

REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *RHABDADENIA RAGONESEI* (APOCYNACEAE) POR CULTIVO *IN VITRO* DE EXPLANTES FOLIARES

EDUARDO FLACHSLAND^{1, 2}, AURELIO SCHININI^{1, 3}, GRACIELA TERADA^{1, 2}, GRACIELA FURST^{2, 4} & LUIS A. MROGINSKI^{1, 2, 5}

Summary: Flachsland, E., A. Schinini, G. Terada, G. Furst & L. A. Mroginski. 2005. Plant regeneration of *Rhabdadenia Ragonesei* (Apocynaceae) by *in vitro* culturing of leaf explants. Bonplandia 14(1-2): 91-96. ISSN: 0524-0476.

Plants of *Rhabdadenia Ragonesei* Woodson (Apocynaceae) were regenerated *in vitro* from leaves explants. The procedure employed includes: 1) Surface sterilization of leaves by immersion in 70% ethanol (10 s) followed by 1,1%NaOCl (15 min) and three wash with sterile distilled water. 2) Callus and buds induction by culture on Murashige and Skoog medium (MS) + 3 mg/L benzyladenine (BAP). 3) Subculture of callus and buds on MS + 1 mg/L BAP, and 4) Rooting on MS + 0.5 mg/L naftalenacetic acid.

Key words: *Rhabdadenia Ragonesei*, Apocynaceae, Iberá, *in vitro* regeneration.

Resumen: Flachsland, E., A. Schinini, G. Terada, G. Furst & L. A. Mroginski. 2005. Regeneración de plantas de *Rhabdadenia Ragonesei* (Apocynaceae) por cultivo *in vitro* de explantes foliares. Bonplandia 14(1-2): 91-96. ISSN: 0524-0476.

Se regeneraron plantas de *Rhabdadenia Ragonesei* Woodson (Apocynaceae) mediante el cultivo *in vitro* de explantes foliares en condiciones ambientales controladas. El procedimiento consistió en: 1) Desinfección de las hojas por inmersión en etanol al 70% (10 s) seguida de inmersión en NaOCl al 1,1% (15 min) y lavado tres veces con agua destilada estéril. 2) Inducción de callos y yemas mediante el cultivo de explantes foliares en el medio de Murashige y Skoog (MS) + 3 mg/L de benciladenina (BAP). 3) Subcultivo de callos y yemas en MS + 1 mg/L de BAP y 4) Enraizamiento de los vástagos obtenidos en MS + 0,5 mg/L de ácido naftalenacético.

Palabras clave: *Rhabdadenia Ragonesei*, Apocynaceae, Iberá, regeneración *in vitro*.

Introducción

La flora nativa sudamericana posee una diversidad genética, cuya conservación y

aprovechamiento ha motivado la ejecución de proyectos regionales (Mc Nely & al., 1990; WCMC, 1992). Fomentar y dirigir estudios de alternativas de protección y manejo de los recursos en aquellas áreas con vegetación re-

¹ Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE). Sargento Cabral 2131. Corrientes (3400). Argentina

² Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE)

³ Miembro Carrera de Personal de Apoyo del CONICET

⁴ Becaria de Prestación de Servicios

⁵ Miembro de la carrera del Investigador Científico, CONICET

Autor/correspondencia: Eduardo Flachsland: bifoliumar@yahoo.es

lativamente intacta, constituye una tarea prioritaria de los estados y de organismos gubernamentales, manifestado en el Convenio Sobre Diversidad Biológica ratificado por la Argentina en la Ley 24.375/94. Por otra parte el interés en la utilización ornamental de plantas nativas cobró impulso nacional en los últimos años motivando numerosos estudios de prospección y domesticación de especies (Hashimoto & al., 2004).

Rhabdadenia Ragonesei Woodson (Apocynaceae) crece en los embalsados (islas flotantes), esteros, bañados, bajos y pantanos del Macrosistema del Iberá, 12.000 km² de áreas inundables ubicados en la Provincia de Corrientes, con una gran diversidad en flora y fauna (Arbo & Tressens, 2002). Es una planta voluble, con ramas de 2-3 m de longitud, glabras, hojas opuestas, lineares y acuminadas, de 6-9 cm de largo y 1 cm de ancho, inflorescencia de 1-3 flores, corola rosado intenso o fucsia, tubo de 3-5 cm de longitud y fauce campanulada de 3 cm de diámetro, fruto foliolar de 5-7 cm de longitud (Woodson, 1940).

Sus flores de llamativos colores, con liberación de un intenso perfume durante el atardecer y la noche (observación en cultivo), sumado a un prolongado período de floración (Septiembre-Marzo) la convierten en una planta muy atractiva desde el punto de vista ornamental, factible de ser mejorada para ser utilizada en jardinería al igual que especies de los géneros afines *Allamanda* L., *Mandevilla* Lindl. y *Trachelospermum* Lem. (Bailey, 1949).

Esta especie habita también en las provincias de Chaco, Formosa, Salta y Santa Fe (Ezcurra, 1999), donde crece también en ambientes palustres. La fragilidad de estos ambientes, sujetos a inundaciones, sequías y explotaciones agrícolas, ganaderas o forestales, permiten considerar a *Rhabdadenia Ragonesei* como una especie que puede ser incluida en los planes de conservación de germoplasma vegetal del Macrosistema Iberá. Para otra especie, *R. biflora* Müll.Arg., ya se han establecido áreas de conservación (www.inbio.ac.cr).

Las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos han demostrado su gran utilidad en la conser-

vación de germoplasma, tanto a corto como a largo plazo (Roca & al., 1993; Engelmann, 2000; Scocchi & Rey, 2004). Sin embargo, estas técnicas pueden ser utilizadas únicamente cuando se dispone de sistemas *in vitro* que brinden, como producto final, plantas enteras.

La regeneración *in vitro* de plantas a partir de diferentes explantes ha sido posible en numerosas especies (Lakshamanan & Taji, 2000). Sin embargo, no existen antecedentes de trabajos con especies del género *Rhabdadenia*.

El objetivo de este trabajo es comunicar la regeneración *in vitro* de plantas de *Rhabdadenia Ragonesei* mediante el cultivo de explantes foliares.

Material y métodos

Se trabajó con plantas de *Rhabdadenia Ragonesei* coleccionadas en Laguna Luna 28.03.49° S, 56.46.26° W, Dpto. Santo Tomé, Corrientes y depositadas en el herbario CTES (Arbo & al. 8570).

Las plantas crecieron con un sustrato compuesto de 60% de tierra negra de jardín, 20% de musgo *Sphagnum* y 20% de turba, las cuales se cultivaron en un invernáculo provisto de una malla de sombreado del 80%. Las plantas fueron fertilizadas, cada 15 días, con 2 g/l de Peter's ® (7-45-15).

Para la extracción de los explantes, las hojas expandidas en un 50% de su tamaño final, fueron desinfectadas en etanol al 70% (10 s) seguido de la inmersión en una solución de 1,1% de NaOCl con el agregado de una gota de Tritón 100, durante 15 minutos. Finalmente, las hojas fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril.

Las hojas desinfectadas fueron seccionadas transversalmente en porciones de 25-35 mm² y en todos los casos se incluyó la vena media. Estos explantes fueron cultivados, con la cara adaxial en contacto con el medio de cultivo, en tubos de vidrio de 40 ml conteniendo 10 ml de medio de cultivo, en los cuales se sembró sólo un explante. Se cultivaron 10 tubos por tratamiento con 3 repeticiones para cada va-

riable. Todos estos trabajos se realizaron en condiciones estériles para lo cual se empleó una cabina de flujo laminar.

Los resultados obtenidos fueron analizados por ANOVA y Test de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significación de $P < 0,01$.

Para el establecimiento de los cultivos se utilizó el medio de cultivo compuesto por las sales minerales y vitaminas de Murashige & Skoog (1962), 3% de sacarosa y 0,65% de Agar Sigma A-1296 (MS) suplementado con 0,1; 1 ó 3 mg/L de alguna de las siguientes citocininas: bencilaminopurina (BAP), cinetina (KIN), 2-isopenteniladenina (2-iP), zeatina (ZEA) o thidiazurón (TDZ).

El subcultivo de los callos y/o callos con primordios de yemas se realizó sobre medio MS suplementado con BAP o TDZ, a razón de 1 ó 3 mg/L o con 3 mg/L de 2-iP.

El enraizamiento de los vástagos regenerados fue inducido en el medio MS, desprovisto de reguladores de crecimiento o suplementado con 0,5 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) o de ácido indolbutírico (IBA).

El pH de los medios fue ajustado a 5,8 antes del agregado del agar, con KOH y/o HCl. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 1,46 kg.cm⁻² durante 20 minutos. Los tubos cultivados fueron cubiertos con Resinite AF 50® (Casco S.A.C.I.F., Bs. As.) y cultivados en condiciones de luz y temperatura controladas a $27 \pm 2^\circ \text{C}$ con un fotoperíodo de 14 horas y 116 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ suministrado por tubos fluorescentes Philips TLD 36 W/840 Holland.

Las plantas obtenidas *in vitro* fueron transferidas a macetas conteniendo un sustrato constituido por turba, vermiculita y musgo *Sphagnum* (1:1:1) y colocados en una cámara climatizada con 80% de humedad relativa.

Resultados y Discusión

Luego de la primera semana de cultivo, los márgenes longitudinales de los explantes foliares se curvaron hacia arriba sobre la vena media, formando un tubo. Posteriormente a partir de las venas, en algunos de los medios

ensayados, se generaron callos de color blanco-verdoso y callos compactos de color verde oscuro a verde-rojizo. Luego de 21 días de cultivo fue posible observar la diferenciación en los callos, de yemas y vástagos (Fig. 1 A, B) seguida de una rápida oxidación del explante foliar. En los medios que incluían ZEA, la oxidación se produjo en la primera semana de cultivo.

La siembra de los explantes en MS promovió el crecimiento de callo, sin embargo la diferenciación de yemas o vástagos se observó únicamente con la adición de ciertas concentraciones de determinadas citocininas al medio MS (Fig. 2). En especial se destacó el tratamiento con 3 mg/L de BAP que permitió la inducción de callos y vástagos en un 83% de los explantes cultivados (Fig. 1 C). Valores sensiblemente menores se obtuvieron con el empleo de TDZ, 2-iP y KIN. Los explantes con ZEA no produjeron ninguna respuesta morfogénica y se oxidaron rápidamente (Fig. 2).

El número de vástagos por callo también fue influido por la citocinina empleada. El mayor número de vástagos por callo (10) fue obtenido en MS + 1 mg/L de BAP, mientras que 5,7 y 5,3 vástagos por callo fueron obtenidos en los medios MS + 1 mg/L de TDZ y en MS + 3 mg/L de BAP, respectivamente. Estas citocininas generaron asimismo los mejores resultados cuando se realizaron los subcultivos de callos conteniendo yemas (Fig. 3).

En todos estos medios de cultivo, únicamente se desarrollaron vástagos. Esporádicamente hubo diferenciación de raíces en el medio MS + 1 mg/L de BAP (Fig. 1 B).

Este comportamiento diferencial de las distintas citocininas en cuanto a su efectividad en la inducción de la caulogénesis, es frecuentemente observado en el cultivo de tejidos (entre otros, Evans & al., 1981).

Se observó que los vástagos de 4 cm de longitud y con 3 nudos diferenciados, subcultivados a medios frescos, enraizaron de manera espontánea (Fig. 1 D).

Los resultados muestran que el porcentaje de los vástagos que forman raíces y el número de raíces por vástago, fue modificado por el medio de cultivo empleado en el establecimiento de los vástagos (Fig. 4). Sin embargo,

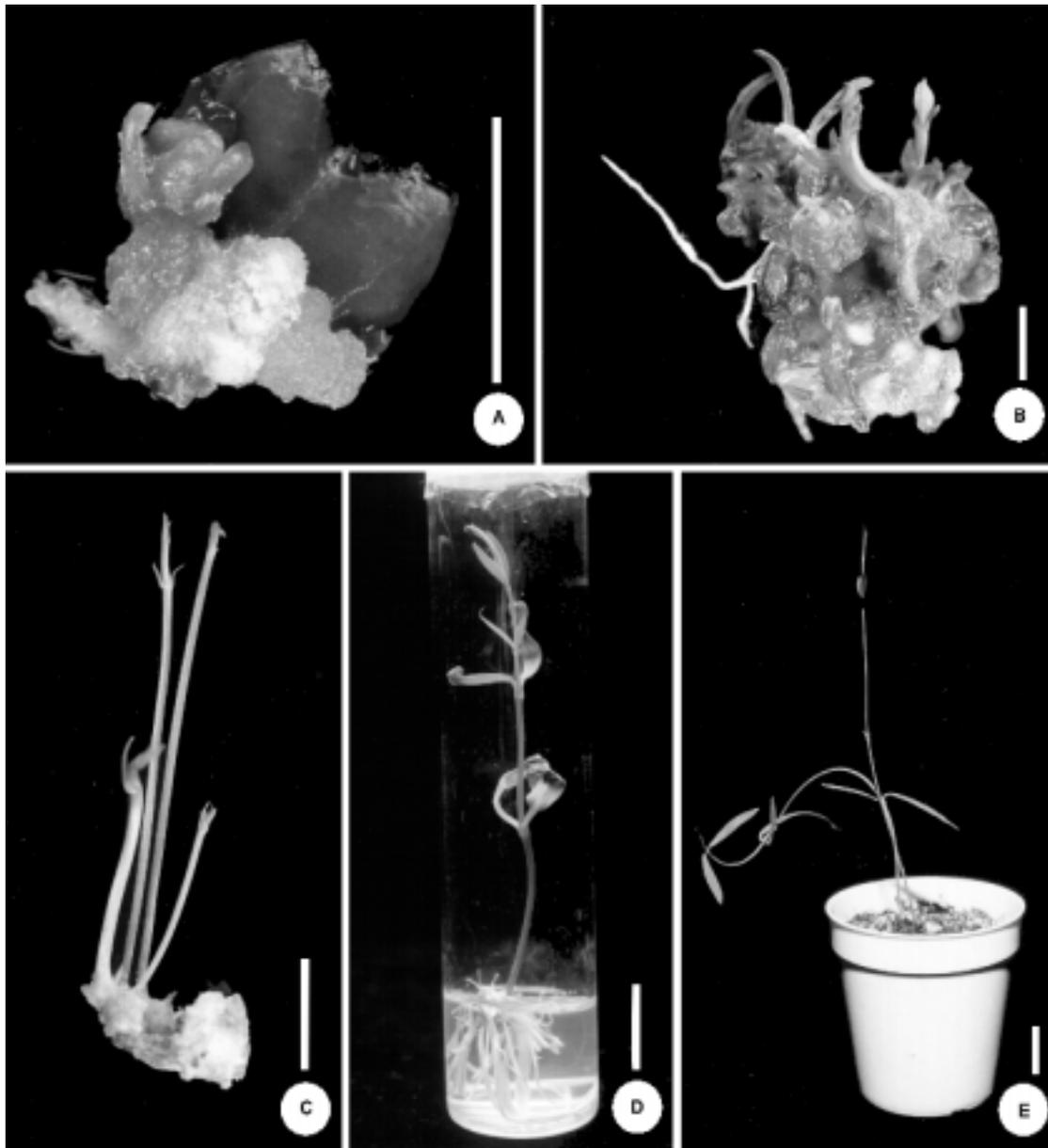


Fig. 1. Regeneración de plantas de *Rhabdadenia Ragonesei*. A: Explante foliar a los 21 días de cultivado en medio MS + BAP 3 mg/L. La regeneración de callos y yemas se originan en la zona de corte (barra= 10 mm). B: Porción de callo y yemas creciendo en medio MS + BAP 1 mg/L luego de 21 días. Se observan algunas raíces originadas en la base del callo (barra= 5 mm). C: Callo con vástagos en MS + BAP 3 mg/L (barra= 30 mm). D: Vástago con 20 días de enraizado en medio MS + ANA 0,5 mg/L proveniente de MS + BAP 1mg/L (barra= 20 mm). E: Planta de 15 días de aclimatada en condiciones de invernadero y en plena brotación (barra= 25 mm)

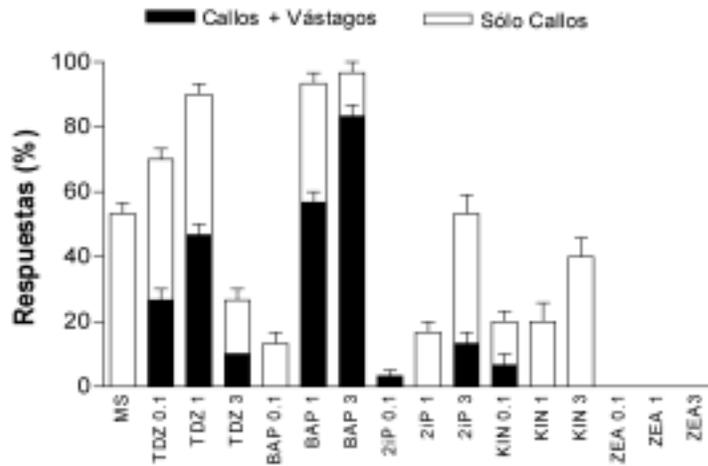


Fig. 2. Efecto de la adición al medio MS de tres concentraciones de citocininas sobre el cultivo de explantes foliares de *Rhabdadenia Ragonesei*. Datos obtenidos a los 21 días de cultivo.

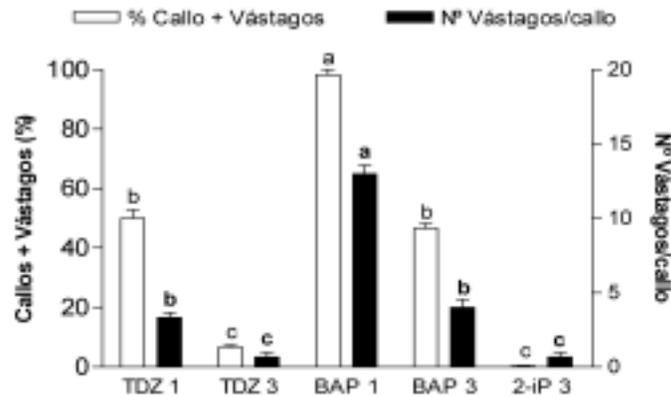


Fig. 3. Efecto del agregado de citocininas al medio MS sobre la producción de vástagos en callos subcultivados originados en explantes foliares de *Rhabdadenia Ragonesei*.

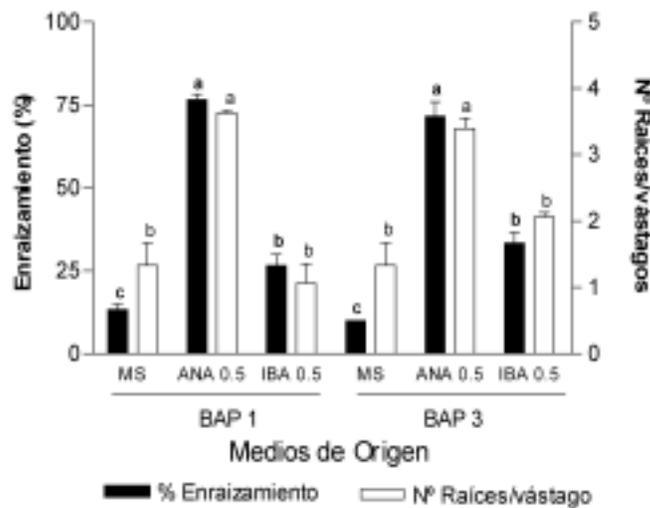


Fig. 4. Efecto del medio de cultivo de origen en el enraizamiento de vástagos de *Rhabdadenia Ragonesei*.

el agregado de auxinas al medio de cultivo, tuvo un efecto significativo, destacándose el tratamiento de MS + 0,5 mg/L de ANA, en el cual se obtuvo un 76% de los vástagos con crecimiento de 3,6 raíces por vástago. Estos resultados, si bien concuerdan con los obtenidos en la mayoría de las plantas en la necesidad de incorporar una auxina al medio de cultivo para inducir rizogénesis (entre otros, Evans & al., 1981), también muestran que hasta un 13% de los vástagos enraizaron con solamente MS. Este hecho sumado a que también hubo formación de callos en medio MS solamente (Fig. 2) sugiere que *Rhabdadenia Ragonesei* produciría auxinas. Resultados similares se obtuvieron con la especie *Trachelospermum asiaticum* Nakai (Jazmín asiático), muy afín a la especie estudiada, en donde se obtuvo enraizamiento de segmentos uninodales utilizando el medio de WPM, sin el agregado de hormonas (Apter & al., 1993).

Entre el 70 y el 100% de las plantas obtenidas *in vitro* de *Rhabdadenia Ragonesei* fueron transferidas al suelo y aclimatadas exitosamente (Fig. 1 E).

En conclusión, este trabajo describe un procedimiento de cultivo *in vitro* que permite la regeneración de plantas de *Rhabdadenia Ragonesei* a partir de explantes foliares. Para ello las etapas fundamentales serían:

1. Inducir la formación de callos y yemas mediante el cultivo de explantes de lámina foliar en el medio de cultivo de MS + 3 mg/l de BAP (durante 21 días).

2. Subcultivar los callos y yemas en el medio de cultivo de MS + 1 mg/l de BAP (durante 10 días).

3. Enraizar los vástagos regenerados en el medio de cultivo de MS + 0,5 mg/l de ANA (durante 15 días).

Bibliografía

APTER, R. C., E. L. McWILLIAMS & F. T. DAVIES (Jr.). 1993. *In vitro* and *ex vitro* adventitious root formation in Asian Jasmine (*Trachelospermum asiaticum*) I. Comparative Morphology. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118: 902-905.

ARBO, M. M. & S. G. TRESSENS (eds.). 2002. Flora del Iberá. EUDENE, Corrientes. 613 pp.

BAILEY, L. H. 1949. Manual of cultivated plants. Mc Millan, New York. 1116 pp.

ENGELMANN, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In F. Engelmann & H. Takagi (eds.). Cryopreservation of tropical Plant Germoplasm. pp. 8-20. IPGRI, Roma.

EVANS, D. A., W. R. SHARP & C. E. FLICK. 1981. Growth and behaviours of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In T. A. Thorpe (ed.). Plant Tissue Culture. pp. 45-113. Academic Press, New York.

EZCURRA, C. 1999. Apocynaceae. In F.O. Zuloaga & O. Morrone (eds.). Catálogo de plantas vasculares de la República Argentina II. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 74: 71-72.

HASHIMOTO, P. N., A. A. DE MAGISTRIS & M. QUINTEROS. 2004. Fase inicial de la domesticación de *Hieronymiella clidanthoides* Pax emed. Castell. (Amaryllidaceae). II Congreso Nacional de Floricultura y Plantas Ornamentales. 26-28 Octubre 2004. Buenos Aires.

LAKSHMANAN, P. & A. TAJI. 2000. Somatic embryogenesis in Leguminous Plants. Pl. Biol. 2: 136-148.

Mc NELLY, J. A., K. R. MILLER, W. V. REITH, R. A. MITTERMEIER & T. B. WERNER. 1990. Conserving the world's biological diversity. IUCN, Gland. 193 pp.

MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.

ROCA, W. M., D. I. ARIAS & R. CHÁVEZ. 1993. Métodos de conservación *in vitro* de germoplasma. In W. M. Roca & L. A. Mroginski (eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. pp. 697-713. CIAT, Cali.

SCOCCHI, A. M. & H. Y. REY. 2004. Conservación de germoplasma *in vitro*. In V. Echenique, C. Rubistein & L. A. Mroginski (eds.). Biotecnología y Mejoramiento vegetal. pp. 179-185. Ediciones INTA. Buenos Aires.

WOODSON, R. E. 1940. Una nueva especie santafecina de *Rhabdadenia*. Lilloa 5: 18-19.

WORLD CONSERVATION MONITORING CENTRE (WCMC). 1992. Global Biodiversity: status of the earth's living resources. Groombridge, B. Chapman & Hall, London. 594 pp.

www.inbio.ac.cr. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), 1997. Costa Rica.

Original recibido el 10 de noviembre de 2004; aceptado el 9 de mayo de 2005.