

Germinación *in vitro* de semillas de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.)Nees

Yudith García-Ramírez*, Marisol Freire-Seijo, Marisol Tejada, Maritza Reyes *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5 Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: yudith@ibp.co.cu

RESUMEN

La disponibilidad de semillas *Dendrocalamus strictus* (Rosb.)Nees se ve afectada por lo largo y errático del ciclo de florecimiento de la especie. Estas semillas, además, mantienen su poder germinativo solo por períodos cortos de tiempo. El cultivo de tejidos ofrece un medio rápido y confiable para su propagación mediante el empleo de las semillas germinadas *in vitro* como material vegetal inicial. Con el objetivo de germinar *in vitro* semillas de *D. strictus* se determinó el efecto de diferentes concentraciones (3.0, 5.0 y 7.0%) y tiempos de desinfección con hipoclorito de sodio (20 y 30 min). Se evaluó el número de semillas germinadas y libres de contaminantes microbianos a los diez días de cultivo. Los resultados demostraron que el método de desinfección donde se empleó hipoclorito de sodio al 3.0% durante 30 minutos fue el más adecuado para la germinación *in vitro* de las semillas de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.)Nees.

Palabras clave: bambú, cultivo de tejidos, desinfección, hipoclorito de sodio

ABSTRACT

The availability of *D. strictus* seeds is affected by the length and erratic flowering cycle of the species. These seeds also retain their germination only for short periods of time. The tissue culture offers a fast and reliable way for the propagation using *in vitro* seed germinated as initial plant material. This research was conducted with the objective of to germinate *in vitro* *D. strictus* seeds. The effect of different concentrations of sodium hypochlorite (NaClO) (3.0, 5.0 and 7.0%) and time for seed disinfection (20 and 30 min) were determined. It was evaluated the number of germinated seeds and free of microbial contaminants after 10 days of culture. The results showed that the method of disinfection which sodium hypochlorite 3.0% for 30 minutes was the best for *in vitro* germination of *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees seeds.

Key words: bamboos, disinfection, sodium hypochlorite, tissue culture

INTRODUCCIÓN

Los bambúes son gramíneas de amplia distribución en el mundo y son los países asiáticos y tropicales los que presentan una mayor diversidad en cuanto a especies y tamaño. *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees es muy común en la India, Nepal, Bangladesh, Burma y Tailandia y se puede encontrar, además, en jardines botánicos (Londoño, 2004).

D. strictus ocupa un lugar primordial en la India por su adaptabilidad en los ecosistemas sanos, la protección que le brinda al ambiente y a los suelos. Sirve de materia prima para la fabricación de muebles, construcción de vallas y edificios e instalación de cercas, obtención de pulpa para la industria papelera, fabricación de instrumentos agrícolas y musicales, confección de medicamentos y para suministrar sus hojas como forraje ganadero (Riesco, 2002).

En Cuba, los recursos maderables son escasos, por ello la reforestación con bambú sería una alternativa ecológica para atenuar las debilidades, sobre la base, de la elevación de una cultura ambiental para la reforestación y el cuidado de los bosques. Por ello

se hace imprescindible la búsqueda de una solución integral y ambientalmente compatible para resolver los problemas del hábitat en comunidades rurales y semirurales. Una de las opciones para atenuar esta problemática es el fomento de bosques de bambú. *D. strictus* es una de las especies apta para la reforestación en las condiciones edafoclimáticas de Cuba (Anónimo, 2007).

La propagación de Bambúes por semillas se dificulta debido a que existen especies que no producen semillas (*Bambusa balcooa*, *Bambusa vulgaris*) y las que florecen lo realizan en largos intervalos de tiempo que varían de 30 a 70 años (*Bambusa bambos*, *Dendrocalamus strictus*, *Bambusa polymorpha*, *Phyllostachys* spp.) La disponibilidad de semillas *D. strictus* se ve afectada por lo largo y errático del ciclo de florecimiento de la especie, lo que dificulta su propagación sexual. Las semillas deben ser colectadas en períodos de escasas lluvias y en el trópico pierden su viabilidad después de 2 a 3 meses (Gielis *et al.*, 2004). Las técnicas de cultivo de tejidos ofrecen un medio rápido y confiable para su propagación debido a las altas tasas de multiplicación y al reducido material vegetal de partida requerido,

además, han sido adaptadas para su utilización en un elevado número de especies con problemas de propagación por métodos convencionales o con poblaciones extremadamente reducidas (Iriando, 2001). Varios investigadores han tenido éxito en la germinación *in vitro* de semillas de *Dendrocalamus* sp. (Nadgauda y Parasharami, 1990; Gielis *et al.*, 2001) así como la propagación subsiguiente de las semillas (Nadgauda y Parasharami, 1990).

Por todo lo antes planteado la presente investigación se desarrolló con el objetivo de determinar el efecto de la utilización de diferentes concentraciones y tiempos de desinfección en hipoclorito de sodio sobre la germinación *in vitro* de *D. strictus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon de semillas *D. strictus* (Figura 1) colectadas en el Jardín Botánico de Cienfuegos, Cuba, durante el mes de abril.

Las espiguillas fueron trasladadas al laboratorio y se extrajeron las semillas. Previo a la desinfección, las semillas fueron seleccionadas cuidadosamente de acuerdo con su coloración, forma y presencia de daños o deformidades.

Desinfección y germinación *in vitro*

Una vez en el laboratorio, las semillas fueron lavadas con detergente y agua corriente para remover restos de suelo, seguidamente, se sumergieron en etanol (70%) durante cinco minutos. Luego de enjuagar las semillas tres veces con agua destilada estéril, fueron colocados en una solución de NaClO a diferentes

concentraciones (1.0, 2.0 y 3.0%) durante dos tiempos (20 y 30 minutos). Finalmente, se procedió al enjuague con agua destilada estéril.

El medio de cultivo estuvo compuesto por las sales y vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (1962), con 0.2 mg.l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP), sacarosa (30 g.l⁻¹) y se empleó como gelificante Gelrite® (SIGMA) a una concentración de 2.5 g.l⁻¹.

El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5.7±1 con el uso de HCl o KOH, previo a la esterilización. Se colocaron cinco semillas por frasco de cultivo y cada uno contenía 25ml de medio de cultivo.

Los frascos de cultivo fueron colocados en cámaras de crecimiento de luz solar donde la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) osciló entre 48.0-62.5 μmol.m⁻² s⁻¹, con una temperatura de 27±2 °C.

A los diez días de cultivo se evaluó el número de semillas libres de contaminantes microbianos y el número de semillas germinadas.

Para el análisis estadístico de los datos se realizaron pruebas de análisis de varianza de clasificación simple y pruebas de comprobación de los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad y con sus respectivos parámetros para las variables de niveles de medición discretos (LSD), comparación de proporciones y prueba de hipótesis para determinar el efecto de la utilización de diferentes concentraciones y tiempos de desinfección en hipoclorito de sodio sobre la germinación *in vitro* de *D. strictus*. Para detectar las diferencias significativas entre las medias a un nivel de significancia del 5%. Todo el proceso estadístico fue realizado a través del paquete estadístico computacional Statgraphics 4.1.



Figura 1. Semillas de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.)Nees

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección y germinación *in vitro*

La germinación *in vitro* de las semillas se inició al tercer día de cultivo, con la presencia de plúmula y radícula bien definidas. Posteriormente a los 15 días de cultivo se evidenció un rápido crecimiento y desarrollo de las plantas (Fig. 2).

Los resultados demostraron que a medida que se incrementó la concentración y el tiempo de desinfección, aumentó el porcentaje de semillas libres de contaminantes y disminuyó el porcentaje de semillas germinadas. Esto pudo deberse a los daños causados por el efecto tóxico del NaClO sobre el embrión cigótico durante la desinfección.

Los microorganismos de mayor frecuencia de aparición fueron los hongos, específicamente *Fusarium* sp. (Datos no mostrados).

Los mejores resultados se alcanzaron en el tratamiento donde se empleó NaClO (3.0%) durante 30 minutos, alcanzándose un 67% de semillas

germinadas *in vitro* y un 83.33% de semillas libres de microorganismos (Tabla 1).

El hipoclorito de sodio ha sido empleado con éxito para la desinfección de semillas de especies de *Dendrocalamus*. Autores como Mukunthakumar (1992) y Madhulika (2000) lograron un 96% y 80% de semillas germinadas *in vitro* de *Dendrocalamus strictus*, respectivamente empleando NaClO al 1.5% durante 20 minutos. De igual forma, Reddy (2006) en esta misma especie, en condiciones *in vitro* obtuvo un 70% de germinación a los diez días de cultivo al emplear Bicloruro de Mercurio al 0.1% durante 15 minutos.

Por su parte, Zamora (1994) para la especie *D. strictus* en condiciones *in vivo* alcanzó entre un 25 a 61% de germinación y en condiciones *in vitro* obtuvo un 100% de semillas germinadas a una temperatura de 30 °C con un nivel de la humedad entre un 50 -70%.

Arya *et al.* (1999) lograron la formación de brotes múltiples (1-25) durante la germinación de semillas de *Dendrocalamus asper* luego de 5 semanas de cultivo, sin embargo, estas no emitieron la radícula.

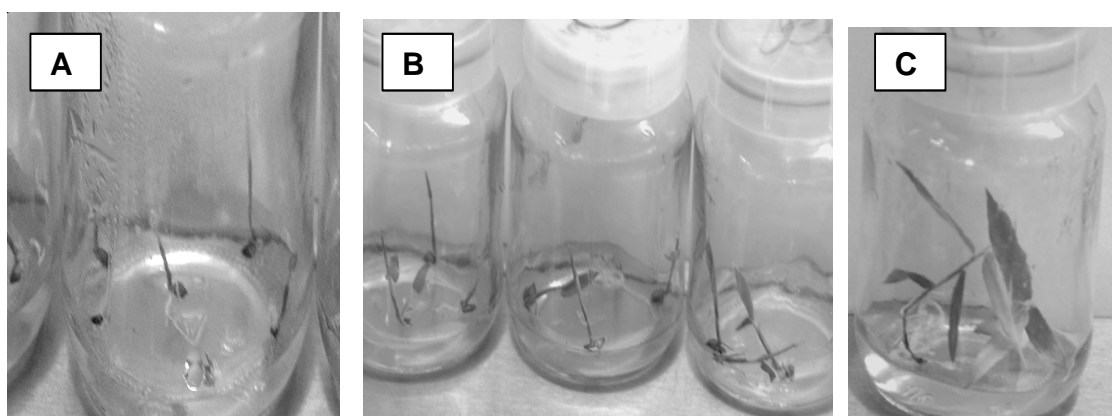


Figura 2. Semillas germinadas *in vitro* de *D. strictus* a los 3 (A), 6 (B) y 15 días cultivo.

Tabla 1. Influencia del tiempo de desinfección y la concentración de NaClO en la germinación *in vitro* de *Dendrocalamus strictus*.

Concentración de Hipoclorito de Sodio (%)	Tiempo de inmersión en Hipoclorito de Sodio (min)	% de Semillas libres de contaminantes	% de Semillas germinadas
3.0	20	79.17 b	75.0% a
3.0	30	83.33 ab	67.0% a
5.0	20	86.67 ab	60.0% b
5.0	30	88.24 ab	59.0% b
7.0	20	90.00 a	59.0% b
7.0	30	90.83 a	57.0% b

Medias con letras diferentes dentro de una misma columna, difieren ($p < 0.05$) según LSD.

La germinación *in vitro* ofrece algunas ventajas sobre la germinación de las plantas de semillero *in situ* ya que ocurre en menor tiempo en comparación con el método convencional. En la literatura científica se hace referencia a que el porcentaje de germinación de semillas de bambú varía según las especies, en condiciones *in situ* en América Latina las semillas de algunas especies como *Guadua angustifolia* Kunth presentan porcentajes altos de germinación (95-100%) y la germinación se logra a los 23 días después de la siembra (Giraldo y Sabogal, 1999). Warriar *et al.* (2004) obtuvieron un 6.0% de germinación después de 18 meses en *Bambusa arundinacea* a partir de semillas con un alto contenido de humedad. Sin embargo, *in vitro* el tiempo de germinación es menor. En otros bambú como *Bambusa*, *Gigantochloa* y *Schizostachyum lumampao* obtuvieron entre un 50-80% de semillas germinadas al séptimo día de sembradas.

CONCLUSIONES

El empleo de NaClO al 3.0% durante 30 minutos permitió la desinfección de semillas de *Dendrocalamus strictus*. Con este tratamiento se logró un 67% de semillas geminadas *in vitro* y un 83.33% de semillas libres de microorganismos.

REFERENCIAS

- Arya, S, Sharma S, Kaur R (1999) Micropropagation of *Dendrocalamus asper* by shoot proliferation using seeds. Plant Cell Rep 18:879–882
- Anónimo (2007) [en línea] En: <http://www.ecosur.org> .html [Consulta: 25 enero 2006]
- Gielis, J, Woods JE, Oprins J (2004) Micropropagation, synthetic seeds and germplasm storage of bamboos en: <http://www.patentstorm.us/patents/6677154-description.html> [Consulta: 7 enero 2006]
- Gielis, J, Peeters H, Gillis K, Oprins J, Debergh PC (2001) Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. Acta Hort 552:195-203
- Giraldo, E, Sabogal, A (1999) Una Alternativa Sostenible: la Guadua. Fudesco. Bogotá
- Iriondo, JM (2001) Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Israel Journal of plant Sciences 44: 115-123
- Londoño, Ximena (2002) Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los bambúes del nuevo mundo. Maestría en Construcción – Modulo Guadua, Arquitectura, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. [en línea] En: <<http://www.hof-landlust.de/scb/taller.html>> [Consulta: 8 septiembre de 2006]
- Madhulika (2000) Thidiazuron-induced *in vitro* flowering in *Dendrocalamus strictus* Nees: En <http://www.ias.ac.in/currsci/dec102000/1529.pdf> [Consulta: 2 de junio de 2006]
- Mukunthakumar, Mathur J (1992) Artificial seed production in the male bamboo *Dendrocalamus strictus* L., Plant science: 87 109-113
- Murashige T, Skoog F(1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15: 473-497
- Nadgauda, RS, Parasharami AV (1990) Precocious flowering and seeding behaviour in tissue-cultured bamboos: En: <http://www.nature.com/nature/journal> [Consulta: 5 enero de 2006]
- Warriar R, V Sivakumar, R Anandalakshmi, S N Vijayachandran, N P Mahadevan, B Gurudev Singh (2004) Improving storability of *Bambusa arundinacea* (Retz.) Willd. Seeds: En: <http://www.springerlink.com/content/ba66e0f1c5a9edca/>. [Consulta: 2 de junio de 2006]
- Reddy, GM (2006) Clonal propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus*) En: <http://www.ias.ac.in/currsci/dec102006/1462.pdf>. [Consulta: 2 de junio de 2006]
- Riesco, A (2002) Caracterización del crecimiento de especies de bambú Rojo. Bamboo resources of the Philippines. Proceedings of the first national conference on bamboo, Iloilo City, Philippines
- Zamora (1994). Congreso Internacional sobre Desarrollo, Medio Ambiente y Recursos: En www.congresoioic.umss.edu.bo. [Consulta: 2 de junio de 2006]