
MICROPROPAGACIÓN DE *GUADUA ANGUSTIFOLIA* KUNTH

MICROPROPAGATION OF *GUADUA ANGUSTIFOLIA* KUNTH

Marta L. Marulanda^{1, 2}, Luis G. Gutiérrez¹, María del Pilar Márquez¹

Resumen

Se obtuvieron plantas a partir de chusquines de *Guadua angustifolia* mediante regeneración in vitro de yemas axilares. En la fase de desinfección, se evaluaron el bicloruro de mercurio (HgCl₂) y el hipoclorito de sodio (NaClO) con distintos tiempos de aplicación. El medio de cultivo en el que se presentaron mejores respuestas estaba compuesto por las sales y vitaminas MS suplementado con 2,5 mg/l de 6 BAP, 10 mg/l de mioinositol, 30 g/l de sacarosa y gelificado con 2,5 g/l gelrite. A la cuarta semana de cultivo se evaluó el número de yemas contaminadas por hongos y bacterias, así como el número final de yemas establecidas y la influencia de la edad fisiológica de las yemas. En la micropropagación de *G. angustifolia*, se lograron además resultados en embriogénesis somática. Se obtuvieron callos proembriogénicos a partir de yemas axilares en un medio suplementado con 6 mg/l de 2-4D. Los callos obtenidos fueron transferidos a medios sin auxinas donde se observó la aparición de estructuras embriogénicas. Los resultados obtenidos sugieren la presencia de un proceso de regeneración vía embriogénesis somática en *G. angustifolia*, el cual no ha sido descrito hasta el momento.

Palabras clave: bambusas, cultivo de tejidos in vitro, embriogénesis somática, organogénesis, Poaceae.

Abstract

Plants were obtained from chusquines of *Guadua angustifolia* through in vitro regeneration of axillary buds. The evaluated disinfection methods were: mercury dichloride (HgCl₂) and sodium hypochlorite (NaClO). The best culture medium was composed by MS salts and vitamins supplemented with 6 Benzylaminopurine 2,5-5,0 mg/l, myo-Inositol 10 mg/l, sucrose 30 g/l and 2,5 g/l Gelrite®. Buds were tested during four weeks for contamination; the final number of established buds and the influence of the physiological age were evaluated. Somatic embryogenesis was also achieved. Proembryogenic calli from axillary buds was induced with 2,4-D. Calli were transferred to media without auxin where embryogenic structures were observed. The results suggest the presence of a regeneration process through somatic embryogenesis on *Guadua angustifolia*, which has not been described before.

Key words: bamboo, in vitro tissue culture, organogenesis, Poaceae, somatic embryo genesis.

INTRODUCCIÓN

La especie *Guadua angustifolia* Kunth conocida comúnmente como guadua, es el bambú tropical económicamente más importante. Esta especie se extiende en América del Sur hacia el norte, hasta los Andes venezolanos y hacia el sur hasta la frontera entre Ecuador y Perú (Judziewicz et al., 1999).

Esta especie es especialmente abundante a bajas altitudes en los Andes colombianos y ecuatorianos,

donde desempeña un papel importante en la vida diaria de sus habitantes, quienes le dan usos diferentes como leña, construcción, fabricación de artesanías y muebles, protección de suelos y fuentes de agua (Cruz, 1994). Puede alcanzar hasta 30 m de altura y 15-20 cm de diámetro. Su crecimiento óptimo se estima en altitudes entre 0-1.800 m, temperatura entre 17-24 °C y precipitaciones anuales entre 2.000-4.000 mm (Castaño y Moreno, 2004).

Recibido: junio de 2004; aceptado para publicación: mayo de 2005.

¹ Grupo de Investigación en Biodiversidad y Biotecnología, Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira (Risaralda), Colombia.

² Universidad Tecnológica de Pereira. La Julita, Pereira (Risaralda), Colombia. Correo electrónico: <ubioteve@utp.edu.co>.

En los últimos años el uso del bambú para la construcción se ha incrementado, debido a su bajo costo y a las ventajas que este material ofrece. De todos los bambúes americanos *G. angustifolia* es el más usado debido a la superioridad mecánica que posee, al bajo peso, la facilidad para su manejo y procesamiento y los bajos costos (Londoño, 1990).

En Colombia, los guaduales se concentran en la región central de los Andes, generalmente entre los 1.000-1.500 m de altitud. En esta región los bosques nativos han sido fuertemente deforestados lo que ha conllevado una fuerte presión sobre los guaduales y la destrucción general de sus hábitats y provocado la disminución evidente de su extensión, afectando drásticamente sus ecosistemas y la diversidad genética de la especie. A pesar de esto, los guaduales (nativos y plantados) sirven como refugios para muchos animales (micos, ardillas, armadillos, aves e insectos) y gran diversidad de flora se encuentra asociada con ellos (Cruz, 1994).

La reproducción sexual de la guadua, si bien garantiza el mantenimiento de su diversidad genética, presenta grandes dificultades, debido a que la especie florece anualmente después de un período seco, y la obtención de la semilla es difícil, ya que alto porcentaje de los *florets* son parasitados durante estados inmaduros, dificultando conservar las semillas a largo plazo. Y aunque los porcentajes de germinación de las semillas son altos (95-100%), es muy difícil la obtención de suficiente cantidad de forma regular (Gómez y Agudelo, 2003).

En la propagación de algunas plantas tropicales no mejoradas genéticamente y de plantaciones espontáneas como la guadua, se ha utilizado material de diferente origen y procedencia, lo cual no garantiza el establecimiento de plantaciones uniformes con las características deseadas. Debido a esto, se hace importante establecer métodos de multiplicación vegetativa que garanticen la obtención de grandes cantidades de material con características idóneas, para el establecimiento de plantaciones (Manzur, 1988).

Actualmente, en el mundo, la micropropagación es la principal técnica aplicada a varias especies de bambú. Gielis et al. (1995) expresan la importancia

del desarrollo de la biotecnología en bambúes con el fin de aprovechar el potencial que este tipo de plantas posee para la construcción, desarrollo de artesanías, protección de suelos, etc.

La mayoría de reportes conocidos sobre la micropropagación de bambúes se refieren a especies asiáticas (Chang y Hung-Lan, 1995; Prutpongse y Gavinlertvana, 1992; Saxena, 1990; Saxena y Dhawan, 1999) en ellos se han desarrollado diferentes métodos para la propagación a gran escala con fines principalmente comerciales. Respecto a la multiplicación in vitro de las especies americanas se conocen pocos reportes (Jiménez et al., 2004; Manzur, 1988; Woods et al., 1992).

En este trabajo se investigaron métodos de propagación in vitro en *G. angustifolia* (brotación axilar y embriogénesis somática), con el fin de obtener, a partir de material seleccionado, producción a gran escala de plántulas para la reforestación y el establecimiento de plantaciones comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Micropropagación a partir de yemas axilares

Material vegetal de partida. Para la inducción de yemas in vitro, se establecieron en el vivero de la Universidad Tecnológica de Pereira chusquines de *G. angustifolia* obtenidos a su vez del vivero de la Corporación Autónoma Regional de Risaralda (CARDER) ubicado en la Virginia (Risaralda), Colombia, los cuales se sometieron a podas de rejuvenecimiento para estimular la producción de brotes y nuevas ramas. En esta fase se realizaron aplicaciones semanales con fungicidas (Benlate[®] y Vitavax[®] (1 mg/l) y fertilizante foliar de la marca Microfertifiza[®] una vez por semana.

Desinfección. De los chusquines establecidos en el vivero se seleccionaron ramas jóvenes con yemas bien definidas, las cuales fueron cortadas y llevadas al laboratorio en donde se realizó un lavado con abundante agua y detergente comercial Pursue[®] aplicado con algodón (20 a 30 min). Las yemas (segmentos nodales de 5 a 8 mm con una yema) fueron individualizadas y lavadas con abundante agua. Posteriormente se realizó una predesinfección con etanol al 70% durante tres minutos. Las yemas

fueron lavadas con agua destilada estéril dentro de la cabina de flujo laminar.

Se evaluaron dos tipos de desinfectantes: bicloruro de mercurio (HgCl_2) e hipoclorito de sodio (NaClO) con distintos tiempos de aplicación, resultando los siguientes tratamientos: **Tratamiento 1.** HgCl_2 0,3% durante 5 min; **Tratamiento 2.** HgCl_2 0,3% durante 10 min; **Tratamiento 3.** NaClO 2% durante 10 min; **Tratamiento 4.** NaClO 2% durante 15 min; **Tratamiento 5.** NaClO 2% durante 20 min.

Para cada tratamiento se emplearon entre 130 y 180 explantes. Registrándose el número de yemas contaminadas por hongos y bacterias, así como el número final de yemas establecidas (sin contaminación) a la cuarta semana de cultivo.

Establecimiento. Basados en la mayoría de los reportes previos en micropropagación de bambusas (Manzur, 1988; Muñoz et al., 1998; Rao y Rao, 1988; Saxena, 1990; Woods et al., 1992), el medio de cultivo para el establecimiento estaba compuesto por las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 100 mg/l de mioinositol, 30 g/l de sacarosa y gelificado con gelrite a razón de 2,5 g/l.

Edad fisiológica de las yemas. Se seleccionaron yemas de los tercios basal, medio y apical de ramas jóvenes de los chusquines mantenidos in vitro. Se utilizaron 200-400 yemas para los ensayos de cada tercio, evaluándose el porcentaje de establecimiento y brotación para cada tipo de explante.

Concentración de 6-BAP. Se probaron diferentes concentraciones de 6-BAP en el medio: 1-2,5 y 5,0 mg/l. En total fueron sembradas 200-250 yemas por cada tratamiento, y fueron incubadas durante una semana en condiciones de oscuridad a 28 °C y posteriormente se transfirieron a cámaras de cultivo con iluminación artificial (2.000 lux, 12 horas luz). Se evaluó el número de yemas con brotes para cada uno de los tratamientos a la cuarta semana de cultivo.

Multiplicación y enraizamiento. Los brotes obtenidos en la fase de establecimiento fueron multiplicados en un medio MS (similar al ya mencionado) suplementado con 2,5 mg/l de 6-BAP, e incubados

en cámaras de cultivo con iluminación artificial (2.000 lux, 12 horas luz). Los subcultivos se realizaron cada cuatro semanas individualizando los nuevos brotes producidos. Para inducir el enraizamiento de los brotes, éstos fueron transferidos a un medio con 1 mg/l de AIA.

Aclimatación in vitro. Las plántulas obtenidas fueron transferidas in vitro para evaluar su capacidad de aclimatación a condiciones ambientales, estas fueron plantadas en bandejas plásticas utilizando como sustrato una mezcla de suelo y arena (3:1). Durante los primeros ocho días fueron mantenidas en cámara húmeda, transcurrido este tiempo se retiró la cubierta y se evaluó su supervivencia. Las plantas permanecieron durante seis semanas in vitro y luego fueron trasplantadas a bolsas. En esta etapa se les hicieron aplicaciones semanales con el fertilizante foliar Microfertifera®.

Micropropagación vía embriogénesis somática

Material de partida y desinfección de explantes. Para la fase de establecimiento se partió del mismo material (yemas provenientes de chusquines) que el empleado en los ensayos para micropropagación por brotación axilar. El protocolo de desinfección consistió en un lavado de los explantes con el detergente comercial Pursue® aplicado durante 20 min, posteriormente las ramas se sumergieron en etanol al 70% durante un minuto, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril y un tratamiento de 10 min en HgCl_2 al 0,3% adicionado con 2 gotas de Tween 20®, luego de lo cual se lavaron los explantes con agua destilada estéril.

Formación y multiplicación de callos e inducción de la respuesta embriogénica. Para la inducción de la callogénesis, se utilizó el mismo medio de cultivo MS base utilizado para los ensayos de micropropagación por organogénesis, pero a la mitad de la concentración de sales. Y se empleó como único regulador de crecimiento el 2,4-D en diferentes concentraciones: 6, 8 y 10 mg/l. Para cada tratamiento se emplearon entre 30-60 explantes (yemas axilares). Todos los ensayos incluyeron ocho semanas de observación con incubación a 28 °C en condiciones de oscuridad.

Una vez obtenidos los primeros callos, éstos fueron divididos y subcultivados en segmentos pequeños (0,5 cm de diámetro aproximadamente), en medios con 6, 8 y 10 mg/l de 2,4-D e incubados en oscuridad a 28 °C. Para cada tratamiento se inocularon entre 30 y 50 callos. Se evaluó el crecimiento de los callos, la oxidación y el necrosamiento.

Los callos multiplicados en medios con 6, 8 y 10 mg/l de 2,4-D se emplearon también para evaluar la respuesta embriogénica (aparición de nódulos y proembriones en los callos).

Diferenciación de embriones. A partir de la aparición de nódulos y de proembriones en los callos cultivados en 6 y 8 mg/l de 2,4-D, se decidió transferir los callos proliferados en estos mismos medios, a medios sin hormonas, y con bajas concentraciones 0,5 mg/l de ácido indolacético (AIA) y ácido giberélico (GA₃) con el fin de promover la diferenciación de los embriones, en condiciones de luz y oscuridad. Para cada tratamiento se emplearon entre 30 y 60 callos (0,5 cm de diámetro aproximadamente). Se evaluó el crecimiento de los callos, la nodulación, la presencia de embriones diferenciados, la oxidación y el necrosamiento.

Análisis estadístico. Como método de análisis estadístico, para todos los ensayos (brotación axilar y embriogénesis somática), se empleó la prueba Chi-cuadrado de Pearson, sobre las tablas de contingencia elaboradas como respuesta en cada experimento. Este

estadístico se construye a partir de las diferencias entre las frecuencias observadas y las esperadas bajo la hipótesis de independencia. Cuando se encontró dependencia entre las variables se acudió al cálculo del coeficiente de contingencia como una medida del grado de asociación entre las variables evaluadas. Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete estadístico SPSS versión 8.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Micropropagación a partir de yemas axilares

Desinfección. El estadístico Chi-cuadrado de Pearson evidencia que para un nivel de significancia de 1%, el tratamiento HgCl₂ (0,3%, 10 min) es el de mejor respuesta para la desinfección de yemas (74,6%), de esta manera, las respuestas evaluadas dependen del tratamiento aplicado con un nivel alto de asociación dado por el coeficiente de contingencia (tabla 1). Este resultado, en combinación con el manejo de las plantas donadoras en fase 0 (aplicación de bactericidas y funguicidas específicos, tabla 1), permitieron disponer de un protocolo efectivo para la desinfección de yemas obtenidas a partir de chusquines cultivados en vivero. En otros trabajos con bambusas, se ha logrado también la desinfección de explantes con HgCl₂, (Saxena, 1990; Ramanayake et al., 2001). Sin embargo, en vista de la alta toxicidad del HgCl₂, Jiménez et al. (2004) en su trabajo sobre micropropagación de *G. angustifolia* en Costa Rica, propusieron el uso de NaOCl (10% durante 10 min) en combinación con el producto comercial PPM®

Tabla 1. Resultados de la de desinfección de yemas de *Guadua angustifolia* con HgCl₂ y NaClO y distintos tiempos de aplicación

Tratamiento	Número de explantes de partida	Tiempo de aplicación (minutos)	Yemas contaminadas por bacterias (%)	Yemas contaminadas por hongos (%)	Yemas establecidas (%)
1. HgCl ₂ 0,3%	140	5	27,8	19,3	52,8
2. HgCl ₂ 0,3%	138	10	18,8	6,5	74,6
3. NaClO 2%	175	10	32,6	52,0	15,4
4. NaClO 2%	147	15	33,3	53,7	12,9
5. NaClO 2%	127	20	41,7	47,2	11,0

Diferencias altamente significativas entre tratamiento vs. yemas establecidas. Test de Chi-cuadrado de Pearson (p < 0,01) y Coeficiente de contingencia (p < 0,01).

(Plant Preservative Mixture) en el medio de cultivo (2 ml) como una alternativa eficaz para la descontaminación de explantes nodales.

Establecimiento: edad fisiológica de las yemas. El estadístico Chi-cuadrado de Pearson evidencia que para un nivel de significancia de 1% existe asociación entre la posición de la yema en la rama con respecto al establecimiento in vitro, particularmente el tercio apical mostró la respuesta más positiva (73,6%) con nivel medio de asociación dado por el coeficiente de contingencia (tabla 2). La eficiencia en la desinfección y la regeneración de los explantes están asociados a la edad fisiológica y la posición en la planta de los explantes. Según George y Sherrington (1984), el estado de desarrollo de la planta madre y la edad fisiológica del explante son de gran influencia en el éxito del cultivo in vitro.

Sin embargo, aunque no existen diferencias significativas, estas yemas más jóvenes mostraron menores valores de brotación (1,8%) que las del tercio medio y basal (tabla 2), ya que mientras menor sea el tamaño y por ende su estado de diferenciación, menor será el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, en tanto que con el aumento del tamaño y la madurez, es mayor el peligro de contaminación y más rápido el

crecimiento y la regeneración (Jiménez, 1998). En general, estos resultados concuerdan con los reportados por Jiménez et al. (2004) quienes micropropagaron *G. angustifolia* costarricense y utilizaron para el establecimiento segmentos nodales procedentes de ramas laterales de plantas adultas.

Concentración de 6-BAP. El estadístico Chi-cuadrado de Pearson evidencia que para un nivel de significancia de 5% la brotación es independiente del tratamiento aplicado (tabla 3). Al evaluar las tres concentraciones de 6-BAP (1-2,5 y 5,0 mg/l), si bien no existen diferencias significativas, la mejor respuesta se obtuvo con la concentración 2,5 mg/l alcanzándose un 47,6% de yemas brotadas (tabla 3). En estos materiales se observó que a partir de los ocho días de cultivo comenzaron a emerger los brotes (figura 1A) y dos semanas después aparecieron las primeras hojas completamente desarrolladas. Nuestros resultados concuerdan ampliamente con Jiménez et al. (2004), quienes reportan una concentración de 3 mg/l de BAP para la brotación de yemas de *G. angustifolia* en Costa Rica.

Los resultados de estos experimentos demuestran la necesidad de la adición de citoquininas al medio de cultivo para estimular la brotación de las yemas axi-

Tabla 2. Evaluación de la respuesta de la yemas de *Guadua angustifolia* provenientes de chusquines teniendo en cuenta su posición en la rama

Posición de la yema	Número de explantes de partida	Yemas establecidas (%)	Yemas brotadas (%)
Tercio basal	423	31,9	2,8
Tercio medio	353	43,3	4,0
Tercio apical	224	73,6	1,8

Diferencias altamente significativas entre posición de la yema vs. yemas establecidas. Test de Chi-cuadrado de Pearson ($p < 0,01$) y Coeficiente de contingencia ($p < 0,01$).

Tabla 3. Efecto de la concentración de 6-BAP sobre brotación de yemas de *G. angustifolia*

Concentración de 6-BAP mg/l	Número de yemas	Brotación (%)
1,0	255	39,6
2,5	210	47,6
5,0	243	44,0

No existen diferencias significativas entre concentración de 6-BAP vs. brotación. Test de Chi-cuadrado de Pearson ($p > 0,05$).

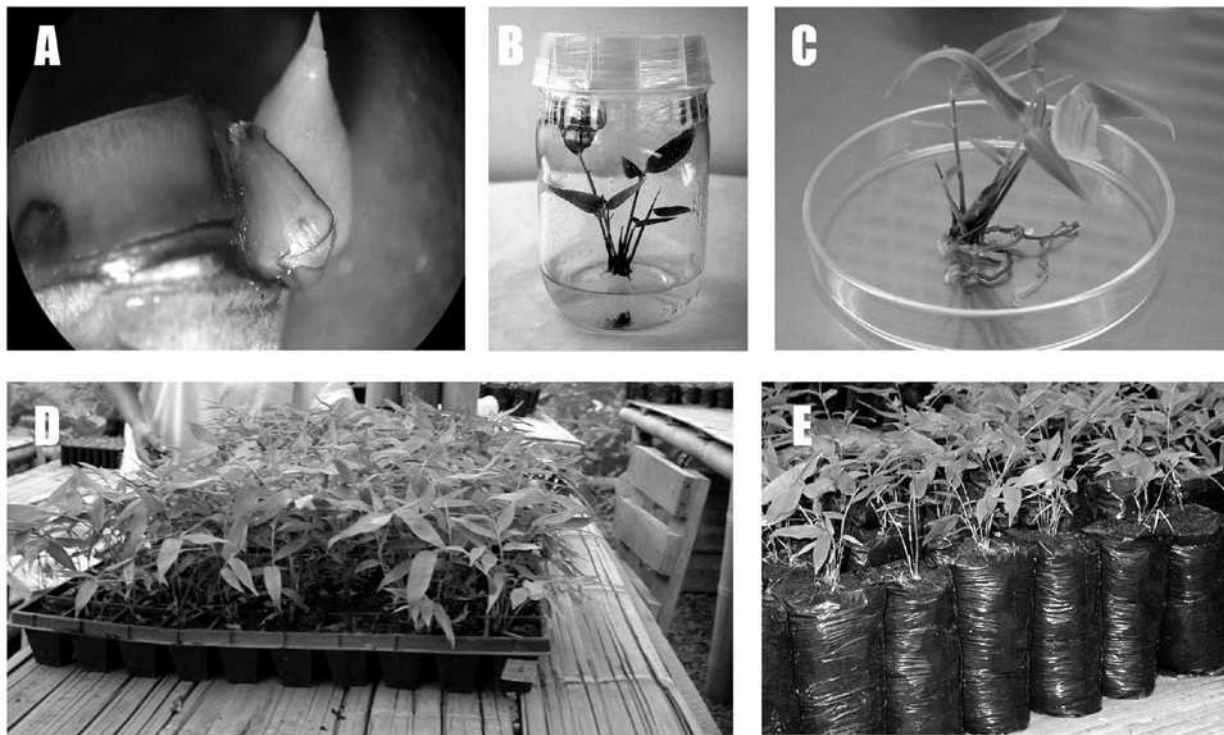


Figura 1. Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth a partir de yemas axilares provenientes de chusquines. **1A.** Establecimiento y brotación de yemas (12 mm) en medio MS + 2,5 mg/l de 6-BAP. **1B.** Multiplicación de plántulas (55 mm) en medio MS + 2,5 mg/l de 6-BAP. **1C.** Plántulas enraizadas (65 mm) en medio MS + 1,0 mg/l de IAA. **1D.** Endurecimiento de vitroplantas en vivero (150 mm). **1E.** Traslado de plantas a bolsa

lares obtenidas de chusquines. Usualmente durante la fase de establecimiento, cuando se emplean yemas o ápices, es necesaria la adición exógena de citoquininas al medio de cultivo debido a que en estos órganos la concentración endógena de este tipo de regulador del crecimiento es baja (Jiménez, 1998).

En otras Poaceae como *Bambusa tulda* Roxb (Saxena, 1990), *Bambusa arundinacea*, *Dendrocalamus strictus* y *Bambusa vulgaris* (Rao y Rao, 1988) se reporta el uso de citoquininas (6-BAP) a concentraciones entre 4-10 mg/l durante la fase de establecimiento.

Multiplicación y enraizamiento. Los brotes obtenidos fueron multiplicados en medio MS con 2,5 mg/l de 6-BAP, realizándose subcultivos cada cuatro semanas. Los brotes multiplicados eran de aspecto vigoroso y con buen desarrollo vegetativo (2 a 4 hojas) (figura 1B).

Un total de 345 brotes se obtuvieron a partir de 170 explantes iniciales. Así la tasa de multiplicación fue

de 2 explantes por explante original. Esta baja tasa de multiplicación es similar a la encontrada por Jiménez et al. (2004), quienes reportan para la misma especie una tasa de multiplicación promedio de 2,5 explantes por explante original. En otras especies de bambusas, la tasa de multiplicación ha sido muy variable (Gielis et al., 2002; Rao y Rao, 1988; Saxena, 1990).

Las plántulas fueron transferidas a un medio MS con 1 mg/l de AIA. En estas condiciones el 90% de las mismas enraizaron y alcanzaron alturas entre 7 y 10 cm (figura 1C). Igualmente la elongación y enraizamiento de las plantas es fácilmente inducible al eliminarse las citoquininas del medio de cultivo y adicionar concentraciones bajas de una auxina suave como el AIA. En general, el enraizamiento en bambusas introducidas in vitro se ha verificado sin mayores problemas (Gielis et al., 2002; Jiménez et al., 2004; Rao y Rao, 1988; Saxena, 1990).

Acimatación en vivero. Se transfirieron a vivero 300 plántulas de las cuales el 95% endurecieron

(figura 1D). Una vez aclimatizadas se pasaron a bolsas (figura 1E) y se abonaron semanalmente con el fertilizante foliar Microfertifiza®. Las plantas de guadua fueron llevadas a campo y actualmente se está realizando una evaluación de su crecimiento y desarrollo. Para otras Poaceae se han reportado tasas de supervivencia, en la fase de endurecimiento, superiores al 70% (Gielis et al., 2002; Rao y Rao, 1988; Saxena, 1990).

Micropropagación vía embriogénesis somática

Formación y multiplicación de callos. La respuesta de las yemas axilares a los tratamientos con 2,4-D fue positiva para la formación de callo sólo en el caso de la concentración de 6 mg/l (datos no mostrados). Luego de aproximadamente 90 días de incubación en oscuridad a 28 °C, se observó la aparición de callo primario (friable y blanco) que se formó en la zona más juvenil de la yema axilar (figura 2A). Estos resultados contrastan con lo encontrado por Muñoz et al. (1998) con *Dendrocalamus giganteus*, en el cual se obtuvo respuesta callogénica con yemas axilares (a los 15 días) utilizando concentraciones entre 2-20 mg/l

de 2,4-D, con mejores resultados de proliferación de callos a una concentración de 4 mg/l. Sin embargo, Yeh y Chang (1987) trabajando con embriones cigóticos de *Sinocalamus latiflora* lograron callo con aspecto nodular sólo después de 90 días de cultivo utilizando 6 mg/l de 2,4-D + 3 mg/l de kinetina.

Los callos formados con 6 mg/l de 2,4-D se multiplicaron en medios de cultivo con concentraciones de 6, 8 y 10 mg/l de esta auxina. Como puede verse en la tabla 4, el estadístico Chi-cuadrado de Pearson evidencia que para un nivel de significancia de 5% el crecimiento es independiente del tratamiento aplicado. A pesar de no existir diferencias significativas, la tasa de multiplicación de los callos fue alrededor de 50%, para las tres concentraciones, luego de cuatro semanas en oscuridad (tabla 4).

De otra parte, a pesar de que el estadístico Chi-cuadrado de Pearson evidencia que para un nivel de significancia de 5% la oxidación es independiente del tratamiento aplicado, el porcentaje de oxidación (70%) para los callos proliferados con 10 mg/l es alto, al igual que el 27% de necrosamiento (el cual

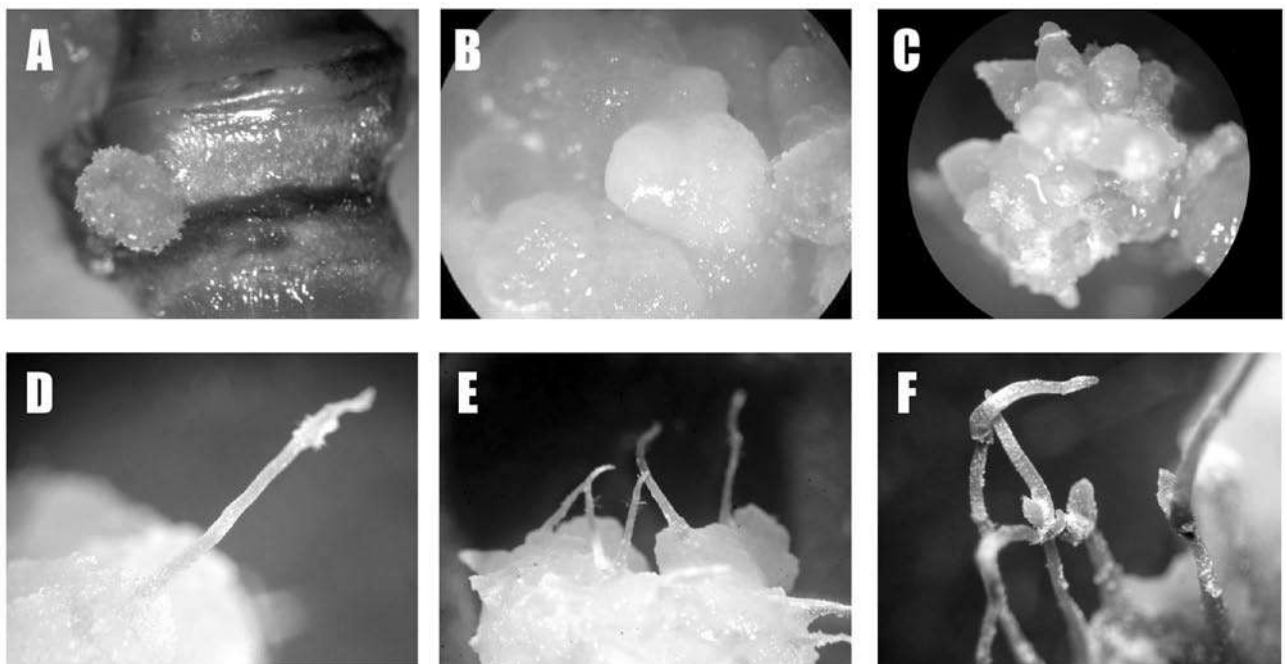


Figura 2. Embriogénesis somática en *Guadua angustifolia* Kunth. **2A.** Formación de callo a partir de segmento nodal (10 mm) en 6 mg/l de 2,4-D. **2B.** Callo nodular (15 mm) en medios 6-8 mg/l de 2,4-D. **2C.** Proembriones (0,05 mm) en callos en medios 6-8 mg/l de 2,4-D. **2D, E, F.** Embriones en fase coleptilar (10 mm) a partir de callo nodular en medio sin auxinas

Tabla 4. Respuesta de los callos multiplicados (en oscuridad) con 6, 8 y 10 mg/l de 2,4-D

Concentración de 2,4-D	Número de callos de partida	Crecimiento (%)	Nodulación (%)	Oxidación (%)	Necrosamiento (%)
6 mg/l	50	48	48	52	0
8 mg/l	44	50	50	43	9
10 mg/l	30	57	0	70	27

No existen diferencias significativas entre concentración vs. crecimiento y concentración vs. oxidación. Test de Chi-cuadrado de Pearson ($p > 0,05$).

es estadísticamente significativo) (tabla 4). El 2,4-D es la auxina más empleada en la inducción de callogénesis en las diferentes especies de bambú, bien sea sólo (Dekkers et al., 1987; Mascarenhas et al., 1988; Rao et al., 1985) o en combinación con citoquininas (Muñoz et al., 1998; Saxena y Dhawan, 1995; Yeh y Chang, 1986, 1987).

Inducción de la respuesta embriogénica. A partir de los resultados anteriormente descritos sobre multiplicación, se observó la aparición de callos compactos y nodulares (figura 2B) y de proembriones (tanto en callos friables como en callos compactos). El estadístico Chi-cuadrado de Pearson evidencia que para un nivel de significancia de 5% existe asociación entre el tratamiento aplicado y la nodulación, siendo los de mejor respuesta los tratamientos de 6 y 8 mg/l de 2,4-D (alrededor del 50%), en tanto que los callos multiplicados en 10 mg/l de 2,4-D no mostraron

nodulación (tabla 4). En especies monocotiledóneas y especialmente en gramíneas, los callos que tienen alto potencial organogénico y embriogénico son del tipo compacto y nodular (Muñoz et al., 1998; Rao et al., 1985; Yeh y Chang, 1986). Además, en el caso del bambú, los callos de tipo friable, son organogénicos y por tanto son capaces de regenerar raíces (Dekkers et al., 1989; Muñoz et al., 1998). Este último fenómeno también apareció en los callos de *G. angustifolia*, pero en muy baja frecuencia (datos no mostrados).

Diferenciación de embriones. Teniendo en cuenta tanto la aparición de callos nodulares como de proembriones (figura 2C) se procedió a subcultivar los callos multiplicados en los medios con 6 y 8 mg/l de 2,4-D en medios de cultivo sin auxinas, ya que, para diferentes sistemas de embriogénesis somática se requiere una auxina sintética para la inducción de la embriogénesis, seguida por la transferencia a

Tabla 5. Respuesta de los callos multiplicados en oscuridad con 6 y 8 mg/l de 2,4-D y transferirlos a medios sin hormonas y a medios con AG₃ y AIA

Tratamientos	Número de callos de partida	Crecimiento (%)	Nodulación (%)	Oxidación (%)	Necrosamiento (%)
2,4-D 6 mg/l					
Sin hormonas	65	69	69	43	10
AIA 0,5 mg/l	45	88	88	11	0
GA3 0,5 mg/l	48	100	100	21	0
2,4-D 8 mg/l					
Sin hormonas	33	42	42	15	0
AIA 0,5 mg/l	44	88	88	11	0
GA3 0,5 mg/l	48	69	69	31	0

Diferencias altamente significativas entre tratamiento vs. crecimiento, tratamiento vs. nodulación y “tratamiento vs. oxidación. Test de Chi-cuadrado de Pearson ($p < 0,01$) y Coeficiente de Contingencia ($p < 0,01$).

un medio sin auxinas para la diferenciación de los embriones (Bhojwani y Razdan, 1996; Evans et al., 1981; Litz y Jarret, 1991).

Como se observa en la tabla 5, con respecto a la respuesta de los callos en los medios sin hormonas y en condiciones de oscuridad, el estadístico Chi-cuadrado de Pearson evidencia que para un nivel de significancia de 1% existe asociación entre el tratamiento y la respuesta al crecimiento y la nodulación, con un nivel alto de asociación dado por el coeficiente de contingencia, siendo mayores los porcentajes en los inóculos provenientes de 6 mg/l de 2,4-D (69%) frente a los inóculos con 8 mg/l de 2,4-D (42%).

Con respecto a la oxidación, el estadístico Chi-cuadrado de Pearson evidencia que para un nivel de significancia de 1% existe asociación entre el tratamiento y la respuesta a la oxidación con un nivel medio de asociación dado por el coeficiente de contingencia, siendo el tratamiento sin hormonas con 6 mg/l el de mayor oxidación (43%) (tabla 5).

En cuanto a las respuestas de los callos que fueron transferidos a medios de cultivo con AIA y GA₃, éstas mostraron valores significativos en cuanto a crecimiento y nodulación. Los callos provenientes de 6 mg/l mostraron crecimiento y nodulación del 100% en giberelina y del 88% para ambas variables en AIA. En tanto que la oxidación fue más significativa en GA₃ (tabla 5). De otra parte los callos provenientes de 8 mg/l mostraron crecimiento y nodulación del orden de 88% en AIA y del 69% para ambas variables en GA₃. Siendo la oxidación más significativa en GA₃ (tabla 5). Estas respuestas estarían reforzando la necesidad de transferir los callos inicialmente inducidos en medios con auxinas, a medios sin ellas (Bhojwani y Razdan, 1996).

Una evaluación general del comportamiento de los callos de *G. angustifolia* en cuanto a oxidación y necrosamiento muestra un problema que parece común con la callogénesis de otras especies de bambú, pues en el caso de *Dendrocalamus giganteus*, *Sinocalamus latiflora* y *Bambusa oldhamii*, luego de subcultivar en el mismo medio, la tasa de crecimiento disminuye y la mayoría de los callos presentan zonas necrosadas y oscurecimiento total del tejido

(Muñoz et al., 1998; Yeh y Chang, 1986, 1987). Concretamente para *G. angustifolia* la oxidación oscila entre un 10-50%, aunque el necrosamiento es significativamente bajo (tabla 5). Esta problemática se ha tratado de solucionar con subcultivos más frecuentes (cada 15 días) y la utilización de antioxidantes, de acuerdo con lo reportado por otros autores (Muñoz et al., 1998; Saxena y Dhawan, 1995; Yeh y Chang, 1986).

También se realizaron ensayos de respuesta embriogénica de callos multiplicados en 6 y 8 mg/l de 2,4-D e inoculados en medios sin auxinas pero en condiciones de luz (fotoperíodo de 12 horas). Las mejores respuestas en este caso, se obtuvieron para los callos provenientes del medio con 6 mg/l (datos no mostrados). Después de 30 días de observación de estos callos embriogénicos, se detectó la presencia de embriones claramente diferenciados. Es notable la aparición de estructuras elongadas de aproximadamente 5-15 mm formadas a partir de los callos nódulares disgregados y que pueden ser ya catalogados como embriones en fase coleoptilar (figuras 2D, E y F).

CONCLUSIONES

Brotación axilar. La mejor desinfección (75%) de las yemas axilares provenientes de chusquines se logró utilizando bicloruro de mercurio al 0,3% durante 10 min, este protocolo se empleó tanto para la micropropagación por organogénesis como por embriogénesis.

Aunque la desinfección es más efectiva utilizando yemas apicales, y estas yemas más jóvenes mostraron altos porcentajes de establecimiento (73,6%), sus tasas de brotación son bajas (1,8%) con respecto a las yemas de los tercios medio y basal.

La mejor respuesta para la brotación de yemas de *G. angustifolia* se obtuvo con 2,5 mg/l de 6-BAP (47,6%), siendo la tasa de multiplicación de 2 explantes por explante original.

El enraizamiento de las vitroplantas (90%) se logró con 1 mg/l de AIA en el medio de cultivo.

Se alcanzó el 95% de endurecimiento de las vitroplantas transferidas a vivero.

Embriogénesis somática. A partir de yemas axilares de *G. angustifolia*, se logró la inducción de callogénesis utilizando medio MS a la mitad de la concentración de sales suplementado con 6 mg/l de 2,4-D y luego de aproximadamente 90 días de incubación en oscuridad a 28 °C.

Los callos formados con 6 mg/l de 2,4-D se multiplicaron en oscuridad a 28 °C en medios de cultivo con concentraciones de 6, 8 y 10 mg/l de esta auxina. La mejor respuesta se obtuvo en las concentraciones de 6 y 8 mg/l, en las cuales se observó la aparición de callos compactos nodulares y proembriones.

Al transferir los callos multiplicados en medios con 6 y 8 mg/l de 2,4-D, a medios sin auxina (sin hormonas,

con AIA y con GA₃) y en oscuridad a 28 °C, se observó la aparición de estructuras nodulares embriogénicas, fácilmente disgregables.

Al inocular los callos multiplicados en medios con 6 y 8 mg/l de 2,4-D, a medios sin auxinas pero en condiciones de luz (fotoperíodo de 12 horas), se evidenció la aparición de embriones claramente diferenciados (fase coleoptilar) en los callos provenientes de 6 mg/l de 2,4-D, luego de 30 días de incubación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos por el apoyo financiero de COLCIENCIAS, Universidad Tecnológica de Pereira y al convenio UTP-GTZ.

REFERENCIAS

- Bhojwani S, Razdan M.** 1996. *Plant tissue culture: theory and practice*, a revised edition. Elsevier. Amsterdam.
- Castaño F, Moreno RD.** 2004. *Guadua para todos. Cultivo y aprovechamiento*. Proyecto Manejo Sostenible de Bosques de Colombia. Bogotá.
- Chang W, Hung-Lan T.** 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from roots of bamboo (*Bambusa beecheyana* Munro var *beecheyana*). *Journal Plant Physiology*, 145:535-538.
- Cruz H.** 1994. *La Guadua: Nuestro bambú*. Centro Nacional para el Estudio del Bambú-Guadua. Corporación Autónoma Regional del Quindío CRQ. Armenia.
- Dekkers AJ, Rao AN, Loh CS.** 1987. In vitro callus in bamboos *Schizostachyum* and *Thyrsostachys* species. En: Rao AN, Dhanarajan G, Sastry CB (eds.). *Recent research on bamboo. Proceeding of the International Bamboo Workshop*. The Chinese Academy of Forestry and International Development Research Center, Singapore. pp. 170-174.
- Evans D, Sharp W, Flick C.** 1981. Growth and behavior of cell culture: embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T (ed.). *Plant tissue culture: methods and applications in agriculture*. Academic Press, California. pp. 170-175.
- George EF, Sherrington PD.** 1984. *Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories*. Exegetics Ltd. Basingstoke. U. K.
- Gielis J, Everaert I, Goetghbeurand P, Deloose M.** 1995. *Bamboo and molecular markers*. International Network for Bamboo and Rattan (INBAR). <http://www.inbar.int/publication/txt/INBAR_PR_05_1.htm>. Fecha de consulta: 5 de julio de 2005.
- Gielis J, Peeters H.** 2002. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. Proceeding of the Twentieth International Escarpia Symposium, Section Ornamentals. *Acta Horticulture*, 522:195-203.
- Gómez GD, Agudelo CA.** 2003. Aspectos fenológicos de *Guadua angustifolia*. *Revista de Investigaciones Universidad del Quindío*, 4(12):9-21.
- Jiménez EA.** 1998. Cultivo de ápices y meristemos. En: Pérez Ponce, JN (ed.). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 45-56.
- Jiménez VM, Castillo J, Tavares E, Guevara E, Montiel M.** 2004. Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth a partir de explantes nodales. En: Aristizábal V (ed.). *Memorias Simposio Internacional Guadua 2004*. Pereira, Colombia. pp. 198-206.
- Judziewicz EJ, Clark LG, Londoño X, Stern M.** 1999. *American bamboos*. Smithsonian Institution Press. Washington, D. C.
- Litz R, Jarret R.** 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca W, Mroginski L (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, C. I. A. T. Cali, Colombia. pp.144-172.
- Londoño X.** 1990. Aspectos sobre la distribución y la ecología de los bambúes en Colombia (Poaceae: Bambusoideae). *Caldasia*, 16(77):139-153.
- Manzur D.** 1986. Cultivo de embriones de *Guadua angustifolia* Kunt in vitro. *Revista de la Universidad de Caldas*, 7:26-33.
- Manzur D.** 1988. Propagación vegetativa de *Guadua angustifolia* Kunt. *Agronomía*, 2:14-19.
- Mascarenhas A, Nadgir S, Thengane C, Phadke S, Khuse S, Shirgurkar M, Parasharami V, Nadgauda L.** 1988. *Potential application of tissue culture for propagation of Dendrocalamus strictus*. International Network for Bamboo and Rattan (INBAR). <http://www.inbar.int/publication/txt/INBAR_PR_02.htm>. Fecha de consulta: 5 de julio de 2005.
- Muñoz M, Guevara E, Montiel M.** 1998. Regeneración in vitro del bambú gigante *Dendrocalamus giganteus* (Poaceae). *Revista de Biología Tropical*, 46(3):50-56.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Prutpongse P, Gavinlertvatana P.** 1992. In vitro micropropagation of 54 species from 15 genera of bamboo. *HortScience*, 27:453-454.

- Ramanayake SMSD, Wanniarachchi WVR, Tennakoon TMA.** 2001. Axillary shoot proliferation and *in vitro* flowering in an adult giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 37:667-671.
- Rao R, Rao U.** 1988. *Tissue culture approaches to the mass-propagation and genetic improvement of bamboos.* International Network for Bamboo and Rattan (INBAR). <http://www.inbar.int/publication/txt/INBAR_PR_02.htm>. Fecha de consulta: 5 de julio de 2005.
- Rao U, Rao R, Narang V.** 1985. Somatic embryogenesis and regeneration of plant in the bamboo *Dendrocalamus strictus*. *Plant Cell Reports*, 3:191-194.
- Saxena S.** 1990. *In vitro* propagation of the bamboo (*Bambusa tulda* Roxb.) through shoot proliferation. *Plant Cell Reports*, 9:431-434.
- Saxena S, Dhawan V.** 1995. *Commercialization of Bamboo Tissue Culture.* International Network for Bamboo and Rattan (INBAR). <http://www.inbar.int/publication/txt/INBAR_PR_05_1.htm>. Fecha de consulta: 5 de julio de 2005.
- Saxena S, Dhawan V.** 1999. Regeneration and large scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 18:438-443.
- Woods SH, Phillips GC.** 1992. Somatic Embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo explants in Mexican weeping bamboo, *Otatea acuminata aztecorum*. *Plant Cell Reports*, 11:257-261.
- Yeh M, Chang W.** 1986. Plant regeneration through somatic embryogenesis in callus culture of green bamboo (*Bambusa oldhamii* Munro). *Theoretical Applied Genetics*, 73:161-163.
- Yeh M, Chang W.** 1987. Plant regeneration via somatic embryogenesis in mature embryo-derived callus culture of *Sinocalamus latiflora* (Munro) McClure. *Plant Science*, 51:93-96.

