

***Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.: PROPAGACIÓN *IN VITRO* A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES**

**GATTUSO, Susana¹; SCANDIZZI, Ángel¹; BUSILACCHI, Héctor²;
DI SAPIO, Osvaldo¹; SEVERIN, Cecilia^{3*}**

¹ Cátedra de Botánica

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR

² Cátedra de Biología

³ Cátedra de Fisiología Vegetal - CIUNR

Facultad Ciencias Agrarias. UNR

C.C. 14, (S2125ZAA)

Zavalla, Santa Fe, Argentina.

E-mail: sgattuso@fbioyf.unr.edu.ar

Resumen

Achyrocline satureioides (Lam.) DC. conocida con el nombre vulgar de "marcela", es intensamente utilizada en la medicina popular por sus propiedades medicinales. En el presente trabajo, se describe una técnica que permite la regeneración de plantas de *A. satureioides* mediante el cultivo *in vitro* de segmentos uninodales. Para la regeneración de brotes se empleó un medio semisólido conteniendo $\frac{3}{4}$ de la concentración de sales minerales y vitaminas del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) (MS $\frac{3}{4}$), con 1 mg/l de benzilaminopurina (BAP) y 3 % de sacarosa. Para estimular el enraizamiento, se probaron MS $\frac{3}{4}$ sin reguladores de crecimiento y MS $\frac{3}{4}$ con 1 mg/l de ácido indol acético (AIA), en ambos casos con 1,5 % de sacarosa. La incubación se realizó con una temperatura de $24 \pm 2^\circ \text{C}$ y un fotoperíodo de 16 horas. En 79 días de cultivo se obtuvo un 42 % de explantos que originaron brotes axilares y las plantas logradas prosperaron exitosamente en suelo con una supervivencia del 77 %. Para la formación de raíces fue necesaria la adición de AIA al medio de cultivo. Con esta metodología se logró la regeneración de plantas de *A. satureioides* a partir de segmentos nodales.

Palabras claves:

Achyrocline satureioides, *in vitro*, plantas medicinales, segmentos nodales

***Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.:** **IN VITRO PROPAGATION FROM NODAL SEGMENTS**

Summary

Achyrocline satureioides (Lam.) DC., commonly called "marcela", is widely used in popular medicine because of its medicinal properties. In the present work, a technique that allows the regeneration of *A. satureioides* plants by means of the *in vitro* culture of uninodal segments is described. For bud regeneration, a semisolid medium containing $\frac{3}{4}$ of the concentration of mineral salts and vitamins of Murashige and Skoog (1962) (MS $\frac{3}{4}$) was used. It was supplemented with 1 mg/l of benzilaminopurina (BAP) and 3% of sucrose. In order to stimulate the rooting, MS $\frac{3}{4}$ without growth regulator and MS $\frac{3}{4}$ with 1 mg/l of indol acetic acid (AIA), in both cases with 1.5% of sucrose, were tested. Incubation conditions were 24 °C, light of 60 mol.m⁻².s⁻¹, and a 16-hour photoperiod. After 79 days of culture, 42% of explants originated axillary buds and the plants developed successfully in the soil with a survival rate of 77%. The addition of AIA to the culture medium was necessary for roots differentiation. The *in vitro* regeneration of *A. satureioides* plants from nodal segments was obtained with this methodology.

Key words:

Achyrocline satureioides, *in vitro*, medicinal plants, nodal segments

Introducción

Las especies del género *Achyrocline* (*Asteraceae-Inulaceae*) crecen desde Venezuela, Colombia, Brasil, Paraguay hasta Uruguay y en Argentina se encuentran desde Salta y Jujuy hasta Río Negro, habitando principalmente las zonas serranas. *A. satureioides* (Lam.) DC. conocida en Argentina con los nombres vulgares de "marcela", "marcelita", "vira-vira", "marcela hembra" o "marcela blanca", es la especie de mayor distribución en nuestro país, ya que se la encuentra en diez provincias y por ser la más utilizada en medicina popular, está sobreexplotada.

Es una planta herbácea, perenne, tomentosa, con un intenso aroma que recuerda al anís, el sabor es amargo, lo que hace que forme parte de bebidas tónicas. Son intensamente utilizadas sus partes aéreas como antidiabéticas, digestivas (García et al., 1990; Ratera y Ratera, 1980; Toursarkissian, 1980) y emenagogas (Moreno et al., 1975; Alonso Paz, 1992, González et al., 1993).

Aunque "marcela" es bastante comercializada, el hecho de no realizarse el cultivo comercial de esta especie, colabora para mantenerla en su estado silvestre. La recolección se realiza al estado natural, lo que lleva muchas veces a la sustitución por *Achyrocline flacida* y *Achyrocline alata*, con las que comparte el mismo área de distribución. Por ser una planta alógama, se encuentra una gran variabilidad genética, la que se expresa en caracteres

importantes tales como, la productividad de biomasa, la morfología y la arquitectura de las hojas y coronas, la época de floración, los contenidos de principios activos y el porcentaje de enraizamiento de las estacas (Magalhães, 1997, 2000). Estos y otros caracteres están siendo explorados en el proceso de domesticación (Montanari Jr., 1997).

La propagación de esta especie es comúnmente realizada a través de semillas y esquejes; se ha intentado utilizar cultivo de tejidos, pero se obtuvieron solamente resultados preliminares, ya que se originaron problemas de contaminación con hongos y bacterias (Ikuta y Barros, 1992). Con esta misma técnica de propagación, hay trabajos comunicados en congresos por Barros & Castro (1995) y por Diefenthaler et al. (1996).

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es un recurso biotecnológico que viabiliza la obtención de plantas con calidad controlada y alta productividad. Ya que las informaciones sobre la micropropagación de *A. satureioides* son escasas en la literatura científica, este trabajo tuvo como objetivo obtener plantas a través del cultivo *in vitro* de segmentos nodales y transferir el material micropropagado a tierra, a fin de auxiliar a la producción de plantas con calidad fitosanitaria y uniformidad genética para obtener una materia médica homogénea que asegure una óptima calidad.

Materiales y Métodos

Se partió de frutos (cipselas) obtenidos de plantas provenientes de los Departamentos de Punilla y Calamuchita, ubicados en la provincia de Córdoba (República Argentina), se colocaron a germinar en un medio de cultivo con agua destilada y 7 g/l de agar, previa desinfección con etanol 96 % durante 2 minutos y 20 minutos en hipoclorito de sodio al 2 % con una gota de Tween 20. Alcanzados los 20 mm de longitud, las plántulas fueron transferidas a una mezcla de tierra con perlita volcánica, donde crecieron bajo invernadero y se constituyeron en las plantas madre dadoras de explantos. Se extrajeron de estas plantas segmentos de tallo con un nudo (5-10 mm de longitud) y una yema axilar, vigorosos y en estado vegetativo, los que se utilizaron como explantatos

Etapas I: Desinfección de los segmentos nodales:

El material se sumergió 30 segundos en etanol al 70 %, luego 20 minutos en hipoclorito de sodio al 2 % con Tween 20 y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada, se trabajó bajo cámara de flujo laminar.

Etapas II: Inducción de brotes:

El medio de cultivo empleado fue el de Murashige y Skoog (1962) con $\frac{3}{4}$ de la concentración de sales minerales y vitaminas (MS $\frac{3}{4}$), se le adicionó 1 mg/l de benzilaminopurina (BAP), 3 % de sacarosa y 0,8 % de agar, ajustándose previamente el pH a 5,7 con HCl o NaOH.

Etapa III: Enraizamiento *in vitro*:

Se probaron 2 medios de cultivo: MS $\frac{3}{4}$ sin el agregado de reguladores de crecimiento y MS $\frac{3}{4}$ con 1 mg/l de ácido indol acético (AIA); en ambos casos se redujo la concentración de sacarosa a 15 g/l.

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos y la incubación se realizó en cámara de crecimiento con una temperatura de 24 ± 2 °C, una intensidad luminica de $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo de 16 horas. Cada 15 días los cultivos se transfirieron a medio fresco.

Resultados y Discusión

En las especies de la familia Asteraceae-Inulae se ha informado que uno de los principales obstáculos para la micropropagación lo constituye la presencia de contaminantes endógenos (Murray et al., 1988). Ikuta y Barros (1992) en estudios preliminares para la micropropagación vegetativa *in vitro* de *A. saturoioides* informaron que tuvieron una gran contaminación por hongos y bacterias, principalmente por *Pseudomonas* spp. En nuestro trabajo, en la primera etapa de cultivo se descartó el 27 % de los explantos por presentar contaminación con hongos y/o bacterias.

Los segmentos nodales que prosperaron permanecieron de color verde y luego de 7 días de cultivo comenzó a manifestarse una elongación de sus yemas axilares, mientras que el crecimiento fue más notable luego de 15 días de cultivo. Los cultivos prosperaron en medio MS $\frac{3}{4}$, con pH ajustado a 5,6-5,8, coincidiendo con lo indicado por Barros y Castro (1995).

Desde los 20 días se pudo observar una proliferación de primordios originados a partir de las yemas laterales, los cuales posteriormente fueron separados y se transfirieron a iguales condiciones de cultivo (Figura 1). Se determinó que el porcentaje de segmentos nodales que dieron vástagos en este período de tiempo fue de 16,70 %, llegando a obtenerse un 42 % en 79 días de cultivo.

El número de vástagos por segmento nodal osciló en promedio entre 1-2 vástagos/explanto, indicando este resultado que en esta condición de cultivo el número promedio de vástagos/nudos fue similar con respecto al número natural observado en esta

especie. Es de destacar que hubo explantos que tuvieron un mejor comportamiento, los que llegaron a diferenciar hasta 6-7 vástagos/segmento nodal. Con las condiciones de cultivo empleadas no se verificó la formación de callos, Diefenthaeler et al. (1996), obtuvieron callos para la extracción de flavonoides, a partir de hojas de plantas micropropagadas medio MS con 1 mg/l de ácido naftalen acético (ANA) y 0,1 mg/l de BAP.

Con el fin de estimular la diferenciación de raíces, a partir de los 36 días de cultivo se transfirieron los vástagos en número equivalente a los siguientes medios de cultivo: MS $\frac{3}{4}$ y MS $\frac{3}{4}$ con 1 mg/l de AIA, suplementados ambos con 1,5 % de sacarosa. En nuestras condiciones de trabajo, en ningún caso se manifestó la formación de callo basal, resultados similares a los obtenidos por Murray et al. (1988) en *Cynara scolymus*. Se observó que las raíces se originaron por organogénesis directa desde el vástago y únicamente hubo respuesta cuando se agregó

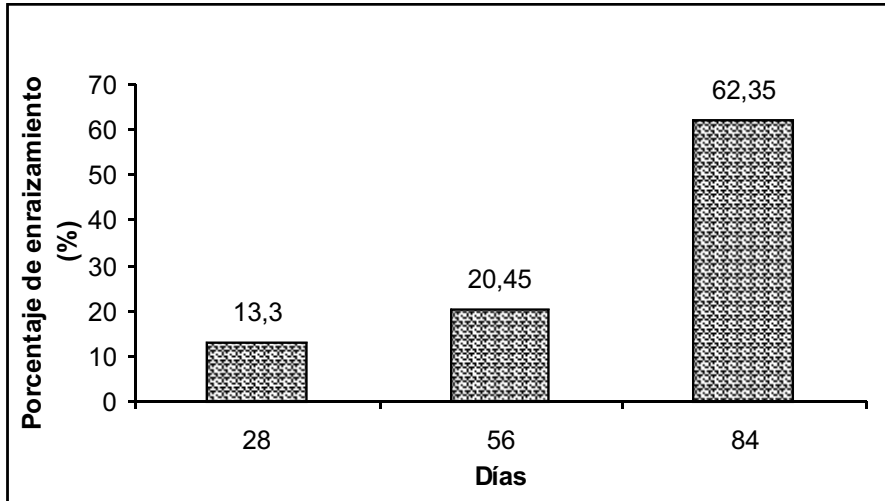
Los plantas obtenidas fueron transferidas a macetas con una mezcla de tierra y perlita de lava volcánica (3:1 v/v). Se mantuvieron cubiertos con polietileno transparente durante 15 días para evitar la deshidratación.

Se determinó el porcentaje de segmentos nodales que dieron vástagos, el número promedio de vástagos por explanto y se determinó el porcentaje de vástagos que enraizaron.

Figura 1: Vástagos originados a partir de segmentos nodales de *A. saturoioides*



Figura 2: Porcentaje de enraizamiento de vástagos de *A. satureioides* a los 28, 56 y 84 días.



AIA al medio. Montanari (1997) verificó que el porcentaje de enraizamiento de estacas de 6 introducciones de *A. alata* provenientes de diferentes regiones del Estado de San Pablo (Brasil), presentó gran variabilidad (0, 3, 6, 7, 8 y 74 %), llegando a la conclusión que el éxito de la propagación de esta especie dependió del genotipo empleado. En este trabajo, a los 84 días de cultivo en medio con AIA, se llegó a obtener un 62,35 % de vástagos enraizados (Figura 2). No se obtuvo respuesta en el medio sin el agregado de reguladores de crecimiento.

Cuando las estacas enraizadas alcanzaron 5-7 cm de longitud, se las transfirió a recipientes con tierra y perlita de lava volcánica, previo lavado de sus raíces. La aclimatación en invernadero fue gradual, se mantuvieron cubiertos durante 15 días con polietileno transparente para evitar pérdidas por deshidratación (Figura 3), luego se transplantaron a macetas de mayor tamaño, observándose un porcentaje de supervivencia de un 77 % a los 150 días (Figura 4).

Figura 3: Aclimatación de plantas de *A. satureioides* en suelo



Figura 4: Planta de *A. satureioides* obtenida a partir de segmentos nodales



Conclusiones

Con este trabajo se demuestra que se puede lograr la regeneración de plantas de *A. satureioides* a partir de la inducción de la brotación de segmentos nodales de 5-10 mm, mientras que, para el enraizamiento de los brotes regenerados es recomendable la

presencia de AIA en el medio de cultivo. Esta metodología permitirá multiplicar clones seleccionados y utilizarlos en la obtención de una materia médica homogénea que asegure una óptima calidad.

Bibliografía

ALONSO PAZ, E.; BASSAGODA, M. J. Y F. FERREIRA. 1992. Yuyos: Uso racional de las plantas medicinales. Ed. Fin de Siglo. Montevideo, Uruguay. p. 69-70.

BARROS, I. B. I. Y R. L. CASTRO. 1995. Influência do pH e do volume de meio "MS" $\frac{3}{4}$ no desenvolvimento *in vitro* da marcela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Hort. Brasil., 13(1): 69.

DIEFENTHAELER, H. A.; LEUCKERT, A.; SANTOS, A. L. G.; LINCK, V. O.; BARROS, I. B. I. Y S. B. RECH. 1996. Investigaçao da manutenção da capacidade biossintética de culturas de calos de *Achyrocline satureioides* obtidos a partir de plantas micropropagadas. En: Resúmenes del XIV Congreso de Plantas Medicinales de Brasil. Florianópolis. p. 7.

GARCÍA, G.; CAMPOS, R.; DE TORRES, R.; BROUSSALIS, A.; FERRARO, G.; MARTINO, V. Y J. COUSSIO. 1990. Antitherpetic activity of some Argentine medicinal plants. Fitoterapia 61(6): 542-546.

IKUTA, A. R. Y I. B. I., BARROS. 1992. Estudos preliminares sobre micropropagaçao de marcela, *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.: asepsia do material. XII Simposio de Plantas medicinais do Brasil. Curitiba-PR. p. 230.

MAGALHARES, P. M. DE. 1997. O caminho medicinal das plantas: Aspecto sobre o cultivo. RZM Press. Campinas. 120 p.

MAGALHARES, P. M. DE. 2000. Agrotecnología para el cultivo de marcela o macela. Em: Martínez, A.; Bernal, H. y A. Cáceres. Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas. Ed. SECAB. Santafé de Bogotá. 524 p.

MONTANARI JR., I. 1997. Vegetative propagation in different genotypes of *Achyrocline alata* DC. Actas del WOCMAP II. Mendoza. p-088.

MORENO, A. R. 1975. 268 Medicinal plants used to regulate fertility in some countries of South America (Sin publicar).

MURRAY, R. E.; SEVERIN, C. R.; GONZALEZ, M. P. Y NAKAYAMA, F. 1988. Producción de plantas de alcaucil (*Cynara scolymus* L.) de sanidad controlada a partir del cultivo de meristemas. Hort. Arg. 8 (16): 20-22.

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

RATERA, E. L. Y M. O. RATERA. 1980. Plantas de la flora Argentina empleadas en medicina popular. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina. p. 62-64.

TOURSASKIASSIAN, M. 1980. Plantas Medicinales de la Argentina. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina. p. 25.