

## Influencia de las características de las plantas cultivadas *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl. en su aclimatización

Ortelio Hurtado\*, Marisol Freire-Seijo, Michel Leiva-Mora, Yudith García-Ramírez. \*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: ortelio@ibp.co.cu

### RESUMEN

La aclimatización es una de las fases de la propagación *in vitro* que influye en la eficiencia de los protocolos de regeneración de plantas. Para mejorar la aclimatización de plantas cultivadas *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*, es preciso definir las características de un material vegetal de calidad. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de las características de las plantas cultivadas *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris* en su aclimatización. Para ello, se consideró la influencia del estado de desarrollo de las plantas cultivadas *in vitro* en su supervivencia durante la aclimatización. A los 30 días de plantadas se midió la altura, el número de brotes y raíces por planta. Se pudo constatar, que la altura de las plantas influyó en la aclimatización de estas en la casa de cultivo. Se observaron diferencias significativas respecto al porcentaje de supervivencia entre los tratamientos con altura de menos de 3.0 cm y con altura superior a 3.0 cm con las que se obtuvieron resultados significativamente superiores. Resultados similares se obtuvieron para el número de raíces emitidas por planta y el número de brotes por planta, independientemente de la presencia de raíces en el momento de la siembra. De los resultados se puede concluir que la altura de las plantas de *B. vulgaris* cultivadas *in vitro* fue la característica morfológica que más influyó en su supervivencia y desarrollo, durante la fase de aclimatización.

Palabras clave: altura, casa de cultivo, características, sustrato

### ABSTRACT

Acclimatization is a phase of *in vitro* plants propagation which influences the efficiency of plant regeneration protocols. It is necessary to define the characteristics of a quality plant material to improve acclimatization of *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* plants cultured *in vitro*. The aim of this study was to determine the effect of the characteristics of *B. vulgaris* var. *vulgaris* *in vitro* plants in the acclimatization phase. Then, the influence of the growth development of *in vitro* plants was considered for their survival during acclimatization. Height and the number of buds and roots per plant were measured after 30 days of planting. Among all the variables, plants height influenced their acclimatization in the greenhouse. Survival rate was significantly different between treatments with plants smaller than 3.0 cm and treatments with plants higher than 3.0 cm. Similar response was obtained after 30 days in the quantification of the number of roots and buds emitted per plant, regardless the presence of roots when planting. Taking into account the results we conclude that the height of the *B. vulgaris in vitro* plants was the morphological characteristic with major influence in the survival and development of plants during the acclimatization phase.

Keywords: height, greenhouse, characteristics, substrate

### INTRODUCCIÓN

Los bambúes, son plantas de rápido crecimiento, extremadamente diversas e importantes desde el punto de vista económico y ambiental. Crecen en regiones tropicales y templadas de Asia y América (Londoño y Zurita, 2008).

Los bambúes son especies protectoras del ambiente y juegan un papel determinante por

la cobertura que brindan al medio donde crecen. La sujeción al sustrato, mediante sus raíces y rizomas, evita la erosión y elimina las cárcavas. Además, contribuyen a embellecer el paisaje y a descontaminar la atmósfera. Es un procesador del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), mucho más eficiente que los árboles del bosque tropical, poseen gran importancia en la conservación de los recursos hídricos, en países de América Latina, especialmente en

México, Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador y Brasil. Las cualidades físicas, su bajo costo y disponibilidad; hacen de estos, el material ideal para la construcción de viviendas, muebles, artículos decorativos utilitarios y artesanía. Es un recurso natural renovable de rápido crecimiento y fácil manejo (Mejía *et al.*, 2009). Sin embargo, su propagación vegetativa para obtener grandes cantidades de plantas es insuficiente debido a que su propagación convencional es muy trabajosa y presenta bajos porcentajes de enraizamiento.

Las técnicas biotecnológicas son una alternativa para la propagación acelerada del cultivo del bambú en condiciones *in vitro*, ya que las vías tradicionales de propagación son limitadas. Además, la reproducción sexual ocurre estacionalmente por medio de semillas. De manera asexual, puede propagarse por la activación de las yemas del rizoma o mediante tallos jóvenes. Esta última vía de propagación es muy empleada pero afecta sensiblemente el número de tallos disponibles para la cosecha y es trabajosa. Por estas razones, se hace necesaria la regeneración y multiplicación de plantas *in vitro*, como una alternativa a la propagación vegetativa (Daquinta *et al.*, 2003).

Para la multiplicación *in vitro* en bambú, se han empleado principalmente dos métodos: organogénesis (Ramanayake *et al.*, 2006) y embriogénesis somática (Gillis *et al.*, 2007).

Especialmente, para especies de *Bambusas* se han desarrollado protocolos de regeneración de plantas vía organogénesis (Sheeba *et al.*, 2005; Ramanayake *et al.*, 2006; Yasodha *et al.*, 2008; Dutta y Borthakur, 2009) en *Bambusa wanim*, *Bambusa vulgaris* var. *striata*, *Bambusa nutans* y *Bambusa balcooa* Roxb, respectivamente.

Uno de los problemas identificados en la propagación *in vitro* de los bambúes, se encuentra en la fase de aclimatización dada la baja supervivencia de las plantas en condiciones *ex vitro*. Esto se relaciona con factores como la calidad de las plantas, la temperatura, calidad de los sustratos, así como la humedad relativa y del sustrato Lavanya *et al.* (2009).

El conocimiento existente acerca de la aclimatización de las plantas cultivadas *in vitro* de los bambúes es limitado, ya que esta etapa del proceso de propagación ha sido poco estudiada. Específicamente sobre aclimatización

de *Bambusa vulgaris* no se encontraron referencias en la literatura científica. Por ello, resultados científicos sobre el tema garantizarían obtener plantas mejor preparadas para su siembra en campo. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de las características de las plantas cultivadas *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl. en su aclimatización.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se emplearon plantas de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* propagadas *in vitro* vía organogénesis (García-Ramírez *et al.*, 2009). Las plantas fueron llevadas a la casa de cultivo entre los meses de enero a abril del año 2009. Luego de concluir la fase de enraizamiento *in vitro* fueron clasificadas en:

- plantas de 1.0 – 3.0 cm de altura, con raíces,
- plantas de 1.0 – 3.0 cm de altura, sin raíces,
- plantas mayores de 3.0 cm de altura, con raíces
- plantas mayores de 3.0 cm de altura, sin raíces,

de esta forma fueron conformaron cuatro tratamientos (Figura 1a-d). Las plantas se mantuvieron en grupos compuestos por dos o tres plantas y cada tratamiento contó con 19 plantas repeticiones (126 plantas en total).

### Aclimatización

Para la aclimatización de las plantas se empleó un sustrato que contenía 80% de humus de lombriz y 20% de zeolita, se llenaron bolsas de polietileno con una capacidad de 572 cm<sup>3</sup> de volumen de sustrato.

A partir de los 30 días de plantadas se cuantificó el número de plantas vivas y se calculó el porcentaje de supervivencia en casa de cultivo a los 30, 60 y 90 días de plantadas. A las plantas vivas se le midió la altura (cm), desde la base de la planta hasta la primera hoja desarrollada. Además, se cuantifico el número plantas con raíces y el número de brotes por planta (se cuantificaron los brotes mayores de 0.1 cm) y el número de hojas por planta (sólo se consideraron las que se encontraban totalmente abiertas).

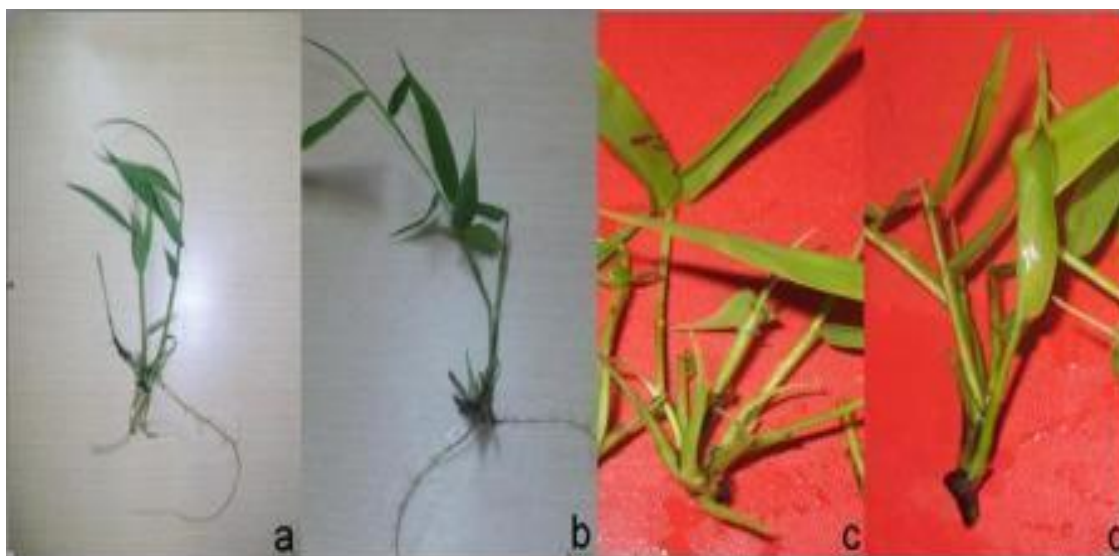


Figura 1. Características de las plantas de *B. vulgaris* var. *vulgaris* empleadas. a) plantas entre 1.0-3.0 cm de altura con raíz, b) plantas mayor de 3.0 cm de altura con raíces, c) plantas mayor de 3.0 cm de altura sin raíces, d) plantas entre 1.0-3.0 cm de altura sin raíz.

El riego se realizó por microaspersión, tres veces al día (8:30 am, 3:00 pm) con una frecuencia de 3 horas con 3 minutos de exposición. El flujo de los fotones fotosintéticos dentro de la casa de cultivo osciló diariamente entre 280 y 400  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La temperatura media durante el día fue de  $30 \pm 2$  °C y la humedad relativa del  $80 \pm 5\%$ .

La comparación de los valores de supervivencia, altura de las plantas, número plantas con raíces y número de brotes por planta se realizó mediante una prueba de *Kruskall Wallis* con previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza, mediante el paquete estadístico PASW *Statistics* versión 18.0 sobre Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

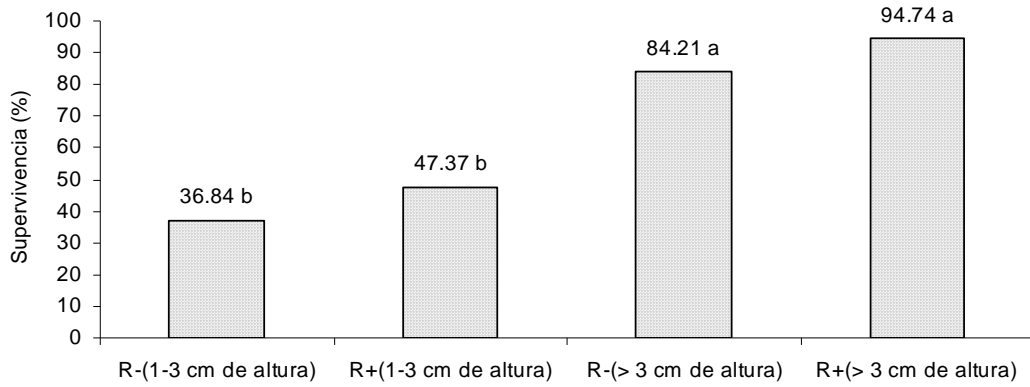
Se encontró que el estado de desarrollo de las plantas enraizadas *in vitro* influyó en la aclimatización de estas en la casa de cultivo. Luego de 10 días de plantadas murieron las plantas de mayor altura y el resto sobrevivieron y continuaron su desarrollo.

A los 30 días se observaron diferencias significativas respecto al porcentaje de supervivencia entre los tratamientos en que

las plantas tenían altura de 1.0-3.0 cm con o sin raíces y los tratamientos en los que se emplearon plantas con altura superior a 3.0 cm con o sin raíces. Las diferencias estuvieron marcadas entre los tratamientos: de las plantas 1.0-3.0 cm de altura sin raíces (R-) (36.84%), con esta altura pero con raíces (R+) (47.37%) y entre las plantas con altura mayor a 3.0 cm sin raíces (84.21%) y las que presentaban raíz (94.74%) (Figura 2).

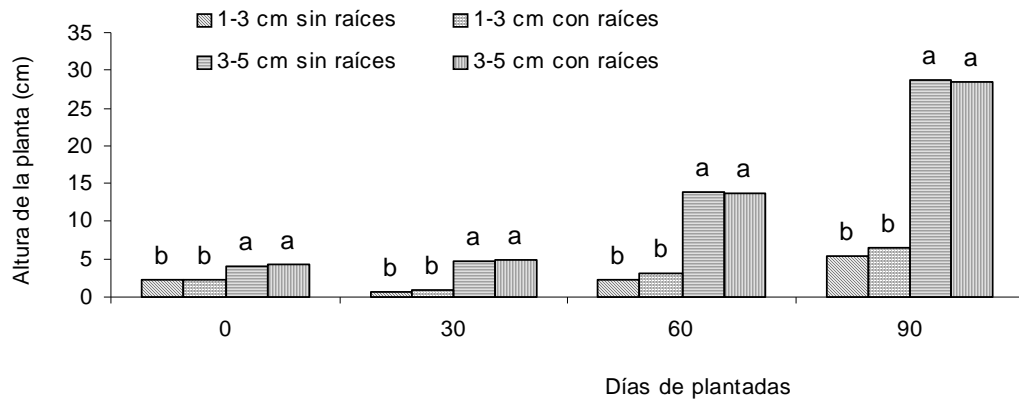
El mayor porcentaje de supervivencia de las plantas propagadas *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* en casa de cultivo, se obtuvo al emplear plantas mayores de 3.0 cm de altura, con presencia o no de raíces. Desde los 30 días de plantadas la altura de las plantas mayores de 3.0 cm difirió significativamente de las plantas con altura entre 1.0 y 3.0 cm con y sin raíces (Figura 3).

Los mayores valores en cuanto a la altura de la plantas se alcanzaron cuando se aclimatizaron plantas mayores de 3.0 cm de altura con o sin raíces, las cuales se diferenciaron significativamente de aquellos en plantas menores de 3.0 cm de altura con y sin raíz. Estas diferencias se manifestaron desde los 30 días de plantadas (Figura 3 y Figura 4) y se incrementaron en el tiempo, con los mayores valores a los 90 días de plantadas.



Barras con letras distintas indican diferencias significativas para  $p < 0.05$  según la prueba de Kruskal Wallis ( $n=45$ )

Figura 2. Efecto de la altura de las plantas cultivadas *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris*, con raíces y sin raíces, en la supervivencia en casa de cultivo.



Barras con letras distintas indican diferencias significativas para  $p < 0.05$  según la prueba de Kruskal Wallis ( $n=45$ )

Figura 3. Influencia de la altura y la presencia de raíces en plantas cultivadas *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris* en la altura de las plantas en fase de aclimatización.



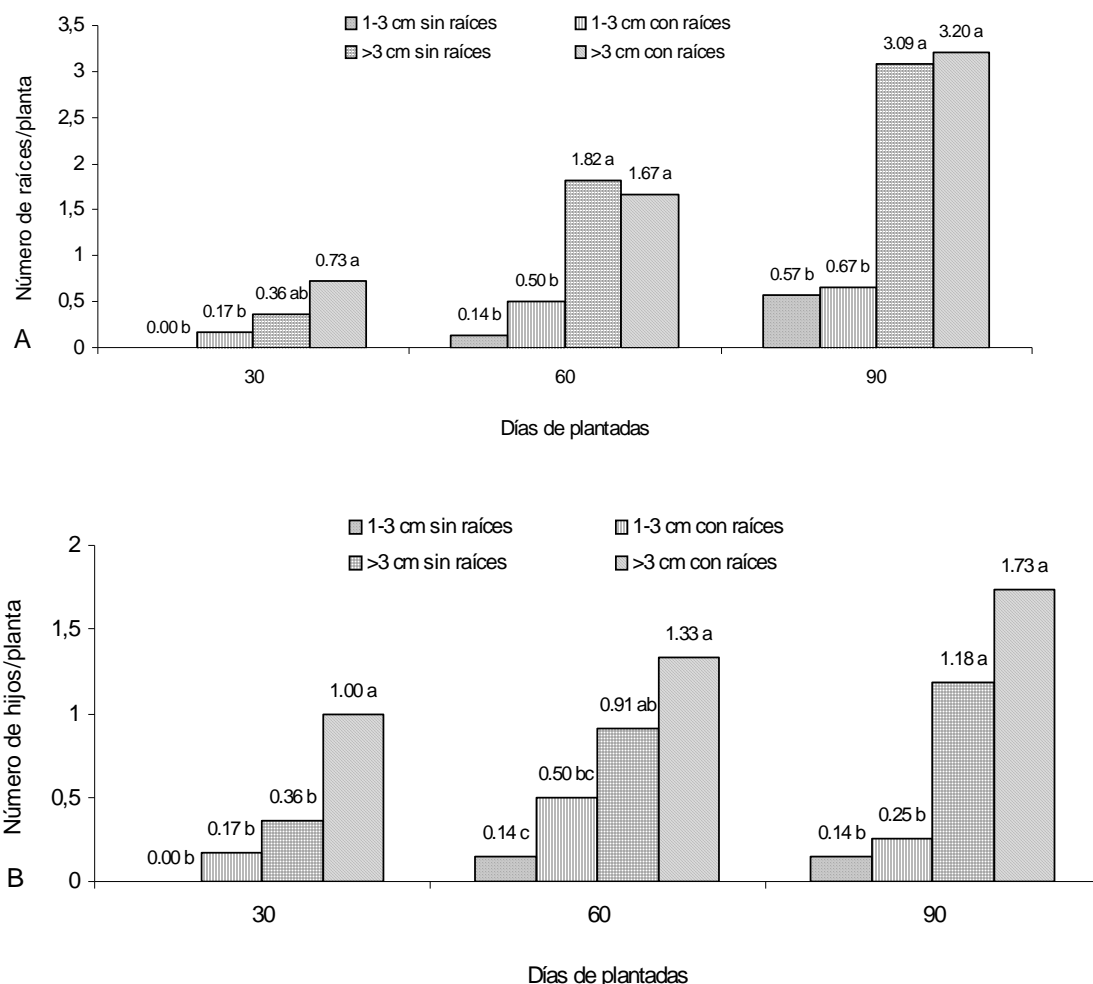
Figura 4. Plantas de *B. vulgaris* var. *vulgaris* con altura mayor de 3.0 cm luego de 30 días de aclimatización.

Durante los primeros días (3 días-30 días) en fase de aclimatización las plantas perdieron las raíces que se formaron durante la fase de enraizamiento *in vitro* y emitieron nuevas raíces. Lo anteriormente descrito pudo deberse a que las raíces tenían una conexión vascular incompleta o deficiente entre la raíz y el brote, lo que produce un mal funcionamiento de estas estructuras. Martínez *et al.* (2005) coinciden en que la supervivencia de las plantas *in vitro* en fase de aclimatización se ve comprometida, entre otros, por factores fisiológicos anatómicos y estructurales.

Al cuantificar el número de raíces emitidas por las plantas, se observó que las mayores

de 3.0 cm de altura emitieron raíces a los 30 días de plantadas, independientemente de la presencia o no de raíces en el momento de la siembra. Luego de 60 días de aclimatizadas las plantas de estos tratamientos se diferenciaron significativamente de los tratamientos donde se emplearon plantas menores de 3.0 cm de altura con o sin raíz (Figura 5A).

Una respuesta similar se tuvo cuando se analizó la variable número de brotes por planta. Las plantas mayores de 3.0 cm de altura fueron las que formaron el mayor número de brotes por planta independientemente de la presencia o no de raíces (Figura 5B).



Medias sobre barras, con letras distintas difieren significativamente para  $p < 0.05$  según la prueba de Kruskal Wallis ( $n=45$ )

Figura 5. Influencia de la altura de plantas cultivadas *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris* sobre el desarrollo de las plantas en fase de aclimatización A) Emisión de la raíz y B) Número de brotes por planta.



Figura 6. Plantas aclimatizadas de *B. vulgaris* a los 60 días de plantadas. a) desarrollo de la zona caulinar en plantas mayores de 3.0 cm de altura b) desarrollo de raíces en plantas mayores de 3.0 cm de altura, c) plantas completas.

Los resultados anteriores indican que la altura de las plantas cultivadas *in vitro* fue la característica morfológica que más influyó durante la fase de aclimatización en las variables analizadas.

Martínez *et al.* (2005) y Sosa-Rodríguez *et al.* (2009), plantearon que las plantas cultivadas *in vitro* de mayor altura tienen más reservas de nutrientes y órganos mejor desarrollados, debido fundamentalmente a las características fisiológicas, estructurales y anatómicas que presentan por la diferenciación de sus tejidos. Estos autores indicaron que dentro de los principales problemas que presentan las plantas cultivadas *in vitro* (eucalipto) está la ineficiente absorción y transporte de agua, debido a una conexión vascular incompleta entre la raíz y el brote.

Luego de transcurrir 60 días, las plantas mayores de 3.0 cm de altura habían brotado nuevas yemas y formado plantas completas con un sistema radicular completo (Figura 6a y 6b).

Cabe mencionar que los estudios de Marulanda *et al.* (2005), Dutta y Borthakur (2009) realizados en *Bambusa edulis*, *Guadua angustifolia* y *Bambusa balcooa* refieren que desarrollan una etapa de endurecimiento *in vitro* para luego transferir las plantas a fase de aclimatización. Esta etapa favorece el incremento de los porcentajes de plantas aclimatizadas que oscilaron entre 80% y 90%.

Autores como Dutta y Borthakur (2009) también han demostrado la relación existente entre la altura de las plantas y su supervivencia durante la fase de aclimatización. Ellos obtuvieron en *B. balcooa* una supervivencia del 90% con plantas entre 2.0 y 6.0 cm de altura. Dichas plantas fueron capaces de formar entre 1.0 y 4.0 nuevos brotes por planta. Sin embargo, no realizaron un estudio detallado de la relación o dependencia existente entre las características morfológicas de las plantas cultivadas *in vitro* y su respuesta en fase de aclimatización.

Por otro lado, en la especie *Dendrocalamus strictus*, Saxena *et al.* (1999) obtuvieron una tasa de supervivencia entre 80% y 92% en casa de cultivo, pero no se refieren a las características de las plantas empleadas.

En otras especies, como *Eucalyptus urophylla* y *Eucalyptus grandis* se ha relacionado la altura de las plantas con el éxito durante su aclimatización. Por ejemplo, Martínez *et al.* (2005) al utilizar plantas cultivadas *in vitro* de 6.0 – 7.0 cm de altura, que poseían como promedio 3.0 raíces y la raíz mayor medía entre 5.0 – 7.0 cm de longitud lograron entre 75% y 85% de supervivencia en fase de aclimatización.

La literatura científica consultada, varios autores refieren la ausencia de investigaciones profundas sobre el desarrollo de las plantas de bambúes en fase de aclimatización (Gillis *et al.*, 2007; Dutta y Borthakur, 2009; Rajneesh *et al.*, 2009; Sayanika *et al.*, 2009). De manera general, se restringen a la evaluación de la

supervivencia sin profundizar en otras variables ni definir la relación existente entre las características morfológicas de las plantas y su respuesta a las condiciones durante la aclimatización. Específicamente, no existen referencias de trabajos realizados en la especie *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*.

## CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados del presente trabajo se puede concluir que la altura de las plantas de *B. vulgaris* cultivadas *in vitro* fue la característica morfológica que más influyó en su supervivencia, durante la fase de aclimatización. Fueron las plantas mayores de 3.0 cm de altura las que mostraron mayor porcentaje de supervivencia, mayor altura, número de raíces y número de brotes por planta. La presencia de raíces no estuvo directamente relacionada con la respuesta de las plantas en fase de aclimatización.

*Este trabajo fue presentado en el marco de la Primera Conferencia Regional de Bambú: El bambú en el desarrollo local, organizada por la Facultad de Construcciones, el Centro de Investigación y Desarrollo de Estructuras y Materiales (CIDEM) de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, la Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), INBAR y la red ECOSur, del 17-19 de mayo de 2011. Villa Clara, Cuba.*

## REFERENCIAS

- Daquinta, M, Rodríguez R, Ramos L, Capote I, Lezcano Y, Trino D, Escalona M (2003) Manejo Biotecnológico de Especies Forestales y Bambúes en Cuba. XII Congreso Forestal Mundial, Québec - Canadá
- Dutta, K y 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
- García-Ramírez Y, Freire-Sejio M, Pérez B, Hurtado O (2009) Efecto de BAP y ANA en la multiplicación *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl. *Biotecnología Vegetal* 9 (3):189 - 192
- Gillis, K, Gielis J, Peeters H, Dhooghe E, Oprins O (2007) Somatic embryogenesis from mature *Bambusa balcooa* Roxburgh as basis for mass production of elite forestry bamboos. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 91:115–123
- Lavanya M, Venkateshwarlu B, Poomasri B (2009) Acclimatization of neem microshoots adaptable to semi-sterile conditions. *Indian Journal of Biotechnology* 8: 218-222
- Londoño X, Zurita E, (2008) Two New Species of *Guadua* (*Bambusoideae: Guaduiniae*) from Colombia and Bolivia. *Journal Botanic Research Institute of Texas* 2 (1): 25-34
- Martínez, R, Azpíroz HS, Rodríguez JL, Cetina MV, Gutiérrez MA (2005) Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* de *Eucalyptus Urophylla* s. t. blake *Eucalyptus Ggrandis* hill ex Maiden. *Ra ximhai* 1(003): 591-597
- Marulanda, LM, Gutiérrez GL, Márquez M (2005) Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth. *Actual Biol* 27 (82): 5-15
- Mejía, G, Amanda I, Gallardo C, Vallejo C, Jairo J (2009) Plants of the genus bambusa: importance and application in the pharmaceutical, cosmetic and food industry. *Vitae* 16 (3): 396-405
- Lavanya, M (2009) Implementación de técnicas de aclimatización para plantas micropropagadas de Vid (*Vitis vinifera* L.) Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
- Rajneesh, KA, Janhvi M, Shyamal KN (2009) Improved *in vitro* shoot multiplication and rooting of *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro: production of genetically uniform plants and eld evaluation. *Acta Physiol Plant* 31:961–967
- Ramanayake, SMSD, Meemadum VN, Weerawardene TE (2006) *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* 'Striata'). *Scientia Horticulturæ* 110: 109–113
- Sayanika, WD, Sharma, GJ (2009) *In vitro* Propagation of *Arundinaria callosa* Munro and Edible Bamboo from Nodal Explants of Mature Plants. *The Open Plant Science Journal* 3: 35-39
- Sheeba, M, Arshad A, Kumar, Subodh, K (2005) Micropropagation of *Bambusa wamin* through shoot proliferation of mature nodal explants. *Journal of Biological Research* 3: 59–66
- Sosa-Rodríguez, FM, Ortiz RS, Hernández RP, Armas PM, Guillen DS (2009) Propagación *in vitro* de *Heliconia standley* Macbride en Cuba. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(2): 17-23
- Yasodha, R, Kamala S, Anand Kumar SP, Durai Kumar P, Kalaiarasi K (2008) Effect of glucose on *in vitro* rooting of mature plants of *Bambusa nutans*. *Scientia Horticulturæ* 116: 113–116