

REGENERACIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE *Aloysia citriodora* Palau (Verbenaceae)

SEVERIN, Cecilia¹; BRUZZESE, Daniela³; DI SAPIO, Osvaldo⁴;
GIUBILEO, María Graciela²; GATTUSO, Susana⁴

¹ Docente de la Cátedra de Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias Agrarias UNR
Consejo de Investigaciones de la UNR (CIUNR)

² Docente Cátedra de Estadística
Facultad de Ciencias Agrarias UNR
C.C. 14. (S 2125 ZAA) Zavalla, Santa Fe, Argentina.

³ Tesinista carrera de Biotecnología
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

⁴ Docentes Cátedra de Botánica
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR
Suipacha 521. 2000 Rosario. Argentina.
E-Mail: cseverin@unr.edu.ar

Resumen

Las plantas de la familia *Verbenaceae* llaman la atención de los investigadores no sólo por su alta diversidad botánica y amplia distribución, sino también por su variable uso. La infusión o decocción de las hojas de *Aloysia citriodora* se utiliza en medicina popular como antiespasmódico, calmante nervioso, expectorante y estomacal. La esencia es una de las más costosas y raras en el mercado de aceites esenciales. Este trabajo propone estimular la regeneración de plantas *in vitro* de *A. citriodora*. Como explantos se emplearon hojas y segmentos nodales cultivados en medio de cultivo de Murashige y Skoog con diferentes concentraciones de bencil amino purina (BAP) y ácido naftalen acético (ANA). Los mejores resultados se obtuvieron con segmentos nodales y en el medio diluido a la mitad sin reguladores de crecimiento se estimuló la mayor brotación (un promedio de 3,29 vástagos/segmento nodal) y en el mismo medio se logró el enraizamiento de los brotes regenerados. Las plantas crecieron exitosamente en suelo.

Palabras clave:

Aloysia citriodora, *in vitro*, plantas medicinales, segmentos nodales

In vitro REGENERATION OF *Aloysia citriodora* PLANTS (Verbenaceae)

Summary

Plants of the *Verbenaceae* family attract the attention of scientists not only because of their high botanical diversity and wide distribution, but also for their many uses. An infusion or decoction of *Aloysia citriodora* leaves is used in popular medicine as an antispasmodic, mild sedative, expectorant and digestive. It yields one of the most expensive and rare essential oils in the market. This work is aimed at stimulating *in vitro* plant regeneration of *A. citriodora*. Pieces of leaves and nodal segments were used as explants and were cultivated in Murashige and Skoog mediums with different concentrations of benzylaminopurine (BAP) and naphthalene acetic acid (NAA). The best results were obtained from nodal segments. The greatest sprouting (the average was 3.29 shoots/nodal segment) and rooting of the regenerated shoots were obtained in a diluted (50:50) medium without growth regulators. Plants obtained grew successfully in the soil.

Key words:

Aloysia citriodora, *in vitro*, medicinal plants, nodal segments

Introducción

Aloysia citriodora Palau, conocida con el nombre vulgar de "Cedrón" o "Yerba Luisa", es una planta originaria de América del Sur y constituye una de las especies más sobreexplotadas en nuestro país.

Es una planta leñosa, arbustiva, que puede alcanzar 1 m o más de altura, las hojas son simples con un característico olor a limón (Muñoz López de Bustamante, 1996). Las partes aéreas contienen 0,2 a 1% de aceite esencial (Lamaison y Petitjean, 1993), Stashenko *et al.* (2003) determinaron que la familia de compuestos mayoritarios es la de monoterpenos oxigenados, de los cuales el 60 % correspondieron al citral. La acción farmacológica de esta especie está relacionada fundamentalmente al aceite esencial, habiéndose informado actividad antiespasmódica, eupéptica, carminativa, antimicrobiana y analgésica local, entre otras (Gupta, 1995; Dellacassa y Bandoni, 2003). Es oficial en la Farmacopea Nacional Argentina VI Ed. (1978) y está incluida en el Código Alimentario Argentino (1969).

Dada la dificultad de obtener semillas en nuestro clima, el procedimiento normal de multiplicación es vegetativo mediante esquejes, acodos o división de pies (Muñoz

López de Bustamante, 1996). La técnica de cultivo *in vitro* es una alternativa potencial para la conservación genotípica y permite además la obtención de un número elevado de plantas en un espacio reducido y bajo condiciones controladas que evitan la trasmisión de enfermedades. Es una herramienta muy útil en programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Olmos *et al.*, 2004). Si bien se conoce que la relación auxina/citocinina es un factor clave en el control de la organogénesis *in vitro* (Skoog y Miller, 1957), los resultados obtenidos al aplicar la técnica no siempre son predecibles, haciendo imperiosa la búsqueda empírica de las condiciones de cultivo más favorables para la especie y el tipo de explanto utilizado.

No se conocen estudios sobre cultivos de tejidos con una posterior puesta a campo de esta especie, por lo tanto, este trabajo se realizó con la finalidad de estimular la regeneración *in vitro* de plantas de cedrón para proporcionar un estricto control de la planta medicinal y solucionar el problema de la escasez por sobreexplotación que sufre esta especie en su hábitat natural.

Materiales y Métodos

Como fuente de explantos, se utilizaron plantas de *A. citriodora* obtenidas en la zona de Rosario (Santa Fe, Argentina), las mismas se mantuvieron en macetas con tierra y en condiciones controladas en el invernadero de la cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNR).

Los explantos probados fueron trozos de hojas de 0,5 cm y segmentos nodales de 0,5 a 1 cm de longitud, con 1, 2 o 3 yemas axilares. Para la desinfección, el material se sumergió 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1,2 % más una gota de Tween 20 y posteriormente se lavó tres veces con agua destilada esterilizada, bajo cámara de flujo laminar.

Los trozos de hojas se cultivaron en un medio de cultivo compuesto por sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) (MS) o en medio de igual composición diluido 4

veces (MS/4) y suplementados con distintas combinaciones de bencil amino purina (BAP) (0; 0,1; 0,5; 1 y 2 mg.l⁻¹) y ácido naftalen acético (ANA) (0; 0,1; 0,5 y 1 mg.l⁻¹).

Los segmentos nodales se implantaron en medio de cultivo diluido a la mitad (MS/2) o diluido 4 veces (MS/4) y suplementado con distintas combinaciones (mg.l⁻¹) de BAP y ANA: 0:0 (medio 0), 0,1:0,1 (medio A), 0,5:0,1 (medio B), 0,1:0,5 (medio C) y 0,5:0,5 (medio D).

En todos los casos se adicionó a los medios 3 % de sacarosa y 0,7 % de agar. El pH se ajustó a 5,6 con NaOH o HCl antes del agregado del agar. Los medios se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Cada 15 días los cultivos fueron transferidos a medio fresco.

La incubación se realizó en cámara climatizada con una temperatura de 25 ± 2 °C,

fotoperíodo de 16 horas y una irradiancia de $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Se determinó el porcentaje de segmentos nodales que dieron vástagos, el número promedio de vástagos por explanto y se midió la longitud de los vástagos formados a los 7, 14, 21 y 28 días desde la brotación.

El diseño estadístico utilizado fue un completamente aleatorizado. Los tratamientos a comparar fueron los distintos medios de cultivo, las variables estudiadas fueron la longitud de los vástagos a los 7, 14, 21 y 28 días y el número de vástagos a los 28 días desde la implantación (a los datos se les aplicó la transformación raíz cuadrada del

número de vástagos). Se hicieron 25 repeticiones por cada tratamiento. Los resultados se sometieron al análisis de la variancia y las comparaciones de las medias entre tratamientos se hicieron mediante el test de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0,05$). En el caso de la longitud de los vástagos se aplicó un análisis de regresión lineal para cada uno de los medios de cultivo, utilizando los días como variables regresoras y se compararon las pendientes de las rectas de regresión.

Los brotes enraizados fueron transferidos a potes con una mezcla de tierra y perlita de lava volcánica y se mantuvieron cubiertos durante 15 días con polietileno transparente para evitar pérdidas por deshidratación.

Resultados y Discusión

Durante el establecimiento *in vitro*, un 4 % de los explantos foliares manifestó contaminación con bacterias o con hongos. Los trozos de hojas sembrados en medio de cultivo sin reguladores, permanecieron inactivos y posteriormente murieron, mientras que en el resto de los tratamientos se produjo un encrespamiento de los explantos y luego la formación de callos. En el único tratamiento donde hubo alguna respuesta de los trozos de hojas fue en el medio con $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de BAP y $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de ANA, se observó en los callos la diferenciación de raíces que se visualizó recién a los 60 días de cultivo. En este período de tiempo y con estas condiciones no se produjo diferenciación de yemas.

La respuesta de los segmentos nodales sembrados varió según el medio de cultivo empleado, el mayor porcentaje de explantos que originó vástagos a partir de las yemas axilares, se presentó en los medios MS/2, a diferencia de lo informado por Sansberro y Mroginski (1995) que en *A. polystachia* obtuvieron los mejores resultados en el medio diluido 4 veces. El número promedio de vástagos por segmento nodal fue significativamente superior en MS/2 carente de reguladores (3,29) (Tabla 1) y fue en este tratamiento donde se obtuvo un máximo de 6 vástagos/explanto, este resultado indica que en este medio de cultivo se incrementó el número de vástagos/nudo con respecto al número natural de esta especie.

Los segmentos nodales manifestaron formación de callos en la superficie de corte, a excepción de los que permanecieron en MS/2

sin reguladores, que fue el único medio en que no hubo formación de callo basal. La rizogénesis directa también fue observada por Sansberro y Mroginski (1995) en *A. polystachia*. En los medios MS/2 y MS/4 con reguladores, el 100 % de los explantos presentó callos basales entre los 7 y los 14 días de cultivo. En MS/4 sin reguladores, el 8 % de los explantos presentaron callos basales.

En los tratamientos MS/4 se manifestó un amarronamiento progresivo que comenzó en las hojas basales.

La formación de raíces en MS/2 con y sin reguladores se produjo a partir de los 14 días de cultivo, en MS/4 sólo se observó enraizamiento en el medio sin reguladores y en el mismo lapso de tiempo. Se alcanzó un 76 % de explantos enraizados (3 raíces/explanto en promedio) en MS/2 sin reguladores luego de 28 días de cultivo.

Tabla 1: Número promedio de vástagos por segmento nodal en medios de cultivo MS/2 y MS/4 con distintas concentraciones de BAP y ANA, en 28 días de cultivo.

BAP : ANA	MS/2	MS/4
0	3,29 a	1,8 a
A	2,50 b	1,4 b
B	1,43 c	1,36 b
C	1,22 c	1,23 b
D	1,00 c	1,17 b

Letras distintas en forma vertical indican diferencias significativas (Duncan $p < 0,05$)

Los nuevos vástagos originados por la brotación de las yemas axilares, se alargaron y a partir de los 28 días de cultivo se empezaron a seccionar en segmentos uni y multinodales y se los mantuvo en MS/2 sin reguladores, donde enraizaron. Se eligió este medio porque fue donde se obtuvieron las mejores respuestas. En coincidencia con Sansberro y Mroginski (1995), en *A. polystachia*, se observó organogénesis directa de raíces a partir de los vástagos, de esta manera las conexiones vasculares son directas entre las raíces y los vástagos sin previa formación de callos en la base de las estacas. Una de las ventajas de la división de los vástagos, es que ofrece la posibilidad de aumentar la tasa de multiplicación con los sucesivos subcultivos (Olmos *et al.* 2004).

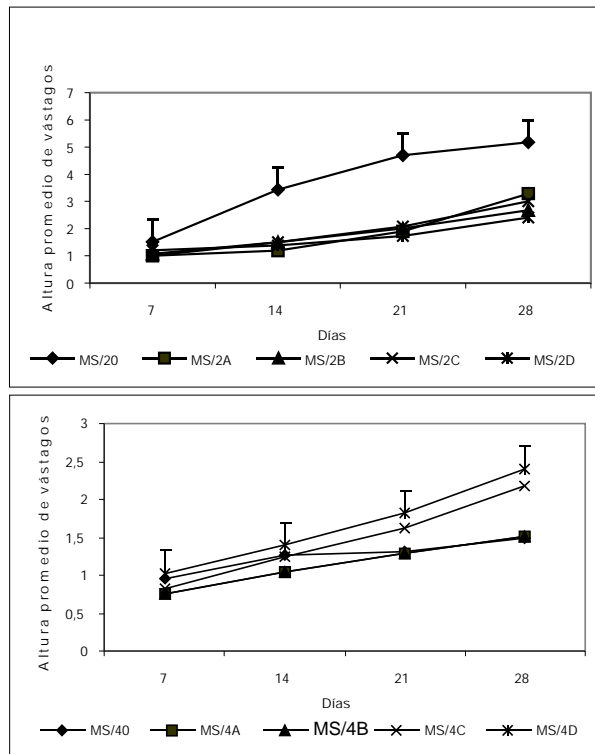
La longitud de los vástagos se determinó a los 7, 14, 21 y 28 días desde la brotación. Los resultados se presentan en las figura 1, donde puede observarse que en el medio MS/2 sin la adición de reguladores se logró un mayor alargamiento de los vástagos en todas las

fechas de medición, las diferencias encontradas con respecto al resto de los tratamientos fueron estadísticamente significativas (Duncan $p < 0,05$). El modelo de regresión lineal para los distintos medios de cultivo resultó altamente significativo ($p < 0,0001$) y la pendiente de la recta en el medio MS/2 0, difirió significativamente con respecto a los demás tratamientos.

Cuando las plantas alcanzaron más 3-4 cm de altura, se las extrajo de los tubos y luego de lavadas sus raíces, se las plantó en contenedores conteniendo tierra mezclada con perlita de lava volcánica, se realizó una aclimatación gradual de las mismas y se las transfirió a macetas de mayor tamaño a medida que fueron creciendo. Las plantas prosperaron exitosamente en tierra.

La organogénesis directa a partir de la regeneración de yemas axilares asegura la estabilidad genética de las plantas regeneradas y es útil cuando el objetivo es la propagación clonal a gran escala.

Figura 1: Longitud promedio de vástagos en medio MS/2 (0, A, B, C y D) a los 7, 14, 21 y 28 días de cultivo.



Las barras indican el error estandar de la media.

Conclusiones

Los mejores resultados se obtuvieron con segmentos nodales. La utilización del medio MS diluido a la mitad sin el agregado de reguladores de crecimiento se estimuló la

mayor brotación y el enraizamiento de los brotes regenerados. Se lograron plantas que crecieron exitosamente en suelo.

Bibliografía

Código alimentario argentino. 1969. Tomo, Ib. Ed. De la Canal y Asociados SRL. Bs. As., Argentina. Ley 18284/69 y anexos. Art. 1215. P.401.

DELLACASSA, E.; BANDONI, A. L. 2003. Hierbaluisa. *Aloysia citriodora* Palau. Revista de Fitoterapia. 3(1): 19-25.

Farmacopea Nacional Argentina VI Ed. 1978. Sexta Edición. Ed. Ministerio de Salud. Buenos Aires, Argentina. P.217.

GUPTA, M. 1995. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. CYTED, Santafé de Bogotá D.C. Colombia. p. 617.

LAMAISON, J. L.; PETITJEAN, F. C. 1993. Verbascoside, major phenolic compound of the leaves of ash (*Fraxinus excelsior*) and vervain (*Aloysia Tripylla*). *Plantes Medicinales et Phytotherapie* 26(3), 225-233.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

MUÑOZ LÓPEZ DE BUSTAMANTE, F. 1996. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Ed. Mundi Prensa-Madrid. p. 365.

OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO, E. 2004. Micropropagación. En: Biotecnología y mejoramiento vegetal (V. Echenique; C. Rubinstein; L. Mroginski). Ediciones INTA, Argentina. p. 163-172.

SANSBERRO, P. A.; MROGINSKI, L. A. 1995. Micropropagación de *Aloysia polystachia* (Verbenaceae). *AGRISCIENTIA XII*: 83-86.

SKOOG, F.; MILLER, C. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. 2003. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 27(105): 579-597.