

Formación de callos e inducción de brotes a partir de tejido intercalar de ramas de plantas adultas de *Guadua angustifolia* Kunth

Marcos Daquinta, Alexis Gregori, Mariela Cid, Yarianne Lezcano, Fernando Sagarra. *Autor para correspondencia.

Laboratorio de Células y Tejidos. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 9. Ciego de Ávila, Cuba. CP 69 450 e-mail: mdaquinta@bioplasmas.cu

RESUMEN

Los bambúes tienen importancia para los programas de construcción y de fabricación de muebles, entre otras aplicaciones. *Guadua angustifolia* Kunth es un bambú originario de Ecuador y Colombia con ciertas características particulares, lo cual es de interés para los programas de reforestación. Las vías de propagación vegetativas son limitadas, aún más cuando se desea introducir la especie a la producción. El objetivo del presente trabajo fue lograr la formación de callos a partir de tejido intercalar de ramas de plantas adultas de *Guadua*. Se realizó un proceso de desinfección con bicloruro de mercurio al 0.2% durante 10 minutos. Los segmentos de tejido intercalar se establecieron en el medio de cultivo enriquecido con picloram. Se logró la formación de callos a partir de estos explantes y la inducción de pequeños brotes en presencia de 6-BAP.

Palabras clave: bambú, inmersión temporal, picloram

ABSTRACT

Bamboo plants are largely used in building programs, furniture construction among others. *Guadua angustifolia* Kunth is a bamboo original from Ecuador and Colombia with certain interesting characteristics for reforestation programs. Vegetative propagation of these species is limited taking into account the desire to introduce them for production. Obtaining callus formation from the intercalar tissues of *Guadua* branches was the objective of this project. Starting material was disinfected using mercury bichlorine (0.2%) for a period of 10 minutes. Intercalar tissue segments were established in culture medium supplemented with picloram. Callus formation was obtained from these explants and the presence of green shoots was achieved with 6-BAP (benzylaminopurine).

Key words: bamboo, temporal immersion, picloram

INTRODUCCIÓN

Los bambúes son importantes para los programas de construcción y de fabricación de muebles, entre otras aplicaciones. *Guadua angustifolia* Kunth es un bambú originario de Ecuador y Colombia con ciertas características particulares, como son la resistencia a algunas plagas y enfermedades y el crecimiento rápido, lo cual es de interés para los programas de reforestación.

La construcción de 1 000 casas de bambú anualmente, con material vegetal proveniente de 60 ha de una plantación de *Guadua* establecida, equivale a la madera de 500 ha de valiosos árboles tropicales (Liese, 1999). La regeneración natural de esta especie ocurre estacionalmente por medio de semillas y asexual por la activación de las yemas del rizoma. Estas vías de propagación son limitadas, aún más cuando se desea introducir la especie a la producción. Una alternativa a la propagación vegetativa es la regeneración y multiplicación de plantas *in vitro*. Esta técnica ha sido utilizada para la propagación de otras especies de bambú, a través de la formación de callos en primordios foliares de ápices (Huang y

Murashige, 1983), en semillas maduras (Rao *et al.*, 1985) y en hojas inmaduras (El-Hassan y Debergh, 1987).

El objetivo del presente trabajo fue lograr la formación de callos a partir de tejido intercalar de *Guadua angustifolia* Kunth, con vistas a establecer en un futuro un protocolo de propagación *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Formación de callos en segmentos de tejido intercalar de *G. angustifolia* Kunth

Se utilizaron segmentos de tejido intercalar (1cm), de ramas jóvenes que se desechaban durante el establecimiento de las yemas axilares. Para ello se siguió como protocolo de desinfección la aplicación de Bicloruro de Mercurio al 0.2% durante 10 minutos y después se realizaron varios enjuagues con agua destilada estéril. Para este estudio se empleó el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) al que se le adicionaron varias concentraciones de Picloram (0, 3, 6, 9 mg.l⁻¹). El mismo se distribuyó en frascos de vidrio de 250 ml de capacidad a razón de 25 ml

y en cada recipiente de cultivo se colocaron cinco segmentos en contacto con el medio de cultivo. Se emplearon diez recipientes por tratamiento y el experimento se repitió tres veces en el tiempo. Los tratamientos fueron los siguientes: MS + 0 mg.l⁻¹ Picloram, MS + 3 mg.l⁻¹ Picloram, MS + 6 mg.l⁻¹ Picloram y MS + 9 mg.l⁻¹ Picloram.

Los recipientes se mantuvieron en oscuridad a 25°C durante 45 días. A las seis semanas de cultivo se evaluó el número de explantes (segmentos intercalares) que formaron callos en cada tratamiento.

Inducción de brotes en callos provenientes de tejido intercalar

Como material vegetal se utilizaron callos obtenidos a partir de segmentos de tejido intercalar de ramas jóvenes. Para la inducción de brotes, los callos se colocaron en medio de cultivo MS con diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP). El mismo se distribuyó en frascos de policarbonato de 250 ml de capacidad a razón de 100 ml y en otro recipiente de cultivo se colocaron cinco callos, los cuales entraron en contacto con el medio de cultivo a través de la técnica de inmersión temporal. Se realizaron tres repeticiones. Los tratamientos utilizados fueron: MS + 0 mg.l⁻¹ 6-BAP, MS + 2 mg.l⁻¹ 6-BAP, MS + 3 mg.l⁻¹ 6-BAP, MS + 4 mg.l⁻¹ 6-BAP.

A las ocho semanas de cultivo se evaluó el número de callos con brotes pequeños (secciones del callo que toman color verde y aparece la formación de primordios foliares).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de callos en segmentos de tejido intercalar de *G. angustifolia* Kunth

En la tabla 1 se observa el comportamiento de la formación de callos en segmentos de tejido intercalar proveniente de plantas adultas de *G.*

angustifolia Kunth. Con excepción de 6 mg.l⁻¹ de Picloram el resto de las concentraciones tuvieron baja respuesta. Los callos obtenidos fueron de color amarillo crema y con estructuras nodulares bien definidas. Huang y Murashige (1983) señalaron el éxito del picloram para la formación de callos en *Bambusa*, *Phyllostachys* y *Sasa*. También Goh *et al.* (1997) plantearon que el picloram es más eficiente para la formación de callos en explantes de raíz de *Calamus manan*. Goh *et al.* (1999) y Huang *et al.* (1999) lograron embriogénesis somática a partir de raíces de *Calamus manan* y de ápices de *Phoenix canariensis* respectivamente con picloram.

El tipo de explante y su estado de desarrollo son dos factores determinantes en la iniciación de callos (Huang y Murashige, 1983). En el presente trabajo con *G. angustifolia* Kunth se obtuvieron callos a partir de tejido intercalar, lo cual representa una ventaja para el establecimiento en un futuro de un sistema de propagación, ya que las ramas secundarias de donde se extrajeron estos explantes constituyen la mayor cantidad de material vegetativo disponible. Los callos desarrollados fueron de tres tipos: friable y translúcido, compacto y nodular, mucilaginoso. Varios autores han observado que en especies monocotiledóneas en general y especialmente gramíneas, se presentan estos tres tipos de callos (Rao *et al.*, 1985; El-Hassan y Debergh, 1987).

Inducción de brotes en callos provenientes de tejido intercalar de *G. angustifolia* Kunth en presencia de 6-BAP

En la figura 1 se observa la influencia de las diferentes concentraciones de citoquinina (6-BAP) en la formación de brotes en los callos nodulares de *Guadua* obtenidos partir de tejido intercalar. En todos los tratamientos donde se empleó el 6-BAP hubo formación de brotes con pequeños primordios. Sin embargo, en el medio de cultivo enriquecido con 3 mg.l⁻¹ 6-BAP se logró el 100% de callos con estas estructuras.

Tabla 1. Comportamiento de la formación de callos en segmentos de tejido intercalar de ramas de *G. angustifolia* Kunth con diferentes concentraciones de Picloram.

Tratamientos (mg.l ⁻¹ Picloram)	Formación de Callos (%)
0	0 c
3	20 b
6	80 a
9	16 b

Medias con letras desiguales difieren para un valor de $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis, Student- Newman- Keuls).

Marulanda *et al.* (2005), a partir de callos de *G. angustifolia* Kunth obtenidos en presencia de 2,4-D, obtuvieron la formación de estructuras embriogénicas, las cuales se convirtieron en embriones somáticos (fase coleoptilar).

En la figura 2 se observa la formación de pequeños brotes verdes en los callos de segmentos de tejido intercalar de *G. angustifolia* Kunth. Con 3 mg.l⁻¹ de 6-BAP se observó la aparición de estos brotes en todos los callos evaluados. El resto de las concentraciones tuvieron menor respuesta.

Aunque Ramanayake y Wanniarachchi (2003), lograron la formación de callos con estructuras nodulares, solo tres plantas fueron regeneradas a partir de los callos de *Dendrocalamus giganteus*

obtenidos en presencia de 2,4-D y ANA, señalan estos investigadores. Continúan planteando, además, que aunque la organogénesis y la embriogénesis son comunes en tejidos derivados de plántulas de bambúes, estos procesos son menos frecuentes a partir de plantas adultas establecidas *in vitro*, similar a lo obtenido en el presente trabajo al trabajar con explantes provenientes de plantas adultas cultivadas en invernadero.

El presente trabajo permitió establecer por primera vez la formación de callos nodulares a partir de tejido intercalar de *G. angustifolia* Kunth y aunque los pequeños brotes no se diferenciaron en plantas, la formación de estos es un buen indicador de la capacidad morfogénica de los callos.

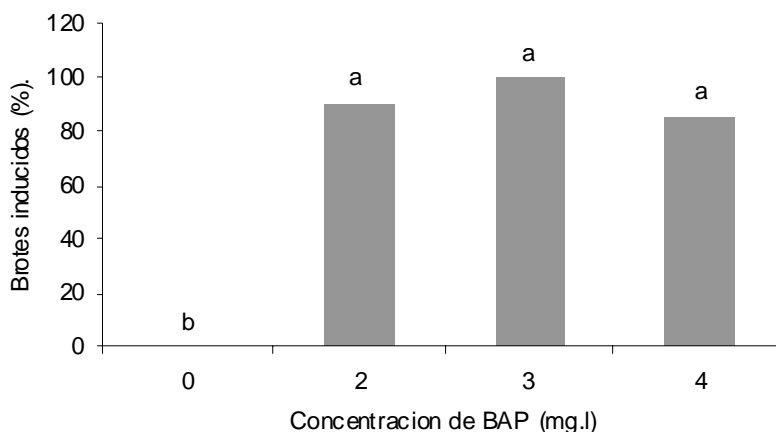


Figura 1. Comportamiento de la inducción de brotes a partir de callos nodulares de *G. angustifolia* Kunth en medio de cultivo enriquecido con 6-BAP.

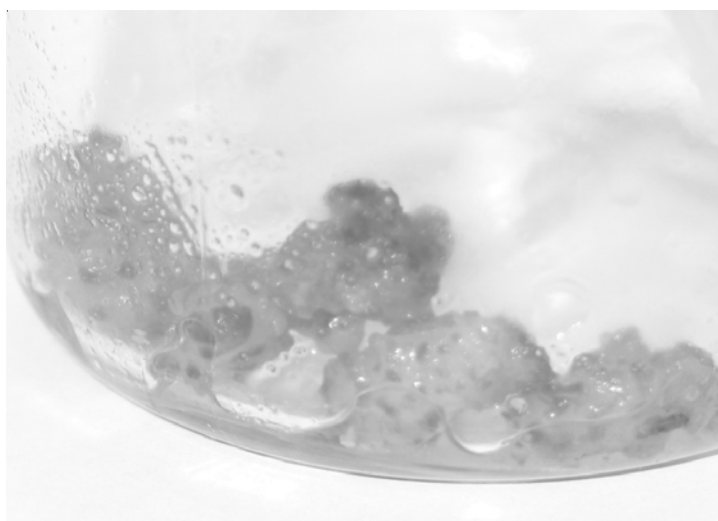


Figura 2. Formación de pequeños brotes verdes en callos de *G. angustifolia* Kunth en presencia de 3 mg.l⁻¹ de 6-BAP.

CONCLUSIONES

Se logró la formación de callos en *G. angustifolia* Kunth. con 6 mg.l⁻¹ de picloram en el medio de cultivo MS a partir de segmentos de tejido intercalar. Los mismos fueron nodulares y se logró la inducción de pequeños brotes en medio de cultivo enriquecido con 3 mg.l⁻¹ de 6-BAP.

REFERENCIAS

- Daquinta, M, Mosqueda O, González MT, Benega R, Teixeira da Silva JÁ (2007) Shoot proliferation of *Caladium x hortulanum* in a Temporary Immersion System. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 1(1): 70-72
- El-Hassan, A, Debergh P (1987) Embryogenesis and plantlet development in the bamboo *Phyllostachys viridis* (Young). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10: 732-777
- Goh, D, Bon Marie-Claude, Monteuis O (1997) Prospects of biotechnology for a Rattan improvement programme. *Bois et Forets des Tropiques* 254(4): 51-67
- Goh, D, Bon Marie-Claude, Monteuis O (1999) Evidence of somatic embryogenesis from root tip explants of the Rattan *Calamus manan*. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 35: 424-427
- Huang, L, Murashige T (1983) Tissue culture investigations of bamboo. I. Callus cultures of *Bambusa*, *Phyllostachys* and *Sasa*. *Botanical Bulletin Academia Sinica* 24: 31-52
- Huong, LT (1999) Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 1-7
- Liese, W (1999) Bamboo: Past-Present-Future. *American Bamboo Society Newsletter* 20(1): 1-7
- Lin, CS, Cheng MJ, Hsiao HW, Hong PI, Jheng FY, Lin CC, Chang WC (2005) Stamen-less inflorescence of *Bambusa edulis*. *Scientia Horticulturae* 107: 76-80
- Marulanda, M, Gutiérrez L, Marquez M (2005) Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth. *Actual. Biol.* 27(82): 5-15
- Murashige, T, Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Murthy BNS, Saxena PK (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration in neem (*Azadirachta indica*). *Plant Cell Reports* 17: 469-475
- Ramanayake SMSD, Wanniarachchi WAVR (2003) Organogenesis in callus derived from an adult giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro). *Scientia Horticulturae* 98: 195-200
- Rao U, Rao I, Narang V (1985) Somatic embryogenesis and regeneration of plant in the bamboo *Dendrocalamus strictus*. *Plant Cell Reports* 3: 191-194