

UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA MULTIPLICACIÓN CLONAL DE LEÑOSAS NATIVAS DE INTERÉS MADERERO Y MEDICINAL.

Coronel, Carolina N.^{1,2}; Alzugaray, Claudia²; Bueno, Mirian S.².

¹*Becaria BIT de Fundación Banco Santa Fe*

²*Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Agrarias, UNR, Zavalla, Santa Fe.*

Área: Ingeniería

Sub-Área: Otras ingenierías y tecnologías

Grupo: Y

Palabras clave: micropropagación, *in vitro*, algarrobo

INTRODUCCIÓN

Los bosques nativos de la provincia de Santa Fe sufren un marcado deterioro, debido fundamentalmente a la deforestación y la fragmentación de los mismos. El algarrobo blanco (*Prosopis alba* Griseb.) es una especie muy demandada debido a la calidad e imputrescibilidad de su madera y el mistol del zorro (*Castela coccinea* Griseb.) posee gran interés por sus propiedades medicinales e industriales. Actualmente la deforestación anual es de 30.000 ha aproximadamente, esto implica una tasa de deforestación cercana a las más altas del mundo (Carnevale et al., 2007).

La micropropagación *in vitro* de plantas, es una de las herramientas que permite propagar árboles seleccionados por sus características fenotípicas como: altura, rectitud de fuste, copa, alto rendimiento de madera y producción de frutos. Además, esta técnica permite incrementar la tasa de multiplicación, que por la vía sexual difícilmente se pueden alcanzar, y mantener un alto margen de sanidad y estabilidad genética del material (Rosero, 2004). Sin embargo, para implementar un plan de propagación masiva, es necesario seleccionar los genotipos mejor adaptados a las condiciones de la región. Esto implicará adaptar y ensayar los protocolos previamente establecidos y mejorar algunos aspectos del pasaje a tierra. Algunos antecedentes relacionados con esta metodología los constituyen los trabajos de varios autores (Domecq, 1985, 1988) en los cuales se acota la técnica de cultivo *in vitro* de yemas axilares y se ensayan distintos métodos de enraizamiento.

La micropropagación es una práctica biotecnológica usada en especies forestales pero poco utilizada para especies nativas (Bueno, 2006). El cultivo de tejidos implica una respuesta rápida para cumplir con el objetivo planteado: propagación clonal *in vitro* de especies nativas leñosas, ya que se obtendrán plantines de alta calidad y mayor vigor (crecimiento y sanidad). Puesto que esta técnica, a nivel básico, requiere poco equipamiento también puede ser utilizada como conservación de germoplasma (Verzino, 2005).

OBJETIVO

Establecer un protocolo de propagación clonal *in vitro* de especies nativas leñosas de interés maderero y medicinal, tales como *Prosopis alba* Griseb y *Castela coccinea* Griseb.

Proyecto: Utilización de técnicas biotecnológicas para la multiplicación clonal de leñosas nativas de interés maderero y medicinal.

Becaria BIT de Fundación Banco Santa Fe: Coronel, Carolina Noelia

Directora del proyecto: Bueno, Mirian Susana

Co-directora del proyecto: Alzugaray, Claudia

METODOLOGÍA DE TRABAJO

1. Producción de microestacas *in vitro* de *Prosopis alba* G. (algarrobo blanco)

Las semillas se obtuvieron a partir de frutos procedentes de rodales puros de *P. alba* de la provincia de Córdoba. Las semillas se escarificaron con lija, se desinfectaron sumergiéndolas 1' en etanol y se evaluaron diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (HCINa) y tiempos de exposición: 10' HCINa 2%, 10' HCINa 4%, 20' HCINa 2% y 20' HCINa 4%. Posteriormente se realizó un triple lavado con agua esterilizada. Se sembraron 120 semillas en medio agar-agua y se evaluó: porcentaje de contaminación, porcentaje de germinación y vigor, expresado como tiempo medio de germinación máxima (TMG) en días.

A los 20 días las plántulas obtenidas fueron repicadas a medio MS en 3 diluciones: MS $\frac{1}{4}$, MS $\frac{1}{2}$ y entero MS 1 con 3% de sacarosa y 0,7 g.l⁻¹ de agar-agar. Se registró: número de nudos, número de hojas desplegadas y presencia de ramificaciones. Se seleccionaron al azar 35 plantas y de cada una de ellas se obtuvieron 4 secciones nodales, sin tener en cuenta el primer entrenudo. Éstas fueron repicadas a MS $\frac{1}{2}$ y tres tratamientos: t: MS $\frac{1}{2}$, α : MS $\frac{1}{2}$ + ANA 0,5 μ M + BAP 1 μ M, β : MS $\frac{1}{2}$ + ANA 0,5 μ M + BAP 0,6 μ M. Los ensayos se realizaron en cámara de germinación con un fotoperíodo de 12 horas y una temperatura de 25°C.

Los resultados se compararon con la Prueba de T al 0,05%, mediante el software InfoStat.

2. Comparación del crecimiento de las plantas de *Prosopis alba* G. (algarrobo blanco) germinadas *in vitro* con las germinadas en arena

Las semillas se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado y se desinfectaron con HCINa 2% durante 10 min, con el agregado de 3 gotas de Twin. Se realizó el triple lavado con agua esterilizada. Se sembraron 20 semillas bajo cámara de flujo laminar en medio MS $\frac{1}{2}$ y otras 20 semillas se sembraron en arena. Éstas últimas se regaron con MS $\frac{1}{2}$ líquido. Todas las semillas se colocaron en cámara de germinación con un fotoperíodo de 12 horas y una temperatura de 25°C. Luego de 4 semanas se trasplantaron 10 plantas de cada tratamiento a macetas con tierra y perlita. Cada maceta fue regada con agua y cubierta con una bolsa de polietileno, para disminuir el estrés del transplante. Diariamente se quitó la cubierta durante unos minutos hasta que las plantas estuvieron completamente rusticadas. Se evaluó el crecimiento de las plantas por medio de los parámetros: altura, número de nudos y número de ramificaciones.

3. Evaluación de la contaminación *in vitro* de *Castela coccinea* G. (mistol del zorro)

Se utilizaron ramas (del año) provenientes de un árbol de la localidad de Rosario, el mes de noviembre del 2016. Los brotes apicales fueron desinfectados con HCINa 1,5% durante 5'. Luego se realizó un triple lavado con agua esterilizada. Se realizaron tres tratamientos: t: MS $\frac{1}{2}$, α : MS $\frac{1}{2}$ + ANA 0,5 μ M + BAP 1 μ M, β : MS $\frac{1}{2}$ + ANA 0,5 μ M + BAP 0,6 μ M. Se colocaron en cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 12 horas y una temperatura de 25°C. Durante las cuatro semanas posteriores se evaluó el porcentaje de contaminación endógeno de los explantes.

RESULTADOS

1. Producción de microestacas *in vitro* de *Prosopis alba* G. (algarrobo blanco)

Se obtuvo un 100% de germinación, la desinfección fue 100% efectiva. El TMG fue de 1,09 días. La desinfección adecuada HCINa (2%) y 10' de tiempo de exposición. La altura media de las plántulas y la producción de brotes no presentó diferencias significativas entre los tres tratamientos. El tratamiento MS ½ mostró un mayor número de nudos y hojas desplegadas, siendo las diferencias significativas. La producción de brotes no varió significativamente entre los tratamientos. Se observó un mayor crecimiento y vigor en el medio testigo. El promedio de brotes por sección nodal fue de 1,2. El medio de cultivo más adecuado para la producción de brotes consiste en MS ½ + 1,5 ppm de BAP.

2. Comparación del crecimiento de las plantas de *Prosopis alba* G. (algarrobo blanco) germinadas *in vitro* con las germinadas en arena

Se observó un mayor vigor de las plantas generadas a partir de cultivo *in vitro*. Las plantas poseen mayor altura, mayor número de nudos y mayor longitud de las raíces al momento del trasplante.

3. Evaluación de la contaminación *in vitro* de *Castela coccinea* G. (mistol del zorro)

El total de los brotes apicales sembrados *in vitro* presentaron contaminación producida por bacterias y hongos endógenos, los tratamientos de desinfección fueron insuficientes.

CONCLUSIONES

1. Producción de microestacas *in vitro* de *Prosopis alba* G. (algarrobo blanco)

La desinfección adecuada para obtener el 100% de explantes libres de contaminantes es HCINa (2%) y 10' de tiempo de exposición. La concentración de MS diluido al 50% favorece el crecimiento de las plántulas de *Prosopis alba* G. La combinación de ANA (auxina) y BAP (citoquinina) no favorece el enraizamiento de las secciones nodales. El medio de cultivo más adecuado para la producción de brotes consiste en MS ½ + 1,5 ppm de BAP. Con el mismo se promueve la neoformación de brotes a partir de meristemas preexistentes, logrando una planta por cada yema. Al no favorecer la formación de callos, los individuos regenerados muestran mayor estabilidad genética.

2. Comparación del crecimiento de las plantas de *Prosopis alba* G. (algarrobo blanco) germinadas *in vitro* con las germinadas en arena

Las condiciones del cultivo *in vitro* favorecen la germinación y el crecimiento inicial de la plántula. La semilla no se deshidrata en ningún momento y permanece libre de patógenos. Se logra una menor mortandad de plántulas, mayor crecimiento radical y plántulas más vigorosas.

3. Evaluación de la contaminación *in vitro* de *Castela coccinea* G. (mistol del zorro)

La desinfección de los explantes aéreos de leñosas es la mayor limitante para lograr cultivos axénicos. La exposición a HCINa 1,5% durante 5' resulta ineficiente para eliminar las enfermedades endógenas de los brotes.

BIBLIOGRAFÍA

- Alzugaray C., Carnevale N. J., Salinas A. R., Pioli R.** 2005. *Observations on quality of Schinopsis balansae* Engl. *Seeds. Seed Technology* (27) 1:49-58.
- Alzugaray C., Carnevale N. J., Salinas A. R., Pioli R.** 2006. *Quality of Aspidosperma quebracho blanco* Schlecht. *Sedes. Quebracho* N° 13 (26-35).
- Alzugaray C., Carnevale N. J., Salinas A. R., Pioli R.** 2007. *Factores bióticos y abióticos que afectan la calidad de las semillas de Schinopsis balansae* Engl y *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltld. *Revista Iberoamericana de Micología*. 24 (2): 142-147.
- Bonga J. M., Von Aderkas P.** 2012. *In vitro culture of trees, Forestry Sciences*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Bueno M., Severín C., Carnevale N. J., Alzugaray C., Giubileo G.** 2006. *In vitro germination and production of Maytenus vitisidaea plants in two culture media*. *Molecular Medicinal Chemistry*. 11: 8-9.
- Carnevale N. J., Alzugaray C., Di Leo N.** 2007. *Studying deforestation in the forest wedge of Santa Fe using satellite remote sensing*. *Quebracho* N° 14 (47-56).
- Di Rienzo, J.; Bobledo, W.; Casanoves, F.; Balzarini M.; González, L.** et al. 2014. *InfoStat*. Versión Beta. Estadística y Biometría, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Domecq, C.** 1985. *Propagación en gran escala de paraíso gigante (M. azedarach L. var. gigantea) mediante el cultivo in vitro de ápices caulinares*. *Phyton*.
- Domecq, C.** 1988 *Cultivo in vitro de yemas axilares de paraíso gigante (M. azedarach L. var. gigantea)*. *Phyton*.
- Murashige T., Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-497.
- Ramos Amaya.** 2012. *Avances en la micropropagación in vitro de plantas leñosas*. Especialización en Biotecnología Agraria, Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), Colombia.
- Rosero, N. C.** 2004. *Micropropagación Clonal de árboles seleccionados de Tectona grandis L. (Teca)*. Disponible en: <http://www.visagesoft.com>
- Sansberro P., Rey H., Mroginski L.A., Luna C.** 2003. *In vitro plant regeneration of Schinopsis balansae (Anacardiaceae)*. *Trees*.17: 542-546.
- Sharry S., Adema M., Abedini W.** 2015. *Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Universidad Nacional de la Plata (UNLP), La Plata.
- Taboada L., Gulotta M., López C.** 1995. *Preliminar results of in-vitro culture of giant Chinaberry tree (Melia azedarach var. gigantea) from axillar buds*. *Quebracho* (3): 43-48.
- Verzino, G.E.; Joseau, M.J.** 2005. *El banco nacional de germoplasma de Prosopis*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UN de Córdoba. 235 p.

Proyecto: Utilización de técnicas biotecnológicas para la multiplicación clonal de leñosas nativas de interés maderero y medicinal.

Becaria BIT de Fundación Banco Santa Fe: Coronel, Carolina Noelia

Directora del proyecto: Bueno, Mirian Susana

Co-directora del proyecto: Alzugaray, Claudia