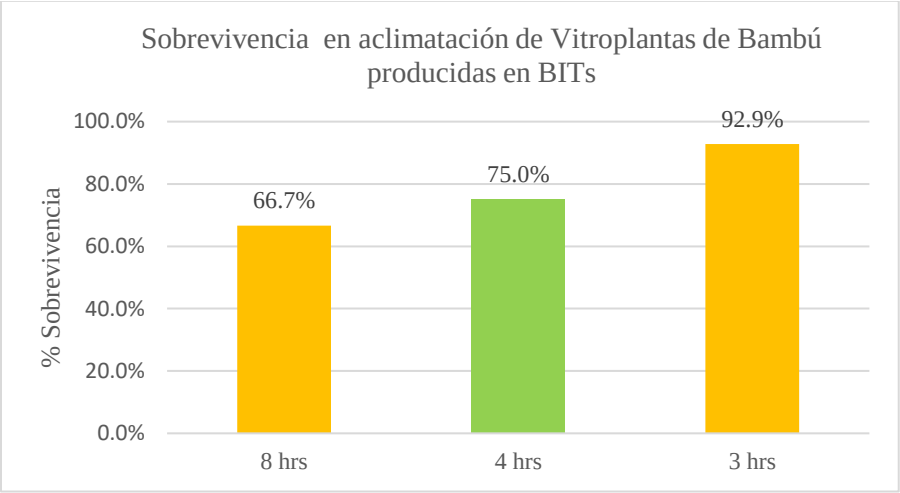
Calidad de raíces de plantas obtenidas en BITs con diferentes frecuencias de inmersión.



En medio de cultivo MS suplementado con sulfato de adenina 10 mg L^{-1}, se obtuvo generación espontánea de raíces, después de 45 días de inoculados los explantes en BITs. Las plantas sometidas a intervalos de inmersión cada 3 horas, produjeron mejor calidad de raíces con promedio de 11.3 raíces y 2.4 cm de longitud, en comparación con 4 y 4.3 raíces, y una longitud de 3.6 y 3.5 cm, obtenidos con la inmersión cada 4 y 8 horas, respectivamente (Figura 7).

Figura 8.

Porcentaje de sobrevivencia de plantas utilizando diferentes frecuencias de inmersión en BITs.



En fase de aclimatación se evaluó la sobrevivencia de vitroplantas de bambú obtenidas bajo 3 intervalos o frecuencias de inmersión evaluadas en este estudio. Como resultado, las plantas obtenidas con intervalo de inmersión cada 3 horas, se adaptaron mejor a las condiciones ex vitro, por la cantidad y calidad de raíces de las plantas y lograron una sobrevivencia de 92.9%, muy superior a 75 y 66.7% de sobrevivencia obtenido con 4 y 8 horas de inmersión, respectivamente (Figura 8). Durante los primeros 8 días se colocaron en malla sombra, tal como sugiere Sánchez *et al*., 2019 y bajo cámara húmeda. Después se pasaron a bandejas, donde estuvieron por 30 a 45 días y al final fueron separadas y trasplantadas a bolsas negras plásticas de polietileno. Al cabo de 2.5 meses después de transplante, las plántulas desarrollaron suficientes raíces para ir a siembra final en campo (Figura 9). Como sustrato se utilizó ceniza de bagazo de caña, compost y vermicompost, a razón de 80:10:10 volumen en volumen, respectivamente.

Figura 9.

Diferentes estados de crecimiento de G. angustifolia en aclimatación: A) Plantas de 8 días; B) Plantas de 30 días; B, C y D) Plantas óptimas para transplante; E y F) Plantas de 15 días después de transplante (DDT); G) Plantas de 45 días DDT, listas para campo.

CONCLUSIONES

Para lograr altas tazas de multiplicación in vitro y de sobrevivencia del Bambú se sugiere utilizar medio MS con una concentración de 3 mg L^{-1} de BAP, con el cual se obtuvieron los mejores coeficientes de multiplicación en BITS, tal como fue evaluado por Gonzaga *et al*., 2016. En promedio se obtienen un total de 13.6 plantas por brote inicial (explante), con intervalos de frecuencia de inmersión cada 3 horas, en comparación con 8.7 y 7.5 plantas para 4 y 8 horas de inmersión, respectivamente. Los resultados de este estudio difieren un poco de aquellos resultados de Gonzaga *et al*., 2016, el cual obtuvo mejor respuesta de multiplicación in vitro, usando intervalos de frecuencia cada 6 horas. Por otro lado, con el uso de sulfato de adenina con una concentración de 2.5 mg L^{-1}, en medio de cultivo MS y utilizando BITs, en 15 a 20 días se logró la generación espontánea de raíces y una mejora en la calidad de la planta. Con intervalos de frecuencia de inmersión de cada 3 horas (8 inmersiones de 3 minutos por día), se logró obtener el mayor número de raíces, lográndose 11 raíces en promedio y con una longitud de 2.4 cm. Igual, la mayor sobrevivencia se obtuvo

en plantas cultivadas a en BITs a intervalos de frecuencia de inmersión de cada 3 horas (8 inmersiones diarias).

Se recomienda realizar otros estudios sobre el tiempo de inmersión de los explantes, para valorar el nivel de fenolización y muerte de tejidos a diferentes intervalos o frecuencias de inmersión y asegurar cultivos axénicos para que no se enmascaren los resultados. El uso de BITs, ha demostrado ser una excelente herramienta altamente valiosa para la producción, no solo de Bambú, sino también de un sinnúmero de diferentes especies de interés comercial.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (SENACYT), por cofinanciar y destinar fondos necesarios para el desarrollo de este estudio. A todo el personal de campo involucrado en toda la logística de colecta de material vegetal, y desarrollo del estudio. Al MSc. Rodolfo Flores, por la ayuda con la identificación de las diferencias especies de bambú que existen en áreas de CALESA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Botero Cortés L. F. (2001). Reproducción de la *Guadua angustifolia* por el Método de chusquines. Guayaquil, Ecuador: International Network for Bamboo and rattan (Inbar).

Marulanda, M L., Carvajalino, M., Vargas, C. Londoño, X. (2002). La biotecnología aplicada al estudio y aprovechamiento de la guadua. Pereira, mayo 16-17 y 18 de 2002.Seminario - Taller Avances en la investigación sobre Guadua.

Marulanda, M. L., Gutiérrez L.G.., Márquez M. Del Pilar. (2005). Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth. Universidad Tecnológica de Pereira: Facultad de Ciencias Ambientales. Actual Biol 27 (82): 5-15.

Mongkolsook, Y., Tanasombut, M., Sumkaew, R., Likitthammanit, P., Wongwean P. (2005). Temporary Immersion System (TIS) for Micropropagation of *Dendrocalamus latiflorus* in Commercial Production. Institute, Kasetsart University, Bangkok. Kasetsart Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement.

Jiménez, V., Castillo, J., Tavares, E. (2006). In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 86, 389–395. https://doi.org/10.1007/s11240-006-9120-4

Giraldo, E., Sabogal, A., (2007). Una alternativa sostenible: La Guadua técnicas de cultivo y manejo. Corporación Autónoma Regional del Quindío. 3ra Ed. Armenia, Colombia.

Freire Seijo, M.Y., García Ramírez,Y., Tejeda, M., Gallardo, G., Fajardo, M., Cruz Martín, M., Sánchez García, C., Alvarado Capó, Y., Acosta Suárez, M., Roque, B., Leiva Mora, M. (2008). Empleo de la biotecnología en la propagación de dos especies de Bambú. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Biotecnología Vegetal Vol. 8, No. 2: 99 - 102, abril - junio, 2008. ISSN 1609-184.

Holst San Juan, Andrea., Jimenez García, V. M. (2010). Efecto del Sistema de Inmersión Temporal (RITA®) sobre el Desarrollo de plántulas de Guadua angustifolia Kunth (Poaceae: Bambusoideae) y su posterior aclimatación. Universidad de Rodrigo Facio, Costa Rica. Tesis presentada para optar por el título grado de Licenciado en Ingeniería Agronómica. PDF

Gonzaga Gutiérrez, L., López Franco, R., Morales Pinzón, T. (2016). Micropropagation of Guadua angustifolia Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA®. African Journal of Biotechnology. https://www.researchgate.net/publication/345151179

García Ramírez, Y., Gonzáles González, M., Quiala Mendoza, E., Freire Seijo, M., La O Cárdenas, M., Moreno Bermúdez, J. L., Hurtado Ribalta, O. (2014). Effect of BA treatments on morphology and physiology of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex Wendl in temporary immersion. Am. J. Plant Science. 5:205-211.

Muthukumaran, P.,Saraswathy, N., Abarna, S.,Kanthimathi, R.,Monisha, V.,Niranjana, N,.,., Raja Nivetha, M. (2018). Protocol for Induction of Multiple Shoot through Nodal Explants Culture of Bambusa bambos for Biomass Production. Department of Biotechnology, Plant Tissue Culture Laboratory, Kumaraguru College of Technology, Coimbatore- 641049, India. https://www.researchgate.net/publication/323776238

Sanches Ornellas, T., Kades Marchetti, C., Henrique de Oliveira G., Fritsche, Y., Pedro Guerra, M. (2019). Micropropagation of Guadua chacoensis Pesquisa Agropecuária Tropical, vol. 49, pp. 1-8, 2019. https://www.redalyc.org/journal/2530/253067965059/html/

Flores, R. (2020). Informe final para la identificación de seis poblaciones de Bambú en la empresa Grupo Calesa, Aguadulce, Coclé, Panamá. PDF

Londoño, X. Por qué el bambú debe ser considerado un producto agrícola Sociedad Colombiana del Bambú. http://bambuguadua.org/wp-content/uploads/2021/06/Por-que-el-bambu-no-es-un-arbol.pdf

Judziewicz, E.J., L.G. Clark, X. Londoño & M.J. Stern. 1999. American Bamboos. Smithsonian Institution, Washington D.C., Washington, Estados Unidos. http://www.panamaagro.com/noticias/actualidad/2047-el-cultivo-de-bambu-frente-a-los-efectos-negativos-del-cambio-climatico-y-de-sus-perspectivas-en-el-pais.html