

CULTIVO *IN VITRO* DE GUATAMBÚ BLANCO (*Balfourodendron riedelianum*) y CEDRO MISIONERO (*Cedrela fissilis*).

Niella, S. P.¹
A. M. Noguera²
J. L. Vera³
F. O. Niella¹

RESUMEN

Los bosques tropicales representan un gran potencial como fuente de madera para la industria y para leña; sin embargo, la destrucción de los mismos es causa de preocupación. La necesidad de conservación de germoplasma *ex situ* es urgente, debido a los problemas de regeneración que los mismos sufren *in situ*, ya sea por la pobre producción de semillas, baja viabilidad semillas y plantulas y/o esterilidad, o por las presiones sociales. El desarrollo de protocolos de micropropagación de especies forestales tropicales, no solo revisten importancia para la conservación de los mismos, pero también, permitirían acelerar los programas de mejoramiento genético, brindando una ganancia genética significativa en un corto período de tiempo.

El objetivo del presente trabajo fue iniciar el desenvolvimiento de un protocolo para la micropropagación de dos especies nativas, Guatambú y Cedro, y organogenesis a partir de segmentos de hojas. Dos medios de cultivos fueron ensayados: MS y WPM, suplementados con diferentes concentraciones de BAP y ANA. Fue posible obtener material rejuvenecido para el establecimiento *in vitro*, sumergiendo en agua las ramas de arboles adultos, para inducir a la brotación en laboratorio. El establecimiento *in vitro* de guatambú se obtuvo en medio de MS suplementado con 0.5 mg/l de BAP y 0.03 mg/l de ANA. En el establecimiento de Cedro no se observaron diferencias significativas entre los medios utilizados. Se indujo a la formación de callos y raíces a partir del cultivo de segmentos de hojas.

Palabras claves: *Balfourodendron*

riedelianum, *Cedrela fissilis*, Organogenesis, Cultivo de tejidos.

ABSTRACT

The tropical forests represents a great potential as a source of timber for the industry and fuel wood. However, the depletion of those forests is a cause of concern. The needs for a program of *ex situ* germplasm conservation is urgent, since its regeneration in the wild is endangered due to regeneration problems like poor seed set, poor viability of seed and seedlings or sterility, and social pressure. The development of micropropagation protocols for tropical species is not only important from the point of view of conservation, but also to bring about quicker short-term tree improvement by capturing the existing genetic variation.

The goal of this research was to develop a micropropagation protocol for two native species, guatambu and cedro, and to induce organogenesis from leaf pieces culture *in vitro*. Two media were tested: MS and WPM, supplemented with different concentration of BAP and ANA. It was possible to obtain juvenile material from branches immersed in water in a laboratory environment. Guatambú was successfully established and multiplied *in vitro* in MS medium, supplemented with 0.5 mg/l BAP and 0.03 mg/l ANA. Cedro was also established with no significant differences between the treatments. Callus and root induction was observed on leaf pieces cultured *in vitro*.

Key words: *Balfourodendron riedelianum*, *Cedrela fissilis*, Organogenesis, Tissue culture.

INTRODUCCIÓN

Los bosque tropicales son un recurso de alto valor potencial como fuente de madera de calidad, pulpa y/o leña. Sin embargo, la destrucción de los mismos es causa de preocupación. La continua disminución y/o fragmentación del hábitat natural de las especies en ecosistemas tropicales y

1 Investigador - Facultad de Ciencias Forestales - Universidad Nacional de Misiones

2 Docente - Facultad de Ciencias Forestales - Universidad Nacional de Misiones

3 Estudiante - Licenciatura en Genética - Universidad Nacional de Misiones

subtropicales, han reducido el tamaño de la población por debajo de los niveles necesario para que una regeneración natural exitosa asegure la sobrevivencia de la especie. Se comprometen así seriamente los programas de conservación *in-situ* en áreas protegidas. Es en este contexto, que la conservación ex-situ toma relevancia como componente necesaria en un programa de conservación de la biodiversidad (Heywood, 1992; Mattick et al., 1992).

La micropropagación de árboles selectos por sus características de forma, crecimiento rápido, calidad de la madera y resistencia a enfermedades, brinda una ganancia genética significativa en un corto período de tiempo. El desarrollo de un protocolo rápido de micropropagación tendría un impacto económico importante, y la ventaja de permitir la obtención de grandes cantidades de propágulos, comparado con los métodos convencionales de macropropagación (Mascarenhas y Muralidharan, 1993).

Experiencias desarrolladas en el cultivo de tejido de especies tropicales es limitado en comparación con los trabajos realizados con especies del bosque templado. Con respecto a trabajos realizados en cultivo de tejidos de especies de la provincia de Misiones, merece citarse el trabajo publicado por Angeloni et al., 1992, en cedro (*Cedrela tubiflora*).

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un protocolo que permita el establecimiento y multiplicación *in vitro* de dos especies nativas, y la inducción a organogenesis a partir de segmentos de hojas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las especies ensayadas fueron las siguientes: Guatambú blanco (*Balfourodendron riedelianum*) y Cedro misionero (*Cedrela fissilis*), utilizando material proveniente de árboles adultos rebrotados en laboratorio y plantas de tres años. Los explantos establecidos *in vitro* consistieron de segmentos uninodales proveniente de brotes nuevos y segmentos de hojas.

Preparación del explanto

Rebrote de árboles adultos: Durante el mes de mayo se cortaron ramas laterales de la base de la copa de árboles localizados en el municipio de Eldorado, provincia de Misiones, las cuales se mantuvieron en bolsas de polietileno hasta su arribo al laboratorio. Las ramas fueron sumergidas en frascos con agua, previo corte fresco de las

bases, a temperatura ambiente, y 12 horas de luz incandescente. Dos veces por semanas se renovaba el agua de los frascos, y las ramas eran rociadas con benlate (450 mg/l). Al cabo de 15 días las ramas comenzaron a brotar y el agua fue cambiada por solución de Knop. Cuando los brotes alcanzaron tres cm de longitud, y por lo menos contenían dos yemas, fueron cortados y utilizados como explantos para el establecimiento *in vitro*.

Rebrote a partir de plantas de tres años:

Plantas provenientes del vivero de la facultad de Ciencias Forestales de Eldorado, UNaM, fueron decapitadas para forzar de esa manera la inducción de brotes laterales. El material fue mantenido en laboratorio, a temperatura ambiente, y 12 horas de luz.

Esterilización:

La siguiente metodología de esterilización se utilizó en forma estándar para todos los explantos: Inmediatamente de cortados, los brotes fueron puestos bajo agua corriente durante cinco minutos. Luego de defoliados y seccionados en segmentos de por lo menos dos yemas cada uno, los segmentos y hojas fueron sumergidos en etanol al 70 %, por un minuto, seguido de una inmersión en solución de lavandina comercial al 10 % con dos gotas de detergente comercial, durante cinco minutos, con agitación. Los explantos así esterilizados fueron llevados a la cámara de flujo laminar y enjuagados tres veces con agua destilada estéril, dos minutos cada enjuague, seguido de una segunda inmersión en lavandina al 5 % por cinco minutos y tres enjuagues con agua estéril.

Medios de cultivo

Los medios de cultivos ensayados fueron los siguientes: Murashige and Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) y Woody Plant Medium (WPM) (McCown y Sellmer, 1987), suplementados con 2.5 % de sacarosa, 0.8 % de agar, pH al 5.8 +/- 0.05. En el cultivo de segmentos nodales las siguientes combinaciones y concentraciones de BAP (Benzylamino purina) y ANA (Acido naftaleno acético) fueron ensayadas: 0.3, 0.5, y 0.8 mg/l BAP y 0.03 y 0.05 ANA. Para el cultivo de segmentos de hojas se ensayaron las siguientes concentraciones y combinaciones de BAP y ANA: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, y 2.5 mg/l de BAP y 0.1, 0.2, y 0.5 mg/l de ANA.

Cultivo

Los segmentos nodales estériles, fueron

seccionados en segmentos conteniendo una sola yema, e inmediatamente cultivados en los medios de cultivos arriba mencionados. Se usaron tubos de cultivos de 2.5 cm de diámetro y 11 cm de alto de base plana, tapados con doble capa de resinite y cultivados a 27 °C +/- 2 °C de temperatura, y un fotoperíodo de 16 horas de luz fluorescente. Todos los tratamientos fueron repetidos cinco veces.

Los subcultivos fueron llevados a cabo en MS, suplementados con 0.5 mg/l de BAP y 0.05 mg/l de ANA, suplementados en algunos casos con carbón activado al 1 %.

El cultivo de hojas se llevo a cabo de la siguiente manera: hojas provenientes de los rebrotes de plantas de tres años en laboratorio fueron seccionadas en segmentos de aproximadamente 0.5 cm, pertenecientes a la base, centro y ápice de la hoja, cultivándose en frascos conteniendo 50 ml de medio de cultivo, con su cara abaxial o adaxial indistintamente en contacto con el medio. Los cultivos se mantuvieron a la luz, con un fotoperíodo de 16 horas de luz fluorescente, a 27 °C +/- 2°C (Rocha S. P., 1991).

RESULTADOS

Guatambú Blanco (*Balfourodendron riedelianum*)

Segmentos nodales

a) Establecimiento

El porcentaje de contaminación de los explantos provenientes de rebrote de rama fue de un 30 %, indicando que la metodología de esterilización debe ser optimizada. Mientras que los porcentajes bajos de contaminación (5%), observados para el material proveniente del rebrote de plantas de tres años, indican que la metodología de esterilización utilizada, fue la apropiada.

Los resultados obtenidos como respuesta a los medios de cultivos, indican que el mejor desarrollo del explanto y producción de brotes se obtuvo en los explantos cultivados en medio de MS, suplementado con 0.5 mg/l de BAP y 0.03 mg/l de ANA, con un promedio de dos brotes por explantos, después de tres semanas de establecidos.

b) Subcultivos

Los brotes obtenidos *in vitro* fueron subcultivados al medio MS con las mismas concentraciones de BAP y ANA. Las observaciones obtenidas al cabo de un mes de subcultivados indicaron una tasa de multiplicación de dos brotes por explantos, observándose también, que las hojas que permanecían en contacto con el medio, formaban callos verdes y vigorosos. También fue posible observar problemas de vitrificación en un 20 %

de los explantos. Cuando los explantos fueron subcultivados a un medio de la misma composición que el anterior pero suplementado con carbón activado al 1 %, se observó una disminución en la vitrificación y elongación de los brotes, en un promedio de 3 cm al cabo de cinco semanas, mientras que los explantos subcultivados a medio sin carbón activado, formaron callos y no elongaron. Después de seis meses del establecimiento se obtuvo una tasa de regeneración baja (10%), los explantos fueron subcultivados cuatro veces, elongaron un promedio de 5 cm. Actualmente se esta desarrollando un protocolo para multiplicación y enraizamiento.

Cultivo de hojas

Se observó formación de callos en todos los tratamientos ensayados, excepto en el tratamiento donde la concentración de BAP y ANA fue 5 mg/l y 0.5 mg/l respectivamente. La mayor producción de callos se observó cuando la concentración de BAP fue de 2.5 mg/l

Cedro misionero (*Cedrela fissilis*)

Segmentos nodales

a) Establecimiento

El porcentaje de contaminación observado en el material proveniente de rebrote de ramas fue de un 80 %, lo cual indica que la metodología de esterilización debe ser optimizada. Mientras que para el material proveniente del rebrote de plantas de tres años, el 12 % de contaminación observada indica que la metodología de esterilización utilizada fue apropiada. Los resultados obtenidos como respuesta a los medios de cultivos, indican que no existen diferencias significativas con los medios ensayados, MS y WPM.

b) Subcultivos

En el primer subcultivo se observaron diferencias en la respuesta del explanto a las distintas concentraciones de BAP utilizadas. Se observó formación de callos en los subcultivos en medio suplementado con 0.1 mg/l de BAP. Al cabo de cuatro meses y tres subcultivos los explantos elongaron 3 cm en promedio, pero fueron perdiéndose debido a la formación de callos o amarramiento.

Cultivo de hojas

Después de 25 días del cultivo, los segmentos de hojas presentaron formación de raíces adventicias en las nervaduras de las mismas. Los segmentos pertenecientes a la región central de la hoja formaron una mayor proporción de callos y raíces. Con

respecto a la concentración y combinación de BAP y ANA, aquellos cultivos en los cuales la relación de BAP/ANA era 10/1 respectivamente (1.0 mg/l BAP/0.1 mg/l ANA; 2.0 mg/l BAP/0.2 mg/l ANA) presentaron un mayor desarrollo de callos. Cuando los valores de la relación BAP/ANA se alejaban de 10/1, ya sea aumentando o disminuyendo, la formación de callos y raíces disminuyó.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran la factibilidad de establecer *in vitro* material joven y adulto de guatambú y cedro. La inducción de brotes a partir de ramas sumergidas en agua en laboratorio probó ser una técnica apropiada para obtener material rejuvenecido para el establecimiento *in vitro*. Las ramas fueron cosechadas solamente en el mes de mayo y junio, siendo necesario entonces, continuar las observaciones en los sucesivos meses para determinar la época óptima que permita obtener la mayor producción de brotes por rama.

En guatambú fue factible determinar el medio de cultivo óptimo para el establecimiento de explantos provenientes de rebrote de ramas o plantas de dos y tres años. Si bien la tasa de regeneración fue baja, los explantos sobrevivieron seis subcultivos y elongaron cinco centímetros. Fue posible la inducción de callos a partir de segmentos de hojas, los cuales se mantuvieron verdes por más de ocho semanas. Resulta alentador las observaciones obtenidas indirectamente del cultivo *in vitro* de segmentos nodales cuyas hojas en contacto con el medio de cultivo formaron callos verde oscuro, con nódulos. Esto nos indica que la factibilidad de inducir brotes se incrementa (posiblemente por tratarse de material más rejuvenecido y proveniente de un microambiente especial). En la actualidad, se realizan en nuestro laboratorio ensayos para el desenvolvimiento de un protocolo de multiplicación y enraizamiento.

La formación de raíces en el cultivo de segmento de hojas de Cedro, permiten especular sobre la existencia de altas concentraciones de auxinas endógenas.

De lo observado en esta serie de experimentos, se puede concluir que:

1. La metodología de sumergir ramas en agua para la obtención de brotes nuevos para cultivo *in vitro* es apropiada.
2. El establecimiento *in vitro* de guatambú es posible en medio MS, suplementado con 0.5

- m/l de BAP y 0.03 mg/l de ANA y en cedro ambos medios, MS o WPM pueden ser utilizados.
3. La metodología de esterilización debe ser optimizada.
4. La presencia de carbón activado en el medio de cultivo es importante, para permitir la elongación de los brotes de guatambú obtenidos *in vitro*.
5. Es posible la inducción de callos a partir del cultivo de segmentos de hojas de guatambú y de callos y raíces en cedro. Es necesario continuar con los estudios tendiente a la inducción de brotes adventicios.

BIBLIOGRAFÍA

- * Angeloni, P. N., L.A. Mroginski, H. Y. Rey, E. A. Flachslund y M. C. Inda. 1992. Establecimiento *in vitro* de especies de los géneros *Gleditsia*, *Prosopis*, *Toona* y *Cedrela*. FACENA 9: 135-150. Facultad de Ciencias Exactas Y Naturales y Agrimensura, Corrientes, Argentina.
- * Heywood, V. H. 1992. Efforts to conserve tropical plants-A global perspective. En: Conservation of plant genes-DNA banking and *in vitro* biotechnology. Adams y Adams eds. Academic Press, Inc. San Diego, New York, Boston, London, Tokio, Toronto.
- * Mascarenhas, A. F. y E. M. Muralidharan. 1993. Clonal Forestry with Tropical Hardwoods. En: Clonal Forestry II, Conservation and Application. Pp.: 169-187 Ed. M. R. Ahuja y W. J. Libby. Springer-Verlag. Berlin.
- * Mattick, J. S., E. M. Ablett, y D. L. Edmonson. 1992. The gene library preservation and analysis of genetic diversity in Australia. En: Conservation of plant genes-DNA banking and *in vitro* biotechnology. Adams y Adams eds. Academic Press, Inc. San Diego, New York, Boston, London, Tokio, Toronto.
- * Mc Cown, B. y J. Sellmer. 1987. General media and vessels suitable for woody plant culture. En: Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 1: General Principles and Biotechnology. Pp.: 4-16. Ed.: J. Bonga y D. Durzan. Martinus Nijhoff Publishers. Boston-Lancster.
- * Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Phys. Plant. 15: 473-497.
- * Rocha, S. P. 1991. Micropropagation and *Agrobacterium* Transformation of Willow (*Salix lucida* Muhl.). Tesis de Maestría, College of Environmental Science and Forestry, State University of New York, Syracuse, NY. USA. ■