

Establecimiento aséptico *in vitro* de segmentos nodales de bambú (*Guadua angustifolia* Kunth) para su micropropagación

María Elisa Hernández García¹, Juan Carlos Acosta Pérez¹, Rosa Margarita Hernández Vélez², Lucio Morales Lara⁴, Francisco Javier Catzím Rojas¹, Emeterio Payró de la Cruz¹ y Juan Florencio Gómez Leyva³.

¹Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de la Zona Olmeca (ITZO). ²Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Villahermosa (ITVH). ³Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Tlajomulco (ITT). ⁴Comisión Estatal Forestal (COMESFOR-TABASCO). epayro@itzonaolmeca.edu.mx

Resumen: El bambú (*Guadua angustifolia* Kunth), como recurso forestal, contribuye significativamente al desarrollo sostenible y disminución de la pobreza en el mundo. Sin embargo, sus semillas tienen baja viabilidad, la propagación asexual es lenta y es posible diseminar patógenos. Lo anterior limita su propagación a gran escala. La micropropagación es una alternativa viable, no obstante, la muerte de explantes por contaminación durante las diferentes fases, obstaculiza el desarrollo tecnológico. El objetivo fue generar un protocolo eficiente para el establecimiento aséptico *in vitro* de segmentos nodales de Guadua. Mediante microcultivos en papa-dextrosa-agar (PDA), se identificaron morfológicamente: *Alternaria* sp. 35%, *Cladosporium herbarum* 31%, *Aspergillus* sp. 25% y *Fusarium solani* 9% (P<0.05). En conclusión, el establecimiento aséptico *in vitro*, se logró mediante inmersión de los segmentos nodales en 4gr/L de Captan y/o Mancozeb por 24 h. **Palabras clave:** cultivo *in vitro*, hongos, Guadua.

Abstract: Bamboo (*Guadua angustifolia* Kunth), as forest resource, contributes significantly to the sustainable development, and decrease of the poverty in the world. However, their seeds have low viability, the

propagation is slow and it is possible to disseminate pathogens. The above-mentioned limits its propagation to great scale. The micro-propagation is a viable alternative, nevertheless, the explants death for contamination during the different phases blocks the technological development. The objective was to generate an efficient protocol for the aseptic establishment *in vitro* of nodal segments of Guadua. By means of microcultures in potato-dextrose-agar (PDA), they were identified morphologically: *Alternaria* sp. 35%, *Cladosporium herbarum* 31%, *Aspergillus* sp. 25%, and *Fusarium solani* 9% (P<0.05). In conclusion, the aseptic establishment *in vitro*, was achieved by means of 24 h immersion of nodal segments in 4gr/L Captan and/or Mancozeb. **Key Words:** *in vitro* culture, fungi, Guadua.

Usuarios: Las instituciones de investigación, educación superior y posgrado en biotecnología y ciencias agropecuarias. Dependencias gubernamentales (CONABIO, SAGARPA, SEMARNAT) y empresas particulares, cuyo ámbito de competencia es el sector agropecuario y forestal, la protección y el aprovechamiento de los recursos naturales, así como la industria de la construcción.

Introducción. El bambú es un recurso natural que ha sido aprovechado intensamente por el hombre durante milenios en las regiones más populosas de la Tierra. Desde tiempos inmemorables el hombre del trópico ha utilizado una gama de diferentes especies locales de bambúes, como materia prima para la construcción de casas, balsas, puentes, armas, herramientas y alimentación (Dransfield y Widjaja, 1995). Los bambúes pertenecen a la familia de las gramíneas (Cortés, 2000). En el mundo se reconocen 90 géneros y unas 1, 040 especies de bambúes, que se distribuyen desde los 46° de latitud norte hasta los 47° de latitud sur, y desde el nivel del mar hasta los 4 000 metros de altura en los Andes ecuatoriales (Cortés, 2000). Judziewicz y cols. (1999) reportan para América 21



Figura 1. A) Cepa de bambú joven en etapa de crecimiento. Edad de la cepa 6 años, edad del tallo 1 año, altura 12mts, diámetro 10cm). B) Cepa de bambú en condiciones óptimas para su comercialización. Edad de la cepa 9 años, edad del tallo 3 años, altura 12mts, diámetro 10cm). C) Chusquin de bambú aproximadamente 1m de altura.

de cristal (GerberMR), conteniendo 20 mL del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), pH 5.5, sacarosa 30 gr/L, gelificado con agar (7 gr/L) e incubados a 25°C y luz constante (1800 luxes luz blanca). Durante la primera semana de incubación, se observó crecimiento de diversos morfotipos de hongos, los cuales fueron subcultivados en medio PDA (Marca BIOXON, No. Catálogo BD211900) e incubados a 28°C, bajo condiciones de obscuridad durante 15 días. Se realizaron preparaciones semipermanentes para su identificación, mediante análisis microscópico, basada en la morfología de las estructuras vegetativas y esporas (Dade y Gunnell, 1969). Seguidamente se realizó una revisión bibliográfica para determinar los fungicidas que han sido empleados para la eliminación de dichos microorganismos.

Etapa 2.- Un nuevo lote de segmentos nodales fue lavado en agua jabonosa (como se describió en la etapa 1). El experimento consistió en inmersión por 24 h de los segmentos nodales, en los siguientes tratamientos (Productos comerciales): T0= Control (ADE), T1= Captan (Nombre químico N – (triclorometilto) ciclohex-4-eno –1,2 –dicarboximida) 4 g/L, T2= Mancozeb (Nombre químico Etilen bis (ditiocarbamato) de manganeso con sal de zinc) 4 g/L, T3= Captan + Mancozeb 4 g/L, T4= Captan + Mancozeb 2 g/L (previo al cultivo *in vitro*). Seguidamente en cámara de flujo laminar se aplicó el procedimiento aséptico descrito en la etapa 1. El medio de cultivo MS, fue suplementado con Benomyl (Nombre químico metil 1-

Aspergillus sp. de acuerdo con Guzmán, (1997) son susceptibles al Mancozeb y Benomyl. *Fusarium solani* estos fitopatógenos, de acuerdo con Herrera y col. (2011), son intolerantes al Benomyl, Mancozeb, Tiabendazol y Diafenoxazol.

Etapa 2.- A partir del cuarto día después de la siembra se observó la aparición de microorganismos únicamente en T0 (100%), mientras que hasta la 6ta semana de incubación se presentó en el T4 (20%b); no obstante, los tratamientos T1, T2, y T3 permanecieron asépticos (0%a). Nuestros resultados concuerdan con Tello (2003), quien reportó *Cladosporium herbarum* en explantes de Guadua logrando su eliminación mediante el uso de Benomyl. Así mismo, Herrera y col. (2011) y Larraga (2011), reportaron *Alternaria* sp *in vitro*, logrando su eliminación con Mancozeb. Pérez (2014) reportó el uso de Benomyl y Mancozeb contra *Fusarium solani*, Gonzales (2010) lo usó contra *Aspergillus* sp., lo anterior en explantes *in vitro* de Guadua. Marulanda y col. (2005), para la inducción de yemas *in vitro*, establecieron chusquines de *G. angustifolia* bajo condiciones de vivero los cuales fueron sometidos a podas de rejuvenecimiento para estimular la producción de brotes y nuevas ramas, realizaron en esta fase de aplicaciones semanales con fungicidas Benlate y Vitavax (1 mg/l) y fertilizante foliar una vez por semana. En otras especies forestales como *Eucaliptus grandis* más del 50% de los hongos filamentosos que conformaban su microbiota fueron eliminados con la aplicación de fungicidas preventivos de

Tabla 1. Hongos encontrados en el cultivo *in vitro* de bambú, frecuencia y significancias

**Hongos encontrados	Frecuencia (%)	*Significancia
<i>Alternaria</i> sp.	35	a
<i>Cladosporium herbarum</i>	9	b
<i>Fusarium solani</i>	31	a
<i>Aspergillus</i> sp.	25	a

*Letras iguales significa que no hay diferencias estadísticas.

**Estas 4 cepas representan el 100% de los hongos encontrados.

asexual propagation is slow and it is possible to disseminate pathogens. The above-mentioned limits its propagation to great scale. The micro-propagation is a viable alternative, nevertheless, the explants death for contamination during the different phases blocks the technological development. The objective was to generate an efficient protocol for the aseptic establishment *in vitro* of nodal segments of Guadua. By means of microcultures in potato-dextrose-agar (PDA), they were identified morphologically: *Alternaria* sp. 35%, *Cladosporium herbarum* 31%, *Aspergillus* sp. 25%, and *Fusarium solani* 9% (P<0.05). In conclusion, the aseptic establishment *in vitro*, was achieved by means of 24 h immersion of nodal segments in 4gr/L Captan and/or Mancozeb. **Key Words:** *in vitro* culture, fungi, Guadua.

Área 6: Biotecnología y Ciencias Agropecuarias.

Problemática: Los métodos convencionales de propagación de *Guadua angustifolia* Kunth, presentan problemas para la multiplicación a gran escala. En la propagación sexual las plantas producen semillas entre los 60 a 80 años de edad, son de baja viabilidad y su tiempo de germinación es muy prolongado. La propagación asexual requiere grandes cantidades de material vegetal, lo cual es de difícil manejo y conservación, ya que pierden fácilmente viabilidad por deshidratación, aunado a la posibilidad de diseminar patógenos tales como diversas especies de *Fusarium* causantes de la podredumbre del cuello y de las raíces, mancha púrpura, entre otros (Andrés-Ares, 2015; Mishra et al., 2008; Ramírez., 2013). Una alternativa para la producción masiva de plantas sanas de *Guadua angustifolia* Kunth es el cultivo *in vitro*, que es un tipo de reproducción asexual de plantas gracias a que, en general, varias células vegetales poseen la capacidad necesaria

géneros y 345 especies, que se localizan desde el sur de Estados Unidos, México, Centro y Sudamérica, en las Islas del Caribe, y hasta el sur de Chile. En México se tienen registrados 8 géneros y 39 especies nativas de bambúes; sin embargo, de acuerdo con Cortés, (2000), el número de especies descritas para México aumentaría si se pudiera contar con más colecciones, principalmente de Chiapas, Oaxaca y Veracruz donde se encuentra el mayor número de las especies descritas. Cortés (2000) reportó que también hay bambúes que han sido introducidos de Asia como por ejemplo el bambú amarillo (*Bambusa vulgaris* var. vittata), bambú plumoso o plumilla (*Phyllostachys aurea*), madake o plumoso (*Phyllostachys bambusoides*), o el bambú colombiano (*Guadua angustifolia*).

Objetivos. El objetivo fue generar una metodología eficiente para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de bambú (*Guadua angustifolia* Kunth), bajo condiciones asépticas para su micropropagación.

Materiales y Métodos. El material vegetal fue obtenido de una plantación comercial ubicada en el Ejido Allende bajo del municipio de Macuspana, Tabasco, México (N17°41'27.4128''; W92°25'26.8752'') (Figura 1).

Etapa 1.- Segmentos nodales (1cm) fueron lavados con agua jabonosa (25 min) y enjuagues con agua destilada estéril (ADE). Posteriormente, en una cámara de flujo laminar, el procedimiento aséptico se llevó a cabo mediante la inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) al 6% (20 min + 3 enjuagues con ADE); inmersión en etanol 90% (20min + 3 enjuagues con ADE). Seguidamente, 100 explantes fueron sembrados individualmente en frascos



Figura 2.- Hongos identificados en cultivo *in vitro* de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth.

(butilcarbamoil)bencimidazol-2-il carbamato) (2 g/L) + Gentamicina (2ml/L) posterior a la esterilización en autoclave. Diez explantes por tratamiento, fueron sembrados e incubados a 25 °C y luz continua (1800 luxes luz blanca). Se realizó análisis de varianza de un diseño completamente al azar y prueba de medias DMS (P<0.05), empleando el programa estadístico MENU de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUNL). Los datos en porcentaje (Frecuencia de los microorganismos identificados), fueron transformados mediante la ecuación arcsin [√ (%/100)].

Resultados y Discusión. Etapa 1.- Hongos filamentosos fueron observados a partir de los 5 días después de la siembra (dds) en el 65% de los cultivos de segmentos nodales, incrementándose al 100% a los 10 dds. De acuerdo con las guías de Dade y Gunnell, (1969), se identificaron cuatro especies, con base en la morfología de la estructuras vegetativas y esporas. Los hongos encontrados (Fig. 2) con mayor frecuencia fueron *Alternaria* sp. 35%, *Cladosporium herbarum* 31%, *Aspergillus* sp. 25%, mientras que *Fusarium solani* 9%b (letras iguales significa que no hay diferencias estadísticas, DMS P<0.05). *Alternaria* sp. de acuerdo con Larraga y col. (2011), reportaron que son susceptibles al sulfato tribásico de cobre, al Azoxystrobyn® y al Mancozeb. *Cladosporium herbarum* de acuerdo con Guzmán (1997); son susceptibles al Benomyl.

contacto como Mancozeb (10gr/L) y oxiclóruo de cobre (10gr/L) en combinación con fungicidas curativos de acción sistémica como el Benomyl (2gr/L) (Cruz et al. 2002). En conclusión, se recomienda la inmersión de explantes nodales en Captan y/o Mancozeb (4 g/L), 24horas, seguido de inmersión 20 min en hipoclorito de sodio (NaClO) al 6% y etanol 90%, + 3 enjuagues con ADE respectivamente. Así como suplementar el medio de cultivo con Benomyl (2g/L) + Gentamicina (2ml/L). Se recomienda realizar subcultivos en medio fresco, antes de la 6ta semana de incubación, una vez que se ha vencido la barrera de contaminación. Actualmente, nuestro grupo de trabajo realiza estudios para evaluar el efecto organogénico de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre explantes nodales de Guadua, enfocado hacia la propagación masiva de plantas sanas.

Impacto socioeconómico. El presente estudio, sienta las bases para investigaciones encaminadas a la micropropagación masiva de plantas de Guadua, como una alternativa viable, para satisfacer la creciente demanda de plantas para establecimiento de plantaciones comerciales en las zonas promisorias en México. Los proyectos de bambú son apoyados por la SAGARPA, a través de la COFUPRO y son parte de las acciones realizadas en el marco de la Cruzada Nacional Contra el Hambre.