



Grupo Calesa

HACIENDA LA ESTRELLA



*II Simposio Científico CINAP*

# DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE *Guadua angustifolia* USANDO BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL BITs, CON FINES DE REFORESTACIÓN

Heidi Hernández, Ismael Núñez, Luz Juárez, Prudencia Guevara, Angela Fuentes, Silvia López, Yumelis Saavedra, Iroel Rodríguez, Abby Guerra.

**Gerencia de Operaciones Agrícolas**  
**Departamento de CAMPO**  
**Área de Agronomía**  
**Sección de Biotecnología**

**OCTUBRE 2022**



# CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN

2. METODOLOGIA Y PROCEDIMIENTOS

3. RESULTADOS

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. BIBLIOGRAFÍA

# INTRODUCCIÓN

El bambú *Guadua* pertenece a la familia *Poaceae*, a la subfamilia *Bambusoideae* y al género *Guadua*.

Es una especie de bambú americano y reúne 30 especies. se distribuye desde México hasta el norte de Argentina, (0-1500 m).

Tiene múltiples beneficios para efectos de reforestación, construcciones, muebles, artesanías, pisos. La biomasa aporta al suelo materia orgánica, captura de CO<sub>2</sub>, libera O<sub>2</sub> a la atmosfera, y almacena grandes cantidades de agua.

La Propagación de *G. angustifolia* se realiza particularmente de manera asexual y sin o con escasa técnica de multiplicación, y tiene restricciones por su baja efectividad. El objetivo de este estudio fue desarrollar un protocolo eficaz y económico para la micropropagación de *Guadua*, utilizando Biorreactores de Inmersión Temporal (BITs), como alternativa a la masificación de la producción de plantas.

## Establecimiento *In vitro* de *Bambú Guadua angustifolia*



**Material Donante.** Rodal de *Guadua angustifolia*.



**Explantos:** Segmentos Nodales.



**Explantos** en etapa de desinfección superficial.



Segmento Nodal en *MS semisólido* +2 mg L<sup>-1</sup> BAP

Para la desinfección se utilizó 0.5% de NaCl / 1 h, detergente 5g en 250 ml / 5 min, 3% NaCl+ 2 gotas tween 20 / 10 min, seguidamente 48 horas en solución de 5 g L<sup>-1</sup> de Benomil 50WP + 5 mL L<sup>-1</sup> de Phytol 24SC.

Se utilizó medio Murashige y Skoog ( MS, 1962),+ 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Se evaluó presencia de contaminantes a los 8, 15 y 22 días después de incubados

## Multiplicación de bambú convencional



**A y B** Explantes (yemas basales e intermedias) en desarrollo y ahijamiento fase 1 (tubo), **C y D**. Planta en multiplicación inducida Fase 2

Para la multiplicación convencional se utilizaron plantas en cuarto subcultivo, se utilizó medio MS y se evaluaron 5 concentraciones de BAP 2, 3, 4, 5 y 6 mg L<sup>-1</sup>. Igual se evaluó el coeficiente de multiplicación (CM) a los 8, 15 y 22 días.

# METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO

## Montaje de BITs de *Guadua angustifolia*



Selección de vitroplantas en 4to subcultivo iniciales para BITs.



Proceso de montaje de en Biorreactores de *Guadua Angustifolia*.

En fase de multiplicación en BITs se utilizó MS con 3 concentraciones de BAP 3, 4, 5 mg L<sup>-1</sup> y utilizaron 3 frecuencias de inmersión (3, 6 y 8 horas). Se evaluó la coeficiente de multiplicación CM y calidad de la planta.

## Establecimiento In Vitro de Bambú *Guadua angustifolia*

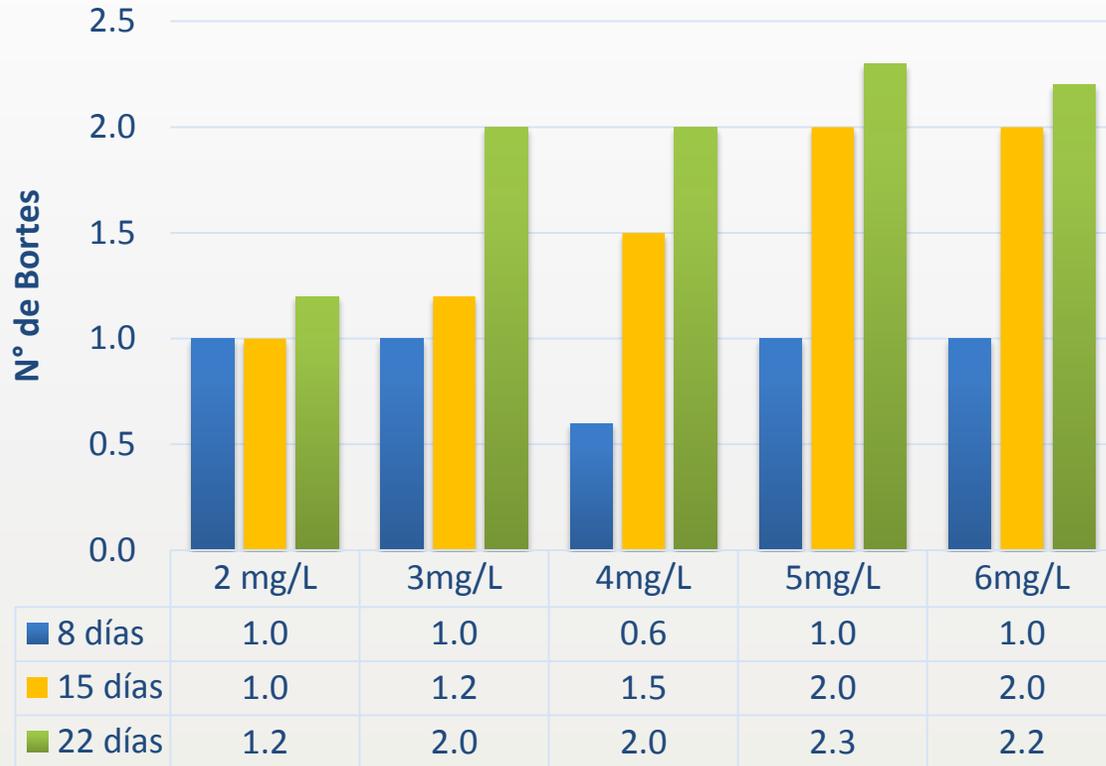


Brotación segmentos nodales **A**: Brotes de 15 días después de siembra en medio de cultivo MS con 2mg L<sup>-1</sup> de BAP. **B**. Brotación de yemas del explante inicial 2 meses de edad).

### Porcentaje de Contaminantes y sobrevivencia

Hongo	Bacterias	Muertos	Vivos
34.7%	32.7%	14.3%	18.3%

## Ensayo de Multiplicación con diferentes concentraciones de Bencilaminopurina - BAP



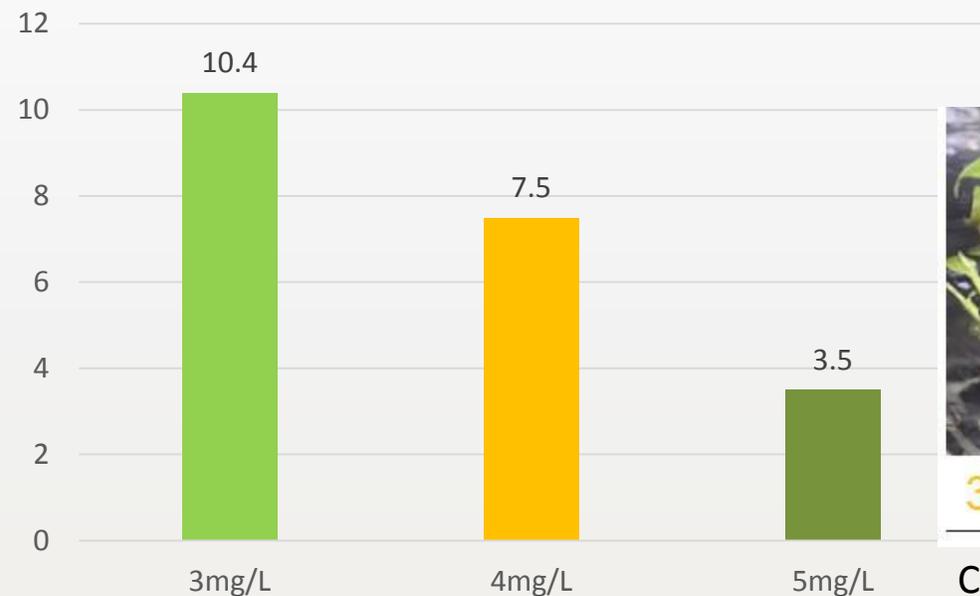
Plantas en micropropagación A y B, 3 mg L<sup>-1</sup>

A partir de los 15 días, se obtuvieron coeficientes de 2 brotes por planta a concentraciones de 5 y 6 mg L<sup>-1</sup>, mientras que a 3 y 4 mg L<sup>-1</sup> se obtienen a los 22 días.

# RESULTADOS

## Micropropagación en BITS, utilizando BAP

Multiplicación de Bambú Guadua a diferentes concentraciones de BAP



Con frecuencia de inmersión cada 3 horas

Se obtuvieron CM de 10.4, 7.5 y 3.5 para las concentraciones de 3, 4 y 5 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Concentraciones de 4 y 5 mg L<sup>-1</sup> presentaron fenolización del tejidos.

## Diferentes Frecuencias de Inmersión en BITs y calidad de la Planta

Micropropagación de *Guadua angustifolia* en BITs

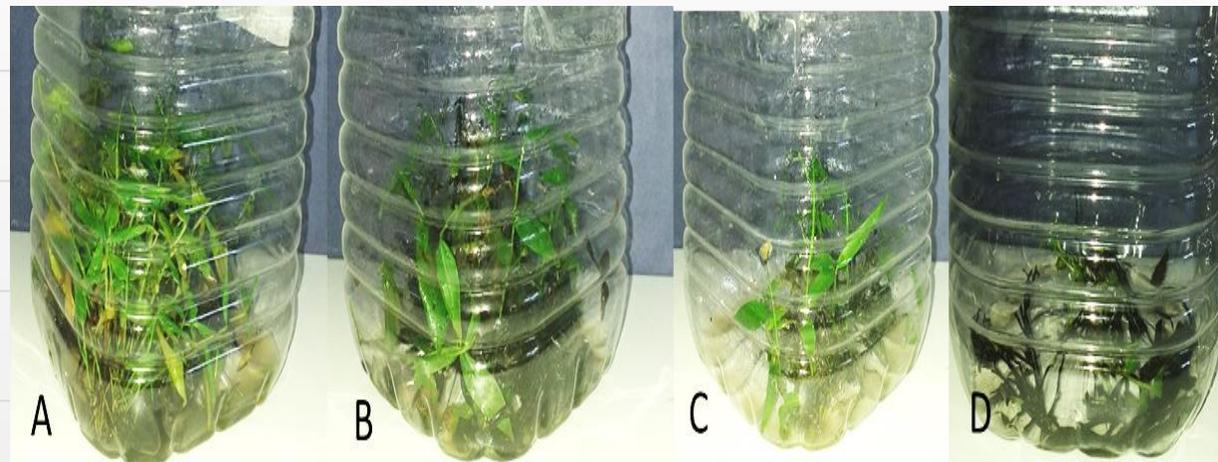
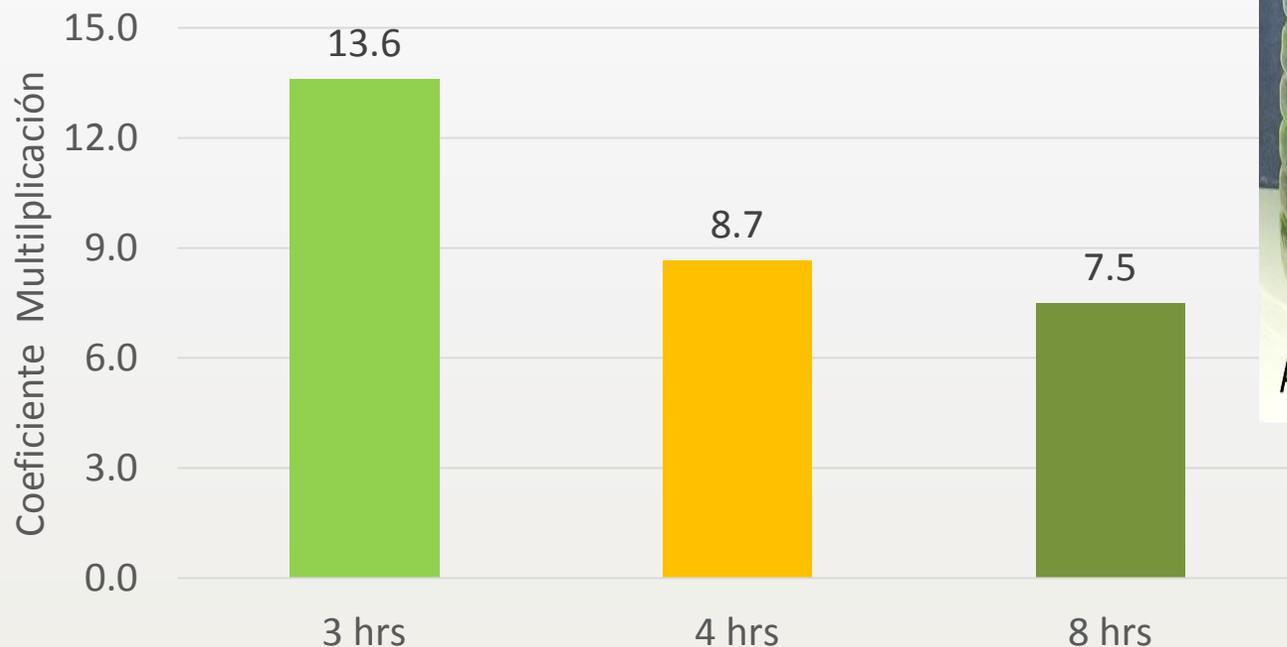
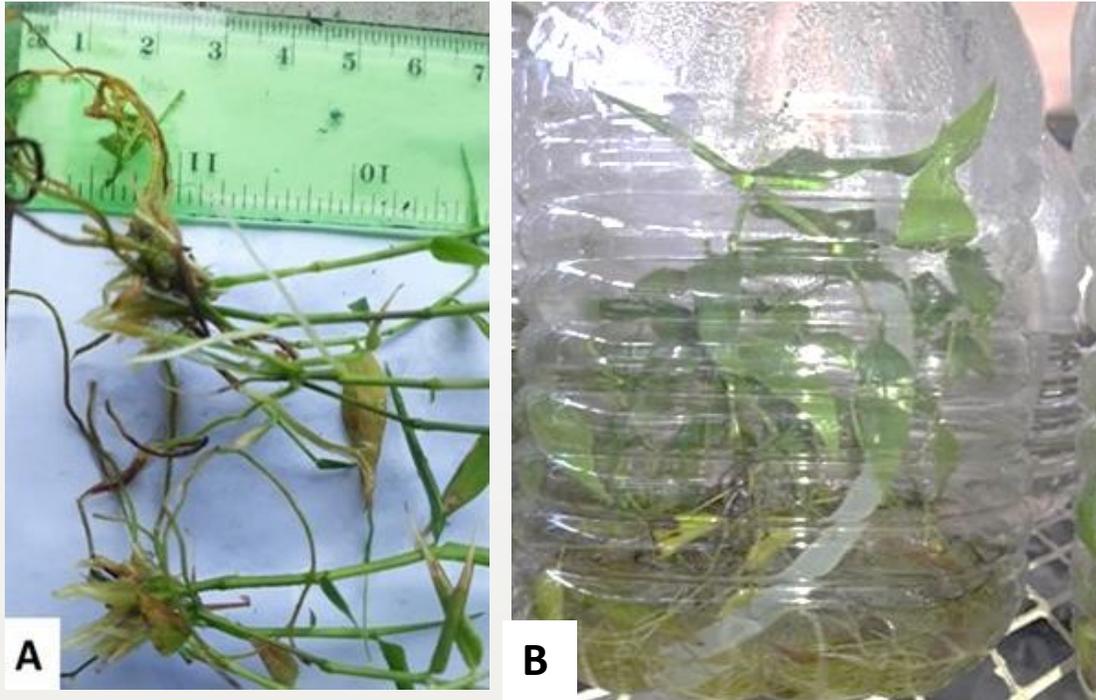


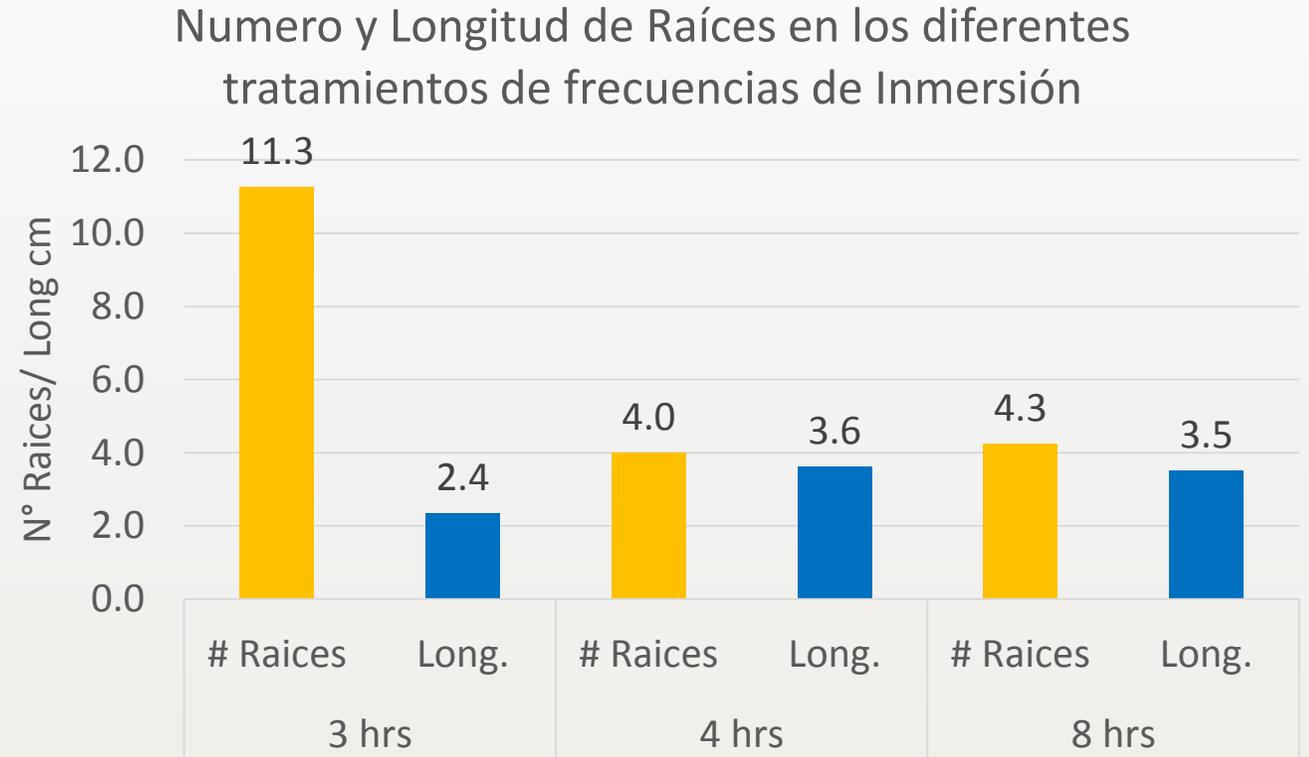
Figura 4. Respuesta en Biorreactores a diferentes frecuencias de inmersión A. 3 horas, B. 4 horas, C y D. Cada 8 horas, a los 22 días.

Promedio de brotes por explante (CM), obtenidos fue de 13.6, 8.7 y 7.5 para las frecuencia de inmersión cada 3, 4 y 8 horas respectivamente. La mejor respuesta se obtuvo usando la frecuencia de inmersión de 3 horas.

## Enraizamiento para vitroplantas en BITs



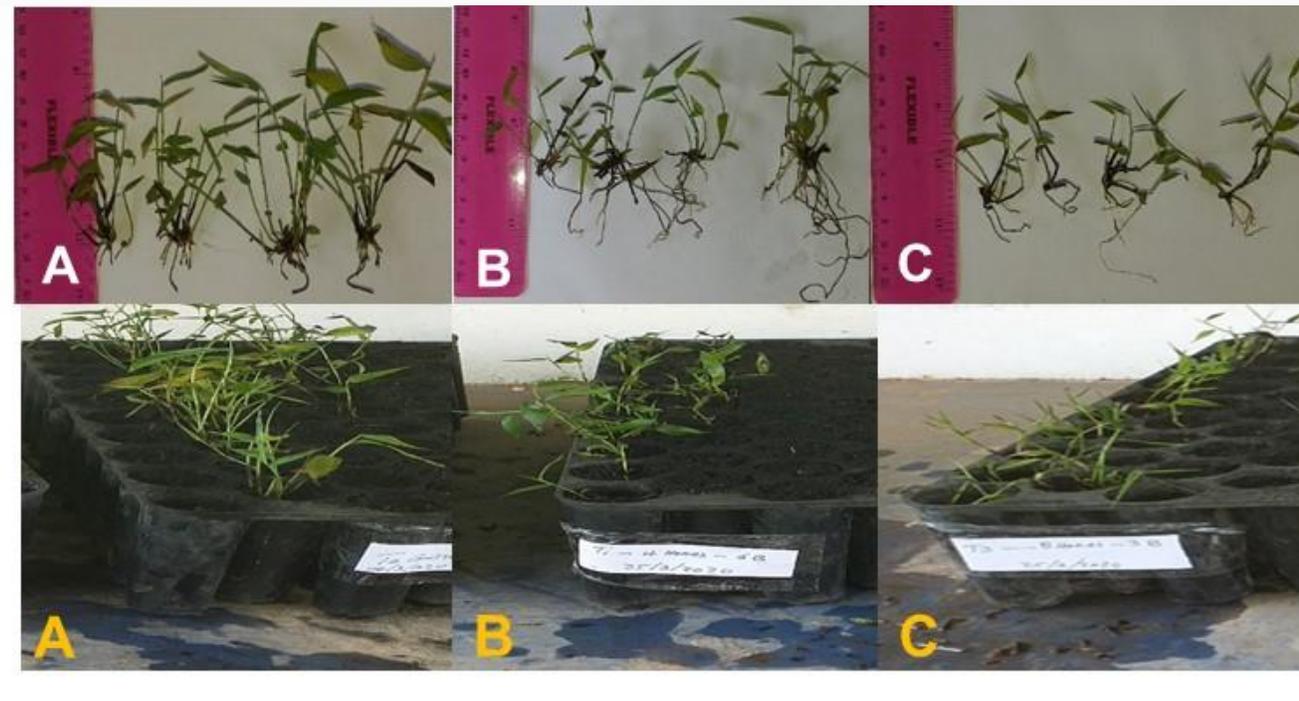
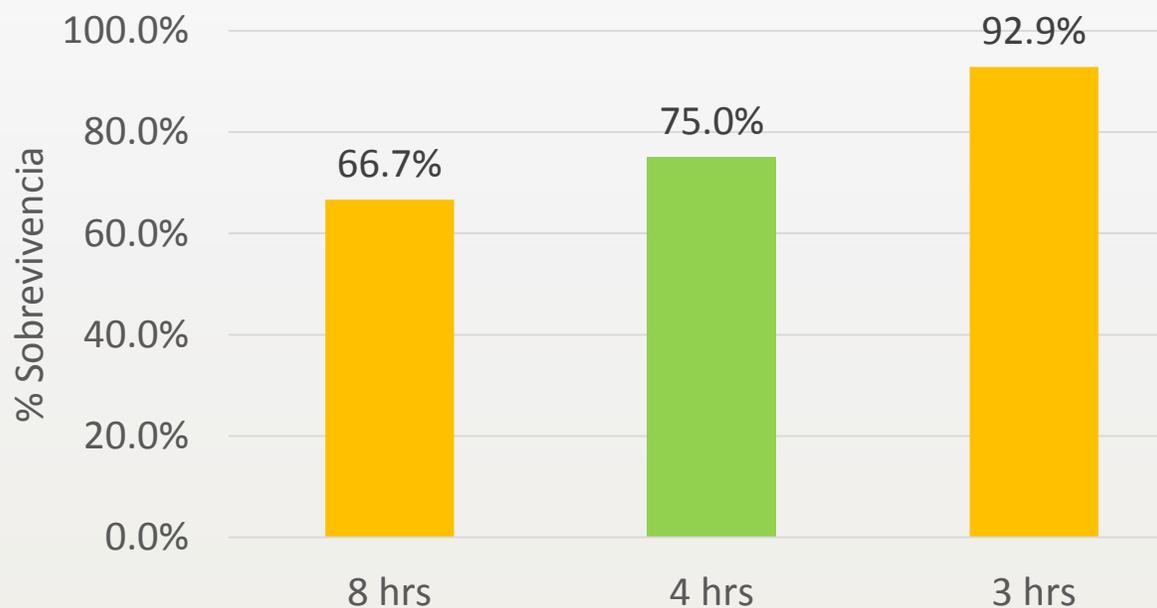
Vitro plántulas en BITs óptimas para aclimatación. A. Inicio de enraizamiento, B. vitroplantas enraizadas en BITs.



La mejor respuesta en cuanto a numero de raíces se obtuvo con el tratamiento de frecuencia de inmersión cada 3 horas, con promedio de 11.3 y en cuanto a longitud de raíces se obtuvo raíces de 4 cm de longitud con la frecuencia de inmersión de 4 h.

## Sobrevivencia en fase de aclimatación de Plantas a diferentes frecuencias de Inmersión

Sobrevivencia de bambú Guadua en aclimatación



Aclimatación de plántulas A. frecuencia de 3 horas, B. frecuencia de 4 horas y C. frecuencia de 2 horas.

Las plantas obtenidas con frecuencias de inmersión cada 3 horas, se adaptaron mejor bajo condiciones ex vitro, obteniéndose un 92% de sobrevivencia vs 75 y 66%.

# RESULTADOS

## Aclimatación de Vitroplantas de bambú de BITs



Plantas aclimatadas después de 30 dds, fueron individualizadas y transplanta.

Se utilizó ceniza de bagazo de caña 100% como sustrato.

# CONCLUSIONES

- ✓ Con concentración de  $3\text{mg L}^{-1}$  de BAP, se obtienen los mejores coeficientes de multiplicación en Biorreactores de Inmersión temporal, para bambú Guadua.
- ✓ En promedio se obtienen un total de 13.6 plantas por brote inicial (explante) para una frecuencia de inmersión de 3 horas, mientras que se obtuvo 8.7 y 7.5 para 4 y 8 horas de inmersión, respectivamente.
- ✓ En un medio de cultivo Murashige & Skoog suplementado con  $2.5\text{ mg L}^{-1}$  Sulfato de adenina se logró obtener vitroplántulas de Guadua con suficientes raíces en BITS en 30 días aproximadamente.
- ✓ Con frecuencia de inmersión de cada 3 horas (8 inmersiones en 24 horas), se logró obtener el mayor número de raíces.
- ✓ La mayor sobrevivencia en aclimatación (92%), se obtuvo en plantas cultivadas en BITS usando una frecuencia de inmersión de cada 3 horas.
- ✓ Hubo un incremento de 6.8 veces el coeficiente de multiplicación utilizando BITS, lo que reduce significativamente el costo de producción, aumenta la sobrevivencia y mejora la calidad de las plántulas.

# RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda evaluar otras frecuencias de inmersión ( 2, 3, 4 horas), y diferentes volúmenes de medios de cultivos, respecto al número de explantes por biorreactor, para validar la respuesta y calidad de plantas.
- ✓ Evaluar diferentes concentraciones de BAP (bencilaminopurina), entre 3 a 5 mg L<sup>-1</sup> , en fase de multiplicación convencional, para validar protocolo y mejorar los coeficientes de multiplicación en BITs.
- ✓ Optimizar el proceso de aclimatación, puesto que son plantas muy delicadas y tienden a deshidratarse rápidamente.

- Londoño & P. M. Peterson Thiago Sanches Ornellas, Carolina Kades Marchetti, Gleison Henrique de Oliveira, Yohan Fritsche, Miguel Pedro Guerra. **Micropropagation of *Guadua chacoensis* (Rojas)**. Pesq. Agropec. Trop., Goiânia, v. 49, e55450, 2019.
- P. Muthukumar, N. Saraswathy, S. Abarna, R. Kanthimathi, V. Monisha, N. Niranjana Devi, M. Raja Nivetha. **Protocol for Induction of Multiple Shoot through Nodal Explants Culture of *Bambusa bambos* for Biomass Production**. Department of Biotechnology, Plant Tissue Culture Laboratory, Kumaraguru College of Technology, Coimbatore- 641049, India. 2018.
- Luís Gonzaga Gutiérrez, Rodolfo López-Franco and Tito Morales-Pinzón. **Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA®** African Journal of Biotechnology. 2016
- M. Freire-Seijo, Y. García-Ramírez, M. Tejeda, G. Gallardo, L. Fajardo, M. Cruz-Martín, C. Sánchez-García, Y. Alvarado-Capó, M. Acosta-Suárez, B. Roque, M. Leiva-Mora. 2008. **Empleo de la biotecnología en la propagación de dos especies de Bambú** 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: marisolf@ibp.co.cu.
- Marta Leonor Marulanda, Maritza Carvajalino, Carolina Vargas, Ximena Londoño. 2002. **La biotecnología aplicada al estudio y aprovechamiento de la guadua**. Seminario - Taller Avances en la investigación sobre Guadua. Pereira, mayo 16-17 y 18 de 2002.
- Jiménez, V., Castillo, J., Tavares, E. et al. **In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation**. Plant Cell Tiss Organ Cult 86, 389–395 (2006). <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9120>.
- Marta L. Marulanda, Luis G. Gutiérrez, María del Pilar Márquez. **MICROPROPAGATION OF *GUADUA ANGUSTIFOLIA* KUNTH**. Actual Biol 27 (82): 5-15, 2005



*II Simposio Científico CINAP*



GRACIAS POR SU  
ATENCIÓN