

## Formación de callos de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees a partir de semillas

Yudith García-Ramírez\*, Marisol Freire-Seijo, Marisol Tejeda, 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 propagación *in vitro* de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees se hace necesaria por el potencial que este tipo de planta posee para la fabricación de muebles, construcción de vallas y edificios, para la industria papelera, fabricación de instrumentos agrícolas y musicales, confección de medicamentos, para suministrar sus hojas como forraje ganadero y para la reforestación. Desarrollar protocolos de regeneración de plantas vía organogénesis y embriogénesis somática sería una alternativa eficiente para propagar esta especie ya que se adapta bien a las condiciones de Cuba. Con el objetivo de formar callos *in vitro* a partir de semillas de *D. strictus* se determinó el efecto de diferentes concentraciones de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (1.0, 2.0, 4.0 mg.l<sup>-1</sup>) y Kinetina (0.5, 1.0 mg.l<sup>-1</sup>). Se evaluó la formación de callos en cada tratamiento y su calidad. Los resultados demostraron que el tratamiento donde se empleó 2,4-D y kinetina a una concentración de 1.0 mg.l<sup>-1</sup> logró la formación de callos *in vitro* a partir de semillas de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees.

Palabras clave: regeneración de plantas, 2,4-D, Kinetina

### ABSTRACT

The *in vitro* propagation of *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees is necessary. This type of plant is very important for the manufacture of furniture, construction of fences and buildings, for the paper industry, manufacturing of agricultural and musical instruments, elaboration of drugs, to provide their leaves as fodder for livestock, and reforestation. The development of protocols for regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis is an efficient alternative to propagate this species. Cuba conditions are suited for this purpose. The effect of different concentrations of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) (1.0, 2.0, 4.0 mg.l<sup>-1</sup>) and kinetin (0.5, 1.0 mg.l<sup>-1</sup>) was determined in order to form calluses *in vitro* from seeds of *D. strictus*. Results showed that *in vitro* callus formation from seeds of *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees treatment was achieved using 2,4-D and kinetin at a concentration of 1.0 mg.l<sup>-1</sup>.

Key words: tissue culture, 2,4-D, Kinetin

### INTRODUCCIÓN

El bambú desempeña un papel crucial en el desarrollo sostenible de las poblaciones rurales. Su uso se extiende con rapidez por Asia, África y América Latina. Se emplea en la artesanía, en la construcción de casas y puentes y como mercancía en el comercio internacional (FAO, 2005).

En los últimos años ha resurgido un gran interés en el empleo del bambú como fuente de materias primas para la industria, motivado por restricciones de carácter ecológico y la escasez de recursos forestales. Igualmente, por la posibilidad de emplear los bosques de bambú como un modulador del medio ambiente por su capacidad de crecimiento y por su adaptación a climas tropicales, subtropicales y templados, además de que favorece la conservación del agua, el suelo y la biodiversidad (Bystriakova *et al.*, 2004). El bambú por las altas tasas de crecimiento es capaz de alcanzar elevados volúmenes de biomasa hasta dos veces más que los árboles de rápido crecimiento. Este recurso

representa una oportunidad para integrar iniciativas de desarrollo sostenible, ya que es un recurso complementario para los medios de vida de los pequeños productores rurales (INBAR, 1999; Morales, 2002), por su fortaleza, elasticidad y dureza. El desarrollo de nuevas utilidades para el bambú es muy recomendable ya que es un recurso renovable y sostenible (Pérez *et al.*, 2000).

En Cuba, no se cuenta con recursos forestales suficientes y la disponibilidad de bambú es pequeña y dispersa por lo que imposibilita una explotación económica para la industria. El bambú se ha utilizado principalmente de forma limitada, en la artesanía y la producción de muebles, siendo muy escasos y con criterios de diseño restringidos en su utilización en la vivienda. Por tanto, se hace necesaria la búsqueda de soluciones creativas para un mayor y mejor aprovechamiento de este importante material vegetal (Pérez *et al.*, 2000).

Desarrollar protocolos de propagación vía organogénesis y embriogénesis somática sería una

alternativa eficiente para propagar esta especie ya que se adapta bien a las condiciones edafoclimáticas de Cuba. En Cuba no se han desarrollado protocolos de regeneración de plantas vía embriogénesis somática y organogénesis indirecta. El cultivo de tejidos ofrece un medio rápido y confiable para la regeneración de plantas mediante el empleo de callos formados a partir de semillas. En esta especie de bambú disponer de semillas como material inicial fue desde el punto de vista científico una posibilidad excepcional debido a lo impredecible y esporádico de este fenómeno. La mayoría de los informes describen protocolos principalmente para los géneros *Bambusa* (Kalia *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2004) y *Dendrocalamus* (Saxena y Dhawan, 1999; Ramanayake *et al.*, 2001; Sood *et al.*, 2002).

La presente investigación se desarrolló con el objetivo determinar el efecto de diferentes concentraciones de ácido 2,4-Diclorofenoxacético (2,4-D) y kinetina para la formación de callos de *D. strictus* a partir de semillas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se emplearon semillas de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees 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.

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 al

2.0% durante 20 minutos. Finalmente, se procedió al enjuague con agua destilada estéril.

### Formación de callos

Se determinó el efecto de diferentes concentraciones de ácido 2,4-Diclorofenoxacético (2,4-D) y kinetina sobre la formación de callos en semillas de *D. strictus*.

El medio de cultivo estuvo compuesto por sales y vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (1962), sacarosa 30 g.l<sup>-1</sup> y Gelrite® (SIGMA) 2.5 g.l<sup>-1</sup>.

Los tratamientos resultantes de la combinación de los reguladores del crecimiento y sus concentraciones se refieren en la tabla 1.

El pH del medio de cultivo fue ajustado a 6.0±1 con el uso de HCl y/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  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , a 27± 2°C.

A los veinte días de cultivo se cuantificó el número de semillas que formó callos, el número de semillas libres de contaminantes microbianos y hasta los treinta y nueve días se evaluó el número de callos con presencia de brotes y raíces.

Para el análisis estadístico de los datos se realizaron pruebas de normalidad, además se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para determinar el efecto de los reguladores de crecimiento en la formación de callos *in vitro* de *D. strictus* a un nivel de significancia del 5%. Todo el proceso estadístico fue realizado a través del paquete estadístico computacional SPSS 15.0 para Windows.

Tabla 1. Tratamientos conformados para evaluar el efecto de dos reguladores del crecimiento en en la formación de callos de *D. strictus* (Rosb.) Nees a partir de semillas.

Tratamientos	Regulador del crecimiento	
	2,4-D (mg.l <sup>-1</sup> )	Kinetina (mg.l <sup>-1</sup> )
1	1.0	1.0
2	2.0	1.0
3	4.0	1.0
4	1.0	0.5
5	2.0	0.5
6	4.0	0.5

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La germinación de los embriones somáticos se inició a los 15 días de cultivo. Los embriones de las semillas germinaron en presencia de 2,4-D auxina efectiva en la inducción de los embriones somáticos, luego se emitió la radícula y se inició el desarrollo de la plúmula, aunque en ninguno de los tratamientos se desarrolló la hoja cotiledonal. Posteriormente, se inició la formación de callos a los 20 días de cultivo, estos eran pequeños, compactos, bien definidos, de

coloración blanquecina y en todos los casos crecieron sobre la radícula que emergió de la semilla, se observó la presencia de callos con estructuras embriogénicas a los 30 días de cultivo (Figura 1). A los 39 días de cultivo se observaron callos con brotes (Figura 2).

Las combinaciones de los dos reguladores del crecimiento empleados fueron capaces de inducir la formación de callos a partir de semillas de *Dendrocalamus strictus* (Tabla 2).



Figura 1. Callos formados a partir de semillas de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees a los 30 días de cultivo.

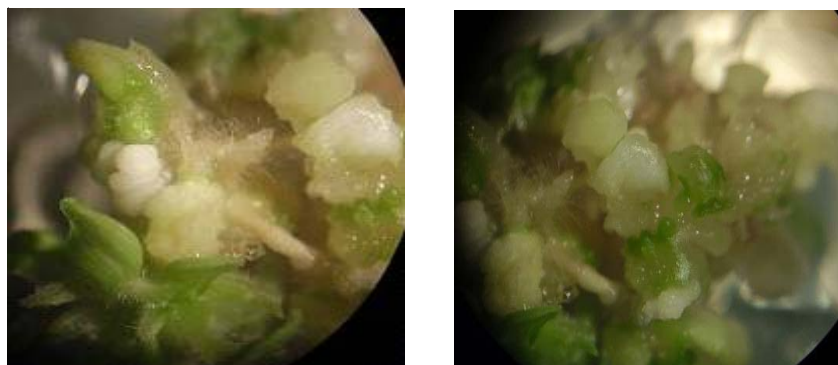


Figura 2. Callos con brotes de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees formados a los 39 días de cultivo.

Tabla 2. Efecto de las concentraciones de los reguladores del crecimiento sobre la formación de callos *in vitro* de *D. strictus*.

Reguladores de crecimiento		Callos formados a partir de semillas (%)	Semillas libres de contaminantes (%)
2.4-D (mg.l <sup>-1</sup> )	Kinetina (mg.l <sup>-1</sup> )		
1.0		78.0 a	90.8 a
2.0	1.0	72.0 ab	90.0 a
4.0		63.0 ab	88.0 ab
1.0		57.0 b	86.2 ab
2.0	0.5	57.0 b	83.0 b
4.0		54.0 b	79.1 b

Medias con letras diferentes dentro de una misma columna, difieren ( $p < 0.05$ ) según la Prueba de Kruskal Wallis.

Otros autores han empleado estos reguladores de crecimiento para formar callos y regenerar plantas en bambú.

Por ejemplo, Rout y Das (1997) para la especie *Bambusa vulgaris* var. *vulgaris* con una menor concentración de 2,4-D obtuvieron emisión de brotes en los callos. Por su parte, Muñoz y Fonseca (1998) para *Dendrocalamus giganteus* refirieron la formación de callos al emplear 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D y kinetina.

En otra especie de *Dendrocalamus* (*D. hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro), Godbole y Sood (2002) formaron callos a partir de segmentos nodales con el uso de 1.0 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D, así como, Sood *et al.* (2002), Ramanayake y Wanniarachchi (2003), Lin *et al.* (2004), Gillis *et al.* (2007) en *Bambusa balcooa* Roxburgh con este mismo regulador de crecimiento (1.0 mg.l<sup>-1</sup>), obtuvieron un 98% de callos con estructura embriogénicas a partir de segmentos nodales. Igualmente, en *Phyllostachys nigra*, Ogita (2005) con 2.0 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D obtuvo callos con estructuras embriogénicas.

## CONCLUSIONES

Se logró la formación de callos a partir de semillas de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees al emplear 2,4-D y kinetina.

## REFERENCIAS

- Bystriakova, N, Kapos V, Lysenko I (2004) Bamboo Biodiversity. UNEP-WCMC/INBAR, Cambridge
- FAO (2005) Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales. Capítulo 2. Extensión de los recursos forestales. p 27. [En línea]: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao.pdf>. Consulta: 25 de agosto de 2008
- Gillis, K, Gielis J, Peeters H, Dhooghe E, Oprins J (2007) Somatic embryogenesis from mature *Bambusa balcooa* Roxburgh as basis for mass production of elite forestry bamboos. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 91:115–123
- Godbole y Sood (2002) Somatic embryogenesis and its conversion into plantlets in a multipurpose bamboo, *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. Curr. Sci 83: 885-889
- INBAR (Red Internacional del Bambú y Ratán) (1999) Evaluation of bamboo resources in Latin America. Ed. Londoño X. Cali
- Lin, C, Lin C, Chang W (2004) Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 76: 75–82
- Kalia, S, Kalia R, Sharma S (2004) *In vitro* regeneration of an indigenous bamboo (*Bambusa nutans*) from internode and leaf explant. J Bamboo Rattan 3: 217–228
- Morales, D (2002) Análisis de la población y productores de bambú en Costa Rica. CATIE, Turrialba
- Muñoz, L, Fonseca A (1998) Morfogénesis *in vitro* del bambú *Dendrocalamus giganteus* Munro. [En línea]: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin>. Consulta: 2 de marzo de 2007
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Plant Physiology 15: 473 - 497
- Ogita, S (2005) Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. Plant Biotechnology 22(2): 119–125
- Pérez, M, Moreda C, Valdés M (2000) Plantas anuales. Fuente alternativa de fibra en la fabricación de papel. [En línea]: <http://ciadicyp.unam.edu.ar/trabajos/trabajos/pulpa>. Consulta: 13 de mayo de 2007
- Ramanayake, S, Wanniarachchi W, Tennakoon, T (2001) Axillary shoot proliferation and *in vitro* flowering in an adult giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 37: 667–671
- Ramanayake, S, W Wanniarachchi (2003) Organogenesis in callus derived from an adult giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall ex Munro). Scientia Horticulturae 98(2): 195-200
- Rout, G y Das, P (1997) *In vitro* plant regeneration via callogenesis and organogenesis in *Bambusa vulgaris*. Biologia Plantarum 39(4): 515-522
- Saxena, S, V Dhawan (1999) Regeneration and large-scale propagation of bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees) through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 18(5): 438-443
- Sood, A, Ahuja P, Sharma O, Godbole S (2002) *In vitro* protocols and field performance of elites of an important bamboo *Dendrocalamus hamiltonii* Nees et Arn. Ex Munro. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 71: 55–63