

## Combinación de técnicas biotecnológicas y tradicionales para la propagación de diferentes especies de bambú

M. Freire-Seijo\*, Y. García-Ramírez, O. Hurtado, León M., L. Fajardo Rosabal, M. Cruz-Martín, C. Sánchez-García, Y. Alvarado-Capó, M. Acosta-Suárez, M. Tejeda, B. Roque, M. Leiva-Mora. \*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. CP 54 830. Cuba e-mail: marisolf@ibp.co.cu

### RESUMEN

La propagación *in vitro* permite clonar plantas libres de patógenos y uniformes. Además ofrece facilidades de transportación y disponibilidad de plantas durante todo el año. Para la propagación *in vitro* de las especies de bambú se han descrito varias dificultades entre las que se pueden citar como las más importantes: la contaminación microbiana endógena y la necrosis de los explantes. Estas han limitado la posibilidad de emplear de manera eficiente y repetible los protocolos de propagación *in vitro* desarrollados hasta el momento. Establecer esquemas de propagación de plantas en los que se combinen las facilidades de las técnicas de cultivo de tejidos y las vías de propagación tradicional constituye una excelente opción para poner en manos de los productores sistemas sostenibles y amigables con el medio ambiente. Las especies utilizadas en la investigación fueron *Guadua angustifolia* Kunth y *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*. Se utilizaron como explantes iniciales yemas axilares de plantas rejuvenecidas en casa de cultivo. Además, fueron identificados por primera vez los contaminantes de alta frecuencia de aparición en una población de plantas en casa de cultivo e *in vitro* además de la presencia de polifenoles tanto en yemas axilares muertas establecidas *in vitro* como en el medio de cultivo. Las plantas llevadas a casa de cultivo fueron capaces de emitir entre cuatro y siete nuevos hijos con altos porcentajes de supervivencia durante los deshijes. Las plantas producidas en el laboratorio y aclimatizadas fueron entregadas a los campesinos quienes se encargan de realizar los deshijes a nivel de vivero. Estos resultados demuestran la posibilidad de emplear estrategias de trabajo de desarrollo local en las que se permita el acceso de los campesinos a los productos de las altas tecnologías.

Palabras clave: actores locales, plantas *in vitro*, propagación vegetativa

### ABSTRACT

*In vitro* propagation allows cloning pathogen-free and uniform plants. This technique favours transportation and availability of plants all the year. Several challenges have been described for *in vitro* propagation of bamboo species. Among them, the most important are endogenous microbial contamination and necrosis of the explants. These have limited the possibility to use the efficient and repeatable *in vitro* propagation protocols developed so far. Establishing plant propagation schemes that combine the facilities of tissue culture and traditional techniques is an excellent choice to put in the hands of farmers sustainable and environmentally friendly systems. The species used in the research were *Guadua angustifolia* Kunth and *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*. Axillary buds of rejuvenated plants at greenhouse were used as initial explants. The contaminants of high frequency appearing in a population of plants at greenhouse and *in vitro* culture were also identified for the first time. Also, the presence of polyphenols in both, dead *in vitro* axillary buds and on the culture medium was identified. Plants transferred to the greenhouse delivered from four to seven new suckers with high rates of survival during the removing of suckers. Plants produced in the laboratory and acclimatized were delivered to farmers. They are in charge of removing suckers at nursery level. These results demonstrated the possibility of using strategies of local development work which enable farmers to access products high technology.

Keywords: local actors, *in vitro* plants, plant propagation

### INTRODUCCIÓN

Cuba es la Isla, de la zona, con mayor diversidad en especies de bambú. Cuenta con un total de siete géneros y 19 especies de bambúes nativos y se encuentran siete géneros y 22 especies de bambúes exóticos (López *et al.*, 1989). Estas especies pueden

propagarse vegetativamente empleando secciones de tallos o culmos. A pesar de que existen otras vías de propagación, esta es la más utilizada por los viveristas en Cuba. Sin embargo, en muchos casos la eficiencia es baja y obliga permanentemente al corte de culmos que pueden ser empleados con fines comerciales o ambientales.

El cultivo de tejidos vegetales y más específicamente la regeneración de plantas vía organogénesis, ha sido empleada para la propagación de bambúes (Jiménez *et al.*, 2006; Ramanayake *et al.*, 2006). Las especies asiáticas, se han propagado *in vitro* con mayor facilidad (Saxena, 1990; Prutpongse y Gavinlertvana, 1992; Saxena y Dhawan, 1999).

Han sido descritas algunas dificultades para emplear este método de propagación, una de ellas se encuentra en la fase de aclimatización de las plantas propagada *in vitro* dada la baja supervivencia de las plantas en condiciones *ex vitro*. Esto se relaciona con factores como la temperatura, calidad de los sustratos, calidad del material vegetal, así como la humedad relativa y del sustrato (Morán, 2008).

En el marco del proyecto Bambú - Biomasa el Instituto de Biotecnología de las Plantas ha trabajado en investigaciones que generen sistemas de propagación para garantizar la producción de plantas de bambú de calidad (Freire-Seijo *et al.*, 2008). Para lograr este objetivo, contar con un sistema de propagación en el que se combinen las técnicas biotecnológicas y tradicionales empleando el deshije como herramienta para el incremento del número de plantas sería factible. En este trabajo se muestran los principales resultados de las investigaciones realizadas para el desarrollo de una estrategia para la propagación de plantas de bambú en las que se combinan las ventajas de las técnicas de cultivo de tejidos (biotecnológicas) y las vías de propagación tradicional como sistema sostenible y amigable con el medio ambiente.

## TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS

### Fase de establecimiento

El establecimiento *in vitro* de las yemas axilares se desarrolló en las especies *Guadua angustifolia* Kunth y *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*. Para ello se emplearon yemas axilares de plantas rejuvenecidas en casa de cultivo. La colecta del material vegetal se realizó en período lluvioso y de seca. El mayor número de yemas brotadas (99%) y de explantes libres de contaminantes microbianos visibles (98%), se logró entre los meses de enero-abril y noviembre-diciembre en la especie *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* (García Ramírez *et al.*, 2010) mientras que para la especie *Guadua angustifolia* se obtuvo 95.81% de brotación de

las yemas axilares al emplear el hipoclorito de sodio al 1.0% durante cinco minutos.

Además, se cuantificaron e identificaron los microorganismos contaminantes que crecieron durante esta fase y se determinó el efecto de 6-Bencilaminopurina (6- BAP) y el estado físico del medio de cultivo.

En las especies leñosas frecuentemente se refieren pérdidas que ocasionan los microorganismos contaminantes durante la fase de establecimiento. Los bambúes no constituyen una excepción, los trabajos realizados por Cruz-Martín *et al.* (2007), Acosta-Suárez *et al.* (2008) y García-Ramírez *et al.* (2010a) describen los resultados al respecto. Se comprobó que sobre las yemas axilares se desarrollaba una microbiota diversa compuesta por hongos filamentosos y bacterias los cuales se identificaron como contaminantes *in vitro*. Los resultados en las investigaciones realizadas sobre el tema permitieron proponer un plan de defensa fitosanitaria para las plantas donantes.

Por otra parte, los resultados permiten emplear el medio de cultivo líquido durante la fase de establecimiento de las yemas axilares (Figura 1). El empleo de medios de cultivo líquidos favoreció el desarrollo morfológico de las plantas *in vitro*, facilitó las operaciones y disminuyó el costo de producción de las plantas. En procesos productivos el uso de medios de cultivo líquidos facilita la detección de los microorganismos, fundamentalmente, bacterias.

Durante la fase de establecimiento las yemas axilares, fundamentalmente de la especie *Guadua angustifolia*, morían luego de la brotación *in vitro*. Se determinó que una de las posibles causas de la mortalidad de los explantes era la presencia de polifenoles, dada por la activación del metabolismo secundario como respuesta a condiciones de estrés en los explantes durante su establecimiento *in vitro*. Se demostró por primera vez la presencia de polifenoles tanto en yemas axilares muertas establecidas *in vitro* como en el medio de cultivo donde se encontraban en un 0.077% y concentraciones de 0.182 y 0.187 mg m l<sup>-1</sup> para fenoles de bajo y alto peso molecular respectivamente (Fajardo, 2006).

En la literatura científica consultada, no se hace referencia a esta problemática, solamente se conoce que varios investigadores atribuyen la muerte repentina de los explantes a múltiples

causas, sin darle hasta el momento una explicación para el caso de la especie *Guadua angustifolia* (Huang *et al.*, 2002).

### Fase de multiplicación

Durante la fase de multiplicación se adicionaron a los medios de cultivo diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento y se estudió la influencia del estado físico del medio de cultivo para propiciar la formación de nuevos brotes.

Los resultados demostraron que durante la fase de multiplicación de las especie *B. vulgaris* puede ser empleado el medio de cultivo líquido (Figura 1) para la multiplicación de los brotes (García-Ramírez *et al.*, 2010b). También se puede afirmar que hasta el quinto subcultivo de multiplicación se producen incrementos en el coeficiente de multiplicación, adicionando 6.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP (García-Ramírez *et al.*, 2009). Resultados más recientes (no publicados) demuestran que las plantas pueden ser multiplicadas durante siete subcultivos (Figura 1), en los subcultivos siguientes el coeficiente de multiplicación disminuye.

### Fase de enraizamiento

Según los resultados de García-Ramírez *et al.* (2010) la fase de enraizamiento debe realizarse en dos etapas, en la primera de ellas debe adicionarse al medio de cultivo Thidiazurón (TDZ) y posteriormente se transfieren las plantas a otro medio de cultivo que contiene ácido indolbutírico (AIA). El mayor porcentaje de plantas con raíces (88.0%) se obtuvo en el tratamiento en el cual se empleó 0.6 mg l<sup>-1</sup> de TDZ. En este mismo tratamiento las plantas alcanzaron 6.96 cm de altura.

En la figura 1 se muestra el aspecto de las plantas al concluir la etapa 2 de la fase de enraizamiento.

### Fase de aclimatización de plantas propagadas *in vitro*

En casa de cultivo se diseñaron los experimentos en función de lograr la aclimatización de las plantas multiplicadas *in vitro* y favorecer la emisión de nuevos brotes para su posterior deshije, sobre este tema profundizan las investigaciones realizadas por Hurtado (2010).

Los resultados mostraron que la altura de las plantas al concluir la fase de enraizamiento fue la característica que más influyó en su aclimatización, Las mayores de 3.0 cm de altura fueron las que mostraron un mejor desarrollo morfológico y anatómico (Hurtado, 2010). Además, se determinó que la combinación de los sustratos humus de lombriz y zeolita proporcionaron a las plantas cultivadas *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris* las mejores condiciones para su desarrollo durante la fase de aclimatización y emisión de nuevos brotes (Figura 1). Bajo estas condiciones las plantas fueron capaces de emitir un promedio de 3.5 brotes/planta.

De forma general, las investigaciones realizadas brindan nuevos aportes al estudio de la aclimatización y la anatomía de esta especie siendo los primeros sobre la aclimatización de plantas de *B. vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl y la caracterización del desarrollo alcanzado por las plantas durante el intervalo del cultivo *in vitro* a la etapa de campo. Igualmente los estudios realizados sobre sustrato, la aplicación de fertilizantes para la obtención de nuevos brotes por planta y la multiplicación vegetativa de las plantas aclimatizadas procedentes del cultivo *in vitro* constituyen los primeros informes.

## PROPAGACIÓN EMPLEANDO TÉCNICAS TRADICIONALES

### Propagación vegetativa

El segundo sistema de propagación desarrollado se basó en la propagación vegetativa empleando secciones de tallos y riendas.

De forma general, las investigaciones realizadas brindan nuevos aportes al estudio de la aclimatización y la anatomía de esta especie siendo los primeros sobre la aclimatización de plantas de *B. vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl y la caracterización del desarrollo alcanzado por las plantas durante el intervalo del cultivo *in vitro* a la etapa de campo. Igualmente los estudios realizados sobre sustrato, la aplicación de fertilizantes para la obtención de nuevos brotes por planta y la multiplicación vegetativa de las plantas aclimatizadas procedentes del cultivo *in vitro* constituyen los primeros informes.



Figura 1. Propagación *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris*. Arriba: características de las plantas de al emplear medios de cultivo en estado líquido (izquierda) y semisólido (derecha) durante la fase de establecimiento. Abajo izquierda: brotes en fase de multiplicación luego de 20 días en medio de cultivo líquido. Abajo centro: brotes en fase de enraizamiento con emisión de raíces a los 20 días de cultivo (Etapa 2). Abajo derecha: emisión de nuevos brotes durante la fase de aclimatización luego de aplicar nitrato de potasio y sulfato de amonio.

## PROPAGACIÓN EMPLEANDO TÉCNICAS TRADICIONALES

### Propagación vegetativa

El segundo sistema de propagación desarrollado se basó en la propagación vegetativa empleando secciones de tallos y riendas.

Se evaluó la influencia del diámetro de las estacas en la brotación de las yemas y su relación con la dinámica de crecimiento de las yemas brotadas. Para ello se emplearon secciones de tallos de diámetros entre 1.0 cm y 3.0 cm. Se estudió el tipo y momento adecuado para realizar la fertilización, la influencia de la inmersión de las estacas en una solución enraizadora (12 mg l<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA), 12 mg l<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB) y 12 mg l<sup>-1</sup> de AIA) antes de la siembra y luego de la brotación de las yemas (Figura 2). Las plantas obtenidas fueron deshijadas y se incluye esta labor en condiciones de casa de cultivo o vivero como una vía para incrementar la población del germoplasma obtenido. Al emplear para la propagación secciones de tallos con un diámetro mayor de un centímetro se logró la brotación de las yemas y emisión de raíces en el 69.9% de las secciones de tallos. Al emplear los brotes obtenidos en la multiplicación de los explantes, se logró aumentar los niveles de supervivencia a un 92.3% (Gallardo *et al.*, 2008).

## COMBINACIÓN DE TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS Y TRADICIONALES

De la brotación de las yemas existentes en las secciones de tallos o riendas se obtienen entre 1 y 4 plantas (dependiendo de la especie) y habitualmente, estas son plantadas directamente en campo. Sin embargo, las investigaciones realizadas demuestran que es posible independizar estas plantas y someterlas a un proceso continuo de deshije (León *et al.*, 2010). Esta alternativa puede aplicarse en condiciones de casa de cultivo o vivero pues los requerimientos son mínimos. Con esta propuesta los viveristas no se ven obligados a ir continuamente al campo a buscar explantes, lo que disminuye costos, humaniza la tarea y minimiza el impacto ambiental del hombre al no dañar los plantones.

De esta forma tanto las plantas multiplicadas *in vitro* y aclimatizadas como las plantas obtenidas de la brotación de las yemas de tallos y riendas pueden ser sometidas a un proceso de deshije.

Las plantas propagadas *in vitro* fueron capaces de emitir entre cuatro y siete nuevos hijos con altos porcentajes (97.4%) de supervivencia durante los deshijos. Los resultados posibilitan emplear estrategias de trabajo de desarrollo local en las que los campesinos accedan a los productos de las altas tecnologías. Los resultados

permitieron confeccionar un manual para la propagación de los bambúes. Este se ha empleado en las capacitaciones a los viveristas de varias provincias del país (Figura 2).

A partir de los resultados de los estudios realizados se confeccionaron dos instructivos técnicos, uno de ellos específicamente para la especie *Guadua angustifolia* debido a las dificultades que tiene esta especie para la emisión de raíces y el segundo instructivo referido a la propagación de la especie *B. vulgaris* aunque puede ser aplicado a otras especies de bambúes.

Un enfoque holístico para la propagación de los bambúes está dado por la combinación de

técnicas biotecnológicas y tradicionales para la propagación de diferentes especies de bambú. La propuesta no absolutiza en la propagación *in vitro* como única vía de propagación puesto que se ofrecen tres opciones (Figura 3): 1) La producción de cantidades mínimas de plantas en el laboratorio. 2) La propagación mediante el método de propagación vegetativa empleando secciones de riendas y tallos. 3) El deshije de plantas provenientes de ambos medios de propagación. Esta propuesta permite poner en manos de los productores plantas de alto valor agregado, proteger el ambiente y las plantaciones de bambúes ya existentes, además de aumentar los ingresos de los viveristas.



Figura 2. Brote de *Guadua angustifolia* Kunth emitiendo raíces a los 35 días de cultivo (izquierda). Actividad de capacitación a los productores para mostrar la forma de realizar la multiplicación vegetativa de plantas de bambú (derecha).

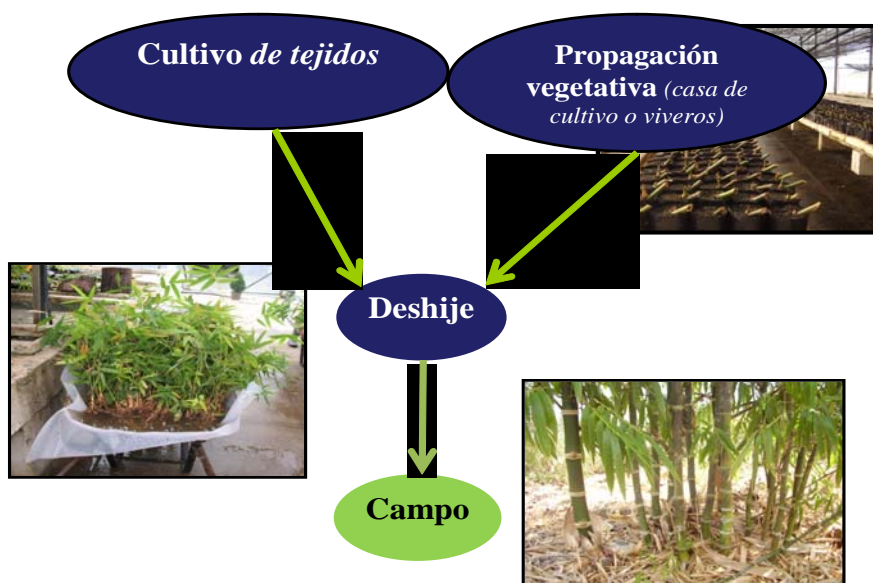


Figura 3. Estrategia para la propagación de bambúes en Cuba.

## CONCLUSIONES

El empleo de yemas axilares como explantes iniciales, medios de cultivos líquidos y concentraciones y tipos adecuados de reguladores del crecimiento posibilitaron establecer un protocolo de propagación *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* y *G. angustifolia* que generaron plantas de calidad.

Además, se demostró que es posible realizar la multiplicación vegetativa de estas plantas mediante el deshije de las plantas obtenidas *in vitro* y aclimatizadas, provenientes de la propagación vegetativa.

## AGRADECIMIENTOS

A facilidades creadas por el proyecto Bambú-Biomasa II, financiado por COSUDE

*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

- Cruz-Martín M, Yudith García-Ramírez, Cynthia Sánchez-García, Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Berkis Roque, Michel Leiva-Mora, Marisol Freire-Seijo (2007) Identificación y control de *Bacillus* sp., contaminante del establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. Biotecnología vegetal 7 (1): 09-13
- Fajardo Rosabal L (2006) Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Guadua angustifolia* Kunt. Tesis presentada para optar por el grado académico de Master en Biotecnología Vegetal. IBP. UCLV. Sta Clara
- Fajardo, L (2006). Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Guadua angustifolia* Kunt. Tesis para aspirar por el grado científico Magíster Scientiae en Biotecnología Vegetal. UCLV. IBP. Santa Clara. 73p.
- Gallardo, J, Marisol Freire-Seijo, Yudith García-Ramírez, Zaida Pérez, Milagros González, J León (2008) Comportamiento en la brotación de las yemas de estacas de *Guadua angustifolia* Kunth empleadas en la propagación. Cultivos Tropicales 29 (1) 17-22
- García-Ramírez, Y, M Freire-Seijo, Blanca Rosa Pérez, Ortelio Hurtado (2010b) 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. Biotecnología Vegetal 10 (2): 113-119
- García-Ramírez, Y, M Freire-Seijo, Blanca Rosa Pérez, Ortelio Hurtado (2010a) Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl. en diferentes épocas del año. Biotecnología Vegetal 10 (3): 151 – 156
- Hurtado, O (2010) Aclimatización y multiplicación vegetativa en casas de cultivo de plantas cultivadas *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl. Tesis presentada para optar por el grado académico de Master en Biotecnología Vegetal, IBP. UCLV. Sta Clara
- 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
- León, M, Freiré M, Suárez M (2010) Propagación vegetativa de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J.C. Wendl. Instructivo técnico No. 001-2010. IBP, Santa Clara
- López, A, AE Pouyu, L Catusus (1989) El endemismo de la Familia *Poaceae* en Cuba Acta Bot. Cubana 82:1-11
- Mayra Acosta-Suárez, Yelenys Alvarado-Capó, Mileidy Cruz-Martín, Berkis Roque, Cynthia Sánchez-García, Michel Leiva-Mora, Marisol Freire-Seijo, Yudith García-Ramírez, Zaida Pérez, Teresa Salabarría, Marisol Tejeda, Milagros González, Ortelio Hurtado (2008) Micobiota de plantas donadoras y contaminantes fúngicos del establecimiento *in vitro* de especies de bambúes. Biotecnología Vegetal. 8:(1): 57-61
- Morán Gutierrez, P (2008) Implementación de técnicas de aclimatización para plantas micropropagadas de *Vitis vinifera* L.) y portainjerto de cerezo (*Prunus cerasus* x *P. canescens*) [En línea] en: [http://ucv.altavoz.net/prontus\\_unidacad/site/artic/20080123/asocfile/20080123110221/moran\\_paola.pdf](http://ucv.altavoz.net/prontus_unidacad/site/artic/20080123/asocfile/20080123110221/moran_paola.pdf)
- Prutpongse P, Gavinlertvatana P (1992) *In vitro* propagation of 54 species from 15 genera of bamboo. Hort. Sci. 27: 453–454
- 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
- Saxena, S (1990) *In vitro* propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. Plant Cell Rep. 9: 431–434
- Saxena, S, Dhawan V (1999) Regeneration and large-scale propagation of bamboo (*Dendrocalmus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. Plant Cell Rep 18: 438–444