



Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth a partir de explantes nodales

- **Víctor M. Jiménez^a,**
Jhamna Castillo^a,
Elena Tavares^a,
Eric Guevara^a,
Mayra Montiel^b

Resumen

Se evaluó el efecto de diferentes estrategias de desinfección, así como de varias concentraciones de la citoquinina 6-bencilamino purina (BAP) en el medio de cultivo, sobre el establecimiento y desarrollo *in vitro* de explantes nodales de *Guadua angustifolia* Kunth. Se observó que la utilización de explantes de plantas cultivadas en invernadero y la desinfección secuencial con un detergente alcalino, una mezcla de Benomyl y Agrimycin, seguidos de hipoclorito de sodio (1.5%), permitió reducir la contaminación externa en los explantes. Además, la incorporación en el medio de cultivo de un agente biocida, desarrollado para ser utilizado en cultivo *in vitro* de plantas (Plant Preservative Mixture®), a una concentración de 2 ml/l, redujo el desarrollo de organismos contaminantes localizados en el interior de los explantes. De las concentraciones de BAP evaluadas, la mayor brotación de yemas axilares se observó con 3 mg/l. Las yemas brotadas crecieron rápidamente, con la consiguiente formación de un eje con varias hojas. El sucesivo subcultivo de estos ejes, cada tres semanas en el mismo medio, permitió la formación de nuevos ejes laterales, así como de raíces. Al cabo de 6 subcultivos, se observó la formación de macollas compuestas por 8-12 ejes. La división posterior de estas macollas en grupos de 5-6, ejes permitió la multiplicación de estas plantas.

Palabras claves: BAP, bambú, cultivo *in vitro*, multiplicación, PPM.

^a Cigras, Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica

^b Escuela de Zootecnia, Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica



Introducción

La propagación convencional de bambú se hace por medio de semillas, secciones de culmos o de rizomas. En general, esta forma de propagación tiene varias desventajas, entre las cuales se pueden citar una floración impredecible o muy espaciada en el tiempo, así como el alto costo (por mano de obra, espacio y transporte) y la baja eficiencia (número limitado de propágulos y baja tasa de multiplicación) que tiene (Gielis *et al.*, 2001). Es por esto que la utilización de la micropropagación se puede constituir en una alternativa atractiva para la multiplicación eficiente en este grupo de plantas. Se han empleado principalmente dos métodos para la multiplicación *in vitro* en bambú: embriogénesis somática (Lin *et al.*, 2004 y referencias citadas en el mismo) y propagación por yemas axilares y microestacas (Bag *et al.*, 2000; Ramanayake *et al.*, 2001 y referencias citadas en ellos). Con la última, se puede tener una tasa de multiplicación muy alta que permita solucionar la carencia de material para producción en gran escala. La mayoría de las publicaciones relacionadas con multiplicación a gran escala de bambú se han efectuado con especies asiáticas. En el género *Guadua*, de origen americano, sólo se conoce un trabajo previo (Marulanda *et al.*, 2002), en el cual se logró la regeneración por organogénesis directa de explantes nodales. En vista de que muchas veces los protocolos para cultivo *in vitro* desarrollados en un laboratorio en particular, no dan los mismos resultados al adaptarlos en otro (Poonsapaya *et al.*, 1989), se decidió evaluar varias estrategias para el establecimiento, el crecimiento, la multiplicación y el enraizamiento *in vitro* de explantes nodales de *Guadua angustifolia* en Costa Rica.

Materiales y método

Se trabajó con segmentos nodales (formados por un nudo y por porciones de entrenudo arriba y abajo, con dimensiones totales de 2-3 mm de diámetro y 25-35 mm de longitud) procedentes de ramas laterales sanas de plantas adultas, creciendo en el campo (Estación Experimental Los Diamantes, del Ministerio de Agricultura y Ganadería, Guápiles, Costa Rica), o de plantas jóvenes, en invernadero, dependiendo del experimento.

A los segmentos nodales se les eliminó las brácteas externas y posteriormente se lavaron en agua de cañería, corriendo por 15 minutos. Como tratamientos previos a la desinfección (predesinfección) se evaluó la inmersión de los explantes, por 10 min en agitación, en las siguientes soluciones: Extran® MA 01 alcalino (Merck, Darmstadt, Alemania), en una concentración de 0.05% (Bag *et al.*, 2000), y la combinación del bactericida Agrimycin (Pfizer, México) con el fungicida Benomyl (Piscis, Costa Rica), en una concentración de 2 g/l cada uno, seguida de una desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) (1.0% por 10 min), adicionado con una gota del agente humectante Tween (Sigma, St. Louis, MO, EUA) por cada 100 ml de solución desinfectante. Posteriormente, se evaluó incrementar la concentración de NaOCl (1.5% por 10 min) y el uso de hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) (10% por 40 min). Finalmente, los explantes se lavaron 3-5 veces con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar. A los explantes desinfectados se les eliminó ambos extremos (generalmente dañados por la desinfección) y se introdujeron en forma vertical (ligeramente inclinada) en el medio de cultivo, hasta que la yema quedara a nivel de la superficie del medio de cultivo. Únicamente se cultivaron explantes que presentaban yema visible. Para esta fase, se utilizaron tubos de cultivo de 25 x 150 mm con tapa plástica, y se estableció un mínimo de 10 repeticiones para cada tratamiento.



El medio de cultivo base estuvo compuesto por las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionadas con tiamina (0.1 mg/l), piridoxina (0.5 mg/l), ácido nicotínico (0.5 mg/l), glicina (2 mg/l), inositol (100 mg/l) y sacarosa (3%). El pH del medio se ajustó a 5.8 con KOH antes del autoclavado, y se solidificó con 2.0 g/l de Phytigel™ (Sigma, St. Louis, MO, EUA). También se evaluó la inclusión en el medio de cultivo, antes del autoclavado, del agente biocida Plant Preservative Mixture (PPM™, Plant Cell Technology, Washington, EUA), en concentraciones de 0.5 y 2.0 ml/l. En esta etapa inicial, en la cual se estudió el proceso de desinfección, se empleó una sola dosis de BAP (3 mg/l). Posteriormente se analizó el efecto de cuatro concentraciones (0, 1, 3 y 5 mg/l) de este regulador de crecimiento sobre la brotación de las yemas.

Los explantes en cultivo se colocaron, inicialmente, en condiciones de oscuridad total (26°C), transfiriéndose a luz (900 lux, fotoperíodo de 16 h y 26°C) cuando sobrepasaron 1,5 cm de altura. Cada 3-4 semanas se subcultivó el material en crecimiento activo a frascos de cultivo de 170 ml de capacidad, con 25 ml de medio de cultivo. Una vez que los explantes alcanzaron aproximadamente, 7 cm de altura, se transfirieron a frascos de cultivo de mayor capacidad (17 cm de altura y 9 cm de ancho) con 100 ml de medio.

Una vez que los explantes brotados progresaron en su desarrollo, se evaluaron dos procedimientos para su multiplicación. En uno, se disectó en forma transversal aquellos brotes que hubieran alcanzado 7-10 cm de altura, cultivando en tubos con medio de cultivo fresco explantes nodales similares a los utilizados para el establecimiento inicial. En el otro, se dejó que las yemas brotadas crecieran y formaran ejes secundarios por brotación de yemas laterales. Una vez que se formaron macollas de 8-12 tallos, se procedió a eliminarles las raíces y a separarlas en grupos de 4-6 tallos. En ambos casos, se utilizó el medio de cultivo con el cual se obtuvo mayor brotación en los experimentos anteriores, y se evaluó la tasa de multiplicación, así como la cantidad de brotes aéreos y raíces formados por explante, además de la presencia de necrosis y clorosis.

Resultados y discusión

Desinfección

Al utilizar NaOCl (1.0% por 10 min) solo, o antecedido de una predesinfección con únicamente, el detergente alcalino Extran o con el mismo, seguido de Agrimycin y Benomyl, más de la mitad de los explantes procedentes de plantas creciendo en el campo, se contaminaron en los primeros 8 días en cultivo (Fig. 1). La combinación de Extran con Agrimycin y Benomyl, seguida del NaOCl, condujo a una reducción cercana al 20% en la contaminación. El Extran, solución utilizada para la desinfección de instrumentos y superficies en laboratorios, ha sido usado previamente con éxito para la desinfección de semillas del bambú asiático *Thamnocalamus spathiflorus* (Bag *et al.* 2000). La combinación de Agrimycin y Benomyl se utiliza habitualmente en nuestro laboratorio, como pretratamiento a la desinfección, para reducir la contaminación portada por explantes recalcitrantes para ser establecidos *in vitro*, debido a la gran cantidad de agentes contaminantes que acarrearán (Dalsaso y Guevara, 1989). Como consecuencia de estos resultados se decidió continuar utilizando estos pretratamientos para los experimentos posteriores.

A pesar de los progresos hechos, los niveles de contaminación todavía no permitían disponer de suficiente material en cultivo como para evaluar parámetros de crecimiento. Por lo tanto, se decidió aumentar la concentración de NaOCl a 1.5% y valorar el uso de Ca(OCl)₂ en el proceso



de desinfección. Como se observa en la figura 2, con ambos tratamientos se logró una disminución importante en la tasa de contaminación de los explantes. Esto fue más notorio en el primer caso, en el cual la contaminación se estabilizó en menos de 60%. El uso de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ causó pérdida de color y flacidez en las yemas, por lo que se decidió discontinuar su uso.

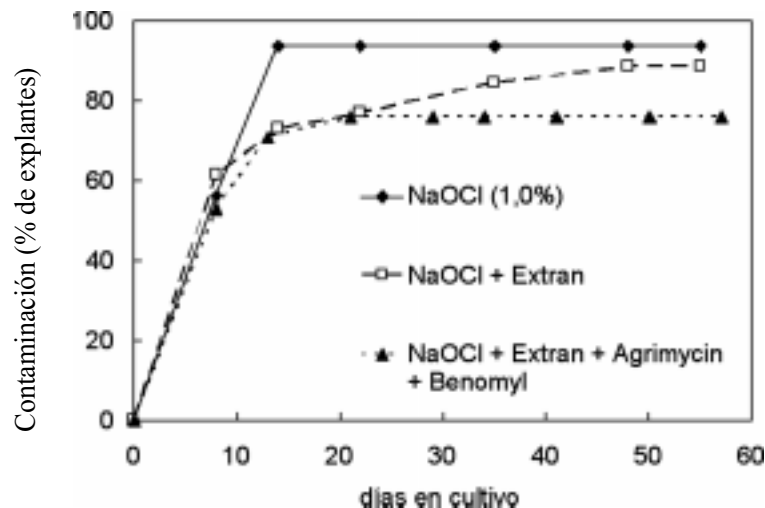


Fig. 1. Efecto de pretratamientos de desinfección sobre la tasa de contaminación, utilizando explantes provenientes de plantas en el campo.

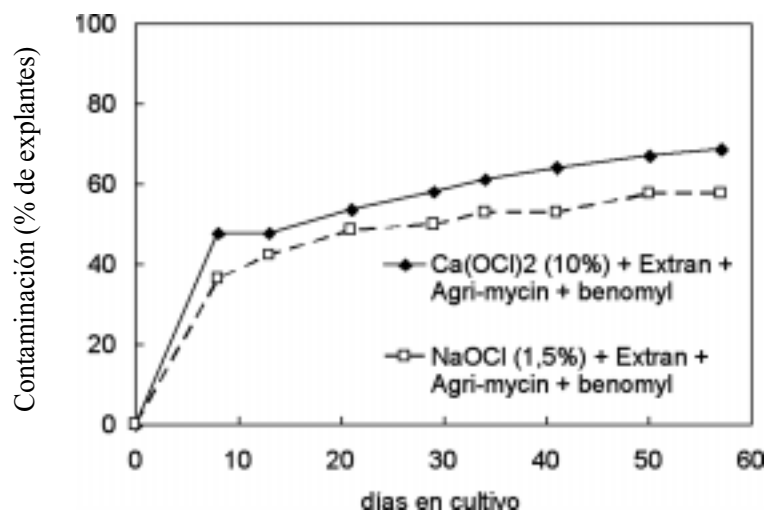


Figura 2. Efecto de dos tratamientos de desinfección sobre la tasa de contaminación, utilizando explantes provenientes de plantas en el campo.

La mayoría de la contaminación se manifestó en el momento en el que la yema iniciaba su crecimiento (7-10 días después de establecido). Al respecto, Ramanayake y Yakandawala (1987) mencionan la aparición de contaminación causada por hongos y bacterias a la tercera semana de cultivo de explantes nodales de *Dendrocalamus giganteus*. El momento de aparición de la contaminación en nuestro experimento hace suponer que los agentes contaminantes se encontraban



en el interior de las brácteas que cubren las yemas, quedando protegidos de la acción de los tratamientos de desinfección. Por esto, una vez que las brácteas se comenzaron a separar, a consecuencia del crecimiento de la yema, los agentes contaminantes entraron en contacto con el medio de cultivo e iniciaron su proliferación.

Esta situación constituye un problema adicional, ya que la desinfección inicial no es efectiva para controlar esta contaminación posterior. Debido a ello se decidió evaluar la inclusión de PPM en el medio de cultivo. Este es un compuesto biocida, estable al calor y de amplio espectro (Guri y Patel, 1998), que se ha utilizado en otras especies para reducir el problema de contaminantes de lenta aparición (Niedz, 1998). En el caso de *Guadua*, la dosis de PPM más alta evaluada (2.0 mg/l), en combinación con un tratamiento previo de desinfección, mostró ser eficiente para limitar la contaminación en los explantes (Fig.3). Esta dosis es considerada como curativa por el fabricante. El uso de una concentración menor (0.5 ml/l), recomendada como dosis preventiva, no tuvo efecto, ya que la contaminación obtenida fue similar a la observada sin el empleo del producto. Si bien no se conocen trabajos previos en los cuales se haya utilizado PPM para el cultivo *in vitro* de bambú, Ramanayake y Yakandawala (1997) lograron una disminución significativa en la contaminación de explantes de plantas adultas de *D. giganteus* creciendo en el campo, al incorporar Benomyl en el medio de cultivo.

Son pocos los trabajos realizados en bambú en los cuales se hace referencia a la problemática de la contaminación para el establecimiento *in vitro* (Ramanayake y Yakandawala, 1997; Marulanda *et al.*, 2002). En estos y otros trabajos (Saxena, 1990; Ramanayake *et al.*, 2001) se ha recurrido a la desinfección con $HgCl_2$, un compuesto altamente tóxico y de difícil manejo ambiental (Pierik, 1987). Los resultados del presente trabajo demuestran que el uso de NaOCl, un producto menos tóxico, en combinación con PPM en el medio de cultivo, constituye una alternativa eficaz. Además, una ventaja adicional del PPM es que, al estar presente en el medio de cultivo, ejerciendo su acción por más tiempo, y no, únicamente, durante el periodo de desinfección, puede inhibir el crecimiento de aquellos microorganismos que se expresan cuando la yema comienza a crecer.

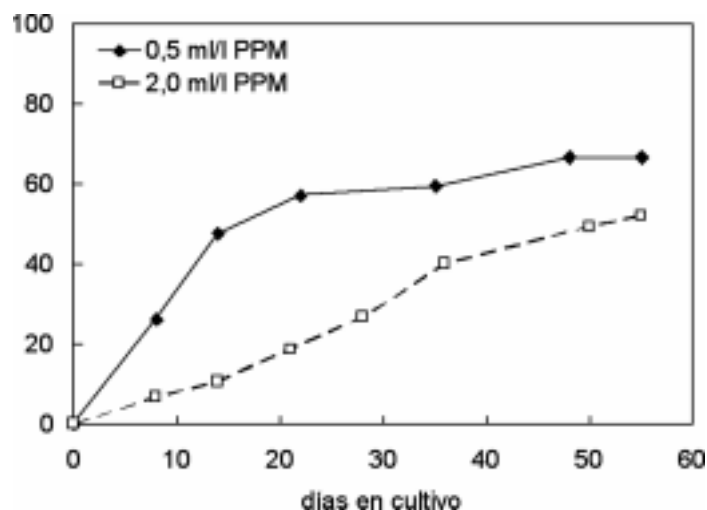


Figura 3. Efecto de dos concentraciones de PPM en el medio de cultivo sobre la tasa de contaminación, utilizando explantes provenientes de plantas en el campo.



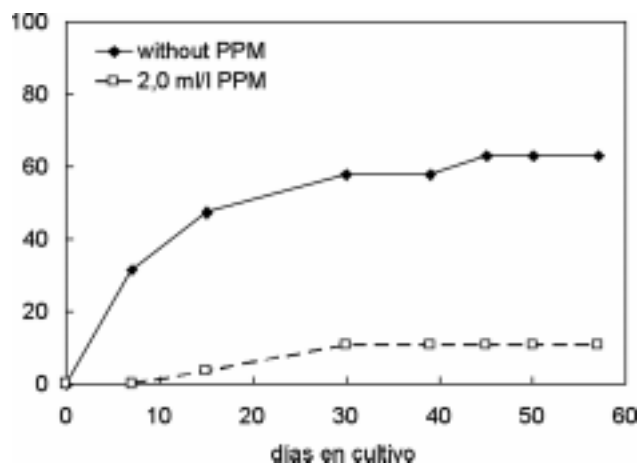


Figura 4. Efecto de la inclusión de PPM (2 ml/l) en el medio de cultivo, sobre la tasa de contaminación, utilizando explantes provenientes de plantas en invernadero.

A pesar de la reducción considerable, observada en la tasa de contaminación como producto de la secuencia de tratamientos evaluados, esta continuaba siendo elevada (50%). Esto ocurre comúnmente en bambú cuando se utilizan explantes provenientes de plantas adultas creciendo en el campo (Ramanayake y Yakandawala, 1997; Gielis *et al.*, 2001). Como alternativa para tratar de reducir la contaminación a niveles aceptables, se empezó a utilizar material cultivado en invernadero, una estrategia que ha tenido éxito en otras plantas perennes (Dalsaso y Guevara, 1989). Esto llevó a una reducción clara en la tasa de contaminación, la cual alcanzó valores cercanos al 10% en presencia de 2 ml/l de PPM (Fig. 4). Sin embargo, en ausencia de este compuesto se observaron tasas de contaminación semejantes a las obtenidas con material procedente de campo, lo cual es un indicativo de la conveniencia de utilizar este producto.

Cultivo

Las primeras yemas brotaron a los 7 días de establecidos los explantes. La leve oxidación inicial observada en los extremos cortados y en la yema, no progresó con el tiempo de cultivo. Inicialmente la yema aumentó de tamaño y seguidamente apareció una hoja en el centro de la misma. Hojas sucesivas se continuaron formando, llegando a alcanzar los ejes producidos un promedio de 3 cm de altura a los 22 días de cultivo. La formación de ejes laterales se observó posterior a los 50 días (Fig. 5). Los tallos de *Guadua* formados continuaron su desarrollo hasta alcanzar aproximadamente 12 cm de altura a los 90 días, momento en que el crecimiento cesó. Bag *et al.* (2000) observaron, en *Thamnocalamus spathiflorus*, un período inicial de 25-30 días de ausencia en la brotación lateral, mientras que en *D. giganteus* ese período fue de 65 días (Ramanayake y Yandawala, 1997).

La figura 6 muestra que, en ausencia de BAP, solo el 15% de las yemas brotaron, mientras que en presencia de este regulador de crecimiento la brotación se duplicó. La mejor brotación (33%) se observó con 3 mg/l de BAP, por lo que se decidió trabajar con esta dosis en los experimentos sucesivos. Con esta citoquinina se ha observado la mejor respuesta en bambú, empleando niveles entre 1 y 12 mg/l (Prutpongsee y Gavinlertvatana, 1992; Ramanayake y Yandawala, 1997; Ravikumar *et al.*, 1998; Bag *et al.*, 2000). En *Guadua angustifolia*, Marulanda *et al.* (2002) mencionan haber obtenido mayor brotación con 1.0 mg/l, aunque sin embargo, no evaluaron concentraciones mayores.



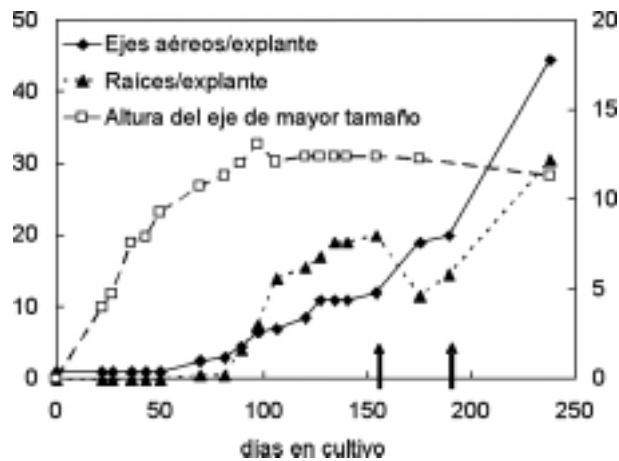


Figura 5. Crecimiento de los explantes nodales cultivados en medio con 3 mg/l de BAP.

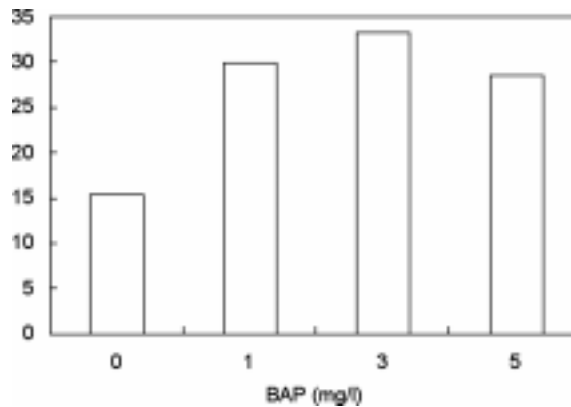


Figura 6. Efecto de la concentración de BAP sobre la brotación de explantes nodales (13 días después del establecimiento).

En una primera etapa, se consideró la multiplicación de los explantes siguiendo el protocolo inicial de establecimiento. Para ello, algunos ejes se seccionaron en segmentos formados por un nudo y se cultivaron en el mismo medio de cultivo, con la idea de regenerar un nuevo tallo a partir de la yema axilar. Como se observa en la figura 7A, la tasa de multiplicación obtenida fue muy baja, manteniéndose cercana a uno. Por su parte, la cantidad de brotes laterales y raíces por explante fue extremadamente reducida. Uno de los mayores problemas de este procedimiento, y que tal vez explique la baja efectividad en la multiplicación, fue el desarrollo progresivo de clorosis y de necrosis en los explantes, la cual llegó, luego de 71 días de cultivo, a afectar el 100% de los explantes (Fig. 7B). En el único trabajo previo en que se menciona la utilización de este procedimiento para la multiplicación *in vitro* de *Guadua* (Marulanda *et al*, 2002), no se indica la eficiencia del proceso.

En una segunda etapa, se dejó que los brotes originales continuaran su crecimiento, sin ser seccionados. El desarrollo de nuevos ejes laterales, que llevó a la formación de macollas, se dio en forma exponencial a lo largo del tiempo (Fig. 5). La división de estas macollas a los 155 días de cultivo, en grupos de 5-6 ejes, mostró una tasa de multiplicación promedio de 2.5 ± 0.5 explantes



por explante original. Una tasa similar fue obtenida 6 semanas después, cuando se hizo una segunda separación (indicadas con flechas en la figura 5). Se obtuvo, de esta forma, luego de 8 meses de cultivo, 45 ejes por explante original (Fig. 5). Se sabe que la tasa de multiplicación varía, no solo de especie en especie (Ramanayake y Yakandawala, 1997; Bag *et al.*, 2000; Gielis *et al.*, 2001) sino que también, de acuerdo con el tamaño del propágulo (Prutpongse y Gavinlertvatana, 1992) y a lo largo del tiempo en cultivo (Ramanayake *et al.*, 2001). Para determinar si esto último también ocurre en *Guadua*, se proseguirá con la evaluación de los experimentos en curso por más tiempo.

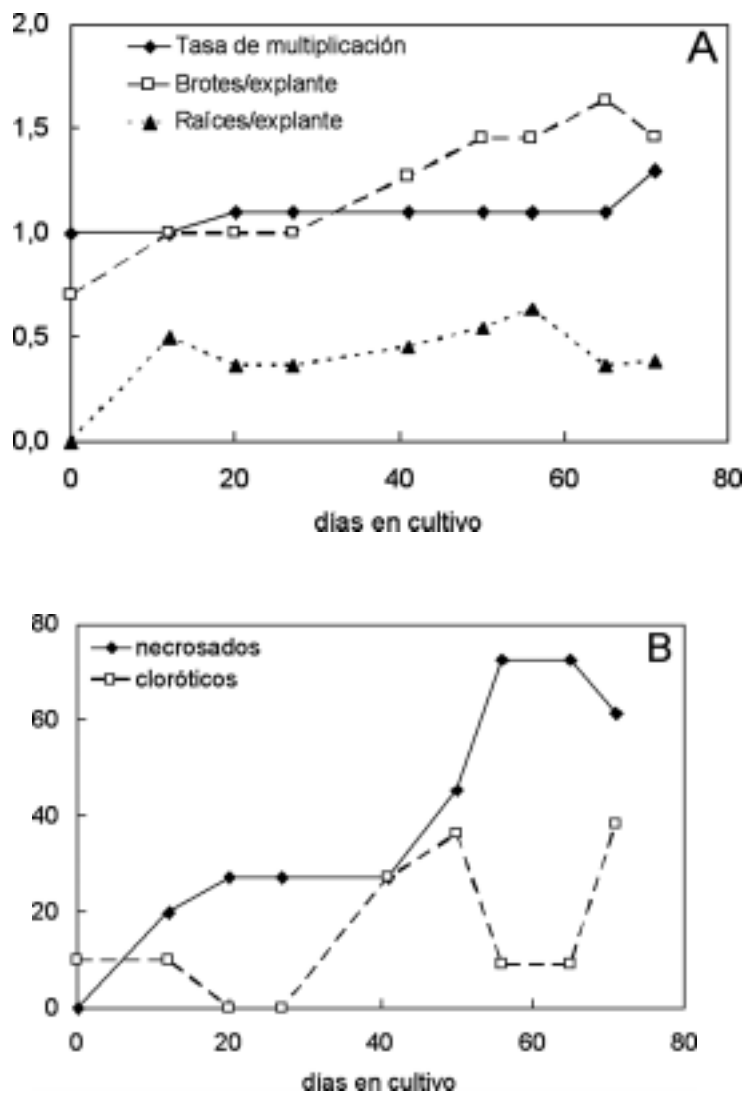


Figura 7. Comportamiento de los segmentos nodales obtenidos de brotes desarrollados *in vitro* a lo largo de 71 días de evaluación.

El enraizamiento ocurrió de manera espontánea en el 100% de los explantes. Este se inició a los 69 días en cultivo y el número de raíces formadas por explante progresó en forma exponencial hasta que las macollas fueron fragmentadas para su multiplicación, momento en que se hizo una poda total de raíces (Fig. 5). Sin embargo, como se puede observar en la misma figura, la produc-



ción de raíces volvió a iniciarse rápidamente y superó los valores presentes antes de la poda. Contrario a lo observado en otras especies (Prutpongse y Gavinlertvatana, 1992; Ramanayake y Yakandawala, 1997; así como referencias citadas en ellos) en *Guadua* no fue necesario el cultivo de los tallos en un medio con auxina para la formación de raíces.

Reconocimientos

Los autores agradecen la colaboración brindada por A.C. Calvo-Retana en los experimentos iniciales. Esta investigación fue financiada con fondos del proyecto EU INCO ICA4-CT-2001-10091.

○ Bibliografía

- Bag, N.; Chandra, S.; Palni, L.M.S.; Nandi, S.K. 2000. Micropropagation of Dev-ringal [*Thamnocalamus spathiflorus* (Trin.) Munro]—a temperate bamboo, and comparison between *in vitro* propagated plants and seedlings. *Plant Sci.* 156:125-135.
- Dalsaso, L.; Guevara, E. 1989. Multiplicación clonal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) cv. 'Fuerte'. *Agron. Costarric.* 13:61-71.
- Gielis, J.; Peeters, H.; Gillis, K.; Oprins, J.; Debergh, P.C. 2001. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. *Acta Hort.* No.552, p 195-203.
- Guri, A.Z.; Patel, K.N. 1998. Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media. United States Patent 5,750,402.
- Lin C.-S.; Lin, C.-C.; Chang, W.-C. 2004. Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 76:75-82.
- Marulanda, M.L.; Carvajalino, M.; Vargas, C.; Londoño, X. 2002. La biotecnología aplicada al estudio y aprovechamiento de la *Guadua*. In Seminario – Taller Avances en la Investigación sobre Guadua. Pereira, Colombia, mayo 16-18, 2002. p. 1-5.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Niedz, R.P. 1998. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. *HortTechnology* 8:598-601.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. 348 p.
- Poonsapaya, P.; Nabors, M.W.; Wright, K.; Vajrabhaya, M. 1989. A comparison of methods for callus culture and plant regeneration of RD25 rice (*Oryza sativa* L.) in two laboratories. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 16:175-186.
- Prutpongse, P.; Gavinlertvatana, P. 1992. *In vitro* micropropagation of 54 species from 15 genera of bamboo. *HortScience* 27:453-454.
- Ramanayake, S.M.S.D.; 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.M.S.D., Wanniarachchi, W.A.V.R.; Tennakoon, T.M.A. 2001. Axillary shoot proliferation and *in vitro* flowering in an adult giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 37:667-671.
- Ravikumar, R.; Ananthkrishnan, G.; Kathiravan, K.; Ganapathi, A. 1998. *In vitro* shoot propagation of *Dendrocalamus strictus* nees. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 52:189-192.
- Saxena, S. 1990. *In vitro* propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. *Plant Cell Rep.* 9:431-434.

