

MUPLICACIÓN IN VITRO DE *Myrocarpus frondosus* Allemão “incienso” A PARTIR DEL ESTABLECIMIENTO DE SEMILLAS

MUPLICATION IN VITRO OF *Myrocarpus frondosus* Allemão “incienso” FROM SEEDS ESTABLISHMENT

Fecha de recepción: 26/03/2014 // Fecha de aceptación: 07/10/2014

Ana María Noguera

Mgter en Biotecnología, Lic. en Genética, docente investigador Facultad de Ciencias Forestales, Bertoni 124 Eldorado.
amnogue@arnet.com.ar

Micaela Evelin Martinez

Mgter en Biotecnología, Ing. Ftal, docente investigador Facultad de Ciencias Forestales, Bertoni 124 Eldorado.
micaevelin@yahoo.com.ar

Cristina Raquel Padilla

Mgter en Biotecnología, Ing. Ftal.
cristinapadilla.ing@gmail.com

Paola Duarte

Prof. en Biología, FCF

RESUMEN

Myrocarpus frondosus Allemão “incienso” es una especie leñosa con aptitudes maderables, la tala selectiva y la reducción de la superficie boscosa ha llevado a su disminución y consecuen- te pérdida de variabilidad genética. La propagación *in vitro* es una herramien- ta para la conservación de germoplas- ma y la propagación de árboles selectos. El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar la fase de establecimiento y multiplicación *in vitro* de *M. frondo- sus*. Se ensayaron tratamientos de des- infección en semillas para su estableci- miento utilizando, hipoclorito de sodio en distintas concentraciones y tiempo de exposición. En la multiplicación de ápices y segmentos nodales de plán- tulas *in vitro* se estudiaron diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopu- rina (6-BAP, 0,1; 0,25; 0,5 y 1 mg/L) y ácido naftalenacético (ANA, 0,1 mg/L). Se obtuvo en el establecimiento de se- millas un 6,5% de germinación al tra- tarlas con solución de hipoclorito de sodio al 3%. La mejor respuesta en la multiplicación se logró con la concen- tración ensayada de 1 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L de ANA.

Palabras Clave: Micropropaga- ción, Fabaceae.

SUMMARY

Myrocarpus frondosus Allemão “incienso” is a species with excellent qualities for timber. Its selective felling combined with the loss of woodland as a result of advancing agriculture areas has reduced its presence and as a conse- quence the loss of genetic variability. The micropropagation of vegetal spe- cies offers an important tool for con- serving germoplasm and for propagat- ing selected trees. The objective of the present research work consisted in de- veloping a protocol for establishment and multiplication of *M. frondosus*. Different disinfection treatments for seeds were tested with sodium hypo- chlorite solution at different concen- trations and exposition times.

In the multiplication phase, dif- ferent treatments were tested with 6-Bencilaminopurina (6-BAP at 0,1; 0,25; 0,5 y 1 mg/L) y Naftalenacetic acid (ANA at 0,1 mg/L). For estab- lishment a 6,5 % of germination was obtained in the treatment with a so- dium hypochlorite solution at 3%. The best answer in the multiplication was obtained with 1 mg/L 6-BAP and 0,1 mg/L ANA concentrations.

Key words: micropropagation, Fabaceae.

INTRODUCCIÓN

M*yrocarpus frondosus* Allemão (Fabaceae) conocida como “incienso”, especie leñosa de gran porte, habita bosques semihúmedos y franjas de transición entre bosques altos y bosques bajos. La caracteriza la presencia de resina aromática (bálsamo). Posee flores pequeñas agrupadas en racimo; su fruto es una sámara que lleva una a dos semillas.

Posee una madera de alto valor económico tanto en el mercado nacional como internacional. Es utilizada en mueblería, la madera es dura, pesada, con diseño vetado suave, brillo mediano, textura mediana y de grano derecho u oblicuo, presenta resistencia mecánica con buena durabilidad (GARTLAND et al. 1993). Además es una especie melífera.

El principal problema que presenta *M. frondosus*, es la escasez de semillas aptas para la siembra, además la cantidad de árboles por hectárea es muy baja y limita aún más la disponibilidad de semillas. Por otro lado las mismas son frágiles y preferentemente hay que cosecharlas del árbol, ya que cuando caen los frutos se pudren rápidamente, debido a la humedad del bosque y la cobertura tan delicada que posee la semilla no la protege, así mismo, las semillas de “incienso” son recalcitrantes y de baja viabilidad (CORVALHO 1982, EIBL et al. 2002) por lo tanto la conservación de los frutos, no debe exceder los tres meses para garantizar una cierta viabilidad (LORENZI 1999). Es también frecuente la presencia de contaminantes endógenos (TEIXEIRA 1993).

Desde esta problemática, se plantea que las técnicas biotecnológicas son una de las herramientas para la conservación y multiplicación de esta especie.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales tiene una aplicación práctica en la clonación, conservación, y manipulación del material vegetal (JIMÉNEZ GONZÁLES 1998). Esta técnica permite la propagación de árboles y proporciona una ventaja económica importante a la industria forestal, permitiendo la propagación masiva de plantas iguales (clones) provenientes de árboles selectos, garantizando de esta manera la genética del material vegetal. Además permite reducir las dificultades presentes, tales como los largos períodos de maduración, la baja viabilidad de las semillas y la dificultad que presentan algunos individuos de propagarse por métodos tradicionales.

Según investigaciones en especies leñosas un adecuado balance de auxinas y citoquininas es indispensable para el éxito del cultivo *in vitro* y la formación de plantas a partir de los diferentes tipos de explantes (JIMÉNEZ GONZÁLES 1998). Se ha descrito para

muchas especies leñosas la necesidad de suplementar al medio de cultivo MURASHIGE y SKOOG (MS) con 6-BAP (6-Bencilaminopurina) o BA (benciladenina). GUEVARA-BERGER et al. (1992) realizaron investigaciones con yemas apicales y entrenudos de plantas jóvenes de *Cedrela tonduzii* “cedro dulce”, aplicando BA (0,5 mg/L), mientras RODRÍGUEZ et al. (2003) lograron buenos niveles de multiplicación en *C. odorata* “cedro” y *Swietenia macrophylla* X *Swietenia mahogani* “caoba híbrida” con la adición de 6-BAP (0,5 mg/L) en el medio de cultivo.

Es posible la micropropagación *in vitro* de *M. frondosus* utilizando técnicas de la biotecnología, ante la necesidad de rescatar especies forestales nativas de la selva misionera, que pueden estar bajo amenaza de extinción y que presentan dificultades para propagarse y que poseen valor económico.

El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de una metodología para la germinación de semillas *in vitro* de *M. frondosus*, y evaluar medios de cultivo para su multiplicación *in vitro* que permitan generar una técnica para mejorar su producción, rescate y conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Propagación Vegetativa de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM), Eldorado, Misiones, durante el período comprendido entre diciembre de 2009 y abril 2011.

El material vegetal utilizado para el estudio fueron, semillas provenientes de árboles semilleros de “incienso” de origen y procedencia Guaraní, Misiones, cosecha 2009. Las mismas, a la semana de cosechadas, fueron tratadas de la siguiente manera: se realizaron cortes de las alas del fruto, luego se efectuó un enjuague con hipoclorito de sodio al 0,5% (en condiciones de laboratorio) y en cabina de flujo laminar se realizó la escarificación y desinfección de las mismas, con alcohol al 70% durante 60 segundos, seguido del tratamiento con una solución de hipoclorito de sodio al 1% y otro tratamiento al 3% durante 15 min en agitación, realizando luego un triple enjuague con agua destilada estéril. Posteriormente se extrajeron las cubiertas seminales y se procedió a una segunda desinfección con alcohol al 70% por 30 s seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 min, con triple enjuague en agua destilada estéril.

En la fase de multiplicación los explantes evalua-

dos fueron, ápices caulinares y segmentos uninodales de 1 cm conteniendo al menos una yema, provenientes de plántulas germinadas *in vitro*.

El medio de cultivo basal empleado fue MURASHIGE y SKOOG (1962) (MS), suplementado con sacarosa al 2%, en estado semisólido gelificado con 0,8% de agar. El pH del medio de cultivo fue de 5,8 y se esterilizó en autoclave a 121°C de temperatura y 1,2 kg/cm² de presión durante 20 min.

Las condiciones de cultivo fueron 27 °C +/- 2 °C, empleando un fotoperíodo de 16 horas luz fría.

Durante la multiplicación se evaluaron los siguientes reguladores de crecimiento: Ácido naftalenacético (ANA), 6-bencilaminopurina (6-BAP) y se realizaron subcultivos cada 45 días para determinar el coeficiente de multiplicación.

En los subcultivos 1, 2 y 3 los explantes se multiplicaron en medio MS completo y suplementado con 1 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L ANA, 2% sacarosa y 0,8% agar.

A partir del cuarto subcultivo se evaluaron los siguientes tratamientos: (1) 0,1 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L de ANA; (2) 0,25 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L de ANA; (3) 0,5 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L de ANA; y (4) 1 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L de ANA.

El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorizado, con una distribución factorial de los tratamientos. La unidad experimental estuvo constituida por cada uno de los explantes evaluados. La variación entre los tratamientos fue analizada aplicando análisis de varianza (ANOVA). Cuando el ANOVA indicó diferencias entre las medias de los tratamientos, se aplicó el Test Duncan para determinar si los tratamientos presentaron diferencias significativas, con $\alpha = 0.05$, para las variables evaluadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento a partir de semillas de *M. frondosus*

En el tratamiento de desinfección de semillas con hipoclorito de sodio al 1%, el porcentaje de desinfección fue del 36% de las semillas tratadas y el 64% restante se contaminaron con hongos. En las semillas tratadas con hipoclorito de sodio al 3%, se logró un 6,5% de semillas germinadas *in vitro* (**Figura 1**); si bien un 12,4% de las mismas presentaron contaminación con hongos (porcentaje menor al que mostró el tratamiento con hipoclorito al 1%); el 80,4% de las semillas de este tratamiento mostraron contaminación con bacterias endógenas (**Gráfico 1**), las cuales no se observaron en el tratamiento con hipoclorito de sodio al 1%, debido a la alta tasa de contaminación úngica que presentó.



Figura 1. Plántulas de *M. frondosus* germinadas *in vitro*, a los 60 días de establecidas.

Figure 1. Young plants of *M. frondosus* developed *in vitro*, after 60 days of the establishment.

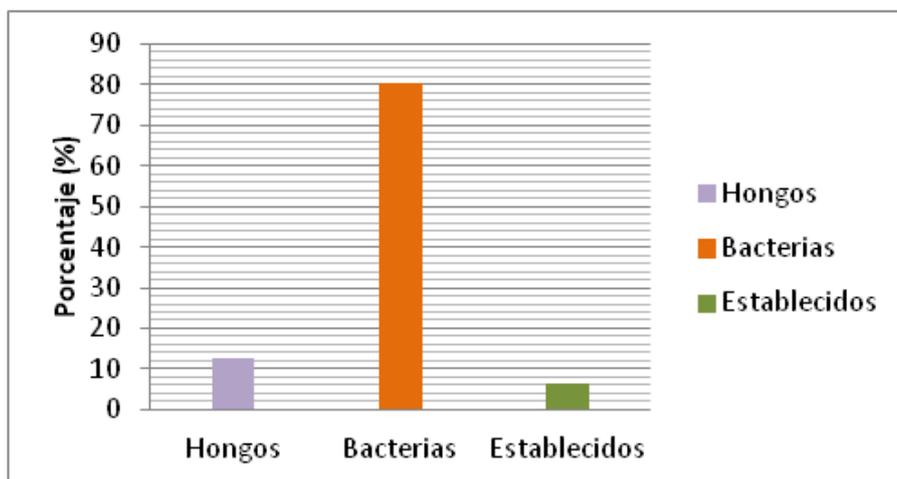
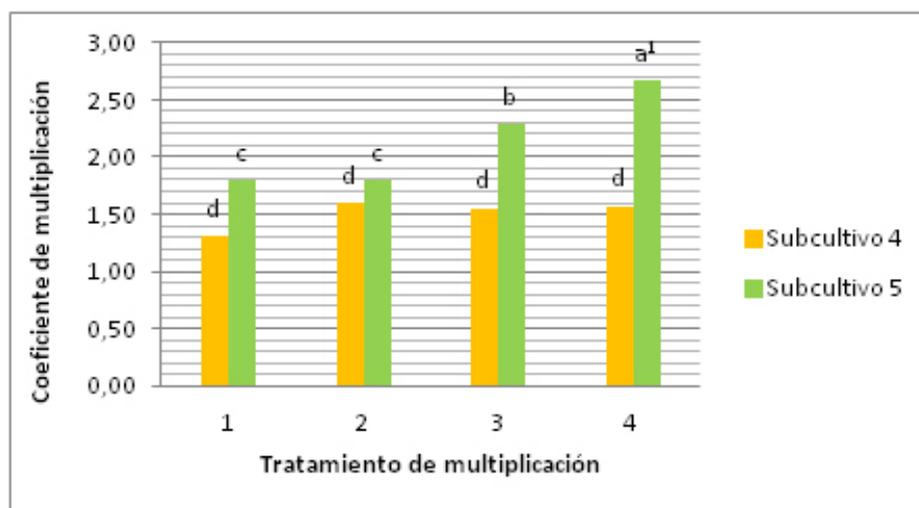


Gráfico 1. Resultados del establecimiento de semillas de *M. frondosus* tratadas con una solución de hipoclorito de sodio al 3%.

Graphic 1. Results of *M. frondosus* seeds establishment treated with 3 % sodium hypochlorite solution.



¹Tratamientos identificados con letras iguales, en el mismo subcultivo, indican que no son significativamente distintos dado $\alpha=0.05$ según comparación múltiple de medias de Duncan, para la variable Coeficiente de multiplicación.

Gráfico 2. Coeficiente de multiplicación de brotes de *M. frondosus* desarrollados a partir de ápices y segmentos nodales, con distintas concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento durante el cuarto y quinto subcultivo, a los 45 días de cultivo.

Graphic 2. *M. frondosus* nodal segment multiplication rate using different growth regulator concentration and combination during the fourth and fifth subculture.

Multiplicación a partir de plántulas *in vitro* de *M. frondosus*

Tras efectuar el análisis de varianza (ANOVA) para la variable coeficiente de multiplicación, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados en el subcultivo 4. En cambio, en el subcultivo 5 se observaron diferencias significativas entre los tratamientos; los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento 4 (1 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L de ANA) con un coeficiente de multiplicación de 2,66, seguido del tratamiento 3 (0,5 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L de ANA) con coeficientes de 2,29 (**Gráfico 2**).



Figura 2. Brotes de *M. frondosus* desarrollados a partir de un segmento nodal durante el tercer subcultivo, con 40 días.
Figure 2. Buds of *M. frondosus* developed from a nodal segment during the third subculture.

Como se ha descrito en la bibliografía para muchas especies leñosas y como refiere MROGINSKI *et al.* (2004), se observó que el regulador de crecimiento 6-BAP promueve significativamente la proliferación y diferenciación de brotes (**Figura 2**). Además, se observó que los brotes obtenidos en los medios suplementados con las mayores dosis de 6-BAP (tratamiento 3 y 4) presentaban mejores condiciones en cuanto a color de hojas y desarrollo de los entrenudos.

CONCLUSIÓN

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se arribaron a las siguientes conclusiones: (1) el mayor porcentaje de explantes de “incienso” se logra a partir de la germinación de semillas desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 15 minutos; (2) el mayor número de brotes en la fase de multiplicación *in vitro* se obtiene con medio de cultivo MS completo suplementado con las concentraciones de 1 mg/L de 6-BAP y 0,1 mg/L de ANA. Sobre la base de los datos obtenidos se plantean los siguientes propósitos: (1) realizar ensayos con semillas de 1 a 15 días de cosechadas; (2) repetir los tratamientos que dieron los resultados más promisorios y (3) continuar con ensayos de enraizamiento de la especie.

BIBLIOGRAFÍA

CORVALHO P.E.R., 1982. Resultados experimentais de especies madeireiras nativas no Estado do Parana. En Anais do Congresso Nacional sobre essencias nativas. Silvicultura en Sao Paulo. Editorial especial Revista Do Instituto Forestal Sao Paulo Brasil. 16(2): 747-765.

EIBL, B.; Bohren A.; Mendez R.; Sosa G.; Di Stasi M. 2002. Pecom Forestal SA/FCF, UNaM. Especies forestales nativas de la selva paranaense, Fichas de divulgación: Ficha 19 de 30 y anexos.

GARTLAND, H. M.; Bohren, A. V.; Grance L. A. 1993. Ficha técnica Árboles de Misiones: *Myrcarpus frondosus* Allem. Fr. Revista Yvyrareta 4(4): 24-25.

GUEVARA-BERGER, E.; Hidalgo-Dittel, N.; Murillo-Gamboa, O. 1992. Cultivo *in vitro* de cedro dulce (*Cedrela tonduzii*); Organization for Tropical Studies; Revista Tecnología en Marcha 11(3): 10-16.

JIMÉNEZ GONZÁLES, E. 1998. Generalidades del Cultivo *in vitro*; Propagación y mejora de plantas por Biotecnología; Pérez Ponce J. (ed.); pp. 13-24.

LORENZI, H. 1999. *Árvoreis Brasileiras*, Manual de identificación y cultivo de plantas arbóreas del Brasil, Vol.1, 2º Edición; Instituto Plantarum De Estudos Da Flora LTDA.

MROGINSKI, L.; Sansberro, P.; Flaschland, E. 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Echenique, V.; Rubinstein, C. y Mroginski L. (eds.); Ediciones INTA, RA.; 2 (2): 35-42.

MURASHIGE, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Phys Plant. 15: 473-493.

RODRÍGUEZ, R.; Daquinta, M.; Capote, I.; Pina, D.; Lezcano, Y.; González-Olmedo, J.L. 2003. Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* X *Swietenia mahogany* (caoba híbrida) y *Cedrela odorata* (cedro). Cultivos Tropicales 24: pp 23-27

TEXEIRA J.B. 1993. Limitações ao proessesos de cultivo *in vitro* de especies lenhosas EMBRAPA. Recursos genéticos e Biotecnología. Brasilia, Brasil.