

## Establecimiento *in vitro* de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl. en diferentes épocas del año

Y. García-Ramírez\*, M. Freire-Seijo, Blanca Rosa 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

La propagación convencional de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl se ve afectada por los bajos porcentajes de enraizamiento y la poca disponibilidad de propágulos. Estos elementos constituyen limitantes para la propagación masiva de bambúes. El cultivo de tejidos ofrece un medio rápido y confiable para desarrollar protocolos de propagación vía organogénesis directa a partir de yemas axilares. Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar la influencia de la época del año de la toma del explante inicial en el establecimiento *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris*. En cada mes, durante un año se realizaron dos establecimientos (24 en total). En cada uno de ellos se establecieron 100 yemas axilares. A los 20 días de cultivo se cuantificó el número de yemas brotadas y el número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles. Los resultados demostraron que la época del año influyó en el establecimiento *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris*. 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.

Palabras clave: bambú, cultivo de tejidos, supervivencia.

### ABSTRACT

Traditional propagation of *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* Schrad. ex Wendl is affected by low percentages of rooting and limited availability of propagules. These elements are handicaps for mass propagation of bamboos. Tissue culture offers a fast and reliable way to develop propagation protocols via organogenesis directly from axillary buds. The objective of this work was to determine the influence of the season to select the initial explant for the *in vitro* establishment. Two establishments were carried out each month during a whole year (24 at all). The number of buds sprouted and the number of explants free of visible microbial contaminants were quantified after 20 days of culture. Results showed that the season influenced on the *in vitro* establishment of *B. vulgaris* var. *vulgaris*. The highest numbers of buds sprouted (99%) and explants free visible of microbial contaminants (98%) was achieved between January to April and November-December.

Keywords: bamboo, tissue culture, survival

### INTRODUCCIÓN

Los bambúes son originarios de Asia y presentan diversidad en cuanto a especies y tamaño (Li, 2006). Son Poáceas de amplia distribución en el mundo desde el continente asiático hasta el americano.

Dentro de los bambúes el género *Bambusa* se destaca por su gran importancia desde el punto de vista medioambiental y tiene especies de gran interés económico como *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J.C. Wendl., conocido como bambú común o simplemente bambú. Es un tipo de bambú alto, sin espinas que forma macizos que comparten rizomas. La especie sobresale dentro del género por sus propiedades físico - mecánicas y por el tamaño

de sus culmos que alcanzan hasta 20 metros de altura y 15 centímetros de diámetro. Originaria del Viejo Mundo, probablemente del Asia tropical. Es el bambú más cultivado en el trópico y en el subtrópico, en la rivera de los ríos y como planta ornamental en las ciudades. En América, *B. vulgaris* se ha adaptado a diversos tipos de suelos y de climas, desde México hasta Uruguay, e Islas del Caribe (Das *et al.*, 2008).

La propagación vegetativa de esta especie se dificulta debido a lo caro y engorroso de los métodos, además de la poca disponibilidad de material vegetal (Reddy y Yekanthappa, 1989). Estos elementos constituyen limitantes para la propagación masiva de bambúes (Koshy y Gopakumar, 2005). En este sentido, la

micropropagación, constituye una alternativa para la propagación *in vitro* de *B. vulgaris* var *vulgaris* a partir de yemas axilares (Sood *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2006; Ramanayake *et al.*, 2006). En la literatura científica, la mayoría de los resultados describen protocolos principalmente para *Bambusa tulda* Roxb, *Bambusa oldhamii* Munro y *Bambusa vulgaris* var. *vittata* (Kalia *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2003, 2004) y *Dendrocalamus* sp. (Ramanayake *et al.*, 2001; Sood y Ahuja, 2002).

A pesar que se han desarrollado protocolos para la propagación *in vitro* en varias especies de bambúes todavía persisten serias limitantes como la alta tasa de contaminación microbiana y la presencia de fenoles que han afectado el establecimiento *in vitro* en varias especies (Ramanayake *et al.*, 2006).

En la búsqueda de posibles soluciones se han estudiado y puesto en práctica alternativas para disminuir los altos porcentajes de contaminación. En este sentido, autores como Das y Pal (2005) han evaluado la influencia de la época de siembra y el manejo de los explantes durante el establecimiento *in vitro* de *B. balcooa*.

Por todo lo antes planteado la presente investigación se desarrolló con el objetivo de determinar la influencia de la época del año en el establecimiento *in vitro* *B. vulgaris* var. *vulgaris*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se creó un banco de plantas donantes de *B. vulgaris* var. *vulgaris* (Figura.1) partiendo de culmos y ramas seleccionadas en campo tal y como se recomienda en el Instructivo técnico para la Propagación vegetativa de *B. vulgaris* var. *vulgaris* (León *et al.*, 2010). Al banco de plantas donantes se le aplicaron dos fertilizaciones foliares semanales con fórmula completa (15:10:15:2) a razón de 2.0 g l<sup>-1</sup> y otra con Bayfolan Forte a razón de 1.5 ml l<sup>-1</sup>.

Antes de seleccionar las yemas axilares para su establecimiento *in vitro* se aplicó durante diez días y de manera alterna cada dos días Fundazol (3.0 g l<sup>-1</sup>), Silvacur y Oxicloruro de cobre (1.5 ml l<sup>-1</sup>+3.0 g l<sup>-1</sup>) y Mancozeb (3.0 g l<sup>-1</sup>).

### Establecimiento *in vitro*

Las yemas axilares se seleccionaron cuidadosamente teniendo en cuenta el grosor del tallo y el desarrollo de la yema axilar. Para el corte de las yemas se empleó tijera de poda. El corte fue realizado a 1.5 cm por encima y por debajo de la yema axilar e inmediatamente fueron colocadas en frascos de cultivo tapados para su traslado al laboratorio. El proceso de desinfección se realizó según el protocolo descrito por García-Ramírez *et al.* (2007) para *Bambusa vulgaris* var. *vittata*.



Figura 1. Banco de plantas donantes de *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* en casa de cultivo.

En cada mes, durante un año (2009) se realizaron dos establecimientos (24 en total). En cada uno de ellos se establecieron 100 yemas axilares. El proceso de desinfección se realizó según el protocolo descrito por García-Ramírez *et al.* (2007) para *Bambusa vulgaris* var. *vittata*.

Para el establecimiento *in vitro* de las yemas axilares se empleó el medio de cultivo propuesto por Fajardo (2006) para esta misma fase de cultivo de la especie *Guadua angustifolia* que contenía sales MS (Murashige y Skoog, 1962), 2.5 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y Gelrite® (SIGMA) (2.5 g l<sup>-1</sup>).

Se emplearon tubos de ensayo (20.0 x 1.5 cm) con tapones de goma. A cada tubo de ensayo se le adicionaron 5.0 ml de medio de cultivo y en cada uno se colocó una yema axilar.

En cada establecimiento, a los 20 días de cultivo se cuantificó el número de yemas brotadas y el número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles para posteriormente calcular el porcentaje de ambas variables para cada mes del año.

Además, se incluyeron valores medios de los datos meteorológicos: humedad relativa (%), temperatura (°C) y precipitaciones (mm) del periodo analizado proporcionados por el Instituto Provincial de meteorología de Villa Clara.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se comprobó que tanto los porcentajes de brotación *in vitro* de las yemas axilares como los de contaminantes microbianos visibles en la fase de establecimiento *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris* variaron en los diferentes meses (Figura 1).

Durante los meses de enero-abril y noviembre-diciembre los porcentajes de yemas axilares brotadas fueron los más elevados durante el año, el porcentaje de explantes libres de contaminantes microbianos visibles, también fue elevado durante este período. Los meses antes mencionados coinciden con la estación seca para Cuba y noviembre-diciembre mostraron condiciones meteorológicas similares a esta época.

La temperatura media diaria, durante esta época, fue siempre inferior a 25°C, con precipitaciones muy escasas inferiores a los

10 mm. La humedad relativa en el mes de enero fue del 77% y disminuyó hasta 71% en el mes de abril. En sentido general esta época estuvo caracterizada por pocas precipitaciones y temperaturas frescas (Figura 1).

Todo lo contrario ocurrió durante los meses de mayo-octubre. El porcentaje de yemas axilares brotadas disminuyó hasta 65% en el mes de octubre. El desarrollo de los microorganismos se favoreció durante esta época lo cual trajo consigo que disminuyera el porcentaje de yemas axilares libres de contaminantes microbianos visibles hasta 14% en el mes de octubre (Figura 1).

De manera general hubo presencia tanto por contaminantes bacterianos como fúngicos, pero fueron estos últimos los que causaron más afectaciones. Acosta-Suárez *et al.* (2008) identificaron en plantas de *B. vulgaris* var. *vulgaris* cultivadas en casa de cultivo como principales fuentes de contaminantes fúngicos los géneros de *Botryotrichum*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* y *Nigrospora*. Estos microorganismos mesófilos ante temperaturas ambientales elevadas y precipitaciones frecuentes encuentran condiciones favorables para su desarrollo. Dichas condiciones estuvieron presentes en los meses de mayo a octubre, fecha que coincidió con los menores porcentajes de explantes libres de contaminantes microbianos visibles.

Agnihotri y Ansari (2000) y Gieles (2002) señalaron que en condiciones *in vitro* la contaminación microbiana constituye una limitante para el establecimiento *in vitro* de bambúes, la misma en gran medida está relacionada con el tipo de explante, época del año y las atenciones fitosanitarias realizadas al banco de plantas donantes, ya que en períodos de escasas precipitaciones los porcentajes de contaminantes microbianos visibles se reducen y se incrementa el número de explantes con yemas brotadas.

Autores como Ramanayake y Yakandawala (1997) y Arya *et al.* (2001) destacaron la correlación existente entre las precipitaciones, humedad relativa y temperatura en el incremento del número de explantes libres de contaminantes microbianos visibles y el número de explantes con yemas brotadas durante el establecimiento *in vitro* de *D. giganteus* y *D. asper*.

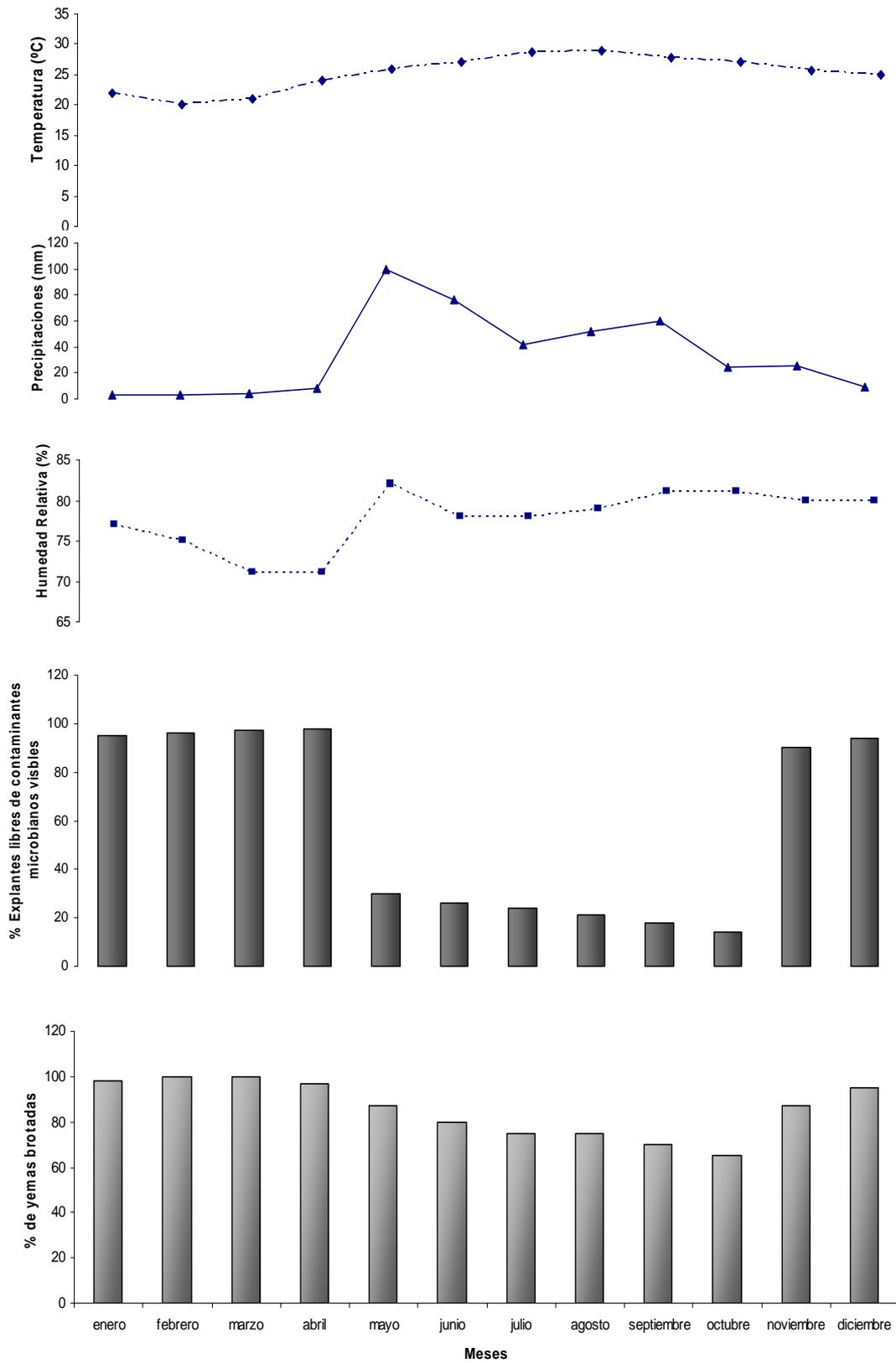


Figura 1. Porcentajes de brotación de yemas axilares y de yemas axilares libres de contaminantes microbianos visibles en el establecimiento *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris* durante un año (dos establecimientos mensuales, n=200). Se incluyen los valores medios de temperatura, humedad relativa y precipitaciones en cada uno de los meses analizados.

Los resultados permiten proponer los meses de enero-abril y noviembre-diciembre como el mejor período del año para realizar los establecimientos *in vitro* de las yemas axilares de plantas en casa de cultivo de *B. vulgaris* var. *vulgaris* para el municipio de Santa Clara.

## CONCLUSIONES

Se determinó que el establecimiento *in vitro* de *B. vulgaris* var. *vulgaris* varió según la época del año en que se colectaron los explantes iniciales (yemas axilares). 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.

Lograr establecer explantes de *B. vulgaris* var. *vulgaris* a través del estudio de la influencia de la época del año, resulta de gran interés ya que contribuye a disminuir la presencia de contaminantes microbianos visibles y permite obtener explantes de óptima calidad, siendo esta la base principal para la obtención de plantas. Esto le permite dar solución a unas de las principales problemáticas que afectan la propagación *in vitro* en varias especies de bambúes.

## REFERENCIAS

Acosta-Suárez, M, Alvarado-Capó Y, Cruz-Martín M, Roque B, Sánchez C, Leiva-Mora M, Freire-Seijo M, García Y, Pérez Z, Salabarría T, Tejada M, González M, Hurtado O (2008) Micobiota de plantas donadoras y contaminantes fúngicos del establecimiento *in vitro* de especies de bambúes. *Biotecnología Vegetal* 8: 57-61

Agnihotri, K, Ansari S (2000) Adventitious rhizogenesis in relation to seasonal variation, size of culm branch cuttings and IAA treatment in bamboos. *Indian For.* 126: 971–984

Arya, I, Satsangi R, Arya S (2001) Rapid micropropagation of edible bamboo *Dendrocalamus asper*. *J. Sus. For.* 14: 103–114

Das, M, Pal A (2005) *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 81:109–112

Das, M, Bhattacharya S, Singh P, Figueiras T, Pal A (2008) Bamboo Taxonomy and Diversity in the Era of Molecular Markers. *Advances in Botanical Research* 47: 225-267

Fajardo, L (2006) Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Guadua angustifolia* Kunt. Tesis para aspirar por el grado científico Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. UCLV. IBP. Santa Clara. 73p

García-Ramírez, Y, Freire-Seijo M, Fajardo L, Tejada M, Reyes M (2007) Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var. *Vittata*. *Biotecnología vegetal* 7(3):153-158

Gielis J, Peeters H, Gillis K, Oprins J, Debergh P (2001) Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. *Acta Horti* 552:195–203

Gielis, J, Oprins J (2002) Micropropagation of temperate and tropical woody bamboos from biotechnological dream to commercial reality. In *Bamboo for sustainable development. Proceedings of the Vth International Bamboo Congress and the VIth International Bamboo Workshop*, pp. 333–344. San José, Costa Rica

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

Kalia, S, Kalia R, Sharma S (2004) *In vitro* regeneration of an indigenous bamboo (*Bambusa nutans*) from internode and leaf explant. *J Bamboo Rattan* 3: 217–228

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 (2003) *In vitro* overing of *Bambusa edulis* and subsequent plantlet survival. *Plant Cell Tiss Org Cult* 72: 71–78

Lin, C, Lin C, Chang W (2004) Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and overing of bamboo *Bambusa edulis*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 76: 75–82

LI, D (2006) Taxonomy and biogeography of the *Bambuseae* (*Gramineae: Bambusoideae*). [En línea] En: <http://www.ipgri.cgiar.org/publications/HTMLPublication/572/ch11.htm>. (Consultado 24 de noviembre de 2007)

Londoño, X, Camayo G, Riaño N, López Y (2002) Characterization of the anatomy of *Guadua angustifolia* (*Poaceae: Bambusoideae*) culms. *J. Am. Bamboo Soc.* 16:18-31

Ramanayake, S, Yakandawala K (1997) Micropropagation of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) from nodal explants of field grown culms. *Plant Sci.* 129: 213–223

- Ramanayake, S, Wanniarachchi W, Tennakoon T (2001) Axillary shoot proliferation and *in vitro* rooting in an adult giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37: 667–671
- 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
- Reddy, Y, Yekanthappa A (1989) Propagation technique of *Oxytenanthera stocksii*. *Myforest* 25:30–32
- Saxena, S, Dhawan V (2004) Commercialization of bamboo tissue culture: potentials and constraints. En: Singh, HP, Dadlani, NK (Eds.), Abstracts, VIIIth World Bamboo Congress (pp101). VIIIth World Bamboo Congress, New Delhi, India
- 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