

## Efecto de la frecuencia de inmersión sobre la multiplicación de brotes de *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland en SIT RITA®

Yudith García-Ramírez<sup>1\*</sup>, Mallelyn González-González<sup>1,2</sup>, Marisol Freire-Seijo<sup>1</sup>, Mariana La O<sup>1</sup>, Berkis Roque<sup>1</sup>, Ortelio Hurtado<sup>1</sup>, Eilyn Mena<sup>1</sup>. \* Autora para correspondencia.

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

### RESUMEN

Los bambúes tienen la particularidad de reunir una amplia gama de servicios ambientales. El presente trabajo, se realizó con el objetivo de determinar el efecto de la frecuencia de inmersión sobre la multiplicación de brotes de *B. vulgaris* cultivados en SIT. Se estudiaron tres frecuencias de inmersión (cada 4, 6 y 12 horas). Se midió la altura de las plantas, se cuantificó el número de brotes por explante y el número de hojas expandidas por cada explante. Además, se determinó el contenido de agua en los explantes. Se comprobó que la frecuencia de inmersión influyó en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*. Los resultados demostraron que el número de brotes (6.5 brotes/explante) y el número de hojas por explante (11.0 hojas/explante) fueron mayores con inmersiones cada seis horas. Los menores valores en todas las variables se encontraron en los explantes cultivados con inmersiones cada 12 h. En este mismo tratamiento se constató el mayor contenido de agua en los explantes. Los resultados indicaron que con el manejo de la frecuencia de inmersión se puede favorecer la multiplicación de *B. vulgaris* en SIT.

Palabras clave: bambú, contenido de agua, propagación *in vitro*.

## Effect of immersion frequency on shoot multiplication of *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland in RITA® TIS

### ABSTRACT

Bamboos are unique in bringing together a wide range of environmental services. The present work was conducted to determine the effect of immersion frequency of shoot multiplication of *B. vulgaris* grown in SIT. Three Immersion frequencies (every 4, 6 and 12 hours) were studied. The plant height was measured and the number of shoots per explant and the number of expanded leaves per explant were quantified. Furthermore, the water content was determined in the explants. It was found that the immersion frequency influenced the *in vitro* multiplication of *B. vulgaris*. The results showed that the number of shoots (6.5 shoots / explant) and the number of leaves per explant (11.0 leaves / explant) were higher with immersion every six hours. The lowest values for all variables were found in explants cultured with immersion every 12 h. In this treatment water content in the explants was higher. The results indicated that with the management of the immersion frequency it can encourage the multiplication of *B. vulgaris* in SIT.

Keywords: bamboo, *in vitro* propagation, water content.

### INTRODUCCIÓN

Los bambúes tienen la particularidad de reunir una amplia gama de servicios ambientales. Entre los bambúes, *Bambusa vulgaris* Schrader ex Wendland representa una valiosa alternativa económica ya que aporta beneficios ecológicos durante su crecimiento. Además, incrementa la

retención de agua en el suelo, evita la erosión y controla el aumento de la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico mediante su secuestro (Wang *et al.*, 2008).

La necesidad de incrementar el número de plantas de alta calidad ha requerido de la búsqueda de alternativas que garanticen el incremento de la eficiencia en los métodos

de propagación *in vitro* y tradicionales. En este sentido el empleo de los Sistemas de inmersión Temporal (SIT) ha sido una alternativa promisoría para incrementar las tasas de multiplicación y enraizamiento en *B. vulgaris* (Ramanayake *et al.*, 2008). Estos biorreactores simples brindan la posibilidad de automatizar el proceso de propagación *in vitro* de la gran mayoría de las especies (Ettienne y Berthouly, 2002). Además, solucionan las dificultades de los medios de cultivo líquidos estáticos al facilitar la manipulación del ambiente *in vitro*, lo que permite controlar parámetros de cultivos y favorece el crecimiento e incrementa la eficiencia biológica del material vegetal (Escalona *et al.*, 2006).

Los estudios relacionados con la frecuencia y el tiempo de inmersión podrían contribuir a incrementar las tasas de multiplicación de los brotes. Estas variables permiten renovar la atmósfera interna del frasco y conjuntamente con una mayor asimilación de los nutrientes se incrementa la proliferación (Sánchez, 2012).

Por otro lado, el manejo de las condiciones de cultivo *in vitro* en los SIT juega un papel muy importante en la eficiencia del proceso de adaptación en la fase de aclimatización (Aragón *et al.*, 2010). Por ello, el empleo de los SIT podría garantizar el desarrollo de plantas de *B. vulgaris* que alcancen la calidad requerida para poder adaptarse en el menor tiempo a las condiciones *ex vitro*. La presente investigación se desarrolló con el objetivo de determinar el efecto de la frecuencia de inmersión sobre la multiplicación de brotes de *B. vulgaris* cultivados en SIT (RITA).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal y sistemas de inmersión temporal*

Se emplearon como explantes brotes con dos pares de hojas completamente expandidas, con un subcultivo de multiplicación, en medio de cultivo líquido estático (Figura 1).

Para el cultivo se utilizaron frascos (RITA) según el diseño 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 otro inferior como reservorio de medio de cultivo (Figura 1).

### **Efecto de la frecuencia de inmersión**

Se inocularon cuatro explantes por cada SIT y se conformaron tres tratamientos con diferentes frecuencias de inmersión cada 4, 6 y 12 horas. El tiempo de inmersión se programó para un minuto. Se utilizaron cinco frascos por tratamiento y en el compartimiento inferior de cada frasco se adicionaron 225 ml de medio de cultivo líquido. El medio de cultivo de multiplicación, estuvo compuesto por sales MS (Murashige y Skoog, 1962), mio-inositol (100 mg l<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g l<sup>-1</sup>) y 3.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP.

Cada 10 días se renovó el medio de cultivo. A los 30 días de cultivo, se midió la longitud del brote principal (cm) desde la base hasta el punto de inserción de la primera hoja y se cuantificaron el número de brotes y de hojas expandidas por cada explante. Para ello, se tomaron 20 brotes por tratamiento.



Figura 1. Plantas de *Bambusa vulgaris* con un subcultivo de multiplicación en medio de cultivo líquido estático y Sistema de inmersión temporal (RITA), que se utilizó para la multiplicación de brotes de *B. vulgaris*.

Además, se determinó el contenido de agua (CA) en los explantes. Para ello, se tomaron 20 brotes por tratamiento, se enjuagaron con agua destilada y se secaron con papel de filtro. Se determinó su masa fresca (MF) (mg) y posteriormente se colocaron en una estufa (Sakura modelo IF-3B) a 60°C durante 72 h, una vez que el peso se mantuvo constante, se determinó su masa seca (mg) y se calculó el contenido de agua (CA) mediante la siguiente fórmula descrita por Bandyopadhyay *et al.* (2004):  $CA (\%) = (MF - MS) / MF * 100$ .

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba de Kruskal Wallis, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la frecuencia de inmersión

Se comprobó que la frecuencia de inmersión tuvo efecto sobre la multiplicación *in vitro* de

los brotes de *B. vulgaris* lo cual se puso de manifiesto en las variables evaluadas (Figura 2).

En los tratamientos con frecuencia de inmersión cada 4 y 12 horas, los brotes mostraron una coloración verde clara, con hojas poco expandidas y bordes enrollados (Figura 2a y 2c). Sin embargo, en el tratamiento con frecuencia de inmersión cada 6 horas, los brotes presentaron una coloración verde oscura, con hojas anchas y abiertas (Figura 2b).

A los 30 días de cultivo, se comprobó que existían diferencias significativas, entre los tratamientos en cuanto a las variables evaluadas. Los mejores resultados se alcanzaron en el tratamiento donde se empleó una frecuencia de inmersión cada 6 horas. En este se incrementó el número de brotes (6.5 brotes/explante) y el número de hojas por explante (11.0 hojas/explante). La longitud del brote principal no tuvo diferencias en los tratamientos con inmersiones cada 4 y 6 h. Sin embargo, estos indicadores morfológicos disminuyeron en los brotes que fueron sometidos a una frecuencia de inmersión cada 12 h (Tabla 1).

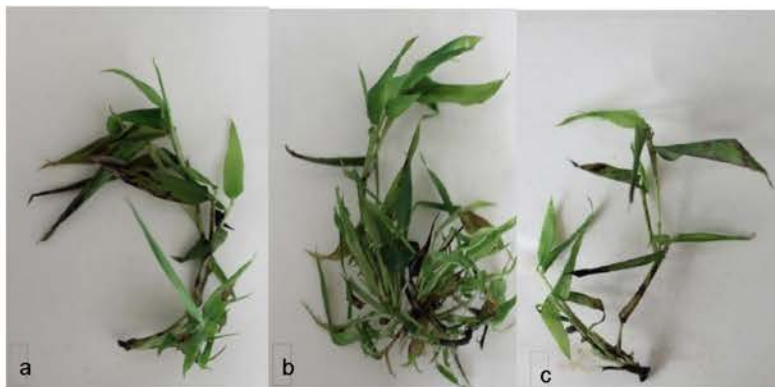


Figura 2. Efecto de la frecuencia de inmersión en la multiplicación de brotes de *B. vulgaris* a los 30 días de cultivo en sistemas de inmersión temporal tipo RITA. a) Cada 4 horas, b) 6 horas y c) 12 horas.

Tabla 1. Efecto de la frecuencia de inmersión sobre la multiplicación de los brotes de *B.vulgaris* cultivados sistemas de inmersión temporal.

| Indicadores morfológicos          | Frecuencias de Inmersión |        |         |        |          |       |
|-----------------------------------|--------------------------|--------|---------|--------|----------|-------|
|                                   | 4 horas                  |        | 6 horas |        | 12 horas |       |
|                                   | Media                    | RM     | Media   | RM     | Media    | RM    |
| Número de brotes/explante         | 4.7                      | 25.10b | 6.5     | 32.7a  | 2.7      | 14.6c |
| Longitud del brote principal (cm) | 7.0                      | 25.5ab | 8.3     | 30.6a  | 6.4      | 20b   |
| Número de hojas/ explante         | 8.1                      | 22.10b | 11.0    | 32.25a | 7.7      | 20.5b |

Rango Medios (RM) con letras diferentes dentro de una misma fila, difieren significativamente ( $p < 0.05$ ) según Kruskal Wallis.

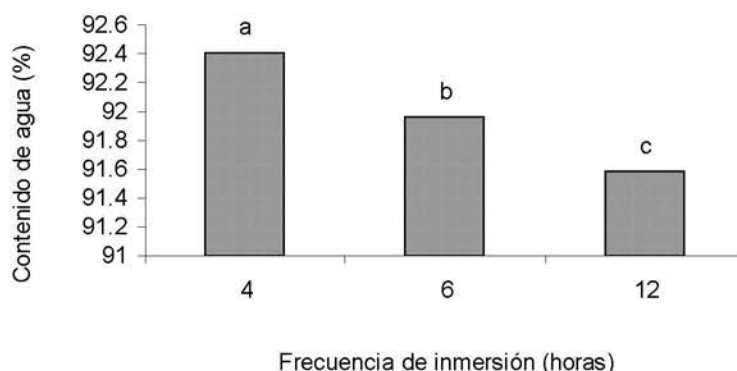


Figura 3. Efecto de la frecuencia de inmersión en el contenido de agua de los brotes de *B. vulgaris*, en los SIT tipo RITA, a los 30 días de cultivo.

La multiplicación y respuesta morfológica de los brotes de *B. vulgaris* en SIT fue favorecida por el empleo de frecuencia de inmersión de 6 horas. Sin embargo, al duplicarse la frecuencia de inmersión en tiempo (cada 12h) esta respuesta fue diferente lo cual puede deberse a la poca asimilación de los nutrientes del medio de cultivo y a la escasa renovación de la atmósfera interna que restringen la disponibilidad de dióxido de carbono y a la acumulación de gases como etileno en el frasco, que de conjunto son factores adversos para el cultivo en sistemas semi-abiertos. Resultados similares fueron informados por Chaille (2011) en *Bambusa ventricosa*.

Autores como Mongkolsook *et al.* (2005) en *Dendrocalamus latiflorus*, hacen referencia al incremento del número de brotes/explante al emplear una frecuencia de inmersión de 6 horas y refirieron que los valores de este indicador fueron inferiores significativamente en las plantas cultivadas con una frecuencia de inmersión de 12 horas.

Por otro lado, el mayor valor de contenido de agua se alcanzó cuando se empleó una frecuencia de inmersión cada 12 horas (Figura 3). La acumulación de agua en el tejido pudiera interferir en el intercambio gaseoso entre el mesófilo o epidermis, donde se reduce el intercambio gaseoso en la fotosíntesis y respiración (Jackson, 2003). Ello pudiera explicar los resultados obtenidos en las variables evaluadas previamente.

Estos resultados coinciden con los descritos por Marulanda *et al.* (2005) y Holst (2010)

quienes al estudiar diferentes frecuencias de inmersión (cada 3 y 12 horas) en la multiplicación *in vitro* de en *Guadua angustifolia* Kunth, comprobaron que el contenido de agua se incrementaba cuando emplearon la frecuencia de inmersión de 12 horas. Lo anterior sugiere la importancia, de evitar tiempos prolongados de frecuencia de inmersión de los brotes, el cual puede producir un agotamiento fisiológico al aumentar el contenido de agua y esto puede repercutir en su decrecimiento.

## CONCLUSIONES

Se determinó que la frecuencia de inmersión influyó en la multiplicación *in vitro* de *B. vulgaris*. Los resultados demostraron que se incrementó el número de brotes (6.5 brotes/explante), y el número de hojas por explante (11.0 hojas/explante) con inmersiones cada 6 horas.

## REFERENCIAS

- Aragón, CE, Carvalho L, González J, Escalona M, Amancio S (2010) *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. *Biol Plant* 54:237–244
- Bandyopadhyay T, Gangopadhyay G, Poddar R, Mukherjee K (2004) Trichomes their diversity, distribution and density in acclimatization of Teak (*Tectona grandis* L.) plants grown *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 78:113–121
- Chaille, L (2001) Optimization of tissue culture protocols for cost-effective production of dracaena, bamboo, and succulent plants. Doctoral dissertation, MSc. Thesis, Department of Tropical Plant and Soil Science. Hawaii.

- Escalona, M (2006) Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta annual*: 48-50
- Ettienne, HP y Berthouly, M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 69:215-231
- 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.
- Jackson MB (2003) Aeration stress in plant tissue cultures. *Bul-garian Journal of Plant Physiology. Special Issue*: 96-105
- Marulanda, M, Gutiérrez LG, Márquez M (2005) Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunt. *Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal* 27(82):5-15
- 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, Thailand*
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Ramanayake, S, Maddegoda K, Vitharana M, Chaturani G (2008) Root induction in three species of bamboo with different rooting abilities *Scientia Horticulturae* 118: 270-273
- 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. Escuela de Biología. (Costa Rica). Facultad de Ciencias. Universidad de Costa Rica.
- 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
- Wang, G, Innes J, Dai S, He G (2008) Achieving sustainable rural development in Southern China: the contribution of bamboo forestry 15(5): 484-495

Recibido: 9-01-2013

Aceptado: 1-03-2013