

CALIDAD FISIOLÓGICA DE SEMILLAS DE *Typha domingensis* Pers. (TOTORA) Y SU PROPAGACIÓN EN CONDICIONES CONTROLADAS

Physiological seed quality *Typha domingensis* Pers. (totora) and spread in controlled conditions

ANTONIO SAMUDIO^{1*}; HÉCTOR NAKAYAMA¹; INOCENCIA PERALTA²; CÉSAR CARDOZO²

¹Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Universidad Nacional de Asunción, Campus San Lorenzo; e-mail: antosamud@gmail.com

²Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, Universidad Nacional de Asunción Campus San Lorenzo.

RESUMEN: *Typha domingensis* Pers (Typhaceae), conocida vulgarmente como “totora”, es una especie palustre característica de los humedales, formando densos rodales. Diversos estudios mencionan en sus resultados que la especie *T. domingensis* posee tolerancia y eficiencia en la retención de contaminantes y nutrientes. En el Paraguay se propone utilizar la “totora” como una alternativa al tratamiento de depuración de recursos hídricos. Sin embargo, existe poca información sobre la especie en cuanto a su germinación y multiplicación para una explotación a gran escala. En el Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas dependiente de la Dirección General de Investigación Científica Tecnológica fue conducido el experimento en el periodo comprendido entre los meses de abril y noviembre de 2013 con el objetivo de estudiar la calidad fisiológica de las semillas de *T. domingensis* sembradas *in vitro*, evaluar la germinación en condiciones controladas de laboratorio y posterior adaptación en invernadero. El diseño experimental utilizado fue el Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial 3 x 3, siendo el factor 1 diferentes temperaturas (20, 25 y 30 °C) y el factor 2 diferentes sustratos (agua, turba y arena) en 3 repeticiones. Las variables evaluadas fueron peso de mil semillas, vigor de las semillas utilizando la técnica del envejecimiento acelerado, porcentaje de germinación en diferentes sustratos y la adaptación en invernadero. Los resultados obtenidos demuestran que 1000 semillas tienen un peso promedio de 69,32 mg; las semillas sometidas a envejecimiento acelerado mantuvieron la viabilidad, la mejor temperatura para la germinación fue de 30 °C en sustrato turba con un 89,55 % de germinación y el 100 % de las plantas llevadas a invernadero se regeneraron satisfactoriamente para una producción masiva.

Palabras clave: *Typha domingensis*, germinación, adaptación.

SUMMARY: *Typha domingensis* Pers (Typhaceae), also known as totora, is a species characteristic of marshy wetlands, forming dense stands. Several studies mention in their results that *T. dominguensis* is tolerant and efficient in retaining pollutants and nutrients. In Paraguay it has been proposed to use the totora as an

Manuscrito recibido: 4 de diciembre de 2014.

Manuscrito aceptado: 18 de diciembre de 2014.

alternative to the actual water purification treatment. However, little information about the species germination and multiplication for large-scale exploitation is available. At the Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas under the Dirección General de Investigación Científica y Tecnológicas an experiment was conducted in the period between April and November 2013 in order to study the physiological quality of *T. domingensis* seeds sown *in vitro*, evaluate seed germination under controlled laboratory conditions and subsequent adaptation of plants to a greenhouse environment. The experimental design was a complete randomized design with a factorial arrangement of 3 x 3, considering different temperatures (20, 25 and 30) as factor 1 and different substrates (water, peat and sand) as factor 2. Three replications were performed. The variables evaluated were thousand seed weight, seed vigor using the technique of accelerated aging, germination percentage in different substrates and adaptation to greenhouse environment. The results show that 1000 seeds have an average weight of 69.32 mg, seeds subjected to accelerated aging maintained viability, the best germination temperature was 30 °C in a peat substrate with a germination percentage of 89,55 % and plant regeneration in the greenhouse was 100 %. These result are satisfactory for *T. domingensis* mass production.

Key words: *Typha domingensis*, germination, adaptation.

INTRODUCCIÓN

Typha domingensis Pers (Typhaceae), conocida vulgarmente como “totora”, o “piripé” (en lengua guaraní), es característica de ecosistemas acuáticos como los humedales de agua dulce y salobre, formando densos rodales mono-específicos en las zonas de disturbios.

En Paraguay se han encontrado 2 especies (*T. domingensis* Pers. y *T. latifolia* L. Dulac), distribuidas tanto en la región Oriental como en la Occidental (Chaco) (Degen y Mereles, 1999), en suelos pantanosos formando colonias muy densas llamadas totorales.

Diversos estudios mencionan en sus resultados que varias especies de *T. domingensis* poseen tolerancia y eficiencia en la retención de contaminantes y nutrientes (Singh et al. 2011). En el Paraguay se propone utilizar la “totora” como una alternativa al tratamiento de depuración de recursos hídricos contaminados, problemática que actualmente enfrenta diversos recursos hídricos del Paraguay como el Lago Ypacaraí y la costanera de la bahía de Asunción.

Algunos autores señalan que la estrategia de regeneración de *T. domingensis* consiste en dispersar sus semillas para permitir la colonización de nuevas áreas y luego expandirse y además, mantener su población a través de la reproducción vegetativa, ya que puede propagarse de forma eficiente por medio de rizomas (Smith et al., 2002).

La germinación de semillas *in vitro* permite obtener material para el establecimiento de protocolos de propagación masiva. De esta manera, las plántulas obtenidas pueden ser empleadas como fuente de explantes asépticos para la multiplicación a gran escala de plantas libres de enfermedades y como un medio de propagación para comenzar la explotación biotecnológica de esta especie.

Considerando que esta especie está poco estudiada respecto a su germinación y cultivo, esta investigación se propuso desarrollar un protocolo de multiplicación

masiva en condiciones de laboratorio e invernadero, por ello se plantearon como objetivos: estudiar la calidad fisiológica de las semillas cultivadas *in vitro*, evaluar la germinación en laboratorio y su posterior adaptación en invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y período experimental

Los experimentos fueron desarrollados en el laboratorio de Biotecnología e invernadero de la Dirección General del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (DGCEMIT) dependiente de la Universidad Nacional de Asunción (UNA), Campus San Lorenzo, en el periodo comprendido entre los meses de abril y noviembre del año 2013.

Material vegetal

En el mes de enero del año 2013 fue realizada la colecta de semillas, seleccionando espigas provenientes de rodales de plantas de *T. domingensis* denominadas comúnmente “totoral” situados en humedales del Departamento de Ñeembucú, Paraguay. Las espigas que presentaban buen aspecto sanitario fueron almacenadas envueltas en papel adsorbente a temperatura ambiente hasta su utilización. El material de herbario fue depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción (Herbario FCQ) O. Aquino y A. Samudio 171 (FCQ).

Determinación del peso de mil semillas de *T. domingensis*

Para determinar el peso de mil semillas de *T. domingensis*, fueron seleccionadas 100 semillas (semillas compuestas por toda la porción de la semilla) al azar y fueron pesadas en la balanza analítica, este procedimiento se realizó en ocho repeticiones, las semillas fueron contabilizadas utilizando el contador de semillas electrónico de la marca Pfeuffer®. El resultado se extrapoló a mil semillas. Los procedimientos fueron realizados según las reglas ISTA (2014).

Determinación del vigor de semillas por el método de envejecimiento acelerado.

La prueba de envejecimiento acelerado fue realizada según el Manual de Pruebas de Vigor (International Seed Testing Association, 1995). Para la selección de semillas viables (semillas vivas), se procedió a la técnica de separación mediante flotación, en donde las semillas que flotaban, fueron descartadas, y las que se encontraban sumergidas fueron seleccionadas para el ensayo, asegurando de esta manera que todas las semillas seleccionadas tengan 100 % de probabilidad de germinación. De esta manera se seleccionaron un total de 1200 semillas para el ensayo, cada unidad experimental fue representada por una cámara conteniendo 100 semillas, se contaron con cuatro repeticiones (cuatro cámaras) por cada tratamiento ($T_1=0$ hs a 45 °C, $T_2=12$ hs a 45 °C y $T_3=24$ hs a 45 °C) teniendo de esta manera 12 unidades experimentales. La cámara de plástico contuvo 100 mL de agua (cámara interna con 100% de humedad relativa), una vez terminada la siembra, las cámaras fueron transferidas a una estufa de envejecimiento acelerado a 45 °C, por el tiempo requerido para cada tratamiento. Una vez concluido el periodo de envejecimiento, las bandejas fueron trasladadas al cuarto de cultivo y mantenidas a una temperatura de 28 °C. Las variables analizadas fueron: porcentaje de germinación, longitud del epicotilo y longitud del hipocotilo.

Se contabilizó en porcentaje de germinación en todos los tratamientos a los 7 días a partir de la siembra, los datos fueron registrados en días. A los 10 días a partir de la siembra, se procedió a la determinación de la longitud del epicotilo y del hipocotilo mediante la utilización de una regla milimetrada bajo una lupa estereoscópica, este procedimiento fue realizado en todos los individuos de todos los tratamientos, los datos fueron registrados en mm (milímetro).

Porcentaje de germinación en diferentes sustratos

La unidad experimental estuvo constituida por cajas *Gerbox*® de 15 cm de lado, por 10 cm de altura conteniendo 150 semillas de *T. domingensis* en cada una. El diseño experimental empleado fue completamente al azar (9 tratamientos con 3 repeticiones dando un total de 27 cajas), con arreglo factorial 3 x 3, siendo el factor 1 diferentes sustratos: agua, turba y arena y el factor 2 diferentes condiciones de temperatura 20, 25 y 30 °C. De esta manera se tuvieron los siguientes tratamientos:

- T1: Agua / 20 °C
- T2: Agua / 25 °C
- T3: Agua / 30 °C
- T4: Turba / 20 °C
- T5: Turba / 25 °C
- T6: Turba / 30 °C
- T7: Arena / 20 °C
- T8: Arena / 25 °C
- T9: Arena / 30 °C

Las semillas fueron desinfectadas previamente, mediante una inmersión en alcohol al 70 %, durante 20 segundos, luego en una solución de hipoclorito de sodio (1:3) por 20 segundos, seguido de un triple enjuague con agua destilada esterilizada. El lavado y siembra de las semillas fueron realizadas bajo la campana de flujo laminar.

La esterilización de las cajas y de los sustratos (agua, arena, turba comercial *Ortek*®) se realizó en autoclave a 1 atm de presión a 121 °C de temperatura durante 50 minutos. Para la siembra se procedió al cargado de las cajas con sustrato hasta la mitad de la capacidad, posteriormente en cada caja fueron sembradas 150 semillas y se agregó agua esterilizada hasta el punto de saturación. Seguidamente cada caja fue tapada con plástico transparente para evitar la pérdida de humedad. Las cajas *Gerbox*® sembradas fueron transferidas al cuarto de cultivo y mantenidas a las condiciones establecidas para cada tratamiento. Se registraron datos de la germinación hasta el día 15 posterior a la siembra.

Para la evaluación se calcularon los porcentajes de germinación medios con el 95 % límite de confianza para cada tratamiento. Los resultados fueron sometidos a un análisis multifactorial de ANOVA y test de Tukey mediante el software para análisis estadístico *InfoStat*®.

Adaptación en invernadero

A las 4 semanas a partir de la siembra en el cuarto de cultivo, el tratamiento con mayor porcentaje de germinación (sustrato y temperatura) fueron trasplantadas en un sistema de flotación / hidropónico, compuesto por bandejas de poliestireno 35 por 70 cm de 120 celdas depositadas en contenedores con 70 litros de capacidad. El medio líquido estuvo compuesto por agua y nutrientes requeridos por la planta.

Para la evaluación de la adaptación en invernadero, se realizó el recuento de plantas normales a los 60 días a partir del trasplante y se expresó en porcentaje de plantas normales. (Plantas normales son aquellas plantas con potencial para su desarrollo cuando crecen en suelo de buena calidad y bajo condiciones favorables de humedad, luz y temperatura). Se tomaron como control para comparar plantas de *T. domingensis* germinadas y desarrolladas naturalmente en un humedal ubicado en la ciudad de Itá (Dpto. Central, Paraguay), en el mismo periodo de tiempo (aproximadamente 90 días).

Se establecieron de esta manera para considerar plantas normales: la altura mínima de 50 cm, coloración verde oscura y sin deformidades.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del peso de mil semillas de T. domingensis

En el presente estudio, el pesaje de 100 semillas arrojó un peso promedio de 6,9325 mg. De esta manera se extrapoló a 1000 semillas, resultando un peso de 69,325 mg, como se puede observar en la **Tabla 1**. Fernández et al. (2001) mencionan que la infrutescencia de la *T. domingensis* produce gran cantidad de semillas, se estima que puede variar en el orden de 20.000 a 700.000 frutos, estos son de un tamaño muy pequeño. Los mismos autores indican que el peso de 100 semillas es de 5 mg.

Tabla 1. Peso de mil semillas de *T. domingensis*.

Cantidad de semillas	Peso promedio	C.V.	Peso del mil semillas
100	6,9325 mg	3,80%	69,325 mg

C.V.: Coeficiente de Variación.

Determinación del vigor de las semillas por el método de envejecimiento acelerado ISTA (1995).

Para la germinación de una semilla deben cumplirse tres condiciones (Hartman y Kester, 1980): que el embrión sea viable (que esté vivo), que los factores externos sean favorables y que no presente factores internos que impidan la germinación. Para este ensayo fueron utilizadas semillas consideradas 100 % viables, asegurando de esta manera el tiempo de exposición a 45 °C como único factor variable. En la **Tabla 2** se aprecia que el lote de semillas que no fue expuesto al envejecimiento acelerado tuvo un porcentaje de germinación del 99,25 %. El lote de semillas que estuvo expuesto a 45 °C por un periodo de 12 hs obtuvo un 73,5 % de germinación, disminuyendo un 26 % su poder germinativo comparadas con el lote que no fue envejecido, así mismo el lote de semillas mantenidas a 45 °C por un periodo de 24 hs obtuvo un porcentaje de germinación de 63,75 % disminuyendo su poder germinativo 35,8 %, sin embargo comparando con el lote que fue expuesto a 12 hs a 45 °C el poder germinativo sólo se redujo un 13,2 %.

Tabla 2. Efecto del deterioro sobre la germinación y crecimiento inicial de semillas de *T. domingensis*, en condiciones de laboratorio.

Variables	Horas de envejecimiento			C.V
	0hs/45°C	12hs/45°C	24hs/°C	
Germinación (%)	99,25 A	73,04 B	63,75 C	6,19
Long. Epicotilo (mm)	22,04 A	19,97 A B	15,98 B	12,33
Long. Hipocotilo (mm)	20,07 A	16,91 A B	10,31 B	19,85

Los lotes de semillas que muestran una elevada germinación en condiciones óptimas, pero luego del deterioro por envejecimiento acelerado bajan notablemente su poder germinativo o produce grandes cantidades de plántulas deformes, son considerados de bajo vigor, de esta manera nos indicaría un bajo desempeño en condiciones de estrés.

Ocurre lo contrario con lotes de semillas con una alta germinación en condiciones óptimas, que luego del envejecimiento acelerado no reduce en gran medida el porcentaje de germinación y no produce cantidades considerables de plántulas anormales, estas semillas son consideradas de alto vigor y con mejor capacidad para soportar condiciones de estrés. Hampton y Tekrony (1995) consideran que aquellos lotes de semillas que presenten una germinación después del envejecimiento acelerado superior al 80 %, podrían ser clasificadas como de alto vigor, entre 60-80 % como vigor medio, y menores de 60 %, como de bajo vigor. En este ensayo las semillas de *Typha* sometidas a 45 °C durante 12 hs disminuyeron su germinación en un 26 % obteniendo 74 % de germinación comparando con el lote que no fue sometido a envejecimiento obteniéndose diferencias significativas, en cuanto a la longitud del epicotilo y del hipocotilo no se observaron diferencias significativas respecto a las semillas que no fueron envejecidas. El lote de semillas que fue sometido a 45 °C durante 24 horas redujo su germinación en un 35,8 %, en cuanto a la longitud del epicotilo y del hipocotilo, hubo diferencias significativas con respecto al lote de semillas que fue sometido a 45 °C durante 12 hs y al lote de semillas que no fue sometido a envejecimiento (testigo). En este ensayo se observó un deterioro progresivo según aumentaba el tiempo de exposición de las semillas a 45 °C, sin embargo la tasa de deterioro fue mayor en las semillas que fueron expuestas durante 12 hs, que durante 24 hs. Según Delouche (1976), el deterioro tiene una connotación negativa, en tanto que el vigor tiene una muy positiva, de este modo, el vigor disminuye a medida que el deterioro aumenta. El deterioro es el proceso de envejecimiento y muerte y el vigor es el principal componente de calidad afectado por el proceso de deterioro.

Porcentaje de germinación *T. domingensis*

Si bien la germinación se produjo en todos los regímenes de temperatura (**Fig. 1**), se puede observar un aumento considerable a los 30 °C, así tenemos que el tratamiento con mayor porcentaje de germinación es el tratamiento con sustrato Turba con 89,5 % de germinación seguidos por sustrato Agua y Arena, 57,3 y 55,7 %. Estos valores coinciden con el trabajo realizado por Lorenzen et al. 2000 donde obtuvieron un 85 %

de germinación en semillas de *T. domingensis* sembradas en sustrato turba a un régimen de temperatura de 30 °C.



Fig. 1. Germinación de una semilla de *T. domingensis* 3 días posteriores a la siembra.

En la **Tabla 3** podemos observar que el tratamiento Turba a 30 °C es el que registró mayor porcentaje de germinación (89 %). Haciendo un análisis podemos observar que el factor Temperatura es el factor principal del diseño experimental, disminuyendo considerablemente la germinación a temperaturas más bajas (25 y 20 °C). Así tenemos que el promedio de germinación de los distintos tipos de sustrato a 30 °C fue de 67,55 %, a 25 °C se registró 11,15 % y a 20 °C casi nula germinación con menos de 1 %.

Tabla 3. Germinación de semillas de *T. domingensis* a diferentes temperaturas y diferentes sustratos.

Temperatura	Sustrato	Medias n	% Germinación	TT
30°C	Turba	134	89,55	A
	Agua	86	57,33	B
	Arena	83	55,77	B
25°C	Agua	28	18,8	C
	Turba	12	8	D
	Arena	10	6,66	D E
20°C	Agua	1	1	D E
	Turba	0	0,44	E
	Arena	0	0,22	E

TT: Test de Tukey: Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí, medias seguidas por letra diferente difieren entre sí, en el nivel de significancia del 5 %.

Adaptación en invernadero

En una bandeja de poli estireno se trasplantaron 134 plantines, las cuales provinieron del tratamiento turba a 30 °C, el cual obtuvo el mayor porcentaje de germinación (**ver Tabla 3**). Los plantines trasplantados en invernadero tuvieron un 100 % de

de prendimiento (**Fig. 2**), el 100% de las plantas presentaron altura mayor a 50cm, el 100% de las plantas tuvieron una coloración verde oscura y el 100% de las plantas no presentaron deformaciones al cabo de 60 días posteriores al trasplante como se aprecia en la **Tabla 4**. De esta manera, todas las plantas presentaron condiciones aptas para desarrollarse a campo y ser utilizadas en sistemas de fito-depuración de aguas (**Fig. 3. A-B**).



Fig. 2. Plantines de *T. domingensis* en sistema de flotación en invernadero.

Tabla 4. Parámetros de adaptación en plantas de *T. domingensis* obtenidas en invernadero.

Mayor de 50 cm	Verde oscura	Sin deformaciones	Total
134	134	134	134 plantas normales
0	0	0	0 plantas anormales



Fig. 3. A-B. *T. domingensis*. A. Planta adulta. B. Dispersión de frutos.

CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos se pudo observar que la mejor condición de germinación de semillas de *T. domingensis* es a un régimen de temperatura de 30°C en un medio de sustrato de tipo turba. Que el factor determinante en la germinación es la temperatura, disminuyendo el porcentaje de germinación a regímenes de temperaturas entre 25 y 20°C.

Las semillas de *T. domingensis* se mantienen viables aún sometidas a envejecimiento acelerado.

La producción de plantas a partir de semillas en vivero es muy factible. Si la producción se hace desde semilla se puede elegir la especie de *Typha* que se desea propagar, teniendo en cuenta que las propiedades de depuración de la planta aumentan o disminuyen según la especie.

En lo que respecta a las plántulas y labores de vivero, se debe realizar un seguimiento cuidadoso del estado de los lotes de plantas, ya que la incidencia de plagas y enfermedades es mayor.

Teniendo en cuenta que, para la implantación de sistemas de depuración de aguas utilizando plantas requiere una gran cantidad de las mismas, con este trabajo se demostró que es posible generar miles de plantas de buena calidad a partir de semillas.

AGRADECIMIENTOS

A la Ing. Agr. Olga Aquino por las sugerencias realizadas para el presente trabajo. Al Dpto. de Botánica de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción por la recepción e identificación de muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bianco, S., Pitelli, R. A. y Pitelli, A. M. (s.f.). Leaf area estimation in *Typha latifolia* using leaf blade linear dimensions. *Planta Daninha*. Recuperado el 3 de diciembre de 2014, de http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010083582003000200011&script=sci_arttext&tln=es
- Degen, R. y Mereles, F. (1999). *Typhaceae*. *Flora del Paraguay*, (28), 7-15.
- Delouche, J. y Baskin, C. (1973). Accelerated ageing techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Technology Laboratory*. Mississippi-Estados Unidos: Mississippi State University.
- Fernandez, J., Beascochea, M., Muñoz, J. y Fernandes, M. (2001). Manual de fitodepuración. Filtros de macrofitas en flotación. Recuperado el 3 de diciembre de 2014, de <http://www.fundacionglobalnature.org/macrophytes/documentacion/Cap%EDtulos%20Manual/Cap%EDtulos%207.pdf>
- Hartman, H. y Krester, D. (1980). *Propagación de plantas. Principios prácticos*. México: Compañía Editorial Continental S. A.

- Hampton, J. y Tekrony, D. (1995). *Handbook of vigour test methods*. ISTA. (3^a. ed.). Zurich-Suiza.
- International Seed Testing Association (ISTA) (2014). *International Rules for Seed Testing*. Zurich-Suiza.
- Pensiero, J. y Gutiérrez, H. (2005). *Flora vascular de la provincia de Santa Fe*. Santa Fe-Argentina: Universidad Nacional del Litoral.
- Simpson, M. (2005). *Typhaceae. Plant Systematics*. California-Estados Unidos: Elsevier Academic Press.
- Singh, D., Richa G y T. Archana. 2011. *Typha*: an Aquatic Macrophyte with Potential Use in Phytoremediation of Wastewater. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*, Vol. 1 (4).
- Smith, R., Shiel, D., Millward, P., Corkhill, R. y Sanderson A. (2002). Soil seed banks and the effects of meadow management on vegetation change in a 10-year meadow field trial. *Journal of Applied Ecology*, 39 (2), 279–293.
- Haston, E., Richardson, J., Stevens, P. F., Chase, M. W., y Harris, D. J. (s.f.). Typhaceae. Angiosperm Phylogeny Website. Recuperado el 30 de enero de 2015, de http://www.researchgate.net/profile/Elsbeth_Haston/publication/227664621_The_Linear_Angiosperm_Phylogeny_Group_%28LAPG%29_III_a_linear_sequence_of_the_families_in_APG_III/links/00b495245476a02b37000000.pdf
- Lorenzen, B., Brix, H., Mckee, K., Mendelssohn, I. y S. Miao. (s.f.). *Seed germination of two Everglades species, Cladium jamaicense and Typha domingensis*. *Aquatic Botany* 66, 169-180. Recuperado el 28 de noviembre de 2014, de [http://www.mit.biology.au.dk/~biohbn/cv/pdf_files/Aquatic%20Botany%2066%20\(2000\)%20169-180.pdf](http://www.mit.biology.au.dk/~biohbn/cv/pdf_files/Aquatic%20Botany%2066%20(2000)%20169-180.pdf)