

Evaluación de antioxidantes en el cultivo in vitro de especies de bambúes nativos de México

RESUMEN: El cultivo in vitro permite propagar y resguardar materiales vegetales. Por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer in vitro cinco especies de bambúes nativos (*Guadua aculeata*, *Guadua amplexifolia*, *Guadua inermis*, *Otatea acuminata* y *Otatea rzedwoskiorum*), con fines de conservación en condiciones de crecimiento mínimo.

Se emplearon yemas axilares de plantas jóvenes establecidas in vitro. Se utilizaron 3 medios de cultivo: Medio MS (Murashige and Skoog, 1962), + L- cisteína; MS+ carbón activado y MS+ ácido ascórbico. Se evaluó el porcentaje de yemas emergidas y de fenolización debido a que son dos de los problemas más comunes en gramíneas. Para lograr distribución normal en los datos, las variables expresadas en porcentaje se transformaron y se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA de clasificación simple.

Para determinar el grado de significación entre las medias se empleó la prueba de Tukey para $p < 0.05$. Se observó que existen diferencias significativas entre el medio utilizado y el porcentaje de emergencia y fenolización. Se mostró poca fenolización en el 90% de los explantes utilizando carbón activado como el antioxidante más efectivo.

PALABRAS CLAVE: bambú, biotecnología, carbón activado, micropropagación, otate



Colaboración

Gabriela Orozco Gutiérrez, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Tecomán

ABSTRACT: In vitro culture allows propagating and protecting plant materials. Therefore, the objective of this work was to establish in vitro five species of native bamboo (*Guadua aculeata*, *Guadua amplexifolia*, *Guadua inermis*, *Otatea acuminata* and *Otatea rzedwoskiorum*), for conservation purposes under minimum growth conditions.

Axillary buds of young plants established in nursery were used. 3 culture media were used: MS Medium (Murashige and Skoog, 1962), + L-cysteine; MS + activated carbon and MS + ascorbic acid. The percentage of buds emerged and phenolization was evaluated because they are two of the most common problems in grasses. To achieve normal distribution in the data, the variables expressed as a percentage were transformed and analyzed statistically using a simple classification ANOVA.

To determine the degree of significance between the means, the Tukey test was used for $p < 0.05$. It was observed that there are significant differences between the medium used and the percentage of emergency and phenolization. Little phenolization was shown in 90% of explants using activated carbon as the most effective antioxidant.

KEYWORDS: bamboo, biotechnology, activated carbón, micropropagation, otate

INTRODUCCIÓN

Los bambúes mexicanos representan un legado milenario de gran aporte ecológico, económico y cultural. Un 50% de las especies nativas de bambú merecen estar en la Norma Oficial Mexicana debido a la sobre-explotación de poblaciones silvestres. Los bambúes, se propagan a gran escala con grandes dificultades. El uso de semillas es un reto debido a la floración esporádica de la planta y los largos ciclos de floración, junto con la recalcitración de la semilla y el consumo por parte de animales salvajes [8]. También se ve afectada la poca disponibilidad de material vege-

tal, los bajos porcentajes de enraizamiento y la poca disponibilidad de propágulos [2]. Estos elementos son limitantes para la propagación masiva de bambúes [7].

Además, el estado físico del medio de cultivo es un factor determinante para la propagación in vitro de bambúes. Autores como [10] hacen referencia a la baja proliferación de plantas in vitro de *B. arundinacea* en el medio de cultivo semisólido y atribuyen como causas, la presencia de fenoles que se acumulan en la base de las plantas. Estos mismos autores señalaron que el lento crecimiento de los brotes pudiera atribuirse a las barreras físicas que impone el estado físico semisólido del medio de cultivo.

La fenolización puede estar relacionada con el estado fisiológico del explante esto es, que la edad ontogénica está vinculada a la presencia y acumulación de compuestos fenólicos en el vegetal. Además, la selección de material vegetal adecuado (tejidos con características fisiológicas juveniles apropiadas) puede ser un factor limitante en el bambú ya que en ocasiones presenta una alta fenolización durante los primeros estadios del cultivo in vitro [5].

La biotecnología en sentido general y en el cultivo in vitro en particular pueden ayudar a resolver estos problemas en esta especie. Se debe tener en cuenta que la multiplicación in vitro constituye una alternativa viable para la propagación masiva, uniformes genéticamente y con caracteres morfológicos juveniles recuperados [4]. El bambú, como muchas otras plantas, se ha propagado con el empleo de las técnicas de cultivo in vitro [14] y [1]. Sin embargo, hasta el momento las especies nativas de México no han sido propagadas por este medio. Durante la propagación in vitro a partir de yemas, existen dos problemas cruciales para lograr éxito en este cultivo: 1) la contaminación y 2) la fenolización u oscurecimiento, especialmente cuando se parte de material colectado directamente del campo [11].

En ese contexto, se evaluó el efecto de tres agentes antioxidantes en el control de la fenolización para el cultivo in vitro por medio de yemas axilares, de 5 especies de bambú nativos (*Guadua aculeata*, *Guadua amplexifolia*, *Guadua inermis*, *Otatea acuminata* y *Otatea rzedwoskiorum*). La selección de estas especies es debido a su potencial constructivo, impacto social y económico, además de su desconocimiento y conservación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ubicación y colecta

Las yemas axilares de *Guadua aculeata*, *Guadua amplexifolia* y *Guadua inermis* se obtuvieron del Campo Experimental INIFAP, ubicado en el municipio de Tecomán, Colima y *Otatea acuminata* y *Otatea rzedwoskiorum* de una parcela experimental en el Remudadero municipio de Comala, Colima. El trabajo de investiga-

ción se realizó en el laboratorio de biotecnología de plantas del mismo instituto.

Desinfección de yemas

Para la desinfección de yemas, éstas fueron tratadas previamente y en condiciones de campo con agente antifúngico benomilo® (2 g/L) y bactericida estreptomina® (2 g/L) tres veces a la semana durante 1 mes para evitar hongos y/o bacterias. Se seleccionaron yemas axilares de bambú de aproximadamente de 3 cm de largo, las cuales fueron lavadas con agua corriente y jabón líquido, el tratamiento de pre desinfección incluyó solución alcalina de Extran® MA 01 (0.05 % v/v) por 10 min y agente antifúngico y bactericida estreptomina a 2 g/L c/u por 10 min.

Posteriormente se llevaron a cabo los tratamientos de desinfección con NaOCl (3 % v/v) por 10 min, finalmente en campana de flujo laminar los explantes fueron lavados con agua destilada estéril 3 veces.

Medios de cultivo

La composición del medio de cultivo utilizado fue [9] adicionado con 30 g/L de sacarosa. Al medio se le adicionó un biocida llamado "Plant Preservative Mixture" (PPM®) (5 mL/L), el pH fue ajustado a 5.7 ya que es un pH ideal para la mayoría de las especies de bambú y solidificado con 2 g/L de gelrite. El medio nutritivo se distribuyó en tubos de ensayo de 60 mL conteniendo 5 mL de medio nutritivo, estos se esterilizaron en autoclave por 15 min a una presión de 16 lb/pulg² y a temperatura de 121 °C. Al finalizar se aisló la yema apical para su implantación en el medio. Los explantes fueron incubados en oscuridad a 28 °C durante dos semanas, finalmente fueron incubados con un fotoperiodo de luz natural para su desarrollo (Figura 1).



Figura 1. *Guadua inermis* establecida in vitro

Agentes antioxidantes

La inoculación de las yemas apicales se realizó en el medio MS suplementado antes mencionado. Se realizó una solución estéril de los antioxidantes, posteriormente se utilizó:

- 1) L-cisteína a 20 mg·L⁻¹,
- 2) carbón activado a 3 g·L⁻¹ y ácido ascórbico (120 mg·L⁻¹) teniendo en cuenta que son los antioxidantes y las concentraciones más empleadas en este cultivo [15] y [12]. Se implantaron un total de 30 yemas por tratamiento, incluyendo el control.

Evaluación de fenolización, contaminación y supervivencia.

Las evaluaciones se realizaron a las 72 h de iniciado el cultivo y se analizó el porcentaje de contaminación y supervivencia de las yemas. Para evaluar el nivel de fenolización, se utilizó una escala cualitativa debido a pruebas de tolerancia, se les clasificó como: poco fenolizado (10-40 % del explante está fenolizado), medianamente fenolizado (40-70 % del explante esta fenolizado y tiene presencia de un halo de color parduzco en el medio alrededor del explante) y altamente fenolizado para aquellos explantes donde el 100 % fenolizado o necrosado y además se observó un halo de color negruzco muy intenso en el medio) método sugerido por [3]. Con esta escala se calculó el porcentaje de explantes pertenecientes a cada categoría en cada uno de los tratamiento. La contaminación fue evaluada por presencia o ausencia de microorganismos y obteniendo el porcentaje promedio. Y la supervivencia, de igual forma, fue evaluada contabilizando brotes vivos o muertos.

Análisis estadístico

El procesamiento de los datos y el análisis estadístico se realizó con el software SPSS® versión 8.0 para Windows®, realizando un Análisis de Varianza (ANOVA) y de la prueba de Tukey para determinar el nivel de significación estadística de las diferencias entre las medias de cada ensayo. Para lograr distribución normal en los datos, las variables que se encontraban expresadas en porcentaje se transformaron para su análisis según la ecuación: $x' = 2 \cdot \arcsen((x/100)^{0.5})$. Para las variables discretas se utilizó la ecuación: $x' = (x + 0.5)^{0.5}$.

RESULTADOS

Agentes antioxidantes

Todas las yemas en los tres tratamientos manifestaron síntomas de fenolización, pero no en la misma intensidad. En la Figura 2, se puede apreciar el resultado cualitativo de los antioxidantes por especie. Las yemas con ácido ascórbico reflejaron los mayores porcentajes de explantes con un alta fenolización (95%), el cual es significativamente diferente al resto de los tratamientos demostrando la ineficiencia de este compuesto antioxidante en el control de la fenolización en las yemas de bambú. En el caso del efecto entre especies, no existen diferencias significativas.

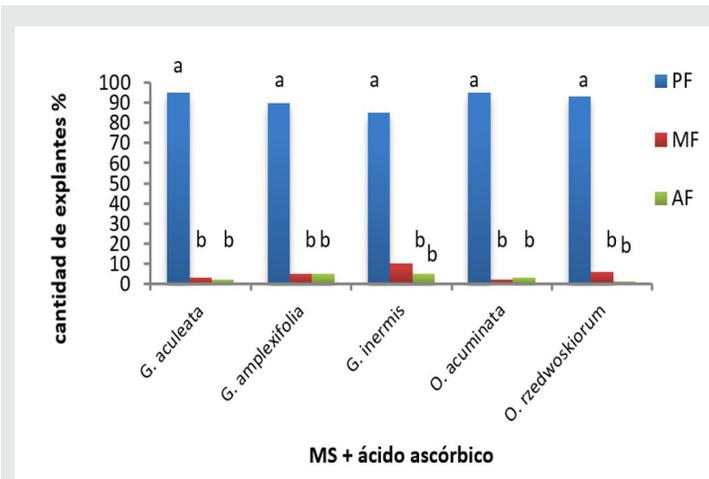


Figura 2. Efecto del antioxidante ácido ascórbico en el nivel de fenolización de yemas (explantes) de luego de 72 horas de cultivo in vitro de bambú: *Guadua aculeata*, *Guadua amplexifolia*, *Guadua inermis*, *Otatea acuminata* y *Otatea rzedwoskiorum*. PF: Poca fenolización, MF: Mediana fenolización y AF: Alta fenolización. Barras con letras iguales, las medias no difieren significativamente según ANOVA y prueba de Tukey, para p<0.05 y n=30.

Para las yemas expuestas a MS + L-cisteína, se clasificaron el 54 % de los explantes con un alto nivel de fenolización, mientras que solo el 30% poseía un nivel medio y un 16% bajo (Figura 3).

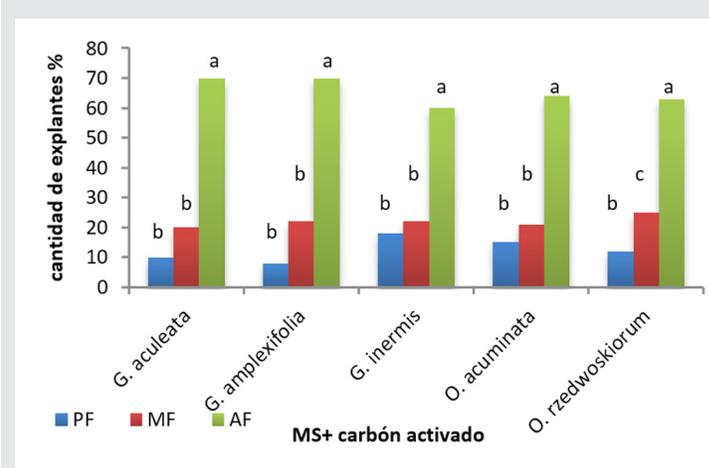


Figura 3. Efecto del antioxidante L- cisteína en el nivel de fenolización de yemas (explantes) de bambú: *Guadua aculeata*, *Guadua amplexifolia*, *Guadua inermis*, *Otatea acuminata* y *Otatea rzedwoskiorum* luego de 72 horas de cultivo in vitro. PF: Poca fenolización, MF: Mediana fenolización y AF: Alta fenolización. Barras con letras iguales, las medias no difieren significativamente según ANOVA y prueba de Tukey, para p<0.05 y n=30

Los niveles más bajos de fenolización se obtuvieron con la utilización del carbón activado, el cual propició una clasificación más heterogénea de los explantes, con 80 % de poco fenolizados, 20 % medianamente fenolizados y 10% altamente fenolizados con diferencias

significativas con el resto de los tratamientos en ambas categorías (Figura 4). De igual forma no existen diferencias significativas entre especies.

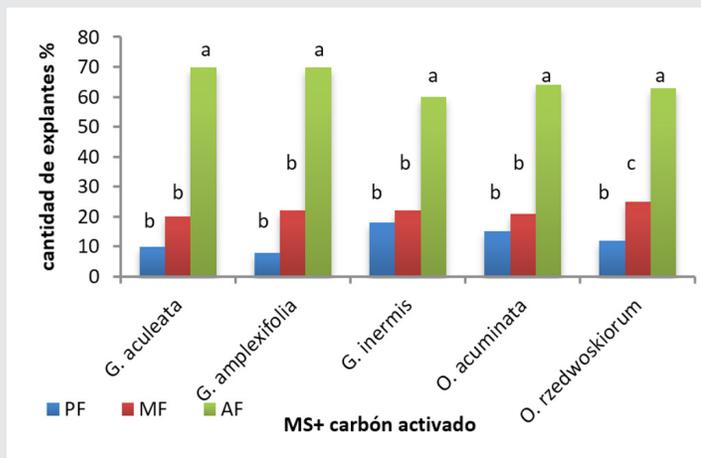


Figura 4. Efecto del antioxidante carbón activado en el nivel de fenolización de yemas (explantes) de *Guadua aculeata*, *Guadua amplexifolia*, *Guadua inermis*, *Oatea acuminata* y *Oatea rzedzowskiorum* luego de 72 horas de cultivo in vitro. Barras con letras iguales, las medias no difieren significativamente según ANOVA y prueba de Tukey, para $p < 0.05$ y $n = 30$

El carbón activado fue el antioxidante más apropiado en la reducción de compuestos fenólicos de bambú, a diferencia de la L- cisteína y el ácido ascórbico, los cuales resultaron en una respuesta muy pobre. La fenolización se caracterizó por un cambio en la coloración del tejido vegetal y la emisión de estos pigmentos rojizos o carmelitas hacia el medio de cultivo. Estos se tornaron muy intensos hasta alcanzar un color vino-oscuro, especialmente para el tratamiento con el ácido ascórbico provocando la muerte de los explantes.

Entre las causas que provocan este estado se encuentra el daño que se produce en la superficie del explante después de realizado un corte o herida, y en otros casos, la senescencia o muerte de algunas células [5]. Se asegura que la biosíntesis de compuestos fenólicos es afectada por situaciones de estrés, tales como heridas o ataques de patógenos [13].

CONCLUSIONES

Se reconoce al carbón activado de coco 3 g/L como el antioxidante más adecuado para emplear en el cultivo de tejidos in vitro de yemas de bambúes nativos, aunque sería posible posteriormente probar algún otro tipo de carbón activado. Para los explantes de bambú de las cinco especies la fenolización resultó ser perjudicial, pues provocó la muerte de los mismos. Por ello, se reconoce al carbón activado como el antioxidante más adecuado para emplear en el cultivo de tejidos in vitro de yemas de bambú. Por otro lado, no se muestran diferencias significativas entre especies. La fenolización

como buen fenómeno de tipo bioquímico interfiere con el normal desarrollo de los explantes inoculados en los medios de cultivo, el explante presenta un oscurecimiento en su totalidad y alrededores del medio donde se encuentra sembrado, debido a la excreción de sustancias como polifenoles y taninos que en la etapa de adaptación in vitro crean oxidación por lo que una reducción o eliminación de este fenómeno es de gran utilidad en el cultivo in vitro de bambú. Finalmente se pretende continuar cultivando bambú nativo in vitro para multiplicar, enraizar y aclimatar en campo.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto INIFAP: "Viabilidad y factibilidad en la propagación, conservación, establecimiento y manejo sostenible de cinco especies nativas de bambú leñoso en la región Pacífico- Centro de México"

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Anand., J. Brar., y A. Sood. (2013). In vitro propagation of an edible bamboo *Bambusa bambos* and assessment of clonal delity through molecular markers. *Journal of Medical and Bioengineering*, 2,257-261.
- [2] L. Cátasus. (2003). Estudio de los bambúes arborescentes cultivados en Cuba. *ACTAF. Cuba*
- [3] O. Concepción., N. Lelurlys., H. Pérez., M. Peralta y R. Trujillo. (2005). Efecto de tres antioxidantes en el cultivo in vitro de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. *Cultivos Tropicales*. 26(1)
- [4] M. Domínguez., J. González., G.C. Rosales., V.C. Quiñonez., S. Delgadillo Mireles., M. E. Pérez. (2008). El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. ISSN-e 1665-4412, 53 p.
- [5] E.F. George. (1993). *Plant propagation by tissue culture*. *Exegetics Ltd* 524 p.
- [6] K. Koshy., y B. Gopakumar. (2005). An improvised vegetative propagation technique for self-incompatible bamboos. *Current Science*, 89: 1474-1476.
- [7] Koshy, K. y Harikumar, D. (2000). Flowering incidences and breeding system in *Bambusa vulgaris*. *Current Science*, 79: 1650-1652.
- [8] T. Murashige., y F. A. Skoog. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.

[9] R. Nadgauda., V. Parassharami., y A. Mascarenhas, (1990). Precocious flowering and seedling behaviour in tissue cultured bamboos. *Nature*, 344:335-336.

[10] M. Ramírez., S. León., y A. Urdaneta. (1999). Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento *in vitro* de *Psidium guajava* L. y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Nierdz. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 16: 243-25.

[11] S. Saxena., y V. Dhawan. (1999). Regeneration and large-scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 18:438-443.

[12] D. Treutter. (2001). Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation*, 34:71-89.

[13] Q. Wei., J. Cao., W. Qian, M. Xu., Z. Li., y Y. Ding. (2015). Establishment of ancient micropropagation and callus regeneration system from the axillary buds of *Bambusa ventricosa*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 122:1-8.

[14] A.B. Zamora., S.S Gruezo y O.P. Damasco. (1988). Tissue culture of *Dendrocalamus*, *Bambusa*, *Gigantochloa*, and *Schizostachyum* species of bamboo. *Journal Philippines Forest Resources*, 13:55-6.