

BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA CAÑA FLECHA (*Gynerium sagittatum* Aubl.)

Segunda Edición



ISIDRO E. SUÁREZ
Editor



**BIOTECNOLOGÍA
APLICADA A LA
CAÑA FLECHA**
(*Gynerium sagitatum* Aubl.)

SEGUNDA EDICIÓN

Isidro E. Suárez
Editor.



© Biotecnología Aplicada a la Caña Flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.), Fondo Editorial Universidad de Córdoba
Cra. 6 No. 77-305 Montería Colombia
ISBN: 978-958-5104-27-3
Segunda Edición 2021

ISIDRO E. SUÁREZ, Instituto de Biotecnología Aplicada del Caribe - IBAC
Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba.

Portada: Planta de Caña Flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) adulta producida por micropropagación.
Contraportada: Planta micropropagada de Caña Flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) adaptada a condiciones *ex vitro*.

Diseño, Diagramación: Luz Stella Villadiego Chica
Email: luchystella@yahoo.es



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial 4.0 Internacional.

.....

DEDICATORIA

A mi familia



AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su agradecimiento a:

Fondo Editorial de la Universidad de Córdoba

Dairo Pérez Polo

Carmen Teresa Polo Tordecilla

Luz Stella Villadiego

CONTENIDO

	Págs.
I. PRESENTACIÓN	13
II. ASPECTOS GENERALES DE LA CAÑA FLECHA (<i>Gynerium sagittatum</i> Aubl.).	15
Origen, distribución geográfica e importancia económica	15
Botánica y propagación de la caña flecha	16
Micropropagación	18
Caracterización molecular	22
Conservación de germoplasma	24
Bibliografía	25
III. MICROPROPAGACIÓN DE CAÑA FLECHA (<i>Gynerium sagittatum</i> Aubl.) Var "CRIOLLA" A PARTIR DE EXPLANTES CON MERISTEMOS PRE-EXISTENTES	29
Introducción	29
Materiales y métodos	32
Resultados y discusión	36
Bibliografía	46
IV. MICROPROPAGACIÓN DE TRES VARIEDADES ("Criolla", "Martinera" y "Costera") DE CAÑA FLECHA (<i>Gynerium sagittatum</i> Aubl.)	50
Introducción	50
Materiales y métodos	51
Resultados y discusión	53
Bibliografía	58

.....

V. MICROPROPAGACIÓN DE CAÑA FLECHA (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) EN MEDIO DOBLE FASE	60
Introducción	60
Materiales y métodos	61
Resultados y discusión	65
Bibliografía	73
VI. ADAPTACIÓN <i>EX VITRO</i> DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CAÑA FLECHA (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.)	76
Introducción	76
Materiales y métodos	77
Resultados y discusión	79
Bibliografía	83
VII. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE CAÑA FLECHA (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.)	84
Introducción	84
Materiales y métodos	85
Resultados y discusión	91
Bibliografía	96
VIII. CONSERVACIÓN <i>IN VITRO</i> DE GERMOPLASMA DE CAÑA FLECHA (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.)	98
Introducción	98
Materiales y métodos	100
Resultados y discusión	101
Bibliografía	105
CONCLUSIÓN GENERAL	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Planta adulta de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.).	17
Figura 2.	Espiguillas con flores de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.).	17
Figura 3.	Plantas nuevas de caña flecha (1) (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) emergiendo de la base de un tallo adulto (2).	18
Figura 4.	Emisión de un nuevos brotes a partir de un explante de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) cultivar "Criolla" en condiciones <i>in vitro</i> .	37
Figura 5.	Multiplicación axilar de tallos de caña flecha (<i>Gynerium</i> <i>sagitatum</i> Aubl.) cultivar "Criolla" en condiciones <i>in vitro</i> .	38
Figura 6.	Efecto de diferentes tratamientos (1 = control, 2 = 0.1 mg l ⁻¹ ANA + 0.3 mg l ⁻¹ BAP, 3 = 0.5 mg l ⁻¹ BAP, 4 = 1.0 mg l ⁻¹ BAP, 5= 2.0 mg l ⁻¹ BAP y 6 = 4.0 mg l ⁻¹ BAP) sobre la multiplicación <i>in vitro</i> de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) cultivar "Criolla".	38
Figura 7.	Efecto de diferentes tratamientos (1 = control, 2 = 0.1 mg l ⁻¹ ANA + 0.3 mg l ⁻¹ BAP, 3 = 0.5 mg l ⁻¹ BAP, 4 = 1.0 mg l ⁻¹ BAP, 5= 2.0 mg l ⁻¹ BAP y 6 = 4.0 mg l ⁻¹ BAP) sobre la multiplicación <i>in vitro</i> de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) cultivar "Criolla".	41
Figura 8.	Formación de raíces en brotes de caña flecha (<i>Gynerium</i> <i>sagitatum</i> Aubl.) cultivar "Criolla" sin suministro de auxinas exógenas.	42
Figura 9.	Efecto de diferentes tratamientos (1 = control, 2 = 0.5 mg l ⁻¹ ANA, 3 = 1.0 mg l ⁻¹ ANA, 4 = 2.0 mg l ⁻¹ ANA, 5 = 3.0 mg l ⁻¹ ANA, y 6 = 4.0 mg l ⁻¹ ANA) sobre el número de raíces adventicias por explante de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) cultivar "Criolla".	43
Figura 10.	Efecto de diferentes tratamientos (1 = control, 2 = 0.5 mg l ⁻¹ ANA, 3 = 1.0 mg l ⁻¹ ANA, 4 = 2.0 mg l ⁻¹ ANA, 5 = 3.0 mg l ⁻¹ ANA, y 6 = 4.0 mg l ⁻¹ ANA) sobre la longitud de raíces adventicias por brote de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) cultivar "Criolla".	44
Figura 11.	Plantas micropropagadas de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) cultivar "Criolla" adaptadas a condiciones <i>ex vitro</i> .	45

.....

Figura 12. Explantes de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) establecidos en medio doble fase (izquierda) y medio semisólido (derecha).	66
Figura 13. Plantas micropropagadas de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) trasplantadas para adaptación a condiciones <i>ex vitro</i> sin cobertura (izquierda) y con cubierta plástica (derecha).	78
Figura 14. Muestras de ADN de Caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) obtenidas con las recomendaciones del fabricante (1 elusión y con las modificaciones adicionadas por los autores (2 elusión).	91
Figura 15. Perfiles de distribución de bandas resultantes de la amplificación de ADN de uno de los genotipos de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) con las ocho combinaciones de iniciadores.	92
Figura 16. AFLPs generados en las muestras de las accesiones de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) analizadas.	92
Figura 17. Análisis de correspondencia múltiple para los genotipos de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) caracterizados.	94
Figura 18. Dendrograma, mostrando el agrupamiento de los genotipos de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) analizados.	94
Figura 19. Plantas de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) Var "Criolla" mostrando los efectos del almacenamiento después de un año en MS + 30 g sacarosa y ¼ MS + 15 g sacarosa.	102

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Multiplicación <i>in vitro</i> de tres variedades de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) en medio con diferentes niveles de BAP.	54
Tabla 2.	Longitud (cm) de tallos de tres variedades de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) multiplicadas <i>in vitro</i> en medio con diferentes niveles de BAP.	54
Tabla 3.	Enraizamiento <i>in vitro</i> de tres variedades de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) en medio con diferentes concentraciones de ANA.	55
Tabla 4.	Longitud de raíces (cm) de tres variedades de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) enraizadas <i>in vitro</i> en medio con diferentes concentraciones de ANA.	56
Tabla 5.	Multiplicación <i>in vitro</i> de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) en medio doble fase y medio semisólido.	66
Tabla 6.	Multiplicación <i>in vitro</i> de tallos de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) en medio doble fase con diferentes concentraciones de BAP.	69
Tabla 7.	Longitud de tallos (cm) de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) cultivados en medio doble fase con diferentes concentraciones de BAP.	70
Tabla 8.	Número de raíces en tallos micropropagados de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) en medio semisólido con diferentes concentraciones de ANA.	71
Tabla 9.	Longitud de raíces (cm) producidas por tallos micropropagados de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) en medio semisólido con diferentes niveles de ANA.	71
Tabla 10.	Altura de plantas (cm) micropropagadas de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) transferidas a condiciones <i>ex vitro</i> .	80
Tabla 11.	Número de tallos de plantas micropropagadas de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) transferidas a condiciones <i>ex vitro</i> .	81
Tabla 12.	Efecto de la cubierta y el enraizamiento sobre el número de raíces por tallo de tres variedades de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) adaptadas a condiciones <i>ex vitro</i> .	81

.....

Tabla 13. Crecimiento de plantas micropropagadas de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) trasplantadas a condiciones <i>ex vitro</i> .	81
Tabla 14. Combinaciones de diferentes iniciadores utilizadas en el desarrollo de los AFLPs.	88
Tabla 15. Tratamientos evaluados en la conservación <i>in vitro</i> de plantas de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.).	100
Tabla 16. Efecto de diferentes concentraciones de sales MS y sacarosa sobre la supervivencia y crecimiento de cultivos de caña flecha (<i>Gynerium sagitatum</i> Aubl.) a los 12 meses después del establecimiento <i>in vitro</i> .	102

I. PRESENTACIÓN

La caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) es una especie vegetal de importancia para la cultura Zenú, cuyo legado cultural a partir de la fibra de esta planta se ha materializado en el *Sombrero Vueltiao*, expresión ancestral de los habitantes de las sabanas de Córdoba y Sucre, y declarado como Símbolo Cultural de la Nación Colombiana.

La fibra extraída de las nervaduras centrales de las hojas de las plantas de caña flecha es la materia prima para la elaboración de cerca de 35 productos artesanales; pero además, el tallo de la plantas es utilizada como material para la construcción de viviendas, elementos musicales, instrumentos de caza y accesorios decorativos. Sus hojas son aprovechadas en la alimentación de animales y para extracción de medicinas tradicionales. Las “pintas” tejidas en las diferentes artesanías han sido reveladas, de acuerdo con estudios documentados, como mecanismos de expresión religiosa, artística y de identificación de clanes políticos y sociales. Además, la comercialización de los productos artesanales representa el mayor renglón de ingresos económicos para muchas familias de los resguardos indígenas Zenúes en una amplia zona de las sabanas de los Departamentos de Córdoba y Sucre. Estos productos artesanales además de ser elementos de identidad regional y muestras tangibles de la herencia de los antiguos pueblos indígenas de la Costa Norte Colombiana, se han convertido en valiosos artículos comerciales tanto a nivel nacional como internacional que en muchos

casos ignora las realidades históricas, culturales, sociales, económicas y ambientales de sus autores, las comunidades y regiones donde estos habitan, pero que gracias a la globalización de estos productos comienza a hacerse visible. Tal es el caso de la obtención de la fibra que ocurre a partir de poblaciones naturales, cuya tasa de extracción es mayor a la capacidad de la planta para restituirlas, lo cual ha ocasionado una disminución significativa de las poblaciones naturales de la planta, especialmente en las zonas productoras de artesanías. Esta situación se asocia al aumento progresivo de la erosión genética de la especie debido a los mecanismos de propagación exclusivamente clonal en los genotipos conocidos y las preferencias de los artesanos por un número reducido de cultivares para la elaboración de los productos.

Esta segunda edición de "Biotecnología Aplicada a la Caña Flecha", además de los estudios de caracterización genética y conservación de material genético, evidencia la superación de limitantes para la producción clonal masiva de plantas por micropropagación para siembras comerciales o restauración de zonas naturales con incrementos significativos la eficiencia de los procesos como son la reducción del costo de plantas por disminución en el uso de reactivos, aumento de las tasas de multiplicación y reducción de mano de obra. Con lo cual se plantean soluciones viables a la problemática de la especie y a las comunidades que dependen del cultivo y explotación de la especie.

II. ASPECTOS GENERALES de la Caña Flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.)

Isidro E. Suárez¹

¹Universidad de Córdoba, Instituto de Biotecnología Aplicada para el Caribe
Colombiano - IBAC

Origen, distribución geográfica e importancia económica.

La caña flecha es nativa del Oeste de la India y en el continente americano se distribuye desde el sur de México a través de América Central y Suramérica hasta el Paraguay (Howard 1979). Se dice que dos ecotipos coexisten en el occidente del Amazonas, uno "pequeño" y otro "grande", y muestran diferencias considerables en la morfología y el modo de reproducción (Kalliola *et al.*, 1992).

En Colombia, se reporta la presencia de caña flecha en Sonsón en las riberas del río Arma, en la hoya del río Samaná,

en los llanos de San Martín, Valle del Cauca y Caloto. También crece en las riberas del río Cauca, el río Nechí y en las orillas de quebradas cerca de la ciudad de Medellín (Pérez 1978; Uribe 1982).

En Córdoba, la caña flecha crece naturalmente en los márgenes de los ríos Sinú y San Jorge, y en los municipios de Momil, Los Córdoba, Purísima, Chimá, Canalete, Valencia y Montelíbano. Se conoce de la existencia de pequeños cultivos en los municipios de Ciénaga de Oro, Montelibano, San Andrés de Sotavento, San Carlos y Pueblo Nuevo.

El cultivo y procesamiento de la caña flecha es la fuente de ingreso de muchas de las familias indígenas que habitan en los últimos reductos del Resguardo Indígena de San Andrés de Sotavento (RISAS). Esta entidad territorial comprende un área de 83.000 ha ubicadas en 13 municipios de los departamentos de Córdoba (San Andrés de Sotavento, Chimá, Momil, Chinú, Ciénaga de Oro, Purísima, y San Antero) y Sucre (Palmito, Sincelejo, Sampués, Tolú, Toluviejo y San Onofre). Su población total está estimada en 40.177 habitantes, de los cuales el 9,8% viven en cabeceras municipales y el 90,2% restante habitan en la zona rural. Muchos de los habitantes de estas poblaciones elaboran artesanías a partir de la caña flecha (Valencia 1987; Zorro y Prieto 1999).

La industria artesanal a base de caña flecha tiene un valor significativo en el aspecto social para las comunidades que la cultivan y utilizan, ya que involucra a la mayoría

de los miembros del núcleo familiar en la elaboración de sus productos, permitiendo que esta actividad sea transmitida de una generación a otra (Serpa 2000; Araméndiz *et al.*, 2005; Durango *et al.*, 2017).

Botánica y propagación de la caña flecha

La caña flecha, también conocida como caña brava, carrizo, chusque ó caña boba, está clasificada taxonómicamente dentro de la clase Liliopsida, orden Poales, familia Poaceae, género *Gynerium*, especie *sagittatum*, y posee un número cromosómico $2n = 72$ o $2n = 76$ cromosomas (Watson y Dallwitz 1992).

La planta de caña flecha es perenne con fuertes rizomas y tallos erectos, la parte basal está cubierta por las vainas de las hojas caídas, mientras que en la parte superior forma un abanico con las láminas expandidas (Figura 1). Los tallos pueden llegar a alcanzar hasta diez metros



Figura 1. Planta adulta de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.).

de altura y mueren tan pronto alcanzan la floración (Schnee 1984; Kalliola *et al.*, 1992).

La planta es dioica y la polinización es realizada por el viento (Pohl 1983). Las flores crecen en espiguillas estaminadas no plumosas, de 3 mm de largo, glumas hialinas de 2 mm de longitud, lemas de 2 - 3 cm de largo, de color púrpura y pubescentes en la base (Figura 2).

La propagación de la caña flecha puede llevarse a cabo por medios sexuales y asexuales. La producción de semilla viable es poca o nula en ciertos ambientes; por ejemplo, bajo



Figura 2. Espiguillas con flores de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.).

las condiciones ambientales de los departamentos de Córdoba y Sucre, no hay producción de semilla fértil, por lo que la propagación ocurre de forma asexual (Croat 1978; Francis 1983; Araméndiz *et al.*, 2008). Las nuevas plantas emergen a partir de tallos estoloníferos en aluviones pedregosos de los ríos caudalosos de las tierras calientes y subtempladas formando grandes colonias (Figura 3). Una planta puede llegar a producir hasta 200 hojas durante su



Figura 3. Plantas nuevas de caña flecha (1) (*Gynerium sagittatum* Aubl.) emergiendo de la base de un tallo adulto (2).

ciclo de vida, teniendo en un momento dado entre 19 a 28 hojas (Howard 1979; Contreras *et al.*, 1998; Kalliola *et al.*, 1992).

Pocos estudios se han realizado con el objetivo de desarrollar métodos para propagar masivamente plantas de caña flecha de forma clonal. Estos estudios se han centrado específicamente en el uso de estacas enraizadas, para lo cual se ha evaluado el efecto del tamaño de los propágulos, la posición en el sustrato y la aplicación de hormonas para aumentar el enraizamiento (Ballesteros y Guardo 1988; González 1997; García y Hernández 2004; Hernández *et al.*, 2005).

Micropropagación

La micropropagación es un método de propagación asexual de organismos vegetales que se desarrolla en condiciones controladas de asepsia, temperatura y luz. Durante la micropropagación, las plantas crecen de forma heterotrófica a partir de sustratos denominados medios de cultivo, los cuales están contenidos en recipientes cerrados de vidrio o plástico (Kane 1996).

Existen tres métodos de micropropagación de plantas: la micropropagación a partir de explantes con meristemos pre-existentes, la organogénesis y la embriogénesis somática.

La micropropagación mediante el cultivo de explantes con meristemos pre-existentes es el método de multiplicación *in vitro* más utilizado en la producción de material de siembra de cultivos como banano, piña, flores y algunos forestales. Este método consiste en inducir la producción

y elongación repetida de yemas axilares mediante la eliminación de la dominancia apical para posteriormente propiciar la formación de raíces previa a la transferencia de los brotes enraizados a condiciones *ex vitro* (Ball 1946; Kane 1996; Chawla 2003).

El proceso de multiplicación masiva de plantas en condiciones *in vitro* a partir del cultivo de explantes con meristemos pre-existentes fue inicialmente concebido como una secuencia de tres estados, de los cuales el primero consiste en el establecimiento *in vitro* de un cultivo en condiciones estériles, seguido por la multiplicación del propágulo establecido y finalmente el enraizamiento individual de los tallos multiplicados (Murashige 1974). Posteriormente, se conceptuó que dos estados adicionales eran indispensables para el éxito completo del proceso: uno inicial, en el cual se realiza un precondicionamiento de la planta seleccionada como

donadora de los explantes, y otro final que comprende los cuidados necesarios para adaptar las plantas micropropagadas a condiciones ambientales *ex vitro* (Debergh y Maene 1981).

La etapa 0, de selección y precondicionamiento de plantas madres, consiste en separar y acondicionar fisiológica y sanitariamente los individuos seleccionados con el fin de obtener el mayor rendimiento en la adaptación de los explantes aislados una vez transferidos a condiciones *in vitro*. Fisiológicamente, durante este estado, se busca inducir en los explantes la producción sucesiva de yemas axilares mediante la reducción la dominancia apical, para lo cual se puede recurrir a un programa de podas que eliminen periódicamente los crecimientos apicales, y a aplicaciones de sustancias inductoras del crecimiento lateral como las citocininas (Read 1988).

De forma alterna, el manejo fitosanitario en la etapa 0, tiene

como objetivo reducir al máximo la posibilidad de contaminación en los explantes por causa de la presencia de microbios. El uso de plantas indexadas libres de microbios sistémicos es la mejor estrategia para evitar la contaminación de los explantes introducidos a las condiciones *in vitro*. La indexación consiste en realizar un diagnóstico mediante pruebas patogénicas o moleculares que permitan determinar o descartar la presencia de microorganismos sistémicos en la planta madre. Adicionalmente a la indexación, la aplicación de medidas de control cultural, como el aislamiento de plantas, y químico, como las aplicaciones de fungicidas de forma periódica, son necesarias para disminuir los microbios y reducir las posibilidades de contaminación de los explantes introducidos a las condiciones *in vitro*. (Leifert y Cassels 2001; Suárez *et al.*, 2005).

En la etapa I, también denominada de establecimiento, los explantes son desinfectados

superficialmente mediante la inmersión temporal de éstos en soluciones de iones de hipoclorito de sodio o calcio, seguidos por un enjuague con agua estilada estéril para evitar daños del agente desinfectante sobre los tejidos. Los explantes desinfectados superficialmente son establecidos *in vitro* en un medio de cultivo definido para su adaptación a las nuevas condiciones.

Durante la etapa II, los explantes adaptados a las condiciones *in vitro* son transferidos a una formulación de medio de cultivo donde se induce la proliferación de nuevos tallos a partir de las yemas presentes en las axilas foliares del explante. La elongación repetida de las yemas axilares es promovida mediante la adición de citocininas, las cuales son suplidas en el medio de cultivo en forma de productos como zeatina, isopentenil adenina, kinetina, benzilaminopurina o tidiazuron (Davis 1995).

Los tallos multiplicados en la etapa II son transferidos a la etapa III, donde las condiciones del medio inducen la formación de raíces adventicias en la base de los tallos; estas raíces tienen como función garantizar la supervivencia autónoma de las plantas micropropagadas una vez trasplantadas a las condiciones *ex vitro*. El crecimiento radical es promovido con la adición al medio de auxinas como el ácido indolacético (AIA), el ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) en el medio de cultivo.

El crecimiento heterotrófico y las condiciones de alta humedad relativa en el ambiente de los cultivos *in vitro*, imposibilitan la supervivencia de las plantas micropropagadas si éstas son transferidas directamente de las condiciones *in vitro* a las condiciones ambientales normales de campo. El suministro de fuentes energéticas al medio evita un desarrollo completo de los cloroplastos y provoca que

estos sean pocos eficientes en la fijación de CO₂; adicionalmente, la incapacidad para controlar la pérdida de agua a través de las capas superficiales de los tejidos, que conlleva a una deshidratación excesiva. Estas son las principales causas de muerte de las plantas micropropagadas cuando son transferidas a las condiciones *ex vitro* (Kane 1996).

La etapa IV de la micropropagación busca evitar la incidencia directa inmediata de las condiciones externas, permitiendo que las plantas desarrollen los mecanismos necesarios para iniciar los procesos de producción autotrófica de alimentos y control de pérdida de humedad. Esta protección se consigue mediante la transferencia de las plantas micropropagadas a locales con condiciones modificadas de riego permanente y control de la intensidad lumínica, los cuales promueven una adaptación gradual a las condiciones externas (Preece y Sutter 1991; Pico 2019).

Uno de los aspectos que normalmente contribuye a aumentar las tasas de supervivencia en la transferencia a las condiciones externas, es el adecuado enraizamiento de las plantas micropropagadas; sin embargo, en algunas especies este no parece ser determinante. En casos como estos, la transferencia directa de los tallos micropropagados de la etapa II a la adaptación *ex vitro*, es suficiente para obtener niveles de supervivencia comparables a las de las plantas enraizadas, y adicionalmente se reduce el tiempo del proceso y se disminuyen los costos de insumos y mano de obra (Suárez *et al.*, 2009).

Caracterización molecular

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que permiten estudiar la presencia de características agronómicas de importancia asociadas con sus variaciones. A diferencia de los marcadores morfológicos que basan la variabilidad en

características fenotípicas, los marcadores moleculares no son influenciados por el medio ambiente, lo cual aumenta su confiabilidad y reproducibilidad para identificar caracteres controlados genéticamente. Los marcadores moleculares se clasifican de acuerdo con las técnicas utilizadas para su aplicación.

Los RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) se basan en el uso de enzimas de restricción y la hibridación de segmentos de ADN con pruebas de secuencias complementarias marcadas radiactivamente. Los RAPDs (*Randon Amplified Polymorphism DNA*) y AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) se basan en el uso de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificar fragmentos digeridos de ADN a partir de iniciadores que se asocian aleatoriamente al ADN aislado de los individuos caracterizados. Los VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*) y SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) además de PCR necesitan la

secuencia de sitios polimorficos con el fin de diseñar los primer específicos a las secuencias que bordean estos sitios.

La técnica de AFLPs fue desarrollada por Vos *et al.* (1995), combinando los principios de los RFLP con los de PCR; el procedimiento para su uso comprende la amplificación selectiva de fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción y su posterior resolución en un gel, donde el polimorfismo es detectado por la presencia o ausencia de fragmentos en un individuo u otro.

Una de las mayores conveniencias del uso de los AFLPs en caracterización genética de vegetales al compararse con otros tipos de marcadores moleculares, es la posibilidad de identificar mayor número de sitios polimórficos. Estudios de caracterización molecular en soya (*Glycine max* L. Merrill) con el uso de AFLPs permitieron detectar aproximadamente 12

veces mas sitios polimórficos que los detectados con RAPDs. Igualmente en frijol caupi (*Vigna unguiculada* (L.) Walp) se detectó una diversidad mayor entre genotipos silvestres y cultivados con AFLPs que la detectada con el uso de isoenzimas en los mismos genotipos (Tohme *et al.*, 1996).

Aramendiz *et al.* (2005) reportaron el único estudio conocido sobre variabilidad genética en clones de caña flecha. El objetivo de este estudio fue, además de medir la variación existente, asociar características agronómicas de importancia económica con grupos comunes de clones. Dentro de los caracteres identificados en el citado estudio se destaca la textura de la pared, cuya modalidad gruesa otorga un valor agronómico significativo en la tolerancia al barrenador del tallo, así como su demanda potencial en la construcción de viviendas y elaboración de muebles. Igualmente, tiene una destacada importancia la calidad de la fibra, sobresaliendo la de

textura suave, que es utilizada en la elaboración de tejidos finos y que representa gran retorno económico.

Conservación de germoplasma

Uno de los pilares de cualquier programa de mejoramiento genético es el mantenimiento o conservación de variabilidad genética representada en un rango de materiales genéticos (colección de germoplasma) que permita la selección de nuevos genotipos o ampliar la variabilidad existente (Chawla 2003).

La conservación de recursos genéticos puede realizarse en el centro de origen o diversificación de la planta (*in situ*) o trasladando el material a una localidad diferente (*ex situ*). Generalmente, el almacenamiento *in situ* es difícil por las distancias a los centros de origen y dificultades de acceso. Mientras que el almacenamiento *ex situ* favorece el cuidado de las plantas y el acceso al material genético en cualquier momento.

El almacenamiento *ex situ* puede efectuarse mediante la conservación de semillas o a través del cultivo de plantas (*in vivo*). El primero es de gran aplicación en especies que producen semillas ortodoxas, como los cereales; mientras que para especies con semillas recalcitrantes o que no producen semilla viable, el almacenamiento de germoplasma debe efectuarse mediante la conservación de plantas (*in vivo*) que permitan la toma y uso de propágulos vegetativos para garantizar la perpetuación del genotipo.

La conservación en bancos de germoplasma (*in vivo*) normalmente se realiza por medio de la siembra de plantas en campo; sin embargo, esta práctica generalmente se traduce en altos costos representados en los valores del terreno y el manejo agronómico; adicionalmente, la exposición de las plantas a estreses bióticos y abióticos pueden conllevar a riesgos de pérdida del material o en su defecto a contaminación

genética. Una alternativa para superar estos inconvenientes es el uso de técnicas de cultivo de tejidos para conservar material genético, lo cual se denomina almacenamiento *in vitro*.

La conservación de germoplasma *in vitro* se caracteriza por utilizar mas eficientemente el espacio por el uso de material con tamaño reducido, mantiene a las plantas libres de plagas y enfermedades por las características asépticas de las condiciones *in vitro*, reduce los riesgos por desastres ambientales al no exponer el material a condiciones externas y facilitar su movilización, y permite el uso de un variado rango de técnicas y materiales vegetales.

La supervivencia del material vegetal almacenado, y su capacidad para regenerar plantas aunado a la estabilidad genética, son los factores más importantes en la conservación de germoplasma en condiciones *in vitro*. El tejido, o porción vegetal,

a almacenar es la variable que más contribuye con la supervivencia y posterior regeneración de plantas en la conservación *in vitro*, observándose que los meristemas y embriones son los que inducen las mayores posibilidades de supervivencia y regeneración, por tratarse de estructuras completamente desarrolladas y organizadas. Por su parte, las células de callo y los protoplastos presentan mayores dificultades para la regeneración de las plantas por sus altos niveles de indiferenciación celular (Reed 2002; Suárez 2003).

BIBLIOGRAFÍA

Aramendiz H, Espitia M y Robles J. 2005. Colección, conservación, caracterización morfoagronómica y producción de semilla de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) del Caribe Colombiano. CIUC, Universidad de Córdoba, Montería, 118p.

- Ball E. 1946. Development in sterile culture of shoot tips and subjacent regions of *Tropaelum majus* L and of *Lupinus albus* L. *American Journal of Botany* 33:301-318.
- Chawla H. 2003. Introduction to Plant Biotechnology. *Science Publisher*, Enfield, p1-134.
- Croat T. 1978. *Flora of Barro Colorado Island*. Stanford University Press, Stanford, 943p.
- Davis P. 1995. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. En: Davies P (Ed.) *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publisher, Boston, p. 1-12
- Debergh P y Maene. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae* 14:335-345.
- Durango E, Pineda J, Canabal J y Vanegas J. 2017. Guía para el mejoramiento de la Cadena Productiva de Artesanías en Caña Flecha en Córdoba. Publicaciones UNISINÚ, Montería, 57p.
- Francis J. 1983. *Gynerium sagittatum* (Caña brava, cane). En Janzen D (Ed.) *Costa Rica Natural History*. University of Chicago Press, Chicago, p.248-249.
- Howard R. 1979. Flora of the Lesser Antilles, Leeward and Windward Islands. *Arnold Arboretum Harvard University*, Boston, 586p.
- Howard R. 1979. Flora of the Lesser Antilles, Leeward and Windward Islands. *Arnold Arboretum Harvard University*, Boston, 586p.
- Kalliola R, Puhakka M y Salo J. 1992. Interspecific variation, and the distribution and ecology of *Gynerium sagittatum* (Poaceae) in the Western Amazon. *Flora* 86(3-4):153-167.
- Kane M. 1996. Micropropagation from pre-existing meristemos, En: Gray D y Trigiano R (Ed.) *Plant Tissue Culture Concepts and*

- Laboratory Exercises*. CRC Press, Boca Ratón, p.75-86.
- Leifert C y Cassells A. 2001. Microbial hazards in plant tissues and cell culture. *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant* 367:133-138.
- Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology* 25:135-166.
- Pérez A. 1978. *Plantas Útiles de Colombia*. Editora Arco, Bogotá, 339p.
- Pico D. 2019. Aclimatación *ex vitro* de plantas micropropagadas de tres variedades ("Criolla", "Martinera" y "Costera") de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de Córdoba, Montería, 45p.
- Pohl R. 1983. *Gynerium sagittatum* (Caña brava, cane) En: Janzen (Ed.) *Costa Rica Natural History*. University of Chicago Press, Chicago, p.248-249
- Preece J y Sutter E. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field. En: Debergh P y Zimmerman R (Ed.). *Micropropagation Technology and Application*. Kluwer Academic Publisher, Boston, p71-93.
- Read P. 1988. Stock plant influences Micropropagation success. *Acta Horticulturae* 226:41-52
- Schnee L. 1984. *Plantas Comunes de Venezuela*. Biblioteca Universidad Central de Venezuela, Caracas, p280.
- Serpa R. 2000. *Los Zenúes*. Secretaría de Cultura de Córdoba, Montería, p123-137.
- Suarez I. 2003. Introducción a la Biotecnología Agrícola. Universidad de Córdoba, *Grupo de Publicaciones Universidad de Córdoba*, Montería, p8-13.
- Tohme J, González O, Beebe S y Duque M. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Science* 36:1375-1384.

- Uribe I. 1982. *Flora Sonsonera o Colección de Monografías Familiares de Vegetales Selectos Indígenas o Cultivados en el Municipio de Sonsón*. Concejo Municipal, Sonsón Antioquia, p.39-40
- Valencia G. 1987. *Córdoba Su Gente Su Folclor*. Casa de la Cultura, Montería, p.146.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van De Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414
- Watson L y Dallwitz M. 1992. *Grass Genera of the World*. En: <http://biodiversity.uno.edu/delta/> [Accedido: 08-18-1999].
- Zorro W y Prieto F. 1999. Aproximación a la problemática económica productiva de la comunidad indígena Zenú. *Tesis Ingeniero Agrónomo*, Universidad de Córdoba, Montería.

III. MICROPROPAGACIÓN DE CAÑA FLECHA (*Gynerium sagittatum* Aubl.) var “CRIOLLA” A PARTIR DE EXPLANTES CON MERISTEMOS PRE-EXISTENTES

Isidro E. Suárez¹, Iván Pastrana V.²

¹Universidad de Córdoba, Instituto de Biotecnología Aplicada para el Caribe Colombiano - IBAC

²Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA

INTRODUCCIÓN

La caña flecha puede propagarse por medios sexuales y asexuales. La floración generalmente ocurre al final del período de sequía y la polinización es de tipo cruzada, aparentemente favorecida por el viento. Las semillas son livianas con un índice aproximado de 1.67 millones kg⁻¹, y aquellas viables pueden germinar entre 3 - 7 días después de ocurrir la imbibición a una temperatura entre 20 y 30 °C (Croat 1978; Kaliolla *et al.*, 1992).

La reproducción natural de caña flecha por métodos asexuales se lleva a cabo por el crecimiento de brotes caulinares que crecen a partir de los rizomas formando macollas que se extienden de forma radial. El crecimiento de los rizomas puede expandirse hasta 20 m de distancia de la planta madre, generando una alta capacidad de colonización de nuevos territorios. Los brotes adventicios que emergen a partir de los rizomas constituyen la fuente de generación de nuevas plantas para el aumento de la población y expansión de la especie (Francis 1983).

A pesar de la gran producción de semilla, la propagación de caña flecha por métodos sexuales es baja debido a los altos niveles de inviabilidad seminal, especialmente en el caribe húmedo colombiano. Esto hace que la propagación natural ocurra preferencialmente de forma asexual y a un ritmo lento.

La necesidad de desarrollar métodos eficientes de propagación de plantas de caña flecha que proporcionen suficiente material para la siembra de cultivos comerciales y detengan el proceso de erosión genética causado por la extracción masiva continua en las poblaciones naturales de la planta, ha motivado el desarrollo de algunas investigaciones científicas.

Ballesteros y Guardo (1988) evaluando el efecto del tamaño y la orientación de estacas tomadas a partir de tallos aéreos, rizomas e hijuelos sobre la producción de nuevas plantas, encontraron que los mejores resultados,

con relación al porcentaje de producción de nuevos brotes y la longitud promedio de los brotes producidos, se obtuvieron cuando se plantaron estacas con 3 - 4 nudos tomadas de tallos aéreos y sembrados verticalmente. Similares resultados fueron observados cuando los propágulos consistieron de porciones de rizomas con 3 - 4 nudos, e hijuelos de tamaño mediano a grande. En el mismo sentido, González (1997) observó que la colocación de las estacas en forma horizontal en el medio de propagación indujo un mayor porcentaje de enraizamiento. García y Hernández (2004) evaluando el uso de hormonas (auxinas) en la eficiencia de la propagación, sumergieron la base de las estacas por 12 horas en soluciones con 2, 4, 6 y 8 g l⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB), en forma separada y en conjunto. Los análisis de los datos mostraron que los tratamientos aplicados no contribuyeron a incrementar significativamente el porcentaje

de enraizamiento, observándose que de forma inversa algunas de las cantidades de producto aplicadas resultaron en niveles de enraizamiento menores a los del tratamiento control.

Un segundo estudio donde las cantidades de los mismos productos fueron reducidas (40, 80, 60 y 120 mg l⁻¹) resultó en un ligero aumento de los porcentajes de enraizamiento, especialmente cuando las estacas fueron tratadas con las dosis más bajas (Hernández *et al.*, 2005).

Los resultados de los estudios anteriores muestran que la caña flecha no es una planta difícil de enraizar, ya que produce raíces incluso sin un suplemento de auxinas exógenas; sin embargo, el tiempo que toman las estacas para alcanzar un buen enraizamiento y el tamaño necesario de los propágulos para poder enraizar, dificultan la aplicación de esta técnica de propagación dirigida como un mecanismo eficiente para

la producción clonal masiva de plantas.

La micropropagación tiene ventajas comparativas con respecto a otras técnicas de propagación asexual como son la multiplicación de plantas en períodos cortos de tiempo, el uso de espacios reducidos, la producción de nuevos individuos a partir de plantas que no producen semillas viables, o que tienen dificultades para multiplicarse por estacas, la posibilidad de obtener plantas sanas a partir de material infectado con microorganismos sistémicos y la alta uniformidad del material producido (Kane 1996; Suárez 2020).

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un protocolo de micropropagación de plantas de caña flecha con el fin de producir masivamente material de siembra clonal para ser utilizadas en el establecimiento de cultivos comerciales. Los resultados obtenidos están dirigidos a contribuir con el

desarrollo integral de la actividad artesanal y reducir el impacto de la misma en el medio ambiente presentando una alternativa para disminuir los niveles de extracción a partir de las poblaciones naturales de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal para la realización de los experimentos consistió de segmentos nodales de aproximadamente 5 cm de longitud con varias yemas axilares, los cuales fueron aislados a partir de brotes basales (hijuelos) desarrollados de plantas adultas de la variedad "Criolla" establecidas en la colección de germoplasma de caña flecha de la Granja Experimental de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba.

Las hojas y las vainas fueron removidas de los segmentos nodales seleccionados, y estos fueron colocados en remojo con agua potable por un período

de 1 hora. Posteriormente, se seccionaron porciones de aproximadamente 2 cm de longitud conteniendo al menos una yema axilar, las cuales fueron desinfectadas superficialmente.

La solución desinfectante se preparó al 1.25% de hipoclorito de sodio mezclado un 20 μ l de Tween 20[®]. La desinfección superficial se realizó por un período de 20 minutos en constante movimiento. Transcurrido el tiempo de desinfección superficial, los explantes fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril en condiciones asépticas en el interior de una cámara de flujo laminar. Los extremos de las porciones nodales blandas, originados por el efecto de la solución desinfectante, fueron removidos con la ayuda de un bisturí estéril.

Los explantes desinfectados fueron establecidos en medios de cultivo semi sólidos. Tres diferentes formulaciones de Murashige y Skoog (MS) (1962)

[completo(MS),MSsuplementado con carbón activado a una concentración de 200 mg l⁻¹ (MSCA) y MS suplementado con concentraciones de 0.1 mg l⁻¹ de ANA y 0.3 mg l⁻¹ de BAP (MSAB)] fueron evaluadas para determinar su efecto sobre el establecimiento de los explantes en condiciones *in vitro*. Cada formulación de medio fue suplementada con (en mg l⁻¹) con los siguientes componentes: mio inositol (100), sacarosa (30000), tiamina HCl (0.4) y TC agar (8000) (Sigma Co.). Aproximadamente 30 ml de medio fueron vertidos en frascos de vidrio de 125 cm³ de capacidad y un explante fue establecido en cada recipiente, el cual fue cubierto con dos capas de papel aluminio y sellados con Parafilm[®]. Los explantes establecidos fueron almacenados a una temperatura de 25 °C y luminosidad diaria de 12 horas (40 μmol m⁻² s⁻²) con tubos halógenos de luz fría fluorescente.

Los tratamientos aplicados fueron distribuidos utilizando

un diseño completamente al azar con 15 repeticiones para cada tratamiento. Al final de la cuarta semana de cultivo se registró el número de explantes que sobrevivieron y el número de explantes que desarrollaron órganos (yemas y raíces).

Con el fin de determinar las mejores condiciones para inducir la proliferación de yemas axilares y el crecimiento de nuevos tallos, los brotes establecidos fueron transferidos a un medio de cultivo MS semisólido independientemente suplementado con cuatro concentraciones (0.5; 1.0; 2.0 y 4.0 mg l⁻¹) de BAP. Estos tratamientos fueron comparados con un control absoluto y un tratamiento suplementado con 0.1 mg l⁻¹ de ANA y 0.3 mg l⁻¹ de BAP.

Al igual que en la etapa de establecimiento, todos los medios fueron adicionados (en mg mg l⁻¹) con mio inositol (100), sacarosa (30000), tiamina HCl (0.4) y TC agar (8000) (Sigma Co.).

Las condiciones ambientales para el cultivo de los explantes fueron similares a las del estado de establecimiento.

Cada tratamiento fue repetido 15 veces, y las unidades experimentales, consistentes de un explante por cada recipiente, fueron distribuidas utilizando un diseño completamente al azar. Los explantes fueron cultivados bajo las condiciones anteriormente descritas durante cuatro semanas, al final de las cuales se registró el número de nuevos tallos producidos por cada explante y el tamaño promedio de los nuevos tallos originados. Los datos colectados para cada variable fueron procesados con un análisis de varianza con base en el modelo estadístico $Y_j = \mu + i + e_j$; donde μ fue el promedio general, i correspondió al efecto del tratamiento para inducir la multiplicación caulinar y e correspondió efecto del error experimental. Adicionalmente, los promedios de los tratamientos fueron separados mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Los tallos axilares producidos en el estado II fueron proliferados utilizando el tratamiento que indujo la mayor tasa de multiplicación, y posteriormente fueron transferidos a medios de enraizamiento con el fin de determinar las mejores condiciones para el enraizamiento en condiciones *in vitro*.

Seis tratamientos consistentes de un control absoluto y cinco tratamientos con diferentes concentraciones (0.5; 1.0; 2.0; 3.0 y 4.0 mg l⁻¹) de ANA fueron independientemente suplementados en un medio semi sólido con (en mg l⁻¹) mio inositol (100), sacarosa (30000), tiamina HCl (0.4) y TC agar (8000) (Sigma Co.).

Cada tratamiento fue repetido 15 veces y las unidades experimentales fueron distribuidas utilizando un diseño completamente al azar. Los cultivos fueron mantenidos en condiciones similares a las indicadas para las etapas I (Establecimiento) y II (Multiplicación).

Después de 4 semanas de cultivo se registró el número de explantes que produjeron raíces, el número de raíces por explante y la longitud de cada raíz, con lo cual se calculó el porcentaje de enraizamiento por cada tratamiento, el número promedio de raíces producidas por cada explante y la longitud promedio de las raíces producidas en cada uno de los tratamientos evaluados. Los datos registrados fueron analizados con un análisis de varianza con base en el modelo estadístico $Y_j = \mu + i + e_i$; donde μ correspondió al promedio general, i correspondió al efecto del tratamiento de enraizamiento aplicado y e fue el efecto del error experimental. Los promedios fueron separados utilizando una prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Para evaluar la necesidad del enraizamiento *in vitro* en la adaptación de las plantas micropropagadas de caña flecha a las condiciones normales *ex vitro*, se tomaron plantas

enraizadas con 0.5 mg l^{-1} de ANA y se transplantaron en un sustrato de propagación compuesto por una mezcla estéril de arena, arcilla y cascarilla de arroz en una proporción en volumen 1:1:1. El sustrato fue depositado en bandejas con 24 orificios, donde en cada uno de los cuales se transfirió un cluster compuesto por 3-4 tallos enraizados. Simultáneamente, clústeres micropropagados con igual número de tallos, pero tomados directamente de la etapa II (Multiplicación de propágulo) previo a la etapa de enraizamiento, fueron trasplantados a las bandejas en condiciones similares a los tallos enraizados. Todos los propágulos trasplantados (140 por cada tratamiento), fueron colocados dentro de un umbráculo cubierto con una polisombra del 70% de cobertura y una frecuencia de riego por aspersion de 30 segundos cada 12 minutos. Al final de la primera semana todas las plantas fueron trasladadas dentro del mismo umbráculo a un sitio con una cobertura del

50% y una frecuencia de riego de 12 segundos cada hora, para finalmente a la cuarta semana colocarlas bajo una cubierta con 70% de luminosidad y cuatro riegos diarios de 30 segundos cada uno. Al final de la octava semana, se registró el número de plantas que sobrevivieron y se realizaron observaciones para determinar la ocurrencia de alguna diferencia morfológica evidente en las plantas recuperadas.

El pH de todos los medios de cultivo empleados fue ajustado a un valor de 5.7 – 5.8 con KOH o HCl previo a la adición del agar. Los medios fueron vertidos en los recipientes de acuerdo con los requerimientos de cada experimento y esterilizados en un autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 1.1 kg cm⁻² por un período de 15 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos obtenidos mostraron que todos los explantes establecidos en el medio de cultivo MS sobrevivieron al establecimiento en las condiciones *in vitro*, mientras que sólo el 60% de los explantes establecidos en los medios de cultivo MSAB y MSCA lograron sobrevivir.

La supervivencia de los explantes una vez transferidos a las condiciones *in vitro*, son el resultado de la interacción del estado fisiológico de la planta madre de la cual fueron aislados, y de las condiciones ambientales suministradas durante el período de adaptación (control de la contaminación, tipo de medio, temperatura y luz); no obstante, es posible que el genotipo tenga algún efecto relacionado. Previamente, fue observado que el mayor porcentaje de supervivencia en explantes de caña flecha del cultivar UC121 ocurrió en presencia de MSAB, (80%) mientras que aquellos

establecidos en medio MS completo sobrevivieron en un 67%, (Suárez *et al.*, 2009).

Las observaciones realizadas en el presente estudio evidenciaron que los explantes sobrevivientes desarrollaron nuevos brotes pero no llevaron a cabo la formación de raíces (Figura 4). Los datos registrados mostraron que el mayor porcentaje de formación de nuevos brotes (60%), al igual que el mayor promedio de nuevos



Figura 4. Emisión de nuevos brotes a partir de un explante de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) cultivar "Criolla" en condiciones *in vitro*.

brotes por explante (3 brotes por explante) ocurrió cuando los explantes fueron establecidos en el medio MSAB. El medio MSCA indujo la formación de nuevos brotes en los explantes en un 40%, con un promedio de dos brotes por cada explante establecido; mientras que el menor porcentaje de explantes con formación de nuevos brotes, al igual que el promedio más bajo de nuevos brotes por explante (1.4), fue observado en aquellos establecidos el medio MS básico, donde solo la mitad de los explantes sobrevivientes experimentaron emergencia de nuevos brotes.

Los resultados obtenidos permiten inferir que los explantes de la variedad "Criolla" producen un mayor número de brotes durante el proceso de establecimiento, en comparación con los explantes del cultivar UC121, donde se observó un promedio máximo de 0.86 nuevos brotes por cada explante (Pastrana y Suárez 2009).

Las observaciones realizadas permitieron determinar que la emergencia de los nuevos brotes ocurrió a partir de las yemas axilares presentes en los explantes establecidos (Figura 5).

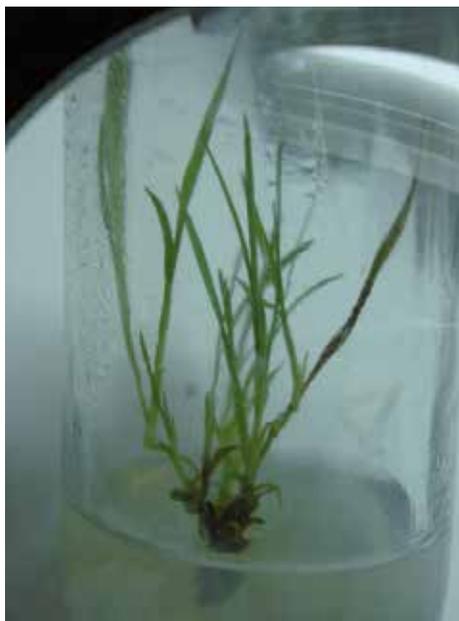


Figura 5. Multiplicación axilar de tallos de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) cultivar "Criolla" en condiciones *in vitro*.

El análisis realizado a los datos registrados, permitió observar que el suplemento de BAP en el medio de cultivo incrementó de forma significativa ($P < 0.0001$) el promedio del número de nuevos brotes producidos por cada explante (Figura 6).

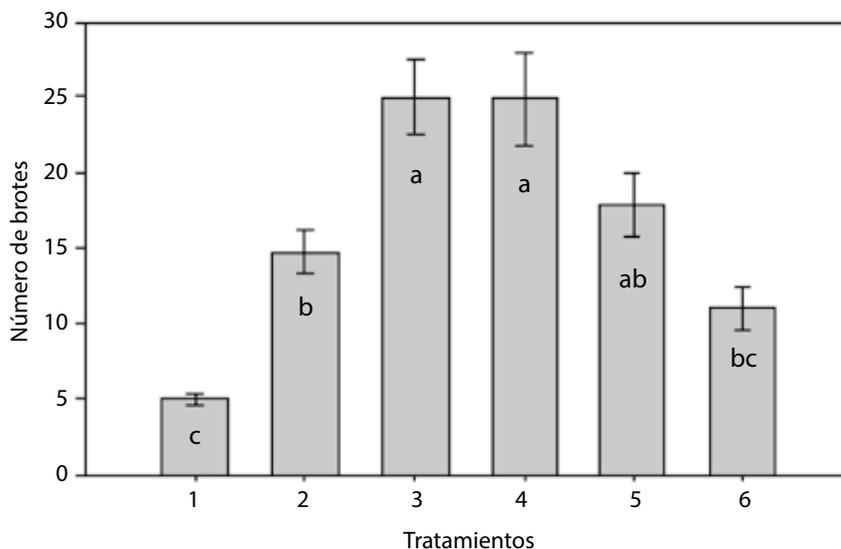


Figura 6. Efecto de diferentes tratamientos (1 = control, 2= 0.1 mg l⁻¹ ANA + 0.3 mg l⁻¹ BAP, 3 = 0.5 mg l⁻¹ BAP, 4 = 1.0 mg l⁻¹ BAP, 5 = 2.0 mg l⁻¹ BAP y 6 = 4.0 mg l⁻¹ BAP) sobre la multiplicación *in vitro* de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) cultivar "Criolla".

El mayor promedio de formación de nuevos brotes se presentó cuando los explantes fueron cultivados en presencia de medio y 1 mg l^{-1} de BAP; los mismos datos muestran que cantidades de BAP $>1 \text{ mg l}^{-1}$ reducen la tasa de multiplicación al compararse con los niveles anteriores, lo que indica una posible sobredosis con efectos negativos para la capacidad de multiplicación del explante.

Algunos estudios en especies relacionadas soportan el efecto inductor de las citocininas en la proliferación de brotes a partir de explantes con meristemas pre-existentes de especies gramíneas del tipo bambú. Pattanavibool y Ramyarangsi (2007) reportaron una tasa de hasta 17.5 nuevos brotes al cultivar explantes de *Bambusa nana* Roxb. en un medio MS suplementado con 4.5 mg l^{-1} de BAP. Mishra *et al.* (2001), al multiplicar *in vitro* *Dendrocalamus strictus* (Roxb.), observaron una tasa de multiplicación de 3.29 nuevos brotes con un suplemento de mg l^{-1}

de BAP, la cual se incrementó a 4.59 brotes por explante al adicionar 0.5 ml de triacontanol por 0.5 l. Jiménez *et al.* (2006) al micropropagar *Guadua angustifolia* Kunt reportaron una tasa de ocho brotes por explante con una concentración entre 2 y 3 mg l^{-1} de BAP, mientras que Marulanda *et al.* (2005) reportaron una tasa de hasta 12 nuevos brotes en explantes de la misma especie con un suplemento de 5 mg l^{-1} de BAP.

Algunos estudios demuestran que el efecto inductor de proliferación caulinar de las citocininas en los explantes no es un evento generalizado y uniforme. El suministro de BAP resultó en una disminución de la tasa de multiplicación de explantes de caña flecha del cultivar UC121 con respecto al tratamiento sin suministro de BAP (Suárez *et al.* 2009). Adicionalmente, Ndiaye *et al.* (2006), al cultivar explantes *in vitro* de *Bambusa vulgaris* Schrad., no observaron ningún efecto significativo como resultado de la adición de BAP

en el medio. Estos resultados apoyan la hipótesis del posible efecto del genotipo sobre la respuesta de los explantes en condiciones *in vitro*.

La combinación de BAP y ANA incrementó significativamente la tasa de multiplicación con respecto al tratamiento control, aunque esta fue estadísticamente inferior a la obtenida en presencia de 0.5 o 1.0 mg l⁻¹ de BAP. Estos resultados coinciden parcialmente con trabajos previos donde se reporta una tasa promedio de 12 nuevos brotes por explante del cultivar UC121 con un suplemento conjunto de 0.1 mg l⁻¹ de ANA y 0.3 mg l⁻¹ de BAP (Suárez *et al.*, 2009). Similarmente, Beltrán y Sehuanes (2004) alcanzaron la mayor tasa de multiplicación en caña flecha con un suplemento de 2-4 mg l⁻¹ de BAP, combinado con suministros de ANA correspondientes a ¼ de la concentración de BAP.

El uso combinado de auxinas y citocininas en la multiplicación *in vitro* ha sido previamente

reportado en este mismo tipo de plantas. Kalia *et al.* (2004) reportaron una tasa de 10,3 nuevos brotes al cultivar explantes con meristemas pre-existentes de *Bambusa nutans* Roxb en un medio semisólido suplementado con 5 mg l⁻¹ de BAP y 1.25 mg l⁻¹ de ANA. Sanjaya *et al.* (2005) obtuvieron tasas de hasta 125 nuevos brotes por explante cada 50 días al cultivar explantes de *Pseudoxytenanthera stocksii* Munro en un medio de cultivo MS líquido suplementado con 0.5 mg l⁻¹ de ANA y 1 mg l⁻¹ de BAP. Kapoor y Rao (2006) utilizaron dosis combinadas de 0.56 a 1.12 mg l⁻¹ de BAP con 5 mg l⁻¹ de ANA y 0.1 mg l⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) en la inducción de rizomas *in vitro* y desarrollo de brotes de *Bambusa bambos* (L.).

El análisis de los resultados del tamaño de los brotes producidos a partir de los explantes cultivados en el medio de multiplicación permitió determinar que los tratamientos aplicados redujeron significativamente la longitud de los nuevos brotes (Figura 7).

La mayor longitud promedio de tallos se registró en los brotes desarrollados en el tratamiento control absoluto, mientras que los brotes desarrollados en los medios suplementados con BAP disminuyeron su tamaño en la medida en que se aumentó la concentración de éste regulador. Resultados similares a los observados en la presente investigación fueron reportados por Suárez *et al.* (2009) en caña flecha y Ndiaye *et al.* (2006) en *Bambusa vulgaris* Schrad.

Salisbury y Ross (1994) afirman que las citocininas pueden inducir

el alargamiento de los brotes solo cuando son adicionadas de forma simultánea con auxinas o giberelinas en el medio. Esta respuesta fue corroborada en el presente estudio, donde pudo observarse que los brotes cultivados en el tratamiento suplido con auxinas y citocininas desarrollaron una longitud significativamente mayor a los suplementados con las dosis más altas de citocininas.

El desarrollo y crecimiento de raíces adventicias en los brotes micropropagados de caña flecha ocurrió en todos los tratamientos

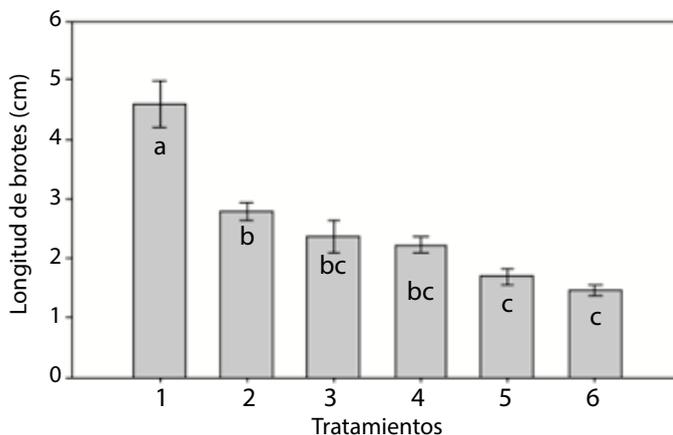


Figura 7. Efecto de diferentes tratamientos (1 = control, 2 = 0.1 mg l⁻¹ ANA + 0.3 mg l⁻¹ BAP, 3 = 0.5 mg l⁻¹ BAP, 4 = 1.0 mg l⁻¹ BAP, 5 = 2.0 mg l⁻¹ BAP y 6 = 4.0 mg l⁻¹ BAP) sobre la multiplicación *in vitro* de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) cultivar "Criolla".

evaluados, incluyendo aquellos donde no hubo suministro de ANA de forma exógena (Figura 8).

Los datos registrados y analizados permitieron determinar que la adición de ANA incrementó de forma significativa el número de raíces por brote y disminuyó significativamente la longitud promedió de las raíces producidas probablemente en beneficio del número de raíces formadas (Figuras 9 y 10).

Las observaciones realizadas muestran que el suministro de auxinas exógenas no es necesario para que ocurra la formación de raíces adventicias en el cultivar "Criolla" de caña flecha. Esta condición es un indicativo de la facilidad de enraizamiento de la especie, lo cual ha sido igualmente observado en estudios previos (Hartmann *et al.*, 2000; García y Hernández 2004; Suárez *et al.*, 2009). Sin embargo, los datos muestran que un suplemento de al menos 0.5 mg l⁻¹ de ANA es necesario para poder obtener un número de



Figura 8. Formación de raíces en brotes de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) cultivar "Criolla" sin suministro de auxinas exógenas.

10 o más raíces adventicias con un tamaño ≤ 1 cm de longitud (Figuras 9 y 10), lo cual no sólo aumenta las probabilidades de supervivencias al momento del transplante a las condiciones *in vitro*, sino que es también claro que las raíces con tamaño reducido permiten un manejo más fácil durante la transferencia y evitan la realización de podas radicales en esta etapa del proceso.

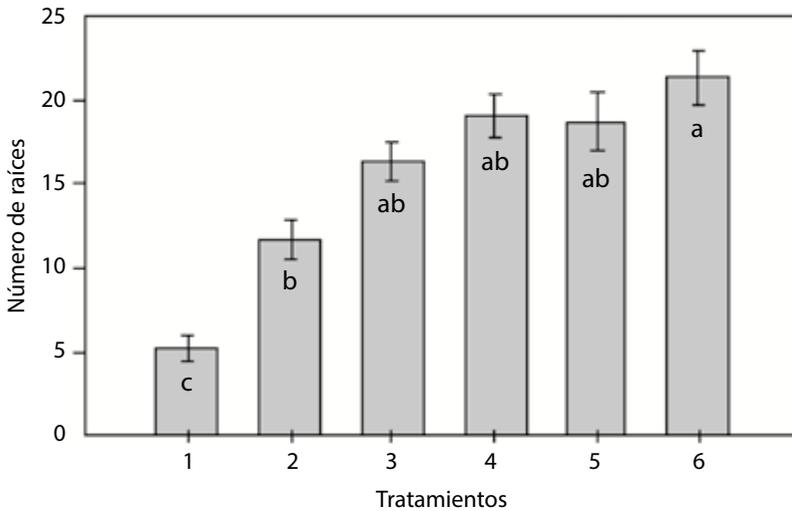


Figura 9. Efecto de diferentes tratamientos (1 = control, 2 = 0.5 mg l⁻¹ ANA, 3 = 1.0 mg l⁻¹ ANA, 4 = 2.0 mg l⁻¹ ANA, 5 = 3.0 mg l⁻¹ ANA, y 6 = 4.0 mg l⁻¹ ANA) sobre el número de raíces adventicias por explante de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) cultivar "Criolla".

Suárez *et al.* (2009) observó niveles de enraizamiento mayores a los resultados del presente estudio durante el enraizamiento de caña flecha cultivar UC121, reportando un promedio superior a 40 raíces por brote y longitud promedio de raíz <1 cm en presencia de 0.5 mg l⁻¹ de ANA. Beltrán y Sehuanes (2004) reportaron el mayor enraizamiento *in vitro* en caña flecha con dosis de 4-6 mg l⁻¹ de AIA, lo cual indica un posible efecto del tipo de auxina suplementado o del genotipo estudiado (Kane 1996).

Estudios relacionados en otras especies gramíneas del tipo bambú sugieren un efecto del genotipo en la respuesta al enraizamiento *in vitro*. Mishra *et al.* (2001) reportaron el mayor porcentaje de enraizamiento (55.66%) de tallos de *Dendrocalamus strictus* Roxb. con un suplemento de 3 mg l⁻¹ de ANA. Jiménez *et al.* (2006) observaron un enraizamiento completo (100%) en brotes axilares de *Guadua angustifolia* Kunt en un medio sin suministro de auxinas. Saxena (1990) reportó un 90% de enraizamiento en brotes de

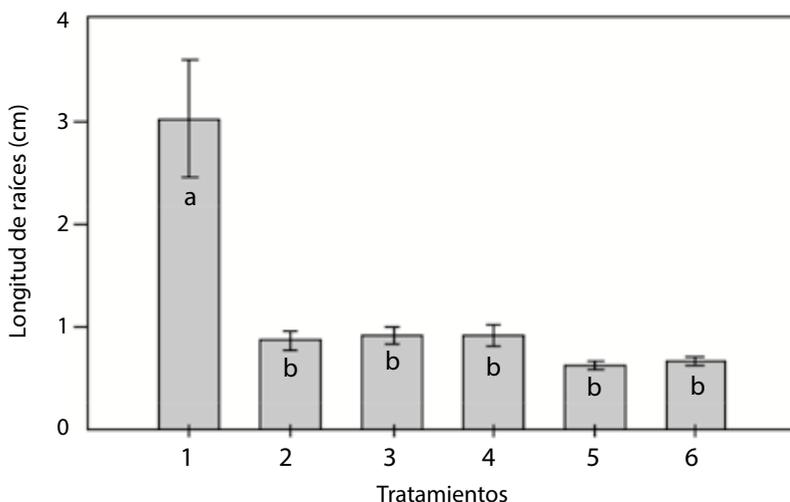


Figura 10. Efecto de diferentes tratamientos (1 = control, 2 = 0.5 mg l⁻¹ ANA, 3 = 1.0 mg l⁻¹ ANA, 4 = 2.0 mg l⁻¹ ANA, 5 = 3.0 mg l⁻¹ ANA, y 6 = 4.0 mg l⁻¹ ANA) sobre la longitud de raíces adventicias por brote de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) cultivar “Criolla”.

Bambusa tulda Roxb. cultivados en un medio MS suplementado con 1.75 mg l⁻¹ de AIA. Ndiaye *et al.* (2006) reportaron un enraizamiento máximo de 45.83% de brotes de *Bambusa vulgaris* Schrad cuando fueron cultivados con dosis ≥ 20 mg l⁻¹ de AIB. Pattanavibooly y Ramyarangsi (2007) alcanzaron un 90% de enraizamiento en brotes de *Bambusa nana* Roxb. cultivados en medio MS suplementado con 18.62 mg l⁻¹ de ANA. Shirin y Rana (2007) obtuvieron la mayor tasa de enraizamiento en brotes

Bambusa glaucescens Willd. con un suplemento de 5.1 mg l⁻¹ de AIB.

El proceso de adaptación realizado permitió la recuperación de plantas completamente acondicionadas a el ambiente *ex vitro* con crecimiento y aspecto normal (Figura 11).

Los datos colectados permitieron observar que tanto los clústeres de tallos transplantados con un enraizamiento previo en condiciones *in vitro*, y aquellos



Figura 11. Plantas micropropagadas de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) cultivar “Criolla” adaptadas a condiciones *ex vitro*.

transplantados directamente después de la multiplicación y sin enraizar, lograron sobrevivir en un 100% en cada caso. Estos resultados permiten demostrar que bajo las condiciones en las cuales fue desarrollado el presente estudio, los brotes micropropagados de caña flecha pueden ser transferidos directamente de la etapa II (multiplicación de propágulo) a la etapa IV (aclimatación *ex vitro*) sin que la tasa de recuperación de plantas se vea afectada por la ausencia del enraizamiento *in vitro* (etapa III).

La supervivencia de plantas micropropagadas transferidas

a la etapa IV sin previo enraizamiento *in vitro* ha sido reportado en diversos estudios. Lara *et al.* (2003) lograron un 80% de recuperación en plantas de *Psycotria acuminata* Benth. después de transferir los tallos multiplicados directamente a condiciones *ex vitro* sin enraizamiento previo. Similarmente, Martín *et al.* (2003) reportaron la recuperación del 89.2% de plantas de *Wedelia chinensis* (Osbeck) después de multiplicar los brotes *in vitro* e inducir el enraizamiento de los mismo en condiciones *ex vitro*.

En la micropropagación de caña de azúcar, además del enraizamiento *in vitro*, la emisión de nuevas hojas y la producción de raíces eficientes en la toma de agua y nutrientes son necesarios para que las plantas micropropagadas transferidas a condiciones *ex vitro* puedan lograr la independencia nutricional e hídrica para continuar su desarrollo (Jelaja *et al.*, 2008), mientras que en maderables como *Tabebuia*

rosea el enraizamiento *in vitro* es necesario para poder alcanzar algún grado de supervivencia de las plantas micropropagadas, lo cual indica un efecto marcado del genotipo sobre la adaptación a las condiciones *ex vitro* (Suárez *et al.*, 2006).

La posibilidad de enraizar y adaptar plantas micropropagadas directamente del estado de multiplicación, aumenta de forma significativa la eficiencia del proceso de micropropagación, ya que reduce el tiempo de producción y disminuye el empleo de mano de obra y el uso de insumos. Adicionalmente, disminuye los riesgos de pérdida de material por la manipulación inherente al estado de enraizamiento y la contaminación con microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ballesteros J y Guardo T. 1988. Estudio preliminar de la propagación asexual de la caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de Córdoba, Montería.
- Beltrán J y Sehuanes I. 2004. Micropropagación *in vitro* de la caña flecha (*Gynerium sagittatum*) (Aubl) Beauv. c.v. "Criolla" mediante el uso de segmentos nodales. *Memorias del XXXIX Congreso de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, Ibagué.
- Croat T. 1978. *Flora of Barro Colorado Island*. Stanford University Press, Stanford, 943p.
- Francis J. 1983. *Gynerium sagittatum* (Caña brava, cane). En Janzen D (Ed.) *Costa Rica Natural History*. University of Chicago Press, Chicago, p.248-249.

- García J y Hernández H. 2004. Efecto de dos fitoreguladores sobre la formación de raíces en estacas de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). *Tesis Ingeniero Agrónomo*, Universidad de Córdoba, Montería.
- González O. 1997. Situación de dos métodos de siembra por estacas de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) de la variedad 'Martinera' en la región de Montelibano, Córdoba. *Tesis Ingeniero Agrónomo*, Universidad de Córdoba, Montería.
- Hartmann H, Kester D, Davies F y Geneve R. 2002. Hartmann and Kester's *Plant Propagation Principles and Practices* 7th Ed Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, p308.
- Hernández J, Aramendiz H y Cardona C. 2005. Influencia del ácido indolbutírico sobre el enraizamiento de esquejes de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). *Revista Temas Agrarios* 10(1):5-13.
- Jelaja N, Neelamathi D y Sreenivasan T. 2008. Micropropagation for quality seed production in sugarcane in Asia and the Pacific. *Asia – Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology*. FAO, Rome, p12-13.
- Jiménez V, Castillo J, Tavares E, Guevara E y Montiel M. 2006. In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86(3):389-395.
- Kalia S, Kalia R y Sharma S. 2004. In vitro regeneration of and indigenous bamboo (*Bambusa nutans*) from internode and leaf explant. *Journal of bamboo and Rattan* 3(3):217-228.
- Kalliola R, Puhakka M y Salo J. 1992. Interspecific variation, and the distribution and ecology of *Gynerium sagittatum* (Poaceae) in the Western Amazon. *Flora* 86(3-4):153-167.

- Kane M. 1996. Micropropagation from pre-existing meristemos, En: Gray D y Trigiano R (Ed.) *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press, Boca Ratón, p.75-86.
- Kapoor P y Rao U. 2006. *In vitro* rhizome induction and plantlet formation from multiple shoots in *Bambusa bambos* var. gigantean Bennet and Gaur by using growth regulator and sucrose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85(2):211-217.
- Lara A, Valverde R, Gomez L y Hidalgo A. 2003. Micropropagación de la planta medicinal *Psycotria acuminata* L. *Agronomia Costaricense* 27:7-20.
- Martin K, Beena M y Joseph D. 2003. High frequency axillary bud multiplication and *ex vitro* rooting of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr – A medicinal plant. *Indian Journal of experimental Botany* 42:262-286.
- Marulanda M, Gutiérrez L y Márquez M. 2005. Micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotecnología Vegetal* 27(82):5-15.
- Mishra Y, Rana P, Shirin F y Ansari S. 2001. Augmenting *in vitro* shoot multiplication by vipul (triacetanol) and adventitious rhizogenesis by rice bran extract in *Dendrocalamus strictus*. *Indian Journal of Experimental Biology* 39(2):165-169.
- Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Ndiaye A, Diallo M, Niang D y Gassama-Dia Y. 2006. *In vitro* regeneration of adult trees of *Bambusa vulgaris*. *African Journal of Biotechnology* 5 (13):1245-1248.
- Pastrana, I. y Suárez. I. 2009. Producción de plantas de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) Variedad

- "Criolla" a través de micropropagación. *Revista Temas Agrarios* 14(2):5-13.
- Pattanavibool R y Ramyarangsi S. 2007. *In Vitro* Micropropagation of young buds of *Bambusa nana*. En: http://www.forest.go.th/Research/English/abstracts_silvic/phai.htm [Accedido: 07-29-2008]
- Salisbury F y Ross C. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica S.A, México D.F., p395-451.
- Sanjaya T, Ratore S y Ravishankar V. 2005. Micropropagation of *Pseudoxytenanthera stocksii* Munro, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41(3):333-337.
- Shirin F y Rana P. 2007. *In vitro* plantlet regeneration from nodal explants of field-grown culms in *Bambusa glaucescens* Willd. *Plant Biotechnology Reports* 1(3):141-147.
- Suarez, I., Araméndiz, H. y Pastrana I. 2009. Micropropagación de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 62(2):5135-5243.
- Suárez I. 2020. Cultivo de Tejidos Vegetales. Fondo Editorial Universidad de Córdoba, Montería, 116p.

IV. MICROPROPAGACIÓN DE TRES VARIEDADES (“Criolla”, “Martinera” y “Costera”) DE CAÑA FLECHA (*Gynerium sagittatum* Aubl.)

Isidro E. Suárez¹, Carlos Pérez Abdala¹ y Claudia M. López¹

¹Universidad de Córdoba, Instituto de Biotecnología Aplicada para el Caribe Colombiano - IBAC

INTRODUCCIÓN

La variedad o ecotipo de caña flecha “Criolla” es la más sembrada y utilizada en la elaboración de artesanías. Sin embargo, existen otros cultivares que se destacan por sus características morfo agronómicas individuales que facilitan la elaboración de ciertas artesanías y/o manufacturas en función de sus distintas cualidades de fibra, el largo y ancho de la laminar foliar, y su textura. Estas requieren una manipulación distintiva a la hora de su procesamiento, lo que permite obtener un producto

con diferentes especificaciones de calidad acorde a las preferencias del mercado.

La implementación de micropropagación ha permitido establecer y multiplicar *in vitro* plantas de caña flecha alcanzando tasas de multiplicación entre 12.5 y 25 nuevos brotes por explante, mostrando un eficiente enraizamiento *in vitro* y una excelente adaptación de las plantas a las condiciones *ex vitro* en condiciones enraizadas o sin enraizar; sin embargo, estos estudios fueron realizados utilizando explantes del cultivar

o variedad "Criolla" (Suárez *et al.*, 2009; Pastrana y Suárez 2009; López 2013; Suarez *et al.*, 2017). Además de la variedad "Criolla" existen variedades de caña flecha como "Martinera" y "Costera", las cuales se cultivan por sus características específicas de fibra u otras ventajas que son útiles para otros usos alternos a la manufactura de artesanías para las cuales no se han determinado las condiciones de multiplicación *in vitro* y adaptación a condiciones *ex vitro*, lo cual puede contribuir con el aprovechamiento de estos genotipos en el cultivo comercial para la obtención de fibra en cantidades industriales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal para el establecimiento de los cultivos y evaluación de las etapas multiplicación, enraizamiento y adaptación *ex vitro* fue obtenido a partir de plantas de caña flecha de las variedades "Criolla", "Martinera" y "Costera",

las cuales se encontraban establecidas en condiciones *in vitro* en frascos de vidrio de 250 cm³ de capacidad con 30 ml de medio de cultivo semisólido MS (Murashige y Skoog 1962) suplido con (en mg l⁻¹): mio inositol (100), sacarosa (30000), tiamina HCl (0.4) y Phytigel (4000) (Sigma Co.). Las plantas se cultivaron por espacio de un año, con transferencias de medio de cultivo fresco cada cuatro semanas, a una temperatura de 25 °C y luminosidad diaria de 12 horas (40 μmol m⁻² s⁻²) con tubos halógenos de luz fría fluorescente, Para evaluar la multiplicación de tallos *in vitro*, se establecieron clústeres formados por 3 tallos de cada una de las variedades en recipientes con 30 ml de medio de cultivo MS semisólido suplementado independientemente con 4 concentraciones (0.0; 0.5, 1.0 y 1.5 mg l⁻¹) de BAP y adicionados por igual con (en mg l⁻¹): mio inositol (100), sacarosa (30000), tiamina HCl (0.4) y agar (8000) (Sigma Co[®]). Los cultivos se establecieron en frascos de

250 cm³, los cuales fueron cubiertos con dos capas de papel aluminio y sellados con Parafilm® para posteriormente almacenarlos en estantes horizontales a una temperatura de 25 °C y luminosidad diaria de 12 horas (40 μmol m⁻² s⁻²) durante 4 semanas. Los clústeres de 3 tallos multiplicados en el tratamiento con la mayor tasa de multiplicación fueron transferidos a medio de enraizamiento consistente de medio con una formulación similar a la del medio de multiplicación pero suplido con cuatro concentraciones (0.0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg l⁻¹) de ANA (ácido naftalenacético) en reemplazo de BAP. Los cultivos fueron mantenidos en las mismas condiciones ambientales descritas para la etapa de multiplicación, y al final de la cuarta semana se registró para cada tratamiento el número de raíces producidas y la longitud promedio de las raíces (cm). Tanto para la evaluación de proliferación de propágulos como para la formación de raíces

adventicias, cada tratamiento se repitió 10 veces para un total de 40 unidades experimentales por tratamiento, las cuales fueron distribuidas utilizando un diseño completamente al azar. Los datos colectados para cada variable fueron procesados con un análisis de varianza con base en el modelo estadístico $Y_{ij} = \mu + i + j + ij + e_{ij}$, donde μ fue el promedio general, i correspondió al efecto de las variedades, j fue el efecto de BAP o ANA y e fue el efecto del error experimental. Los promedios de los tratamientos fueron separados mediante la prueba de Tukey con un $\alpha = 0.05$. Para evaluar la eficiencia del proceso en la adaptación *ex vitro*, plantas enraizadas de cada variedad fueron trasplantadas en bandejas plásticas con 72 alveolos conteniendo turba como sustrato, donde en cada alveolo se transfirió un clúster con 5 a 6 tallos enraizado en el tratamiento que arrojó los mejores resultados en la etapa de enraizamiento. Tres bandejas fueron establecidas con plantas

de cada variedad para un total de 216 plantas por variedad y 648 plantas de las tres variedades. Las bandejas fueron colocadas en una casa malla (50% de cobertura) con un riego por aspersión de 1 minuto diario.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis estadísticos permitieron detectar la presencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en número de tallos nuevos y la longitud de los mismos como efecto de los factores variedad, concentración de BAP y la interacción de los dos. En las variedades "Criolla" y "Martinera" las mayores tasas de multiplicación se observaron cuando los explantes fueron cultivados en medio adicionado con 1.0 mg l^{-1} de BAP, mientras que para la variedad "Costera" el mayor número promedio de tallos se presentó en el tratamiento suplido con 0.5 mg l^{-1} de BAP; de forma contraria, las menores tasas de multiplicación

para las tres variedades se presentaron cuando estas fueron cultivadas en medio sin adición de BAP. Los datos colectados evidenciaron que para las variedades "Criolla" y "Martinera", las concentraciones de 0.5 y 1.0 mg l^{-1} de BAP indujeron un incremento significativo del número de tallos con respecto al tratamiento control, mientras que concentraciones superiores redujeron los valores de esta variable; de forma diferente, para la variedad "Costera" la disminución del valor de esta variable inició con la concentración de 0.5 mg l^{-1} (Tabla 1). En cuanto al tamaño de los tallos, los tratamientos adicionados con distintos niveles de BAP redujeron significativamente el tamaño promedio de los tallos comparados con el tratamiento donde no se adicionó BAP al medio de cultivo en las tres variedades; siendo la concentración de 1.5 mg l^{-1} de BAP la que indujo los tallos con la menor longitud promedio. Durante la etapa de

Tabla 1. Multiplicación *in vitro* de tres variedades de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) en medio con diferentes niveles de BAP.

BAP (mg l ⁻¹)	Número de tallos		
	Criolla	Martinera	Costera
0.0	12.3 D*	8.2 D	9.9 D
0.5	108.6 AB	78.0 AB	34.9 C
1.0	121.6 AB	129.3 A	31.8 C
1.5	71.4 AB	71.4 B	23.8 C

*Valores con la misma letra no son diferentes estadísticamente de acuerdo con la prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

multiplicación de propágulo, se pudo observar de manera similar para las tres variedades, una relación inversa entre la proliferación de tallos y su respectiva longitud (Tabla 2).

Los tallos multiplicados y transferidos a la etapa de enraizamiento mostraron

formación de raíces en todos los tratamientos, incluyendo el tratamiento control; sin embargo, los resultados del análisis de varianza mostraron la presencia de diferencias estadísticas ($Pr < 0.05$) con respecto al número de raíces y la longitud promedio de las mismas como resultado de

Tabla 2. Longitud (cm) de tallos de tres variedades de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) multiplicadas *in vitro* en medio con diferentes niveles de BAP.

BAP (mg l ⁻¹)	Longitud de tallos (cm)		
	Criolla	Martinera	Costera
0.0	13.4 A*	11.3 AB	9.9 D
0.5	5.2 CD	5.6 C	34.9 C
1.0	3.3 FE	3.9 DE	31.8 C
1.5	2.5 F	3.4 FE	23.8 C

* Valores con la misma letra no son diferentes estadísticamente de acuerdo con la prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

las concentraciones de ANA, el efecto de las variedades y de la interacción de estos dos factores.

Los mayores promedios de formación de raíces adventicias se registraron en los tallos cultivados en presencia de las dosis más altas (1.0 y 1.5 mg l⁻¹) de ANA; sin embargo, en todos los casos, la adición de la dosis mínima de ANA (0.5 mg l⁻¹) indujo la formación de un número >20 raíces por tallo (Tabla 3). Con respecto a la longitud de las raíces producidas, para las variedades "Criolla" y "Martinera" la raíces con mayor longitud crecieron a partir de tallos cultivados en

medio sin ANA disminuyendo de manera proporcional con el aumento de la dosis de ANA en cada uno de los tratamientos; mientras que en la variedad "Costera", la respuesta de esta variable no mostró una tendencia definida con relación al incremento o disminución de la concentración de ANA (Tabla 4). Para el trasplante a condiciones *ex vitro*, las plantas de todas las variedades fueron enraizadas *in vitro* en medio de enraizamiento con una concentración de 0.5 mg l⁻¹ de ANA. Cuatro semanas después del trasplante, se observó una supervivencia del 100% en todas las plantas de las tres variedades, condiciones de

Tabla 3. Enraizamiento *in vitro* de tres variedades de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) en medio con diferentes concentraciones de ANA.

ANA (mg l ⁻¹)	Número de raíces		
	Criolla	Martinera	Costera
0.0	14.4 D*	7.0 D	5.4 D
0.5	44.4 BC	43.8 BC	23.0 DC
1.0	53.8 BA	59.4 A	47.2 BC
1.5	63.6 BA	73.0 BA	56.7 BA

* Valores con la misma letra no son diferentes estadísticamente de acuerdo con la prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Tabla 4. Longitud de raíces (cm) de tres variedades de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) enraizadas *in vitro* en medio con diferentes concentraciones de ANA.

ANA (mg l ⁻¹)	Longitud de raíces (cm)		
	Criolla	Martinera	Costera
0.0	3.45 BA*	3.65 A	3.30 BA
0.5	2.35 EBDC	1.97 EDC	2.90 BDAC
1.0	1.82 ED	1.62 E	2.53 EBDAC
1.5	1.77 ED	1.59 E	3.01 BAC

*Valores con la misma letra no son diferentes estadísticamente de acuerdo con la prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

salud apropiadas y ausencia total de anomalías o muestras de poca adaptación.

El efecto inductor de proliferación caulinar de las citocininas (BAP, Kinetina, 2ip, thidiazuron) en tallos cultivados en condiciones *in vitro* ha sido evidenciado en caña flecha y otras especies vegetales; sin embargo, es necesario la evidencia experimental para determinar la concentración que induce los niveles de propagación más eficientes con respecto a tasas de multiplicación, tamaño de los tallos y efecto en la supervivencia (Suárez *et al.*, 2009; Suárez y Pastrana

2009; Suárez y Quintero 2011; Suárez 2020). Los resultados del presente estudio mostraron que el tratamiento más eficiente para la multiplicación *in vitro* de las variedades "Criolla", "Martinera" y "Costera" fue la adición de 0.5 mg l⁻¹ de BAP. De las tres variedades, "Costera" presentó el menor número promedio de nuevos tallos correspondiente a 34.9 brotes explante por cada explante cultivado. Sin embargo, en la dinámica de proliferación del cultivo *in vitro*, donde el incremento en la producción de los brotes es de tipo logarítmico; una tasa de multiplicación de 10 nuevos brotes por explante, con una base de 10 explantes,

en 15 meses podría producir un número superior al millón de plantas (López 2017; Suárez 2020), lo cual indica que con los resultados obtenidos en el presente estudio, incluso para la variedad "Costera", el protocolo permite tasas de multiplicación más eficientes que las obtenidas por métodos convencionales de propagación (Hernández *et al.*, 2005).

Los resultados presentes y previos indican que la caña flecha es una planta fácil de enraizar por su tendencia a formar raíces adventicias incluso en medio simple sin presencia de auxinas (Hartmann *et al.*, 2002; Suarez *et al.*, 2009; Pastrana y Suarez 2009; López y Suárez 2018; López 2017); sin embargo, la aplicación de auxinas es una práctica viable y decisiva para la formación de raíces, ya que permite adelantar la iniciación radical, incrementar el número y la calidad de raíces, aumenta la uniformidad y reduce el tiempo para el proceso de enraizamiento y adaptación

a las condiciones *ex vitro* (Vargas *et al.*, 1999; Ramírez *et al.*, 2004; Oliva 2005). En el presente trabajo, se pudo evidenciar que la adición de dosis mínimas de ANA (0.5 mg l^{-1}) en el medio garantizan la formación de >40 raíces de tamaño reducido, lo cual facilita el manejo de los tallos al momento de retirarlos de los recipientes para el trasplante y contribuye con la correcta adaptación de las plantas a las condiciones *ex vitro*, en lo cual se observa una supervivencia del 100% en todas las variedades. La realización del presente estudio ha contribuido a demostrar que la micropropagación es una herramienta con grandes posibilidades para ser utilizada en la producción masiva de plantas de caña flecha no solo de la variedad "Criolla" sino también de las variedades "Martinera" y "Costera" con lo cual se amplían las posibilidades de establecer cultivos comerciales y reducir el impacto de la actividad artesanal en las poblaciones naturales de esta especie.

BIBLIOGRAFÍA

Hartmann H, Kester D, Davies F y Geneve R. 2002. Hartmann and Kester's *Plant Propagation: Principles and Practices* 7th Ed Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, 880p.

Hernández J, Araméndiz H y Cardona C. 2005. Influencia del ácido indolbutírico sobre el enraizamiento de esquejes de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). *Revista Temas Agrarios* 10(1):5-13.

López C. 2013. Efecto del recipiente y medio de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). *Tesis Licenciado en Ciencias Naturales y Medio Ambiente*, Universidad de Córdoba, Montería, 40p.

López C y Suárez I. 2018. *In vitro* arrow cane (*Gynerium sagittatum* Aubl.) multiplication in double phase medium. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 35(2):5-13.

Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497

Oliva C. 2005. Efecto de los ácidos naftalenacético e indolbutírico en el enraizamiento de estaquillas de *Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh, camu camu. *Folia Amazonica*, 2: 27-32.

Pastrana I y Suarez I. 2009. Producción de plantas de caña flecha (*Gynerium sagittatum*) 'Criolla' a través de micropropagación *Revista Temas Agrarios* 14(2):2-18

Ramírez M, Urdaneta A y Vargas G. 2004. Tratamientos con ácido indolbutírico y lesionado sobre el enraizamiento de estaquillas de icaco (*Chrysobalanus icaco* L.). *Agronomía Tropical*, 54: 203-218.

Suarez I, Aramendiz H y Pastrana I. 2009, Micropropagación

de Caña Flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.), Revista Facultad Nacional de Agronomía 62(2):5135-5143.

Suárez I. 2020. Micropropagación de plants. En: Cultivo de Tejidos Vegetales, Fondo Editorial, Universidad de Córdoba, Montería, p57-68.

Suarez I, Ortiz O y López C. 2017. Formación *in vitro* de rizomas en caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) y recuperación de plantas. Revista Temas Agrarios 22(1):11-20.

Vargas G, Arellano G y Soto R. 1999. Enraizamiento de estaquillas de Icaco (*Chrysobalanus icaco* L.) sometidas a aplicaciones de auxinas. *Bioagro* 11:103-108.

V. MICROPROPAGACIÓN DE CAÑA FLECHA (*Gynerium sagittatum* Aubl.) EN MEDIO DOBLE FASE

Isidro E. Suárez¹, Claudia M. López¹ y Alicia Humánez Álvarez²

¹Universidad de Córdoba, Instituto de Biotecnología Aplicada para el Caribe
Colombiano - IBAC

²Universidad del Sinú

INTRODUCCIÓN

La implementación de la multiplicación *in vitro* como un método de propagación de plantas de caña flecha ha mostrado ser eficaz y eficiente para producir excelente material de siembra de forma masiva para el establecimiento de cultivos y disminuir el riesgo de extinción de la especie; no obstante, es un método relativamente costoso comparado con los métodos convencionales de propagación (Guzmán 2001; Araméndiz *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2009; Pastrana y Suárez

2009). Algunos de los factores que más contribuyen con el alto costo de las plantas producidas a través de micropropagación lo constituyen el uso de agentes gelatinizantes para el medio de cultivo y la utilización de mano de obra calificada para realizar los subcultivos, por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas para reducir el costo de las plantas producidas. El agente gelatinizante es el encargado de proporcionar la consistencia semisólida que garantiza la estabilidad de las plantas y el paso de los nutrientes de la formulación de

nutrientes a los tejidos; por su parte, los subcultivos realizados por personal debidamente entrenado son los que favorecen la proliferación y crecimiento de los nuevos brotes que contarán como la tasa de multiplicación necesaria para lograr las grandes cantidades de material que caracteriza los procesos de micropropagación. Se estima que los dos componentes, agente gelatinizante y mano de obra, contribuyen con aproximadamente el 50% de los costos totales de las plantas producidas a través de micropropagación; sin embargo, para lograr una adecuada transferencia de la tecnología de producción de plantas de caña flecha y una apropiación social por parte de las comunidades productoras de fibra, es necesaria la búsqueda de alternativas que minimicen el uso de agente gelatinizante y mano de obra en la micropropagación de las plantas (Couselo *et al.*, 2006; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012). En el presente trabajo

se analiza el efecto del uso de medio de cultivo doble fase en los costos de producción de plantas y la eficiencia de la micropropagación de diferentes cultivares de caña flecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

Multiplicación *in vitro* de plantas de caña flecha (*Gynerium sagitatum* Aubl. Var. "Criolla") en medio doble fase.

El material vegetal consistió de plantas de caña flecha de la variedad "Criolla" cultivadas en condiciones *in vitro* en medio semisólido MS (Murashige y Skoog 1962) por aproximadamente un año, con subcultivos periódicos a medio fresco cada 4 semanas. Los explantes consistieron de clústeres de 3 tallos obtenidos de plantas de 6 semanas de crecimiento en medio fresco, los cuales fueron establecidos en recipientes de vidrio de 250 cm³ con 30 ml de medio semisólido MS adicionado con (en mg l⁻¹) mio inositol (100),

sacarosa (30000), tiamina HCl (0.4) y solidificado con Phytigel® (3000) (Sigma Co.). Este método de multiplicación se comparó con el cultivo de explantes con características similares pero cultivados en aproximadamente 100 ml de medio semisólido con adición de una fase superior de 30 ml de medio líquido de la misma formulación dispuestos en recipientes transparentes autoclavables de policarbonato de 750 cm³. En el método con el medio doble fase se establecieron cuatro explantes por cada recipiente, mientras que en los recipientes que contenían únicamente medio semisólido se estableció un explante por cada recipiente. Para ambos casos, los recipientes fueron cubiertos con dos capas de papel aluminio, sellados con Parafilm® y almacenados a una temperatura aproximada de 25 °C con 12 horas diarias de luz suministrada por lámparas de luz fría fluorescente y una intensidad lumínica de 40 μmol m⁻² s⁻². Cada cuatro semanas, los recipientes con medios doble-

fase fueron adicionados 30 ml de medio líquido de la misma formulación, mientras que los tejidos establecidos en medio semisólido fueron subcultivados y transferidos a medios nuevos de la misma formulación en recipientes del mismo tamaño; estas actividades se realizaron de forma periódica cada 4 semanas durante 90 días. Se estableció un número total de 6 repeticiones por cada tratamiento para un total de 12 unidades experimentales iniciales, las cuales fueron distribuidas utilizando un diseño completamente al azar. Al final del período de evaluación (90 días) se registró para cada tratamiento los datos del número de tallos por recipiente, número de tallos por explante cultivado y la longitud de los tallos (cm), los cuales fueron analizados con la prueba de *T* (Student) para determinar la presencia de diferencias estadísticas con base en el modelo estadístico $Y_{ij} = \mu_i + \beta_j + E_{ij}$, donde μ es el promedio general, β_j el efecto

la formulación del medio y E_{ij} el efecto del error experimental. Adicionalmente, se registraron las características morfológicas de las plantas micropropagadas y, teniendo en cuenta la tasa de multiplicación calculada (número de nuevos tallos por explante), se estimó el costo de producción de los tallos en cada método.

Micropropagación de tres variedades (“Criolla”, “Martinera” y “Criolla 1”) de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) en medio doble fase.

El material vegetal consistió de plantas de caña flecha de las variedades “Criolla”, “Martinera” y “Criolla 1” cultivadas en condiciones de vivero en recipientes de plástico (materas de 48.5 x 60 cm) en sustrato 1:1 (arena: turba) y bajo casa malla con una polisombra con 50% de penetración de luz. Los explantes se obtuvieron de porciones de tallo de aproximadamente 3 cm de longitud con al menos una yema axilar colocados en remojo

con agua potable por un período de una 1 hora y posteriormente desinfectados superficialmente en una solución de hipoclorito de sodio (1.25% cloro activo) con 20 μ L de Tween 20®, seguido por tres enjuagues con agua destilada estéril en el interior de una cámara de flujo laminar. El establecimiento se llevó a cabo en medio semisólido MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con (en mg l⁻¹): mio inositol (100), sacarosa (30000), tiamina HCl (0.4) y Phytigel (4000) (Sigma Co.). Los recipientes consistieron de frascos de vidrio de 250 cm³ de capacidad con 30 ml de medio donde se estableció un explante, consistente de un tallo de 1.5 cm de longitud con una yema axilar. Una vez establecido el explante, el recipiente fue cubierto con dos capas de papel aluminio, sellados con Parafilm® y se almacenaron a una temperatura de 20 °C y 12 horas de luz proporcionadas con lámparas de luz fría fluorescente (40 μ mol m⁻² s⁻²) con subcultivos a medio de la misma formulación

cada 4 semanas durante 3 meses. Los cultivos establecidos (Adaptados) fueron utilizados como fuente de explantes para evaluar la multiplicación *in vitro* de las tres variedades en medio doble fase. Para esta evaluación se utilizaron explantes compuestos por un cluster de 3 tallos cada uno, y se establecieron en recipientes de vidrio con 25 ml medio de cultivo semisólido MS adicionado con mio inositol (100), sacarosa (30000), tiamina HCl (0.4), agar (8000) (Sigma Co.) y suplementado independientemente con cinco concentraciones (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg l⁻¹) de BAP (Benzilaminopurina). Los recipientes fueron cubiertos con dos capas de papel aluminio, sellados con Parafilm® y almacenados a una temperatura de 25 °C con 12 horas diarias de luz a una intensidad de 40 μmol m⁻² s⁻². Pasados 20 días después del establecimiento, los cultivos fueron adicionados con 5 ml de medio líquido de la misma formulación, de acuerdo

con el tratamiento aplicado originalmente; repitiendo esta misma actividad cada 20 días en cuatro ocasiones para un total de 100 días de cultivo bajo las mismas condiciones descritas. Cada tratamiento fue repetido cinco veces para un total de 75 unidades experimentales, las cuales fueron distribuidas utilizando un diseño completamente al azar. Al final del período de evaluación de los cultivos, se tomaron los datos, registrando el número de nuevos tallos producidos por cada explante y el tamaño promedio de los nuevos tallos originados. De forma seguida, con el fin de determinar las mejores condiciones para el enraizamiento de los tallos multiplicados, a partir del tratamiento que resultó con las mayores tasas de multiplicación para cada variedad, se tomaron clústeres de 3 tallos y se transfirieron en medio de cultivo MS semisólido (30 ml) adicionado con (en mg l⁻¹) mio inositol (100), sacarosa (30000), tiamina HCl (0.4)

y agar (8000) (Sigma Co.) y suplementado independiente con 5 concentraciones (0.0; 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg l⁻¹) de ANA (Ácido naftalenacético). Los cultivos fueron mantenidos en condiciones ambientales similares a la etapa de multiplicación, y después de cuatro semanas se registró el número de explantes que emitieron raíces, el número promedio de raíces producidas por cada clúster y la longitud promedio de las raíces producidas en cada uno de los tratamientos evaluados. Tanto para la evaluación de multiplicación como de enraizamiento Los datos colectados para cada variable fueron procesados con un análisis de varianza con base en el modelo estadístico $Y_{ik} = \mu + T_i + \beta_j + (T\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$; donde μ es el promedio general, T_i correspondió al efecto de la variedad, β_j correspondió al efecto de las dosis de BAP o ANA, según el experimento, y ε_{ijk} fue el efecto del error experimental, mientras que los

promedios fueron separados con la prueba de separación de medias Tukey ($\alpha = 0.05$). Plantas enraizadas de cada variedad fueron trasplantadas en bandejas plásticas con 72 alveolos conteniendo turba como sustrato, donde en cada alveolo se transfirió un clúster con 5 a 6 tallos enraizados. Las bandejas fueron colocadas en una casa malla (50% de cobertura) con un riego por aspersión de 1 minuto diario. Por cada variedad se transfirieron 216 plantas (3 bandejas) para un total de 648 plantas de las tres variedades.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Multiplicación *in vitro* de plantas de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl. Var. "Criolla") en medio doble fase.

Para ambos tratamientos, la emisión de los nuevos crecimientos caulinares se originó a partir de las yemas axilares presentes en los explantes establecidos sin

observarse la presencia de tallos adventicios ni la formación de tejidos callosos (Figura 12).

Los resultados de la prueba de separación de medias demostró la presencia de diferencias estadísticamente significativas en los resultados de las variables número promedio de tallos por recipiente ($Pr = 0.0011$), número promedio de brotes

por explante ($Pr = 0.0148$) y longitud promedio de los brotes producidos ($Pr < 0.0001$) como resultado del efecto de la formulación del medio de cultivo utilizado (Tabla 5). Los datos colectados permiten observar que los explantes cultivados de manera continua por 90 días en medio de cultivo doble fase resultaron con un número mayor de nuevos



Figura 12. Explantes de caña flecha (*Gynerium sagitatum* Aubl.) establecidos en medio doble fase (izquierda) y medio semisólido (derecha).

Tabla 5. Multiplicación *in vitro* de caña flecha (*Gynerium sagitatum* Aubl.) en medio doble fase y medio semisólido.

Medio	Tallos por recipiente	Tallos por explante	Longitud de Tallos (cm)	Costo de tallo (\$ COP)
Doble fase	47.50 A*	13.00 A	7.6 A	161
Semisólido	6.88 B	6.88 B	5.2 B	561

*Valores con letras diferentes son diferentes de acuerdo con $T \alpha = 0.05$

brotos por recipiente, mayor número de brotes por explante cultivado y brotes de mayor longitud comparada con el método tradicional consistente de subcultivos periódicos de explantes individuales cada 30 días (Tabla 5).

Las tasas de multiplicación calculadas para cada método y consecuente análisis de costos representado en las diferencias de componentes (menor uso de agente gelatinizante), cantidades de los medios de cultivo (adición de medio líquido comparado con uso de medio nuevo) y los costos del uso de personal (subcultivo, lavado, etc.), permiten estimar una reducción aproximada del 80% en los costos de producción de cada brote cuando la propagación de propágulo ocurre en medio doble fase comparado con aquellos producidos en medio semisólido (Tabla 5).

Las formulaciones de los medios para cultivo *in vitro*

pueden ser de consistencia semisólida, líquida o doble fase, cuando se combinan los dos estados (Couselo *et al.*, 2006). Las formulaciones en estado semisólido favorecen la estabilidad de los explantes y permiten prolongar el tiempo entre subcultivos; sin embargo, dificultan la toma de nutrientes, su preparación es un poco más complicada y resultan en costos mayores por el uso de agentes solidificantes o gelatinizantes. El medio líquido es el más económico porque no utiliza agentes solidificantes, la absorción de los nutrientes y reguladores por parte de los cultivos es más fácil y rápida, y, generalmente, inducen mayores tasas de proliferación; sin embargo, los tiempos de cultivo son más limitados debido al rápido agotamiento de las condiciones nutritivas del medio (Litz y Gray 1995). El medio en estado doble fase combina los beneficios de las formulaciones semisólidas y líquidas: la fase semisólida proporciona estabilidad a los

cultivos, permite la toma rápida y uso eficiente de nutrientes a partir de la fase líquida, y favorece el mantenimiento de los tejidos sin realizar subcultivos periódicos, mediante la adición sucesiva de medio líquido. Estas condiciones disminuyen los costos por manipulación, uso de equipos y adición de agentes gelatinizantes, y minimiza los riesgos por contaminación ocasionada en la transferencia del material a un cultivo fresco. Adicionalmente, cuando se utiliza medio doble fase, se facilita el uso de recipientes con mayor tamaño que permiten un mejor desarrollo de los cultivos, debido a la capacidad misma del recipiente, la ausencia de subcultivos que eliminan el estrés causado por los cortes y las transferencias a medio fresco. Esto puede favorecer las condiciones de transferencia a condiciones *ex vitro*, ya que plantas con órganos de mayor crecimiento y estructuras más desarrolladas tendrán mayores reservas nutricionales y por ende mayores posibilidades

de sobrevivir en la etapa de aclimatación (Suárez y Quintero 2011; Huang *et al.*, 2011; Mollo *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los observados en otras especies vegetales cultivadas bajo las mismas condiciones: Scherwinski-Pereira *et al.* (2012) y Calvanese *et al.* (2007) observaron un aumento superior al 50% en la tasa de multiplicación de brotes caulinares de piña (*Ananas comosus*) y *Aechmea blanchetiana* (Bromealiaceae), respectivamente, cuando los explantes fueron cultivados en medio doble fase, al compararse con explantes con transferencias a medio nuevo cada 4 semanas. La micropropagación de plantas de caña flecha en medio doble fase no solo disminuye los costos en la producción de las plantas manteniendo sino que además permite obtener plantas de mayor tamaño, disminuye los riesgos por contaminación en la manipulación y es más amigable con el medio ambiente por generar menor gasto de

recursos como agua, insumos, detergentes, papelería y otros.

Micropropagación de tres variedades (“Criolla”, “Martinera” y “Criolla 1”) de caña flecha (*Gynerium sagitatum* Aubl.) en medio doble fase.

Los datos obtenidos a partir del análisis de varianza mostraron la presencia de diferencias estadísticas significativas ($Pr < 0.05$) con respecto al número de tallos y la longitud de los mismos por efecto de la variedad, las concentraciones de BAP y la interacción de estos dos factores. Las mayores tasas de multiplicación fueron observadas en medio adicionado

con 0.5 mg l^{-1} de BAP para todas las variedades, mientras que las tasas más bajas ocurrieron para todas las variedades, cuando los explantes fueron cultivados en ausencia de BAP (Tabla 6). De igual forma, la dosis de 0.5 mg l^{-1} de BAP indujo los tallos con mayor longitud para todas las variedades, mientras que la presencia de la mayor concentración de BAP (2.0 mg l^{-1}) indujo los valores más bajos de longitud de los tallos (Tabla 7).

Para la longitud de los tallos, el ANOVA permitió detectar la presencia de diferencias estadísticas significativas entre todos los tratamientos ($Pr < 0.05$). La variedad Criolla con una

Tabla 6. Multiplicación *in vitro* de tallos de caña flecha (*Gynerium sagitatum* Aubl.) en medio doble fase con diferentes concentraciones de BAP.

BAP (mg l ⁻¹)	Variedad		
	Criolla	Criolla 1	Martinera
0.0	5.2 BC*	3.2 C	3.4 C
0.5	28.2 A	10.0 BC	21.2 A
1.0	11.8 B	7.0 BC	7.6 BC
1.5	10.2 BC	6.2 BC	5.0 BC
2.0	6.8 BC	7.8 BC	3.4 C

*Valores con letras diferentes son diferentes de acuerdo con $T \alpha = 0.05$

Tabla 7. Longitud de tallos (cm) de caña flecha (*Gynerium sagitatum* Aubl.) cultivados en medio doble fase con diferentes concentraciones de BAP.

BAP (mg l ⁻¹)	Variedad		
	Criolla	Criolla 1	Martinera
0.0	7.2 CDBE*	8.0 CADBE	8.4 CADBE
0.5	10.8 A	9.2 CAB	9.6 AB
1.0	8.0 CADBE	6.4 CFDE	5.8 FDE
1.5	8.8 CADB	5.9 FDE	7.4 CDBE..
2.0	5.5 FE	4.0 F	3.8 F

*Valores con letras diferentes son diferentes de acuerdo con $T \alpha = 0.05$

adición al medio de 0.5 mg l⁻¹ produjo las plantas con la mayor longitud promedio (10.8 cm), aunque no fue estadísticamente diferente a las plantas de las otras dos variedades cultivadas en presencia de la misma cantidad de BAP (Tabla 7); no obstante, fuera de este dato, no se observa una tendencia específica al aumento o disminución de la longitud de las plantas en la medida que se aumenta o se disminuye la dosis de BAP en el medio de cultivo.

En el análisis del enraizamiento se encontraron diferencias significativas ($Pr < 0.05$) entre los diferentes tratamientos en estudio. La adición de

ANA indujo la emisión de un número de raíces adventicias estadísticamente superior al tratamiento control en cada una de las variedades estudiadas. La mayor producción de raíces en todas las variedades ocurrió en presencia de 1.0 mg l⁻¹ de ANA disminuyendo cuando la dosis aumentó por encima de este nivel (Tabla 8). Para el caso del tamaño de las raíces, la mayor longitud de raíces se observó cuando las plantas fueron cultivadas en ausencia de ANA observándose una tendencia a disminuir el tamaño en la medida que aumentó la dosis de este regulador de crecimiento (Tabla 9).

Tabla 8. Número de raíces en tallos micropropagados de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) en medio semisólido con diferentes concentraciones de ANA.

ANA (mg l ⁻¹)	Variedad		
	Criolla	Criolla 1	Martinera
0.0	13.2 FDE*	9.2 FE	5.2 F
0.5	33.0 CAB	43.0 A	25.0 CDE
1.0	41.8 AB	42.0 AB	46.4 A
1.5	33.4 CAB	34.0 CAB	26.2 CDB
2.0	35.2 CAB	34.6 CAB	36.4 CAB

*Valores con letras diferentes son diferentes de acuerdo con $T \alpha = 0.05$

Tabla 9. Longitud de raíces (cm) producidas por tallos micropropagados de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) en medio semisólido con diferentes niveles de ANA.

BAP (mg l ⁻¹)	Variedad		
	Criolla	Criolla 1	Martinera
0.0	3.7 B*	6.0 A	3.8 B
0.5	1.9 DEC	2.9 BC	2.7 DBC
1.0	1.5 DEC	1.2 E	2.0 DEC
1.5	1.6 DEC	1.6 DEC	1.4 DE
2.0	1.5 DEC	1.1 E	1.3 DE

*Valores con letras diferentes son diferentes de acuerdo con $T \alpha = 0.05$

Las plantas de todas las variedades presentaron una supervivencia completa (100%) a las 4 semanas después del trasplante a las condiciones *ex vitro*. El crecimiento que se observó fue saludable con emisión rápida de nuevos órganos y tejidos sin muestra ninguna de daños necróticos o clorosis que denotaran síntomas de poca adaptación.

La micropropagación a partir de explantes con meristemos pre-existentes basa su éxito principalmente en la adición de BAP en el medio con el fin de eliminar, o reducir, la dominancia apical en los explantes y estimular el crecimiento repetido de las yemas axilares (Kane 1996; Suárez 2005; Ozdemir *et al.*, 2014; Shekhawat *et al.*, 2015; Yavuz

2016; Quiroz *et al.*, 2017). Los resultados del presente estudio muestran que efectivamente la adición de BAP incrementa la tasa de multiplicación de explantes de caña flecha en concordancia con estudios previos (Pastrana y Suarez 2009; Suarez 2009). Las tasas de multiplicación obtenidas, incluso en sus niveles más bajos ("Criolla 1"), estiman producciones sostenidas superiores al millón de plantas en un año en un medio doble fase, con lo cual se agregan beneficios adicionales al proceso como son reducción significativa de costos, menores riesgos de contaminación y mayor crecimiento de los explantes (Serrano-Martínez *et al.*, 2011; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012; López 2013; Senapati 2015). Este último aspecto es de marcada importancia, ya que en este modelo de producción los explantes no son transferidos a medio fresco sino que el medio semisólido es adicionado periódicamente con medio líquido para restituir la nutrición del mismo, haciendo que los brotes tengan un

crecimiento continuo desde el establecimiento hasta su trasplante a condiciones *ex vitro*, alcanzando hasta 3x mayor longitud que con el método tradicional. Esto se traduce en un mejor desempeño de la planta en las etapas iniciales de crecimiento en condiciones normales de campo (Pastrana y Suarez 2009) (Serrano-Martínez *et al.*, 2011; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012; López 2013; Senapi 2015). (Pospíšilova *et al.*, 1999; Suárez y Quintero 2014; Clapa *et al.*, 2013).

La micropropagación de plantas de caña flecha en medio doble fase genera beneficios como son una reducción de costos de producción, menor impacto ambiental representado en disminución de gastos de agua y producción de desechos, mayor eficiencia por ausencia de subcultivos que terminan en un mejor desarrollo de las plantas micropropagadas y mayores probabilidades de una mejor adaptación a las condiciones *ex vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aramendiz H, Espitia M y Robles J. 2005. Colección, conservación, caracterización morfoagronómica y producción de semilla de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) del Caribe Colombiano. CIUC, Universidad de Córdoba, Montería, 118p.
- Calvanese M, Tavares A, Aguiar F, Kanashiro S, Chu E, Stancato G y Harder I. 2007. Efeito da ANA, 6-BA e agar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith, bromelia nativa da mata Atlântica. *Revista Ceres* 311:63-67.
- Clapa D, Fira A y Joshee N. 2013. An efficient *ex vitro* rooting and acclimatization method for horticultural plants using float hydroculture. *HortScience* 48(9) 1159-1167.
- Couselo J, Varela P y Rey M. 2006. Effect of benzyladenine concentration and double-phase culture system on *in vitro* multiplication of adult Albariño plants. 2006. *American Journal of Ethnology and Viticulture* 57(1):109-112.
- Guzmán R. 2001. La magia del sombrero Vueltiao. Región Caribe, *Diario El Tiempo* Domingo 16 de septiembre, p 23.
- Huang P, Liao L, Tsai C y Liu Z. 2011. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 105:73-78
- Kane M. 1996. Micropropagation from pre-existing meristemos, En: Gray D y Trigiano R (Ed.) *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press, Boca Ratón, p.75-86.
- Litz R y Gray D. 1995. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11:416-425.

- López C. (2013). Efecto del recipiente y medio de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). Tesis Licenciado en Ciencias Naturales y Medio Ambiente, Universidad de Córdoba, Montería.
- Mollo L, Martins M, Oliveira V, Nievola C y Figueiredo-Ribeiro R. 2011. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured in vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 107:141–149.
- Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Ozdemir F, Yildirim M y Pourall Kahriz M. 2014. Efficient micropropagation of highly economic, medicinal and ornamental plant *Lallemantia iberica* (Bieb.) Fisch. and C. A. Mey. *BioMed Research International* doi:10.1155/2014/476346.
- Pastrana I y Suarez I. 2009. Producción de plantas de caña flecha (*Gynerium sagittatum*) 'Criolla' a través de micropropagación. *Revista Temas Agrarios* 14(2):2–18
- Pospíšilová J, Tichá I, Kadlecěk P y Haisel D. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42(4), 481-497.
- Quiroz K, Berrios M, Carrasco B, Retamales JB, Caligari P y García-González R. 2017. Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*). *Biological Research* 50(1):20.
- Scherwinski-Pereira J, Ararunam E, da Silva T, Gomes A, Maciel S y da Silva F. 2012. Double-phase culture system for large scale production of pineapple. *Plant Cell Tissue*

- and Organ Culture* 109:263–269.
- Senapi N. 2015. A doublé phase culture system: An economic and time saving protocol for *In vitro* propagation of plant. *SAJ Biotechnology*, 2,101. doi: 10.188/5/23/75/6713.1.301.
- Serrano-Martínez F, Cano-Castillo M y Marco-Medina A. 2011. El medio en doble fase y su aplicación en el cultivo *in vitro* de plantas amenazadas. *Centro Iberoamericano de la Biodiversidad (Cibio Revistas - Cuadernos de Biodiversidad)* 37:3-8.
- Shekhawat M, Manokari M y Ravindran C. 2015. An improved micropropagation protocol by *Ex Vitro* rooting of *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. through Nodal Segment Culture. *Scientifica (Cairo)* doi:10.1155/2015/578676.
- Suárez I y Quintero I. 2011. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un endulzante natural. *VIII Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal*, Ciego de Ávila, Cuba.
- Suarez I, Aramendiz H y Pastrana I. 2009, Micropropagación de Caña Flecha (*Gynierium sagittatum* Aubl.), *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 62(2):5135-5143.
- Suárez I. 2005. *Biotecnología Vegetal Agrícola*. Grupo de Publicaciones Universidad de Córdoba, Montería, 120pp.
- Yavuz D. 2016. Optimization of regeneration conditions and *In Vitro* propagation of *Sideritis Stricta* Boiss & Heldr. *International Journal of Biological Macromolecules* 90:59-62.

VI. ADAPTACIÓN EX VITRO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CAÑA FLECHA (*Gynerium sagittatum* Aubl.).

Isidro E. Suárez¹, Diego Pico Vellojín¹ y Claudia M. López¹

¹Universidad de Córdoba, Instituto de Biotecnología Aplicada para el Caribe
Colombiano - IBAC

INTRODUCCIÓN

Las plantas cultivadas *in vitro* poseen características anatomorfológicas que las diferencian de las plantas propagadas en ambientes externos y que repercuten en sus procesos de crecimiento, desarrollo, y adaptación a diferentes ambientes (González 1997; Kane 2006; Chawla 2003; Hernández *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2013). Las plantas propagadas en medios ambientales normales son autótrofas desde sus primeros momentos, están en contacto con agentes externos como microorganismos y artrópodos,

y se enfrentan desde la etapa de vivero a condiciones ambientales que cambian relativamente poco con respecto a sus condiciones finales de cultivo. En condiciones *in vitro*, las plantas desarrollan una anatomía y fisiología que difiere significativamente de las plantas cultivadas en condiciones de campo o de cultivo, por ejemplo, son cultivadas en medio de cultivo que suple sus necesidades energéticas por lo que la nutrición es de carácter heterotrófica; como consecuencia de esto, los cloroplastos no se desarrollan y no realizan fijación de CO₂. Las condiciones dentro del

recipiente mantienen una humedad relativa saturada rodeando a los tejidos, por lo que no desarrollan mecanismos para el control de la pérdida de humedad. Las condiciones asépticas requeridas eliminan cualquier interacción con agentes externos, y la luz artificial tiene una menor intensidad lumínica que la emitida por los rayos solares. Todos estos factores contribuyen a que el paso de las plantas cultivadas en condiciones *in vitro* a las condiciones *ex vitro* de ambiente normal, sea una de las etapas más críticas para el éxito de la operación de micropropagación, y que, de no realizarse de forma adecuada, puede terminar anulando todo lo bueno realizado con anterioridad porque el resultado será la muerte de las plantas (López y Suárez 2018). Dentro del manejo de las condiciones ambientales, la humedad es la que tiene el mayor impacto inmediato en la supervivencia de las plantas durante el trasplante, por lo que la determinación de

las condiciones para garantizar la hidratación son de vital importancia en la adaptación. En el presente trabajo se evaluó la utilización de cubiertas plásticas para conservar la humedad de las plantas y su efecto en la supervivencia y crecimiento de plantas micropropagadas de caña flecha transferidas a condiciones *ex vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal consistió de plantas micropropagadas de caña flecha de las variedades "Criolla", "Martinera" y "Costera" multiplicadas en recipientes de vidrio de 250 cm³ conteniendo 30 ml de medio semisólido MS (Murashige y Skoog 1962) adicionado con (en mg l⁻¹) mio inositol (100), sacarosa (30000), tiamina HCl (0.4), BAP (Benzilaminopurina) (0.5) y solidificado con Phytigel® (3000). Una vez establecidos los explantes (clústeres de 2-3 tallos), los recipientes fueron cubiertos con dos capas de

papel aluminio, sellados con Parafilm® y almacenados a una temperatura aproximada de 25 °C con 12 horas diarias de luz suministrada por lámparas de luz fría fluorescente y una intensidad lumínica de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ durante cuatro semanas. Una parte de los tallos multiplicados de las tres variedades fueron transferidos a medio de enraizamiento con una formulación similar al medio de multiplicación, pero en lugar de BAP se adicionaron 0.5 mg l⁻¹ de ANA (Ácido naftalenacético); las condiciones y tiempo de cultivo fueron similares a las indicadas para la etapa de multiplicación.

Las plantas, tanto multiplicadas como enraizadas, fueron transferidas a condiciones *ex vitro* en bandejas de propagación de 72 alveolos conteniendo turba humedecida como sustrato y se mantuvieron en una casa malla con polisombra de 50% de cobertura. La mitad de las plantas de cada variedad, enraizadas y multiplicadas, fueron cubiertas con tapas plásticas transparentes que permiten el paso de la luz pero evitan la pérdida de agua por evaporación (Figura 13). Las bandejas cubiertas fueron irrigadas tres veces al día durante los tres primeros días removiendo la cubierta

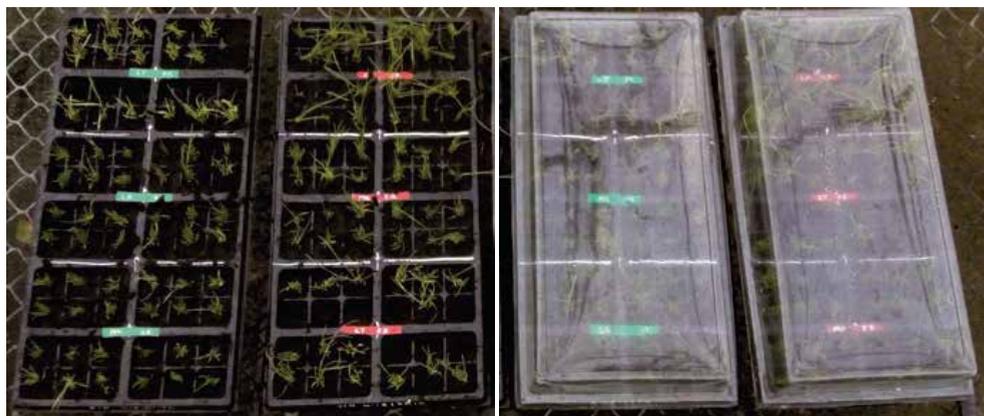


Figura 13. Plantas micropropagadas de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) tranplantadas para adaptación a condiciones *ex vitro* sin cobertura (Izquierda) y con cubierta plástica (Derecha).

y haciendo aplicaciones de agua destilada estéril con un atomizador manual. Después del tercer día, las cubiertas fueron movidas hacia un lado de la bandejas sin removerlas totalmente, con el fin de permitir intercambio gaseoso, manteniendo el mismo régimen de riego, y al final del quinto día se removió totalmente la cubierta. Las plantas que quedaron en las bandejas sin cubierta fueron irrigadas con una frecuencia de 2 riegos diarios de 60 segundos cada uno suministrados por un sistema de riego por nebulización. A partir del sexto día, todas las plantas tuvieron el mismo régimen de riego descrito para las plantas sin cubierta. El experimento consistió en un arreglo factorial [variedades (3) x condición de enraizamiento *in vitro* (2) x cobertura (2)] para un total de 12 tratamientos. Cada tratamiento tuvo 35 réplicas para un total de 240 unidades experimentales, las cuales fueron distribuidas con un diseño experimental de parcelas sub divididas, donde la

parcela principal fue la cubierta, la sub parcela la condición de enraizamiento y la sub-sub parcela la variedad. A los 30 días después del trasplante, para cada tratamiento, se determinó el número total de plantas que sobrevivieron, se calculó el porcentaje de supervivencia, y se registraron los valores de altura de las plantas, número de tallos y numero de raíces. Los datos de altura de planta, número promedio de tallos por clúster y numero promedio de raíces fueron analizados con un ANOVA ($\alpha = 0.05$) y se separaron los promedios con la prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos evidenciaron que la supervivencia de las plantas transferidas a condiciones *ex vitro* fue del 100%, independientemente de la variedad, la condición de enraizamiento y la presencia o

ausencia de cubierta durante el trasplante. El análisis de varianza aplicado a los datos colectados permitió detectar la presencia de diferencias estadísticas significativas ($Pr < 0.05$) con respecto a las variables altura de planta, número de tallos y número de raíces formadas tanto en el análisis entre las plantas de las diferentes variedades como en el análisis conjunto de las plantas independientemente de la variedad por el efecto de los factores. Los tallos multiplicados sin enraizar redujeron significativamente su tamaño promedio en las variedades "Costera" y "Martinera", al compararlas con la variedad "Criolla", mientras que las plantas

multiplicadas y enraizadas de la variedad "Costera" trasplantadas en bandejas con cubiertas produjeron un menor número de tallos al compararlas con las plantas de la variedad "Criolla" adaptadas sin cubierta, y proveniente de plantas enraizadas *in vitro* (Tablas 10 y 11). En cuanto a la formación de raíces, en todos los tratamientos se observó un mayor número de raíces en plantas que fueron previamente enraizadas *in vitro* (Tabla 12). Sin embargo, de forma general, los mayores promedios generales de altura de plantas, número de tallos y formación de raíces se presentaron cuando las plantas fueron aclimatadas en bandejas sin cubierta (Tabla 13).

Tabla 10. Efecto de la cubierta y el enraizamiento sobre la altura de plantas (cm) micropropagadas de caña flecha (*Gynerium sagitatum* Aubl.) transferidas a condiciones *ex vitro*.

Cubierta	Enraizamiento	Variedad		
		Criolla	Costera	Martinera
Sin cubierta	Sin enraizar	17.86 ABCD*	11.22 E	10.86 E
	Enraizada	21.72 A	17.46 ABDC	19.80 AB
Con cubierta	Sin enraizar	16.92 ABCDE	13.20 CDE	12.06 CDE
	Enraizada	15.4 BCDE	18.10 ABC	11.92 DE

*Valores con la misma letra no son diferentes estadísticamente de acuerdo con la prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Tabla 11. Efecto de la cubierta y el enraizamiento sobre el número de tallos de plantas micropropagadas de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) transferidas a condiciones *ex vitro*.

Cubierta	Enraizamiento	Variedad		
		Criolla	Costera	Martinera
Sin cubierta	Sin enraizar	4.4 AB*	5.4 AB	4.2 AB
	Enraizada	6.4 A	4.6 AB	4.2 AB
Con cubierta	Sin enraizar	4.4 AB	2.6 B	2.6 B
	Enraizada	4.6 AB	2.8 B	4.6 AB

*Valores con la misma letra no son diferentes estadísticamente de acuerdo con la prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Tabla 12. Efecto de la cubierta y el enraizamiento sobre el número de raíces por tallo de tres variedades de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) adaptadas a condiciones *ex vitro*.

Cubierta	Enraizamiento	Variedad		
		Criolla	Costera	Martinera
Sin cubierta	Sin enraizar	6.6 BC*	2.8 CD	5.0 BCD
	Enraizada	12.6 A	7.0 BC	8.8 AB
Con cubierta	Sin enraizar	5.2 BCD	6.0 BCD	1.8 D
	Enraizada	7.4 B	8.4 AB	7.4 B

*Valores con la misma letra no son diferentes estadísticamente de acuerdo con la prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Tabla 13. Efecto de la cubierta y el enraizamiento sobre el crecimiento de plantas micropropagadas de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) trasplantadas a condiciones *ex vitro*.

Cubierta	Altura de plantas	Variable	
		Número de tallos	Número de raíces
Sin cubierta	16.49 A*	4.86 A	7.10 A
Con cubierta	14.60 B	3.60 B	6.03 B

*Valores con la misma letra no son diferentes estadísticamente de acuerdo con la prueba de separación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Las cubiertas plásticas transparentes son las más utilizadas en la protección de plantas micropropagadas transferidas a condiciones *ex vitro* por motivo de costos y manejo; sin embargo, los incrementos rápidos y elevados en temperaturas, especialmente en climas tropicales, puede causar trastornos fisiológicos como aumento de las tasas de respiración, baja fotosíntesis y mal funcionamiento enzimático que tienen efectos negativos en la adaptación y crecimiento de las plantas (Ilczuk y Jacygrad 2016; Makowczynska *et al.*, 2016). En el presente estudio, la temperatura en la cual se llevó a cabo la micropropagación de las plantas dentro del laboratorio fue de aproximadamente 20 °C, mientras que la temperatura de adaptación *ex vitro* en la casa malla estuvo por encima de los 28 °C, la cual pudo ser mayor al interior de las bandejas cubiertas. De acuerdo con lo establecido en estudios previos, la tasa de respiración aumenta bajo estas condiciones, lo cual resulta en

un mayor consumo de reservas energéticas en las plantas cubiertas comparadas con aquellas mantenidas en bandejas sin cubrir. Puesto que las plantas micropropagadas recién transferidas a las condiciones *ex vitro* no tienen capacidad para realizar fotosíntesis eficientemente, el consumo de reservas se realiza a expensas de las almacenadas en órganos producidos *in vitro* como los tallos, hojas y raíces (Kodym y Leeb 2019; Suárez *et al.*, 2019). Por lo tanto, las plantas menos estresadas por calor (descubiertas) tendrán mayor energía disponible para crecimiento y desarrollo que las que se mantuvieron cubiertas por un período de tiempo, lo cual pudo haberse traducido en mayor número de órganos y de mayor tamaño. Aunque es necesario evaluar en mayor detalle estos factores, los resultados encontrados indican que la adaptación *ex vitro* de plantas micropropagadas de caña flecha es más eficiente cuando se realiza en bandejas sin cubierta plástica.

BIBLIOGRAFÍA

Chawla H. 2003. *Introduction to Plant Biotechnology*. Science Publisher, Enfield, p1-134.

González O. (1997). Situación de dos métodos de siembra por estacas de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) de la variedad 'Martinera' en la región de Montelíbano, Córdoba. *Tesis Ingeniero Agrónomo*, Universidad de Córdoba, Montería. 74 p.

Hernandez J, Aramendiz H y Cardona C. 2005. Influencia del ácido indolbutírico sobre el enraizamiento de esquejes de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). *Revista Temas Agrarios* 10(1):5-13.

Ilczuk A. y Jacygrad E. 2016. *In vitro* propagation and assessment of genetic stability of acclimated plantlets of *Cornus alba* L. using RAPD and ISSR markers. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. DOI 10.1007/s11627-016-9781-6

Kane M. (1996). Micropropagation from pre-existing meristemos. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press, Boca Ratón, p.75- 86.

López C. y Suárez I. (2018). *In vitro* arrow cane (*Gynerium sagittatum* Aubl.) multiplication in double phase medium. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 35(2),5-13.

Makowczyn´ska J, Sliwinska E, Kalemba D, Piałczak E y Wysokin´ska H. 2016. *In vitro* propagation, DNA content and essential oil composition of *Teucrium scorodonia* L. ssp. *Scorodonia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 127:1–13.

Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497

Suarez I, Pastrana I y Rivera H. (2013). *Biotechnología Aplicada a la Caña Flecha (Gynerium sagittatum* Aubl.). Fondo Editorial Universidad de Córdoba, Montería, p.72.

VII. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE CAÑA FLECHA(*Gynerium sagitatum* Aubl.)

Hernando Rivera Jiménez¹, Isidro E. Suárez¹, Juan Diego Palacio², Franco Alirio Vallejo³.

¹Universidad de Córdoba, Instituto de Biotecnología Aplicada del Caribe IBAC.

²Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA.

³Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira

INTRODUCCIÓN

La caña flecha *Gynerium sagitatum* Aubl., $2n = 72$ o $2n = 76$ cromosomas) se multiplica preferencialmente por métodos asexuales tanto de forma natural como dirigida (Francis 1983; Watson y Dallwitz 1992). Esta forma de reproducción, aunada con la preferencia de los artesanos por el cultivar “Criolla”, ha causado una disminución en la base genética de la especie, lo cual es reportado en un estudio de caracterización

morfoagronómica sobre 25 accesiones de caña flecha colectadas en diferentes regiones de la geografía colombiana (Araméndiz *et al.*, 2008). La caracterización morfoagro- nómica ha sido de gran utilidad y ha permitido la acumulación de abundante información en especies de alto valor agronómico; sin embargo, al referirse a la caracterización de materiales presentes en colecciones de germoplasma, esta técnica presenta algunas limitantes.

La eficacia de los análisis de características altamente heredables, la baja sensibilidad en genotipos con gran similitud y el efecto que ejercen los factores ambientales sobre los caracteres cualitativos, son algunos de los elementos que afectan significativamente la información generada en estudios de variabilidad con base en características morfológicas.

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que permiten detectar la presencia de un gen asociado a un carácter y también se utilizan para determinar la variación presente en grupos de individuos con base en su genotipo. Al estar basados en las variaciones de las secuencias de ADN, la caracterización molecular no está influenciada por las condiciones ambientales, lo que le permite convertirse en un complemento perfecto de la caracterización morfoagronómica en el estudio de colecciones de germoplasma (Moreno 2001).

En el desarrollo del presente trabajo se ha realizado por vez primera un estudio a nivel molecular en plantas de caña flecha y ha tenido como objetivo analizar la variabilidad existente, con base en la utilización de marcadores del tipo AFLPs, en los genotipos establecidos en la colección de Germoplasma de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba y comparar los resultados obtenidos con los reportados con base en una caracterización morfoagronómica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las muestras para la extracción del ADN fueron obtenidas de tejidos foliares aislados de 25 accesiones de caña flecha recolectadas en los departamentos de Córdoba, Antioquia, Norte de Santander, Santander, Valle del Cauca y Caldas, y que se encuentran establecidas en la colección de germoplasma de caña flecha ubicada en la Granja Experimental

de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba (Araméndiz *et al.*, 2008).

Extracción de ADN

El ADN fue aislado de aproximadamente 20 mg de tejido foliar, los cuales fueron mezclados con nitrógeno líquido y macerados en un mortero de porcelana estéril hasta obtener un polvo fino.

El material vegetal procesado fue adicionado con 400 µl de la solución reguladora AP1 (fenol + buffer de lisis) y 4 µl de enzima ARNasa A. La mezcla fue incubada a una temperatura de 65 °C por 10 minutos con agitación cada 2 minutos; transcurrido este tiempo, a la mezcla se le adicionaron 130 µl de la solución reguladora AP2 (cloroformo) y se procedió a incubarla durante 5 minutos en hielo.

La mezcla fue centrifugada por 5 minutos a una velocidad de 14000 rpm; el líquido sobrenadante fue colectado y

transferido a una columna de separación (Quiashredder®), para luego ser centrifugado durante dos minutos a 14000 rpm. El líquido filtrado fue adicionado con 15 veces el volumen de la solución reguladora AP3 (Etanol + isopropanol), y aproximadamente 650 µl de la mezcla fueron transferidos a una nueva columna de separación; la cual fue sometida a centrifugación durante 1 minuto a una velocidad de 8000 rpm.

El líquido filtrado a través de la columna fue descartado, repitiéndose los dos últimos pasos por una ocasión cada uno. Posteriormente, la columna fue nuevamente adicionada con 50 µl de solución tampón AW e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente; seguidamente, la columna fue centrifugada durante un minuto a 8000 rpm, este paso fue repetido una vez, y la muestra obtenida fue almacenada en un congelador a -80 °C.

Desarrollo de AFLPs

La generación de los AFLPs se realizó con base en el protocolo descrito por Vos *et al.* (1995) con algunas modificaciones.

El ADN genómico fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* (E) y *MseI* (M), según las instrucciones del fabricante, y los fragmentos resueltos en un gel de agarosa al 1%. Los fragmentos resultantes de la digestión fueron asociados con un adaptador con 3 nucleótidos para cada extremo, y posteriormente amplificados usando PCR.

Se utilizaron un total de ocho combinaciones de iniciadores (Tabla 14) para cada muestra de ADN, con el fin establecer la mejor combinación en la amplificación de los sitios polimórficos. Cada reacción fue conducida en un volumen final de 20 μL , conteniendo 5 μM de ADN,

10 μM de cada primer, 25 mM de cada desoxiribonucleótido, dos μM de solución reguladora *Plus Mg*[®] 10X, 0.2 μL de ADN polimerasa (*Thermus aquaticus*) y 8.1 μL de agua destilada.

Los ciclos de desnaturalización del ADN, asociación de iniciadores y extensión de las cadenas, correspondieron a 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos y 72 °C por 60 segundos, respectivamente. Se realizaron un total de 23 ciclos con un ciclo final de 5 minutos a 72 °C.

Los fragmentos amplificados con PCR fueron separados con electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 6% con una conductividad eléctrica de 120 W. El gel fue teñido con nitrato de plata y posteriormente revelado de acuerdo con los protocolos descritos por Besse *et al.* (1998).

Tabla 14. Combinaciones de diferentes de iniciadores utilizadas en el desarrollo de los AFLPs.

Combinación	Nucleótidos complementarios en el extremo <i>EcoRI</i>	Nucleótidos complementarios en el extremo <i>MseI</i>
1	ACC	CAG
2	ACC	CTG
3	ACA	CAT
4	ACA	CTA
5	ACT	CAA
6	AGC	CTC
7	AGG	CTT
8	ACC	CAT

Análisis de datos

De los resultados obtenidos a partir de las ocho combinaciones de iniciadores probadas, se realizó un análisis con el fin de encontrar las combinaciones de iniciadores que permitieran diferenciar el mayor número de sitios polimórficos entre las diferentes muestras.

La presencia o ausencia en cada una de las muestras analizadas de bandas específicas fueron transformadas en una matriz binaria con un valor de uno (1) para presencia, o cero (0) para ausencia de una determinada banda. La matriz generada

se tomó como base para calcular una segunda matriz de similaridad utilizando el paquete estadístico GELSTAT[®]. Finalmente, con la ayuda del mismo paquete estadístico se construyó un dendrograma con el fin de agrupar las diferentes variantes.

El análisis de la diversidad genética de la población estudiada se realizó con base en la ecuación del Índice de Diversidad de Shannon de una población *j* (*H_j*) así:

$$H_j = - \sum_{i=1}^m P_{ij} \ln P_{ij}$$

Donde: P_{ij} es la frecuencia del carácter i (presencia, $i = 1$ o la ausencia de la banda $i = 0$) en la población j y m corresponde al número de caracteres (bandas o sitios) analizado. El valor mínimo del índice equivale a cero (0) y aumenta al incrementarse la diversidad (Shannon y Weaver 1949).

El análisis de agrupamiento se realizó calculando el Índice de Similitud para Datos Moleculares (Dice 1945; Nei y Li 1979) con base en la matriz obtenida a partir de los datos de presencia y ausencia de bandas generadas con los AFLPs. Este índice expresa la probabilidad de que una banda en un individuo esté también en otro, cuantificada como la relación de número de bandas coincidentes (entre los dos individuos) entre el número total de bandas (número medio de bandas en un individuo); cuanto menor sea la distancia genética entre accesiones más alta será esa probabilidad (Moreno 2001).

Los valores promedios por par de individuos mediante el Índice de Similitud para Datos Moleculares se obtienen mediante la fórmula:

$$S_{ij} = 2a / (2a+b+c)$$

Donde: P_{ij} es la frecuencia del carácter i (presencia, $i = 1$ o la ausencia de la banda $i = 0$) en la población j y m corresponde al número de caracteres (bandas o sitios) analizado. El valor mínimo del índice equivale a cero (0) y aumenta al incrementarse la diversidad (Shannon y Weaver 1949).

El análisis de agrupamiento se realizó calculando el Índice de Similitud para Datos Moleculares (Dice 1945; Nei y Li 1979) con base en la matriz obtenida a partir de los datos de presencia y ausencia de bandas generadas con los AFLPs. Este índice expresa la probabilidad de que una banda en un individuo esté también en otro, cuantificada como la relación de número de bandas coincidentes (entre los dos individuos) entre el número total

de bandas (número medio de bandas en un individuo); cuanto menor sea la distancia genética entre accesiones más alta será esa probabilidad (Moreno 2001).

Los valores promedios por par de individuos mediante el Índice de Similitud para Datos Moleculares se obtienen mediante la fórmula:

$$S_{ij} = 2a / (2a+b+c)$$

Donde: S_{ij} es la similitud entre los individuos i y j , a corresponde al número de bandas compartidas por i y j , b es el número de bandas presentes en i pero ausentes en j y c es el número de bandas presentes en j pero ausentes en i .

Las matrices y los dendrogramas de similitud fueron calculados utilizando el programa NTSYS-PC, versión 2.02i, mediante el método UPGMA y el agrupamiento SAHN (Sequential Agglomerative, Hierarchical and Nested) (Rohlf 1993).

Los datos fueron analizados adicionalmente con una visión

multidimensional mediante el Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM) con toda la población; esto para obtener una representación gráfica de la estructura o relación de parentesco de las accesiones y cultivares de la población en estudio. La información fue procesada con el paquete estadístico NTSYS-PC, versión 2.02i. Este mecanismo visualiza la dispersión de los individuos en un espacio multidimensional, relacionando cada una de las diferentes variables (bandas) con los individuos en un mismo gráfico, originando tantas dimensiones como variables se tengan (Rohlf 1993).

La información obtenida fue comparada con los datos colectados en el análisis de caracterización morfoagronómica (Aramendiz *et al.*, 2005), con el objetivo de determinar las correlaciones y diferencias genéticas significativas entre los grupos obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de ADN

El procedimiento inicialmente sugerido y empleado generó ADN con alta degradación, por lo que fue necesario realizar algunas modificaciones. El tiempo de incubación inicial fue reducido de 10 a 5 minutos, y el tiempo de acción de la solución tampón AP2 se redujo a 3 minutos de los 5 que sugiere el manual del fabricante. El ADN resultante de la segunda elusión tuvo una mejor calidad por lo que se decidió tomar ésta como fuente principal (Figura 14).

Desarrollo de AFLPs

Los datos obtenidos a partir de la reacción de amplificación en cinco muestras tomadas al azar (1, 4, 8, 12, 19) utilizando las 8 combinaciones de iniciadores seleccionadas, permitieron observar que las combinaciones E-ACC/M-CAG, E-ACA/M-CAT, E-ACA/M-CTA y E-ACT/M-CAA arrojaron los mayores niveles de polimorfismo. Esto permitió seleccionarlas para realizar las reacciones de PCR con las muestras de ADN de todos los individuos (Figura 15).

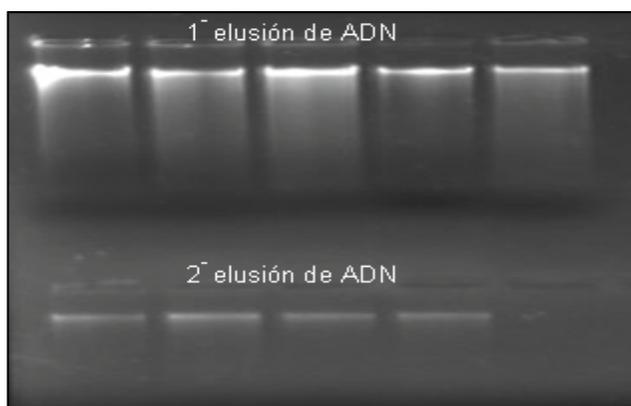


Figura 14. Muestras de ADN de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) obtenidas con las recomendaciones del fabricante (1 elusión) y con las modificaciones adicionales por los autores (2 elusión).

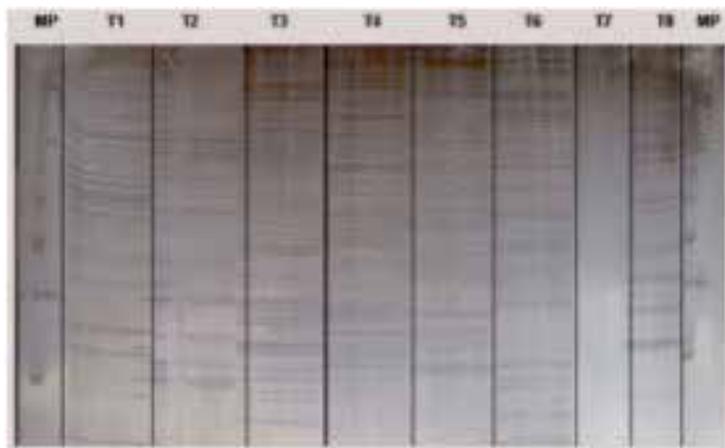


Figura 15. Perfiles de distribución de bandas resultantes de la amplificación de ADN de uno de los genotipos de caña flecha (*Gynerium sagitatum* Aubl.) con las ocho combinaciones de iniciadores.

Análisis de datos

Un total de 223 fragmentos de ADN con tamaños comprendidos entre 40 y 300 pares de bases fueron generados por las cuatro combinaciones de iniciadores utilizadas en las 25 muestras de ADN amplificadas con PCR (Figura 16).

El número de bandas generadas por cada par de iniciadores varió entre 43 (E-ACC/M-CAG) y 72 bandas (E-ACA/M-CTA) con un promedio de 55.75 bandas por cada par de iniciadores. Del total de 223 fragmentos generados, 75 resultaron ser polimórficos.

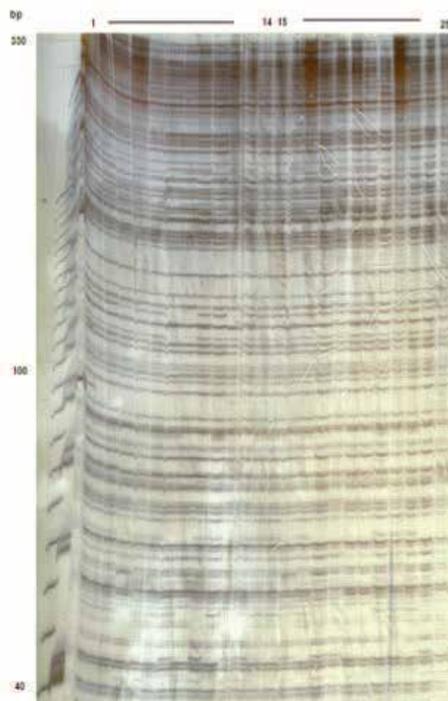


Figura 16. AFLPs generados en las muestras de las accesiones de caña flecha (*Gynerium sagitatum* Aubl.) analizadas.

La combinación de iniciadores E-ACC/M-CAG detectó el mayor porcentaje de polimorfismo entre las 4 combinaciones evaluadas (39.53%), seguida por la combinación E-ACA/M-CAT (38.46%). La combinación E-ACA/M-CTA generó un total de 72 bandas, de las cuales 23 fueron polimórficas (31.94%), mientras que con la combinación E-ACT/M-CAA fueron generadas 56 bandas encontrándose que 15 de ellas fueron polimórficas (25.80%).

Estudios de caracterización molecular en accesiones de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) fueron realizados utilizando combinaciones de iniciadores similares a las utilizadas en el presente trabajo (Selvi *et al.*, 2005). Los resultados de las amplificaciones obtenidas en estos estudios reportan niveles de polimorfismos comprendidos entre 78.9% y 50%, con un promedio de 82.4 fragmentos por combinación de iniciadores. Lima *et al.* (2002) al realizar una caracterización molecular de 79 cultivares de

caña de azúcar empleando AFLPs reportaron la amplificación de 2331 bandas de las cuales 1121 (48%) correspondieron a sitios polimórficos. Resultados similares a los reportados en los dos estudio anteriormente citados fueron publicados por Besse *et al.* (1998) en la misma especie.

Los resultados obtenidos con base en la matriz de presencia/ausencia revelaron que los marcadores AFLP desarrollados fueron informativos y mostraron diferencias entre las diferentes accesiones evaluadas. Esto se basa en los resultados del análisis de correspondencia múltiple (ACM) (Figura 17) y el dendrograma (Figura 18) generados, los cuales mostraron una tendencia de agrupación en cuatro grupos. En el grupo 1 se ubicaron las accesiones 3, 9, 11, 18, 19, 20a y 28. El grupo 2 estuvo conformado por las accesiones 1, 2, 5, 6, 8, 13, 14, 15, 16, 20b, 22, y 23. En el grupo 3 se localizaron las accesiones 4, 29, 7, 12 y 21, y el grupo 4 tuvo a la accesión 24 como su único integrante.

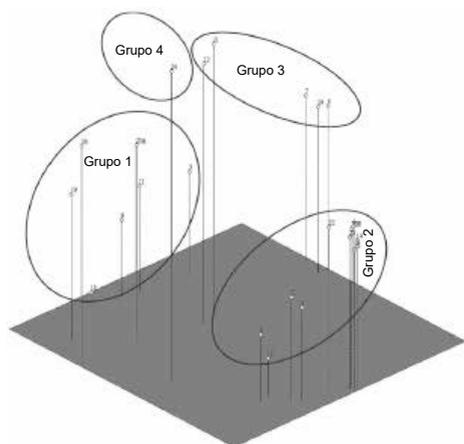


Figura 17. Análisis de correspondencia múltiple para los genotipos de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) caracterizados.

Al comparar los resultados del presente análisis con los obtenidos en la caracterización morfoagronómica realizada por Araméndiz *et al.* (2008), se puede observar que la mayoría de los individuos que conforman el grupo 2 (1, 2, 5, 14, 16, 20b y 22) del presente estudio se asocian de manera similar en el análisis morfoagronómico y se caracterizan por presentar textura de fibra suave, vaina con escasa pubescencia, color de vaina verde y pared del tallo gruesa, área útil de la nervadura inferior y diámetro del tallo delgado. Estas accesiones provienen de los municipios de San Andrés de

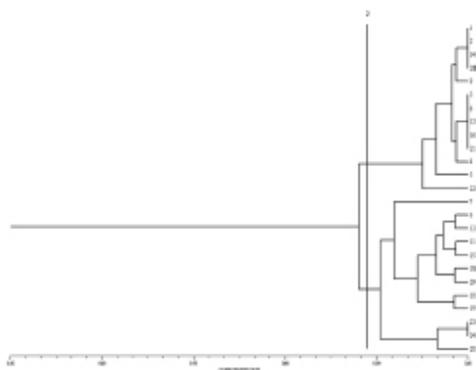


Figura 18. Dendrograma, mostrando el agrupamiento de los genotipos de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) analizados.

Sotavento, Sahagún, Ciénaga de Oro y Montelibano, en el Departamento de Córdoba.

Los individuos agrupados en los grupos 1 y 3 de la presente caracterización molecular se identifican con los del grupo 2 determinado en la caracterización morfoagronómica, los cuales muestran textura gruesa, abundante pubescencia en la base de la hoja y vaina, pared delgada del tallo, diámetro del tallo delgado y ligeramente grueso, área útil de la nervadura inferior a intermedia y ángulo de la hoja agudo; las accesiones de este grupo son originarias

de los municipios de Tierralta y San Andrés de Sotavento en el departamento de Córdoba, Caucasia en el departamento de Antioquia y Chinchiná en el departamento de Caldas (Aramendiz *et al.*, 2005).

Finalmente, el individuo número 24, que conforma el grupo número 4, es igualmente agrupado de forma independiente por Araméndiz *et al.* (2008), y se caracteriza por ser un cultivar promisorio para futuros programas de mejoramiento, debido a que en la información registrada de su pasaporte no reporta incidencia de ataque plagas como el barrenador del tallo, de la caña flecha (*M. atroparsella*), principal plaga de la especie.

Estudios de caracterización molecular de genotipos se han ejecutado en diversas colecciones de especies gramíneas. González-Jiménez *et al.* (2011) caracterizaron 12 genotipos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) con AFLPs

encontrando una distribución de 2 grupos y un tercero formado por una sola variedad. Marulanda y López (2010) caracterizaron 55 accesiones de guadua (*Guadua* sp) encontrando polimorfismo en 382 de 771 bandas amplificadas. Morales *et al.* (2016) reportó una distribución de tres grupos de pasto banderita (*Bouteloua curtipendula*) al analizar 51 accesiones con AFLPs, en los cuales se detectaron 186 bandas de las cuales 150 fueron polimórficas. Tomas *et al.* (2013) caracterizaron 6 accesiones de pasto *Elymus scabrifolius* usando AFLPs con 5 combinaciones de primers, generando 328 bandas de las cuales 50 fueron polimórficas para todos los materiales evaluados. Las accesiones segregaron en dos grupos cercanos a sus parentales.

A diferencia de la caracterización morfoagronómica, donde los resultados permitieron afirmar la existencia de duplicados en la colección, en el presente estudio, el Análisis de Correspondencia Múltiple realizado con base

en los datos generados por los AFLPs indicó que todos los individuos caracterizados fueron genéticamente diferentes, soportando la alta sensibilidad de la técnica para caracterizar genotipos de esta especie.

Los genotipos caracterizados manifiestan una baja correlación entre la distancia geográfica y el nivel de diferenciación genética con respecto a la misma, lo cual indica un flujo de material asistido por su carácter de reproducción asexual a las diferentes regiones del país. Estos resultados, se correlacionan, adicionalmente, con bajos niveles de variabilidad genética llamando la atención acerca de los riesgos que genera esta condición, por lo que se recomienda considerar la realización de estudios como rescate de embriones, germinación *in vitro* u otros que permitan la recuperación de plántulas sexuales con nuevos, y diversos genotipos, para ser introducidas en programas de mejoramiento o propagadas masivamente por micropropagación.

BIBLIOGRAFÍA

- Aramendiz H, Espitia M y Robles J. 2005. Colección, conservación, caracterización morfoagronómica y producción de semilla de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) del Caribe Colombiano. CIUC, Universidad de Córdoba, Montería, 118p.
- Araméndiz H, Espitia M y Cardona C. 2008. Valoración de los Recursos Fitogenéticos de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) en el Caribe Colombiano. CIUC, Universidad de Córdoba, Montería, 118p.
- Dice L. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: p. 297-302.
- Francis J. 1983. *Gynerium sagittatum* (Caña brava, cane). En Janzen D (Ed.) *Costa Rica Natural History*. University of Chicago Press, Chicago, p.248-249.
- González-Jiménez V, Valdez-Balero A, Gómez F, Silva H, Pérez J, Ortiz C. 2011. Caracterización molecular de variedades de caña

- flecha cultivadas en el estado de tabasco, México. *Biotecnología Vegetal* 11(2):107-113.
- Marulanda M, López A. 2010. Estimación de variabilidad genética en especies y genotipos del género *Guadua* en Colombia, con marcadores moleculares AFLP. En: *Biodiversidad y Biotecnología de la Guadua angustifolia* Kunth. Universidad Tecnológica de Pereira, p57-76.
- Morales C, Avendaño C, Melgoza A, Gil K, Quero A, Jurado P, Martínez M. 2016. Caracterización morfológica y molecular de poblaciones de pasto banderita (*Boueloua curtipéndula*) en Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 7(4):455-469.
- Moreno, S. 2001. Análisis de resultados de la caracterización molecular, conservación y caracterización de recursos fitogenéticos. INEA, Valladolid, p253-265.
- Nei My Li W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation inter ms of restriction endo nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(10):5269-5273.
- Rohlf F. 1993. *NTSYS-PC, Numerical taxonomy and multivariate analysis system, versión 1.80*. Exeter Software, New York. Setauket, NY.
- Shanon C y Weaver W. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana, 19p
- Tomas P, Gottlieb A, Schrauf G, Poggio L. 2013. Utilización de marcadores morfológicos y moleculares AFLPs en la identificación de germoplasma nativo y cultivado de *Elymus scabrifolius* (Poaceae). *Rev. FCA UNCUYO* 45(2):85-100
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van De Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414
- Watson L y Dallwitz M. 1992. *Grass Genera of the World*. En: <http://biodiversity.uno.edu/delta/> [Accedido: 08-18-1999].

VIII. CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE CAÑA FLECHA (*Gynerium sagittatum* Aubl.)

Isidro E. Suárez¹ e Iván Javier Pastrana Vargas²

¹Universidad de Córdoba, Instituto de Biotecnología Aplicada del Caribe IBAC

²Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA

INTRODUCCIÓN

Todo programa de mejoramiento genético vegetal tiene como base aumentar la variabilidad genética, seleccionar genotipos superiores a partir de esta base genética y conservar un rango de genotipos que permita en determinado momento reiniciar o continuar el proceso de mejoramiento genético.

Para especies con semillas ortodoxas, la conservación de germoplasma a través de semillas reduce costos debido a una mayor

eficiencia de espacio y manejo del material a conservar; mientras que especies con semillas recalcitrante, o que no producen semillas, la conservación de germoplasma debe hacerse a de manera obligatoria a través de plantas propagadas de partes vegetativas (*in vivo*) que garanticen el genotipo y la perpetuación de este en la propagación.

Bajo condiciones normales, el mantenimiento de germoplasma en condiciones *in vivo* genera costos considerables

representados en el cultivo de las plantas, el uso de terrenos generalmente de gran valor y la siembra periódica en especies bianuales; adicionalmente, en las colecciones *in vivo* se aumenta el riesgo de pérdida del material por el deterioro progresivo de las plantas, el ataque de agentes bióticos y la amenazas de desastres naturales (Suárez 2003; Suárez 2020).

El almacenamiento de germoplasma en condiciones *in vitro* es una alternativa a las limitantes de la conservación de germoplasma *in vivo* debido a que reduce los altos costos por espacio, el material se encuentra libre de plagas y enfermedades, y se disminuyen los riegos por desastres ambientales al no haber exposición directa con el medio ambiente natural.

Existen diversas formas de almacenar ger moplasm a en condiciones *in vitro*. La crioconservación consiste en el almacenamiento de

tejidos vegetales a ultrabajas temperaturas ($<-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), las cuales se pueden lograr con refrigeradores, el uso de dióxido de carbono sólido, y el nitrógeno líquido.

Otro método alternativo de conservación de germoplasma *in vitro* es a través del cultivo lento, el cual consiste en el almacenamiento de tejidos vegetales en formulaciones de medios de cultivo modificadas con el objetivo de reducir las tasas de crecimiento y multiplicación sin atender contra la supervivencia del material. Estas modificaciones de los medios pueden consistir en la disminución de las cantidades de fuentes energéticas (Carbohidratos), reducción de la concentración de las sales o la adición de reguladores de crecimiento que disminuyen el desarrollo de los órganos. En el presente estudio se evaluó el efecto de la concentración de sacarosa y sales minerales en la conservación *in vitro* de caña flecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los explantes consistieron de segmentos de tallo (1 – 1.5 cm de longitud) con yemas axilares, obtenidos de plantas de caña flecha cultivar “Criolla” establecidas en condiciones *in vitro*, las cuales fueron cultivadas durante seis meses en un medio semisólido MS suplementado con (en mg l⁻¹) myo inositol (100), tiamina HCl (0.4) y agar (7000) (Sigma®). El pH del medio fue ajustado entre 5.7 – 5.8 con KOH o HCl previo a la adición del agente solidificante, posteriormente esterilizado en un autoclave a 121 °C y 1.1 kg cm⁻² por 20 minutos y vertido en recipientes de vidrio. Los cultivos fueron mantenidos a una temperatura promedio de 25 °C con 12 horas diarias de luz a una intensidad de 40 μmol m⁻¹ s⁻¹ aproximadamente.

Efecto diferentes concentraciones de medio MS y sacarosa en la conservación *in vitro* de cultivos de caña flecha (*Gynerium sagitatum* Aubl.)

Los explantes fueron establecidos independientemente en frascos de vidrio de 250 cm³ de capacidad conteniendo 30 ml de medios MS (Murashige y Skoog 1962) semisólido a diferentes concentraciones de sales y suplidos con cantidades variadas de sacarosa (Tabla 15).

Tabla 15. Tratamientos evaluados en la conservación *in vitro* de plantas de caña flecha (*Gynerium sagitatum* Aubl.).

Tratamiento	Medio
1	MS + 30 g de sacarosa
2	MS + 15 g de sacarosa
3	MS + 60 g de sacarosa
4	½MS + 15 g de sacarosa
5	½MS + 60 g de sacarosa
6	¼MS + 15 g de sacarosa
7	¼MS + 60 g de sacarosa

Los cultivos fueron almacenados a una temperatura promedio de 25 °C con 12 horas diarias de luz a una intensidad de 40 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ durante 12 meses después de los cuales se registró el porcentaje de supervivencia y se evaluó el número de nuevos brotes producidos por cada explante, la longitud de los brotes producidos, el número y la longitud de las raíces.

Preparación de medios y diseño experimental

El pH de todos los medios fue ajustado entre 5.7 – 5.8 con KOH o HCl previo a la adición del agente solidificante, posteriormente esterilizado en un autoclave a 121 °C y 1.1 Kg cm^{-2} por 20 minutos y vertido en recipientes de vidrio. Los tratamientos fueron distribuidos con un diseño completamente al azar, donde cada unidad experimental correspondió a un explante establecido en un recipiente, y cada tratamiento fue replicado 30 veces. Los datos colectados fueron procesados

con un análisis de varianza utilizando el modelo estadístico $Y_{ij} = \mu + a_i + b_j + \epsilon_{ij}$; donde μ es el promedio general, i representa el efecto de las formulaciones de medios de cultivo, j el efecto de las cantidades de sacarosa y ϵ_{ij} es efecto del error experimental. Los promedios fueron separados con la prueba de múltiples rangos de Tukey ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas de caña flecha cultivadas en los diferentes tratamientos mostraron características de crecimiento diferentes de acuerdo con los tratamientos aplicados (Figura 19). Los datos colectados a los 12 meses después del establecimiento de los cultivos en condiciones *in vitro* muestran que ninguno de los tratamientos evaluados indujeron porcentajes completos (100%) de supervivencia (100%) o mortalidad inferior al 70% (Tabla 16). Los mayores



Figura 19. Planta de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) Var “Criolla” mostrando los efectos del almacenamiento después de un año en MS + 30 g sacarosa (Izquierda) y ¼ MS + 15 g sacarosa (Derecha)..

porcentajes de supervivencia se observaron en los explantes que fueron cultivados en ¼MS + 60 g de sacarosa (96.66%) y aquellos cultivados en presencia de ¼ MS + 15 g de sacarosa (93.33%), mientras que aquellos cultivados en presencia de MS + 30 g de sacarosa y ½MS + 15 g de sacarosa sufrieron la mayor tasa de mortalidad (30%) (Tabla 16).

Los tratamientos evaluados afectaron cuantitativamente

Tabla 16. Efecto de diferentes concentraciones de sales MS y sacarosa sobre la supervivencia y crecimiento de cultivos de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.) a los 12 meses después del establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	Sobrevivencia (%)	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de raíces	Longitud de raíz (cm)
MS + 15 g de sacarosa	73.33	3.21 BC	3.21 B	4.25 D	1.87 B
MS + 30 g de sacarosa	70.00	3.03 C*	4.53 AB	5.08 CD	2.82 B
½MS + 15 g de sacarosa	70.00	3.05 C	3.90 B	5.70 CD	2.21 B
MS + 60 g de sacarosa	93.33	5.37 A	5.5 B	7.13 BCD	4.07 B
¼MS + 15 g de sacarosa	93.33	4.23 ABC	6.46 A	10.65 AB	3.35 B
½MS + 60 g de sacarosa	83.33	5.17 AB	6.27 A	9.42 BC	4.20 B
¼MS + 60 g de sacarosa	96.67	5.87 A	5.74 AB	14.10 A	12.29 A

* Valores con la misma letra son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$)

los procesos de formación de órganos en los explantes cultivados. El análisis de varianza permitió detectar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($Pr < 0.0001$) con respecto a las variables número promedio de nuevos brotes, longitud de nuevos brotes, número promedio de raíces por explante y longitud de raíces por explante.

El análisis de separación de medias mostró que los tratamientos MS + 30 g de sacarosa y $\frac{1}{2}$ MS + 15 g de sacarosa indujeron las menores tasas de formación de nuevos brotes por explante, mientras que los tratamientos MS + 60 g de sacarosa y $\frac{1}{4}$ MS + 60 g de sacarosa incrementaron de manera significativa la tasas de multiplicación de nuevos brotes a partir de los explantes (Tabla 16). Los mismos datos permiten observar una tendencia hacia una mayor producción de nuevos brotes cuando la cantidad de sacarosa en el medio es de 60 g l⁻¹. Esta tendencia no se conserva

en la variable longitud de brotes, donde no existe una asociación entre los valores resultantes con la concentración de sacarosa o sales.

En cuanto a la formación de raíces, no se observa un patrón definido de comportamiento como respuesta a las diferentes concentraciones de sales, mientras que las mayores longitudes de raíces se observan en cultivos mantenidos en medios con un suplemento de 60 g de sacarosa sin alcanzar diferencias significativas (Tabla 16).

La conservación de germoplasma es una actividad vital para la supervivencia de especies en peligro de extinción. La caña flecha puede ser una de las especies que integre la lista de especies amenazadas en su supervivencia, si no se toman medidas urgentes que contrarresten la pérdida de poblaciones naturales (Araméndiz *et al.*, 2005).

Debido a los bajos costos y mayores niveles de seguridad, la conservación de germoplasma en condiciones *in vitro* es una de las estrategias preferidas para la conservación de recursos genéticos vegetales (Suárez 2003; Suárez 2020). La información obtenida en el desarrollo del presente trabajo ha demostrado que es posible conservar clones de caña flecha en condiciones *in vitro*, disminuyendo tanto el suministro de las fuentes energéticas como la concentración de sales en el medio, hasta por un año, sin afectar su supervivencia y conservando la capacidad de multiplicación. Los datos colectados permiten inferir que el cultivo de brotes obtenidos a partir de plantas cultivadas *in vitro* en un medio MS reducido a $\frac{1}{4}$ de su concentración de sales y una concentración de 15 g de sacarosa permite alcanzar porcentajes de supervivencia superiores al 90%, con una reducción importante de costos debido a la disminución en el uso de insumos y las labores de

subcultivo del material durante 12 meses.

La conservación de germoplasma mediante el uso de cultivo lento de tejidos vegetales en condiciones *in vitro* ha sido una tecnología aplicada en la conservación de diferentes especies vegetales involucrando el manejo de variables como las cantidades de insumos en el medio (cultivo lento) y el grado de temperatura (crioconservación). Efendi *et al.* (2001) reportaron la crioconservación de tejidos embriogénicos de aguacate y su posterior regeneración en plantas. García *et al.* (2004) evaluaron el efecto de la temperatura y diferentes cantidades de manitol en el medio sobre la conservación *in vitro* de germoplasma de caña de azúcar, reportando la mayor supervivencia y calidad de los cultivos a 15 °C en presencia de 10 g l⁻¹ de manitol. En otro estudio con fuentes alternativas de carbohidratos, Montalvo-Peniche *et al.* (2007) observaron que los mejores resultados en la

conservación de germoplasma de *Chile Habanero* en condiciones *in vitro* ocurrió en presencia de 2% de sorbitol. Iriondo y Pérez (2002) almacenaron meristemas de *Ipsea malabarica* durante 20 meses en un medio ½ MS sin suministro de carbohidratos.

El almacenamiento a períodos de tiempo superiores a los experimentados en el presente estudio también han sido evaluados, aunque los resultados sugieren poca conveniencia en algunos casos. Reed (2002) conservó *in vitro* meristemas de fresa observando que los mejores resultados fueron observados a los 9 y 12 meses, con una disminución marcada en la supervivencia y calidad de los cultivos al extenderse hasta los 19 meses; no obstante, es necesario evaluar la posibilidad de almacenar caña flecha por períodos de tiempo superiores a un año, al igual que determina el efecto de las variaciones en el fotoperíodo, diferentes grados de temperatura y uso de reguladores de crecimiento en la supervivencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Aramendiz H, Espitia M y Robles J. 2005. Colección, conservación, caracterización morfoagronómica y producción de semilla de caña flecha (*Gynerium sagitatum* Aubl.) del Caribe Colombiano. CIUC, Universidad de Córdoba, Montería, 118p.
- Efendi D, Litz R y Alorani F. 2001. Cryoconservation of embryogenic avocado (*Persea americana* Mill.) cultures *in vitro*. *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant* 37:39 (Abstract).
- García L, Pérez J, Rodríguez M, Pérez B, Martínez Y y Sarría Z. 2004. Conservación *in vitro* de plantas de caña de azúcar. *Bioteología Vegetal* 4(2):101-105.
- Iriondo J y Pérez C. 2002. Micropropagation and *in vitro* storage of *Centarium rigualii* Esteve (Gentianaceae). *Israel Journal of Plan Sciences* 44(23):115-123.

Montalvo-Peniche M, Iglesias-Andreu L, Mijangos-Cortez J, Nahuat-Dzib S, Barahona-Pérez F, Canto-Flick A y Santana-Buzzy N. 2007. *In vitro* germplasm conservation of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Hortscience* 42(5):1-6

Reed P. 1988. Stock plant influences micropropagation success. *Acta Horticulturae* 226:41-52

Suarez I. 2003. Introducción a la Biotecnología Agrícola. Universidad de Córdoba, *Grupo de Publicaciones Universidad de Córdoba*, Montería, p8-13.

CONCLUSIÓN GENERAL

El programa de investigación del Instituto de Biotecnología Aplicada del Caribe con énfasis en la caña flecha ha generado nuevos conocimientos sobre el manejo del cultivo de tejidos y la genética de esta especie por un período cercano a los 20 años, que se sintetizan en la presente publicación de la segunda edición de “Biotecnología Aplicada a la Caña Flecha”, el cual es el resultado de la contribución de entidades como el Instituto de Biotecnología Aplicada del Caribe (IBAC) de la Universidad de Córdoba, de investigadores asociados, estudiantes y personal de apoyo con cuyo arduo trabajo se lograron obtener los resultados de los trabajos científicos que aquí se consignan.

El programa de investigación en caña flecha planteó desde un inicio dos objetivos: conocer la diversidad genética de los diferentes cultivares de caña flecha que crecen en la región para contribuir a su conservación, y desarrollar un mecanismo eficiente de propagación para producir de forma sostenida grandes cantidades de material de siembra de forma sostenida y amigable con el medio ambiente. El empeño del personal científico y el apoyo de las entidades y dependencias asociadas, hicieron posible la realización de estudios de caracterización molecular de diferentes genotipos, y el desarrollo de mecanismos que permitieran la conservación de estos en condiciones *in vitro* por largos períodos de tiempo. De forma alterna, el desarrollo de aproximadamente 10 estudios en el componente de propagación *in vitro*, permitió generar un protocolo de micropropagación que

no solamente tiene una alta eficiencia en su tasa de multiplicación sino que permitió bajar los costos del material producido, reducir los tiempos de obtención de las plantas y mantener altos estándares de calidad genética y fenotípica, el cual ha sido evidenciado no solo en condiciones de laboratorio sino también en la eficiencia de la adaptación y crecimiento de las plantas micropropagadas en campo.

La segunda, y final, edición de Biotecnología Aplicada a la Caña Flecha provee a investigadores, productores y a todas las personas asociadas a la conservación, cultivo y aprovechamiento de la caña flecha con información relevante de alto rigor científico para la toma de decisiones en la elaboración de planes y proyectos relacionados con la producción y almacenamiento de material de siembra de los principales cultivares de caña flecha. Esperamos este trabajo contribuya con la preservación de las poblaciones naturales de la especie y favorezca el aprovechamiento comercial de la planta de una forma amigable con el medio ambiente.

**BIOTECNOLOGÍA APLICADA A
LA CAÑA FLECHA (*Gynerium sagittatum* Aubl.)**

Segunda Edición



ISBN 978-958-5104-27-3