

Efecto del tiempo de inmersión sobre la multiplicación *in vitro* de *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland en SIT RITA®

Mallelyn González González¹, Yudith García-Ramírez^{2*}, Elisa Quiala², Mariana La O², Berkis Roque², Eilyn Mena², Ortelio Hurtado², Marisol Freire-Seijo². *Autora para correspondencia.

¹Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

²Instituto 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

Los SIT permiten dar solución a las limitantes que afectan la propagación *in vitro* de bambúes e incrementan la calidad de las plantas propagadas *in vitro* y la supervivencia de estas en condiciones de casa de cultivo y campo. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del tiempo de inmersión sobre la multiplicación de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en SIT (RITA). Para ello, se analizaron un grupo de variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas como el número de brotes por planta, la longitud de los brotes, el número de hojas por brotes y los contenidos de agua, fenoles y lignina. Se demostró que el tiempo de inmersión influyó en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*. Los explantes tratados con un minuto de inmersión desarrollaron un mayor número de brotes (5). Estos brotes presentaron coloración verde oscura, 92.1% de agua y 13% de lignina. Sin embargo, el incremento del tiempo de inmersión a tres minutos causó aumento en el contenido de agua de los brotes y disminución del contenido de lignina, lo que afectó su respuesta morfológica y su multiplicación en los SIT (RITA). El análisis de variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, permitió definir que un minuto es el tiempo óptimo de inmersión para la multiplicación de brotes de *B. vulgaris* en sistemas de inmersión temporal (RITA). El procedimiento de multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris* descrito ofrece la ventaja de utilizar medios de cultivo líquidos y sistemas automatizados.

Palabras clave: bambú, multiplicación *in vitro*, variables morfológicas, sistemas de inmersión temporal

Effect of immersion time on *in vitro* multiplication of *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland in RITA® TIS

ABSTRACT

The TIS provides solutions to the constraints that affecting *in vitro* propagation of bamboos and increases the quality of the plants *in vitro* propagated and survival of these in greenhouse conditions and field. This study aimed to determine the effect of immersion time on the multiplication of *B. vulgaris* shoot grown in TIS (RITA). Morphological, physiological and biochemical variables such as the number of shoots per plant, length of shoots, number of leaves per shoot, water contents, and lignin phenols were analyzed. It was demonstrated that the immersion time influenced the *in vitro* multiplication of *B. vulgaris*. The explants treated with the immersion time of a minute developed a greater number of shoots (5). These shoots showed dark green coloration, 92.1% water and 13% lignin. However, the increase of immersion time to three minutes caused increase in the water content of shoots and decreased lignin content, which affected their morphological response and multiplication in the TIS (RITA). Analysis of morphological, physiological and biochemical variables, allowed defining one minute is the optimum immersion time for shoot multiplication of *B. vulgaris* in temporary immersion systems (RITA). The method of *in vitro* propagation of *B. vulgaris* described offers the advantage of using liquid culture media and automated systems.

Key words: bamboo, *in vitro* multiplication, morphological variables, temporal immersion systems

INTRODUCCION

Bambusa vulgaris Schrader ex Wendland (*B. vulgaris*) es una especie eficaz en la protección de los suelos y la conservación de las aguas (Lárraga-Sánchez, 2011).

Sin embargo, su aprovechamiento comercial a través de la propagación vegetativa se dificulta debido a la poca disponibilidad del material vegetal. Por todo esto, los métodos tradicionales empleados por los viveristas en Cuba para la propagación de los bambúes, son

ineficientes, trabajosos y económicamente desfavorables (Catasús, 2003).

En consecuencia, se han desarrollado varios protocolos de regeneración de plantas vía organogénesis de *B. vulgaris* con el empleo de medios de cultivo semisólidos (Ndiaye *et al.*, 2006). No obstante, las bajas tasas de multiplicación y enraizamiento *in vitro*, además de los bajos porcentajes de supervivencia *ex vitro* obtenidos en estas investigaciones han impedido su aplicación a escala comercial. Para dar solución a dicha problemática se han empleado los medios de cultivo líquidos, lo cual permite reducir los costos de producción y facilita la automatización durante el proceso de propagación *in vitro* en bambúes (Ramanayake *et al.*, 2006). En este sentido, han sido ensayadas diversas alternativas con el objetivo de incrementar el número de plantas *in vitro* de *B. vulgaris*, para satisfacer las demandas en el sector forestal, a través del empleo de los Sistemas de inmersión temporal (SIT) (Holst, 2010).

Los SIT se han utilizado para la multiplicación *in vitro* de varias especies: *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. (Quiala *et al.*, 2006), *Oryza sativa* L. (Sánchez, 2012), *Saccharum* spp. (Arencibia *et al.*, 2012). En los bambúes aunque son escasas las referencias en la literatura científica consultada el empleo de sistemas de inmersión temporal se ha descrito para *Guadua angustifolia* Kunth (Holst, 2010), *Dendrocalamus latiflorus* Munro (Mongkolsook *et al.*, 2005) y *Bambusa ventricosa* McClure (Chaille, 2011).

Los SIT permitirán dar solución a las limitantes que han afectado la propagación *in vitro* de bambúes e incrementar la calidad de las plantas propagadas *in vitro* para mejorar la supervivencia de estas en condiciones de casa de cultivo y posteriormente en campo. En adición, aumentar la eficiencia de la propagación masiva bambúes contribuirá a la conservación de la biodiversidad, a partir de su implementación en los proyectos de reforestación. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del tiempo de inmersión sobre la multiplicación de brotes de *Bambusa vulgaris* en SIT.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistemas de inmersión temporal (SIT)

Para la multiplicación de brotes de *B. vulgaris* se utilizó el SIT (RITA) descrito por Teisson *et al.* (1996). Este sistema RITA consta de dos frascos de 250 ml de capacidad, uno superior en el que se coloca el material vegetal y uno inferior en el que se almacena el medio de cultivo (Figura 1). Dirigido por un temporizador o autómata, se aplica presión de aire filtrado en el compartimento inferior. Este aire empuja el medio de cultivo hacia el compartimento superior. El material vegetal se mantiene inmerso en el medio de cultivo líquido durante el tiempo que la presión es aplicada. Durante el período de inmersión el aire es insuflado, a través del medio de cultivo líquido y renueva la atmósfera dentro del frasco de cultivo. La presión en exceso escapa a través de filtros en la parte superior de los frascos RITA.



Figura 1. Sistema de inmersión temporal RITA empleado en la multiplicación de *B. vulgaris*.



Figura 2. Explantes de *B. vulgaris* empleados en la multiplicación *in vitro* en medio de cultivo líquido estático.

Material vegetal

Como material vegetal, se emplearon brotes establecidos (20 días de cultivo, 6.0 cm de altura) a partir de yemas axilares según lo descrito por García-Ramírez *et al.* (2010) para esta especie en un medio de cultivo líquido estático (Figura 2).

Efecto del tiempo de inmersión

Se colocaron cuatro explantes en el frasco superior de los SIT RITA. Se estudiaron dos tiempos de inmersión (uno y tres minutos), con una frecuencia de inmersión de 6 horas (4 inmersiones/24 h). Se utilizaron cinco frascos por tratamiento y en el frasco inferior de cada sistema se adicionó 225 ml de medio de cultivo de multiplicación. El medio de cultivo de multiplicación, contenía sales inorgánicas Murashige y Skoog (1962) (MS), mio-inositol (100 mg l⁻¹), sacarosa (30 g l⁻¹) y 6-BAP (3.0 mg l⁻¹).

Basados en resultados preliminares, se realizaron renovaciones de medio de cultivo, cada 10 días. A los 30 días de cultivo se emplearon diferentes variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas para caracterizar las plantas. Se evaluaron 20 brotes por tratamiento.

Caracterización morfológica

Las características morfológicas de las plantas se describieron. Además, se cuantificó el

número de brotes por explante y el número de hojas expandidas por cada explante, así como se midió la longitud del brote principal (cm) desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja.

Contenido de agua (CA)

Los brotes provenientes de cada tratamiento, se enjuagaron con agua destilada y se secaron con papel de filtro. Se determinó su masa fresca (g) (MF) con el empleo de una balanza analítica Sartorius®. Después de su pesaje, los brotes fueron depositados en bolsas de papel y se colocaron en una incubadora Sakura® a 60 °C. El material vegetal se pesó diariamente hasta que su peso se mantuvo constante. Se determinó su masa seca (g) (MS) y se calculó el contenido de agua (CA) en porcentaje, con la utilización de la fórmula descrita por Bandyopadhyay *et al.* (2004): $CA\% = (MF - MS) / MF \times 100$.

Contenido de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó según el procedimiento descrito por Tuberioso *et al.* (2009), con modificaciones. Para determinar el contenido de fenoles totales se empleó el segundo par de hojas de los brotes multiplicados *in vitro*. Las muestras (0.5 g) se homogenizaron en nitrógeno líquido, con empleo de morteros y pistilos preenfriados, se mezclaron con 5 ml de etanol al 80%, se calentaron a 50°C por 30 min. La mezcla se

centrifugó a 8 000 g por 10 min. Se colectó una alícuota de 1.0 ml de sobrenadante y se enrasó hasta 3 ml con agua bidestilada, se agregó 1.0 ml de reactivo de Folin Ciocalteu 1N (Merck, Alemania) y se dejó reposar durante 5 min, posteriormente se le añadieron 2.0 ml de carbonato de sodio al 20%. Las muestras se calentaron en baño María con agua a punto de ebullición y se enfriaron en agua potabilizada corriente. La solución se enrasó a 10 ml con agua bidestilada y se dejó reposar durante 30 min. La densidad del color azul se midió a una absorbancia de 750 nm en espectrofotómetro UV-visible (Genesys 6, Thermo Electron Corporation, USA). Como solución blanco se utilizó 1.0 ml de etanol al 80%.

El contenido de fenoles totales se determinó mediante extrapolación en una curva de calibración con el empleo de ácido gálico (AG) como patrón a concentraciones en el rango de 100 a 400 mg y se expresó en mg equivalentes de AG por gramo de masa fresca (mg EAG gMF⁻¹).

Contenido de lignina

El contenido de lignina se determinó con la utilización del procedimiento descrito por Kirk y Obst (1988). Se colectó el segundo par de hojas de los brotes multiplicados *in vitro* y se tomó una muestra de 300 mg de masa fresca obtenida de la homogenización en nitrógeno líquido.

Las muestras se lavaron en metanol (1.0 ml) y fueron secadas en una campana de extracción, este proceso se repitió tres veces. De cada

muestra se tomaron 200 mg y se hidrolizaron en 4.0 ml de H₂SO₄ al 72 % (v/v) a 30°C durante 1 hora. A las muestras hidrolizadas se le adicionaron 112 ml de agua bidestilada y se colocaron en una autoclave a 121°C y 1.2 atm, durante 1 hora. Con empleo de papel de filtro se colectó el material sólido de cada muestra, el que fue lavado con agua bidestilada y secado en una campana de extracción. Posteriormente las muestras secas se pesaron en una balanza analítica Sartorius® y se determinó el porcentaje de residuos de la pared celular con respecto a los 200 mg iniciales para cada muestra. El porcentaje de residuos de la pared celular se expresó como contenido de lignina.

Las diferencias entre los valores obtenidos fueron determinadas mediante la prueba estadística no paramétrica *Mann-Whitney*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza, utilizando el paquete estadístico PASW Statistics versión 18.0 sobre Windows

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tiempo de inmersión influyó en la multiplicación *in vitro* de los brotes de *B. vulgaris* cultivados en los SIT, durante 30 días. Los explantes tratados con un minuto de inmersión desarrollaron varios brotes de coloración verde oscuro y hojas expandidas (Figura 3 a). Sin embargo, los brotes obtenidos en el tratamiento con tres minutos de inmersión, a partir del séptimo día de cultivo, mostraron síntomas de clorosis y a los 30 días gran parte de su tejido estaba necrótico (Figura 3 b).



Figura 3. Brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA) durante 30 días. a) un minuto de inmersión y b) tres minutos de inmersión.

Tabla 1. Influencia del tiempo de inmersión en sobre brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA).

Variables	Tiempo de Inmersión (minutos)			
	1		3	
	Media	RM	Media	RM
Número de brotes/explante	5.0	13.50 a	3.6	7.50 b
Longitud de los brotes (cm)	10.1	14.95 a	7.8	6.05 b
Número de hojas/brote	18.5	15.50 a	5.5	5.50 b

Rangos Medios (RM) con letras diferentes dentro de una misma fila, difieren significativamente ($p < 0.05$) según Mann-Whitney.

Tabla 2. Influencia del tiempo de inmersión sobre variables fisiológicas y bioquímicas en brotes de *B. vulgaris* cultivados en sistema de inmersión temporal (RITA).

Variables	Tiempo de Inmersión (minutos)			
	1		3	
	Media	RM	Media	RM
Contenido de agua (%)	92.1	5.50 b	93.9	35.5 a
Fenoles totales (mg EAG g ⁻¹ MS)	49.1	35.5 a	19.4	15.5 b
Contenido de lignina (%)	13.1	35.5 a	11.0	15.5 b

EGA g⁻¹MS: mg equivalentes de ácido gálico por gramo de masa fresca. Rangos Medios (RM) con letras diferentes dentro de una misma fila, difieren significativamente ($p < 0.05$) según Mann-Whitney.

Se observaron diferencias significativas en los valores de las variables evaluadas en los explantes de *B. vulgaris* multiplicados en SIT con diferentes tiempos de inmersión (Tabla 1). El número de brotes por explante, la longitud de los brotes y el número de hojas por brote fueron significativamente superiores en los explantes inmersos en el medio de cultivo durante un minuto (Tabla 1).

La multiplicación de brotes de *B. vulgaris* en SIT fue favorecida por el empleo de cortos períodos de inmersión (1 min), sin embargo, la respuesta morfológica de los brotes se afectó cuando el tiempo de inmersión se extendió a 3 min. Esto puede deberse a la influencia de factores como las relaciones hídricas, el intercambio gaseoso y el incremento en la toma de nutrientes (Quiala *et al.*, 2012). Es conocido que los tiempos de inmersión prolongados afectan el intercambio gaseoso y por ende el desarrollo de los explantes, ya que aumenta la posibilidad de hiperhidratación de los tejidos (Sánchez, 2012).

Resultados similares fueron obtenidos en *Dendrocalamus latiflorus* (Mongkolsook *et al.*,

2005) y *Bambusa ventricosa* McClure (Chaille, 2011), independientemente de las diferencias entre los genotipos las inmersiones durante un minuto beneficiaron la multiplicación de los brotes en SIT.

Se comprobó, además, que el tiempo de inmersión influyó sobre la respuesta fisiológica de los brotes de *B. vulgaris* multiplicados en los SIT (RITA). El aumento del tiempo de inmersión a tres minutos provocó un incremento en 1.8% del contenido de agua en el tejido de los brotes (Tabla 2). Sin embargo, el contenido de fenoles totales y de lignina fueron significativamente superiores en los brotes cultivados en SIT con un minuto de inmersión (Tabla 2).

Extender el tiempo de inmersión en los SIT a tres minutos, pudo haber disminuido la concentración de O₂ en el frasco y provocar condiciones primeramente de hipoxia y después de anoxia (carencia de oxígeno). La falta de oxígeno bloquea la actividad del ciclo de los ácidos tricarbónicos y de la respiración, con lo que la producción de ATP y la

regeneración de NAD⁺, NADP⁺ se detienen y el estado energético de las células se reduce. La falta de ATP inhibe el transporte activo de H⁺ hacia la vacuola, ya que la actividad ATPasa de tonoplasto se bloquea y el citoplasma se acidifica irreversiblemente. Como consecuencia, se detiene el metabolismo de las células y por tanto el transporte de los nutrientes. Esta deficiencia de oxígeno, provoca la paralización del crecimiento, la epinastia de las hojas, el cierre de los estomas y bloqueo de la fotosíntesis y la respiración (Azcón-Bieto *et al.*, 2008).

La necrosis observada en los brotes pudo estar relacionada con un estrés oxidativo, debido a que la tasa de respiración del tejido pudo ser afectada por la prolongación del tiempo de inmersión a tres minutos. Esta afectación de la respiración puede incrementar la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y la peroxidación de lípidos lo que induce hiperhidricidad y estrés oxidativo provocando mortalidad del tejido (Martre *et al.*, 2001).

Aparte del oscurecimiento de explantes, el estrés oxidativo se ha relacionado con el desencadenamiento de otros desórdenes fisiológicos, morfológicos, epigenéticos y genéticos que ocurren en los explantes cultivados, tales como recalcitrancia, hiperhidricidad y variación somaclonal. También puede influir el potencial osmótico del medio de cultivo, el cual puede aumentar o inhibir la biosíntesis de compuestos fenólicos, su difusión y oxidación (Azofeifa, 2009).

La oxidación del tejido y el grado de inhibición del crecimiento en el explante son muy dependientes del genotipo. Muchas veces se encuentran diferencias entre especies del mismo género (Huang *et al.* 2009) e incluso cultivares de una misma especie.

El contenido de lignina en los brotes, también decreció, a medida que se aumentó el tiempo de inmersión (Tabla 2), lo cual pudo haber influido en los cambios morfológicos antes mencionados.

Resultados similares fueron obtenidos por Sánchez (2012) y Quiala *et al.* (2012) en otras especies cultivadas en SIT. Estos autores indicaron que la pérdida del contenido de lignina estuvo relacionada con cambios morfológicos

en los brotes y el grado de hiperhidricidad de estos, lo cual puede estar influenciado por el tiempo de exposición de los explantes al medio de cultivo líquido o por condiciones de hipoxia en los tejidos, causado por el incremento del tiempo de inmersión.

Las condiciones de cultivo en SIT pueden afectar el crecimiento de las plantas *in vitro* y su estado fisiológico, a través de cambios en el medio ambiente *in vitro* durante todo el período de cultivo, debido a las interacciones entre cada componente de las condiciones de cultivo y el crecimiento de las plantas (Quiala *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

Mediante el análisis de variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas se logró diferenciar el efecto de dos tiempos de inmersión en la respuesta de brotes de *B. vulgaris* multiplicados en SIT. El tiempo de inmersión de un minuto favoreció la multiplicación de los brotes en sistemas de inmersión temporal (RITA). El procedimiento descrito en este estudio es aplicable para la multiplicación de *B. vulgaris* en medios de cultivo líquidos y sistemas automatizados.

REFERENCIAS

- Arencibia, A, Bernal A, Cortegaza R (2012) Regulating Gene Expression in High-scale Plants Micropropagation. Journal of Plant Sciences 6: 213-224
- Azcón-Bieto, J, Tolón M (2008) Fundamentos de Fisiología Vegetal. 2da edición. Mc Graw Hill Interamericana de España S.A.U. Madrid
- Azofeifa, A (2009) Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía Mesoamericana 20:153-175
- Cátasus, L (2003) Estudio de los bambúes arborescentes cultivados en Cuba. ACTAF. Cuba
- Chaille, Lee C (2011) Optimizacion of tissue culture protocols for cost_effective production of Dracaena, Bamboo, and succulent plants
- García-Ramírez, Y, Freire-Seijo M, Blanca Rosa Pérez, Hurtado O (2010) 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* Schrad. ex Wendl. Biotecnología Vegetal. 10(2):113 – 119

- Holst, A (2010) Efecto del sistema de inmersión temporal (RITA®) sobre el desarrollo de plántulas *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae: Bambusoideae) y su posterior aclimatación. Tesis presentada para optar por el grado académico de Licenciado en Ingeniería Agronómica. Universidad de Costa Rica, San José. 52p
- Huang, LC, Lee YL, Huang BL, Kuo CI, Shaw JF (2009) High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in bamboo tissue culture. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 38 (4): 358 – 365
- Kirk T and Obst J (1988) Lignin determination. *Methods Enzymol.* (161): 87-101
- Lárraga-Sánchez, N (2011) Propagación *in vitro* y convencional de tres especies de Bambú. Tesis de Maestría. (Página web en línea) Disponible en: <http://hdl.handle.net/10521/538>
- Martre, P, Lacan D, Just D, Teisson C (2001) Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 67:25–35
- Mongkolsook, Y, Tanasom M, Sumkaew R, Likitthammanit P, Wongwean P (2005) Temporary Immersion System (TIS) for Micropropagation of *Dendrocalamus latiflorus* in Commercial Production. Kasetsart Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
- Ndiaye, A, Mamadou S, Niang D, Gassama-Dia Y (2006) *In vitro* regeneration of adult trees of *Bambusa vulgaris*. *African Journal of Biotechnology.* 5 (13): 1245-1248
- Quiala, E, Barbón R, Jiménez E, de Fera M, Chávez M, Capote A, Pérez N (2006) Biomass production of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, a medicinal plant, in temporary immersion system. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 298–300
- Quiala, E, Cañal MJ, Meijón M, Rodríguez R, Chávez M, Valledor L, de Fera M, Barbón R (2012) Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109:223-234
- 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
- Sánchez Cordero, L (2012) Multiplicación de callos embriogénicos de arroz (*Oryza sativa* L.) subespecie indica mediante un sistema de cultivo por inmersión temporal automatizado (RITA®). Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética y Biotecnología
- Teisson, C, Alvard D, Berthouly M, Cote F, Escalant J, Etienne H, Lartand M (1996) Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. *Acta Hort.* 440: 521-526
- Tuberoso, G, Montorob P, Piacenteb S, Coronac G (2009) Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50: 440-448

Recibido: 12-11-2012

Aceptado: 24-12-2012