

DESINFECCIÓN Y ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE SEMILLAS DE *Bastardiopsis densiflora* (HOOK. & ARN.) HASSLER

DISINFECTION AND ESTABLISHMENT IN VITRO OF *Bastardiopsis densiflora* SEEDS (HOOK. & ARN.) HASSLER

Fecha de recepción: 14/11/2014// Fecha de aceptación: 03/03/2015

Ana María Noguera

M.Sc. Lic. en Genética, Profesor adjunto regular, Investigador, Laboratorio Biotecnología Vegetal, FCF, UNaM. E-mail: amnogue@arnet.com.ar

Micaela Evelin Martinez

M.Sc. Ing. Ftal., Adscripto, Investigador, Laboratorio Biotecnología Vegetal, FCF, UMaM. E-mail: micaevelin@yahoo.com.ar

Alejandro Friedl

Ing. Ftal. M.Sc. en Manejo Forestal, Profesor titular regular, Investigador, Laboratorio de Inventario y Manejo, FCF, UNaM. E-mail: afriedl@facfor.unam.edu.ar

Fernando Vier

-Alumno Prof. Biología, ayudante de investigación, Laboratorio Biotecnología Vegetal, FCF, UMaM. E-mail: ferjviersh@live.com

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo es, desarrollar un protocolo de desinfección y establecimiento *in vitro* de semillas de *Bastardiopsis densiflora* (Hook. & Arn.) Hassler “loro blanco” para su posterior multiplicación. *B. densiflora* es una especie arbórea nativa de rápido crecimiento, maderable, melífera y de uso múltiple, indicada para plantaciones en fajas de enriquecimiento en bosques degradados. Se trabajó con semillas proveniente de árboles de monte nativo de la zona de Aristóbulo del Valle (Misiones). La cosecha se realizó directamente desde el árbol realizando la poda de ramas terminales con frutos. En la desinfección del material vegetal se evaluaron concentraciones y tiempos de exposición de sustancias desinfectantes. También se evaluó un pretratamiento de escarificación mecánica. Las semillas se establecieron en un medio Murashige y Skoog (1962), en cámara de cría, en oscuridad y con condiciones controladas de temperatura. Se obtuvieron, en todos los tratamientos de desinfección, bajos o nulos

SUMMARY

The main objective of this work is to develop a disinfection protocol and the establishment *in vitro* of seeds of *Bastardiopsis densiflora* (Hook. & Arn.) Hassler “loro blanco” for further multiplication. *B. densiflora* is a fast growing native tree species, for multiple uses such as timber and honey feed, and also suitable for enrichment strips planting in degraded forests. We worked with native tree seeds from Aristobulo del Valle (Misiones). The harvesting was carried out right from the trees, by pruning the terminal branches with fruits. In the plant material disinfection, concentrations were evaluated and exposure time to disinfectant solutions. A pretreatment of mechanical scarification was also evaluated. The seeds were established in a Murashige and Skoog (1962) medium, in a breeding chamber in controlled conditions of temperature and darkness. In all disinfection treatments, low or zero contamination rates in the seeds were obtained. The highest germination percentage (91,58 %) was obtained by performing a mechanical scarification followed by a simple disinfection.

porcentajes de contaminación de las semillas establecidas. El mayor porcentaje de germinación (91,58 %) se obtuvo al realizar una escarificación mecánica seguida de una desinfección simple.

Palabras clave: cultivo in vitro, micropropagación

Keywords: *In vitro* culture, micropropagation.

INTRODUCCIÓN

B. densiflora “loro blanco”, es una especie arbórea nativa de rápido crecimiento, maderable, melífera y de uso múltiple. Presenta un típico crecimiento monopódico que es uno de los aspectos más importantes para lograr un fuste recto maderable. Su madera moderadamente dura y semi-pesada con una densidad media 0,6–0,7 g/cm³, presenta un veteado delicado, textura fina y grano derecho. Es fácil de trabajar, utilizada en la construcción y para la fabricación de muebles.

Árbol de desarrollo promisorio, en fajas de crecimiento alcanza una altura promedio de 11 metros y 10 cm. de diámetro con una supervivencia del 60 % a los 7 años. Esta especie es ideal para su manejo maderable a partir de los sistemas de conducción de la regeneración natural, en áreas de bosques perturbados y con claros amplios (EIBL *et al.* 2003). Es sensible a las heladas en sus primeros años de crecimiento por lo que deberá ser protegida hasta que la altura de la yema apical no sufra daños por la misma, esta protección estará dada por el bosque remanente en las fajas de crecimiento. Por lo que es una especie indicada para plantaciones en fajas de enriquecimiento en bosque degradado debido a que tiene efectos beneficiosos sobre los suelos de los bosques degradados (MONTAGNINI *et al.* 2006). En Misiones, los proyectos de reforestación y del enriquecimiento forestal de bosques degradados empleando especies nativas como *B. densiflora*, son estrategias viables para mantener la biodiversidad y recuperar el ecosistema forestal. Según EIBL *et al.* (2012) y en base a resultados obtenidos tras establecer un ranking de especies por crecimiento, el mismo estaría encabezado por: Timbó en plantación mono específica o mixta, Cañafístola y *B. densiflora* en plantación mixta.

Con respecto a la importancia de la especie, una de las características es su alta calidad como recurso melífero. MIRANDA *et al.* (2013), señalan que en el marco de APIMONDIA 2011 la miel de “loro blanco” fue galardonada por técnicos apícolas nacionales entre las 10 mejores del país (WWW.NEARURAL.COM). Estos logros hablan de la potencialidad de la región para producir mieles diferenciales por origen botánico-geográfico y que podrían ser catalogadas como “orgánicas” y /o “ecológicas”; sin embargo en Misiones según MIRANDA *et al.* (2012), en las mieles se registran como recursos nectarios, otras especies vegetales con

porcentajes mayores, entre el 68 % al 37 %, y solo un 21% de aparición de la especie *B. densiflora*. De acuerdo a distintas investigaciones realizadas en torno a la producción y calidad de las mieles se interpreta que, la baja presencia de *B. densiflora* en las mieles de la región puede deberse a la escases del recurso nectarario, a pesar de que es una de las especies más buscadas por los apicultores debido a la calidad de las mieles generadas.

En la apicultura además es de gran interés para los productores locales ya que provee de recursos a las abejas durante los meses de invierno, debido a su floración temprana y abundante, período en el cual hay escasas fuentes de alimento para la apicultura.

Teniendo en cuenta que la provincia de Misiones posee una superficie de bosques degradados que requieren de su reestructuración y enriquecimiento y que la semilla de *B. densiflora* posee un poder germinativo bajo, de 20 a 40 %, según EIBL *et al.* (2012b); la germinación, producción y desarrollo de plantines a través de la micropropagación, puede convertirse en una estrategia viable.

La micropropagación permite la multiplicación de plantas a partir de pequeñas porciones de tejido, de manera rápida y con la posibilidad de multiplicar genotipos selectos. Es una técnica ampliamente utilizada en el mundo aplicada a árboles leñosos ya que permite fortalecer la capacidad de multiplicación de las especies, con la revigorización y rejuvenecimiento vegetal. Debido a la ventaja que ofrece la micropropagación y la necesidad de conocer el comportamiento de esta especie en el cultivo *in vitro*, se plantea utilizar esta técnica para la investigación de base.

En América Latina y Centro América, el estudio de la micropropagación en especies leñosas de interés comercial está ampliamente difundido, en cambio investigaciones para la micropropagación de especies leñosas nativas de la Selva Misionera son escasas.

La presente investigación tendrá como antecedentes, investigaciones realizadas con especies leñosas, ya que para la especie *B. densiflora* no se poseen antecedentes sobre la micropropagación.

El objetivo principal es desarrollar un protocolo de desinfección y establecimiento de semillas de *B. densiflora* “loro blanco” para su posterior multiplicación con el objeto de obtener plantines.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Forestales, UNaM, Eldorado, Misiones.

El material vegetal utilizado para el estudio fueron, semillas de Loro blanco de árboles de monte nativo de la zona de Aristóbulo del Valle. La cosecha se realizó directamente desde el árbol realizando la poda de ramas terminales con frutos, luego se procedió a la limpieza y separación de los mismos para obtener las semillas.

Desinfección del material vegetal

Se realizaron ensayos de desinfección de las semillas de "loro blanco". Se utilizaron dos lotes de semillas de diferente cosechas, siendo el lote A utilizado en los ensayos 1 al 4 (tabla 1) y el lote B para los ensayos 2, 5 y 6 (tabla 2).

Procedimiento base de desinfección de semillas

El proceso de desinfección consistió en el lavado de las semillas en agua corriente con gotas de detergente comercial durante 10 min, seguido de múltiples enjuagues en agua corriente. Posteriormente las semillas, en cabina de flujo laminar, fueron desinfectadas con alcohol al 70 % durante 5 min, seguido de una solución de hipoclorito de sodio en los tiempos y concentraciones según cada tratamiento, finalizado el tratamiento de desinfección las semillas fueron enjuagadas con agua destilada estéril tres veces y se procedió a realizar la siembra en tubos con medio (MS), previamente preparados y esterilizados.

Tabla 1. Ensayos de desinfección en semillas de Loro blanco correspondientes al lote de cosecha A.
Table 1. Tests seeds disinfection of Loro blanco. Batch A.

Ensayo	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de exposición (min)	Pre Trat. de semillas
1	1 %	15	Base
2	2 %	15	Base
3	1 % y 0,5 %	15	Doble desinfección
4	2 % y 0,5 %	15	Doble desinfección

Tabla 2. Ensayos de desinfección en semillas de Loro blanco correspondientes al lote de cosecha B.
Table 2. Tests seeds disinfection of Loro blanco. Batch B.

E nsayo	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de exposición (min)	Pre Trat. de semillas
2	2 %	15	Base
5	4 %	30	Químico
6	2 %	15	Mecánico

Variaciones de desinfección

En algunos ensayos luego del procedimiento base de desinfección, se realizó una segunda desinfección con hipoclorito de sodio en una concentración de 0,5 % durante 5 min. y enjuague con agua destilada estéril tres veces.

En el lote de semillas B se evaluaron tratamientos de desinfección aplicando el procedimiento base con un porcentaje de hipoclorito de sodio del 2% durante 15 minutos de exposición (Base) y aumentando la dosis del desinfectante al 4% y el tiempo de exposición a 30 min., al que se llamó tratamiento Químico por efectuarse una escarificación química en la cobertura de las semillas

También se efectuó un pretratamiento a las semillas de escarificación mecánica, para lo cual las mismas fueron escarificadas con papel lija de grano fino 240 durante 10 min. y posteriormente las mismas fueron desinfectadas según el procedimiento base (Tabla 2).

Para cada tratamiento el número de repeticiones fue de 60 semillas, siendo la semilla la unidad experimental.

Establecimiento del material vegetal en el cultivo *in vitro*

La desinfección del material vegetal se realizó con sustancias desinfectantes y establecimiento del mismo en medios de cultivo *in vitro* adecuados para la fase a evaluar (Figura 1).

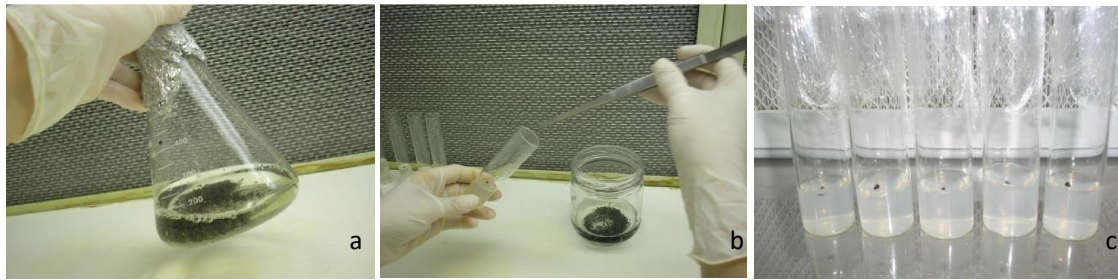


Figura 1. a Desinfección de semillas. b Establecimiento de semillas. c Semillas establecidas en MS.
Figure 1. a Disinfection of seeds. b Establishment of seeds. c Seeds *in vitro*.

El medio de cultivo basal empleado fue Murashige y Skoog (MS) 1962, suplementado con 2 % de sacarosa, en estado semisólido gelificado con 0,8 % de agar. El pH del medio de cultivo fue de 5,8 y se esterilizó en autoclave a 121°C de temperatura y 1,2 kg/cm² de presión durante 20 minutos.

Las condiciones de cultivo fueron, en oscuridad, el tiempo necesario para la germinación de las semillas y posteriormente las germinadas se llevaron a luz con un fotoperiodo de 16 horas luz y temperatura de 24 °C± 2 °C.

Diseño experimental y análisis estadístico

En todos los casos se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, con una distribución factorial de los tratamientos. La unidad experimental estuvo constituida por cada uno de los explantes evaluados. La variación entre los tratamientos fue analizada aplicando análisis de varianza (ANOVA). Cuando el ANOVA indicó diferencias entre las medias de los tratamientos, se aplicó el Test Duncan de comparaciones múltiples, para comparar los tratamientos que presentaron diferencias significativas, con $\alpha = 0.05$, para las variables evaluadas.

Las variables consideradas para evaluar el efecto de los tratamientos fueron: % de contaminación de las semillas establecidas y % de germinación de las mismas.

hipoclorito de sodio explica las diferencias entre los tratamientos, mientras que una segunda desinfección y la interacción entre los factores evaluados no influyeron sobre la variable estudiada.

Con respecto a la germinación *in vitro* de las semillas se observó que, la misma fue paulatina durante todo el tiempo en el que se desarrollaron los ensayos (120 días), lográndose un porcentaje máximo de germinación de plántulas en el tratamiento 4 (Tabla 3 y Figura 2).

Tabla3. Porcentaje de contaminación y germinación de semillas, luego de los tratamientos de desinfección. A los 120 días del establecimiento. Lote de semillas A.

Table 3. Percentage of seeds contamination and germination seeds, after disinfection treatments. At 120 days of the establishment. Seeds batch A.

E nsayo	% de Contaminación	% de Germinación
1	1,8 ab	45,6 ab
2	3,6 ab	49,1 ab
3	7,5 b	34,0 b
4	0 a	61,4 a

Para cada evaluación, ensayos identificados con letras iguales en la misma variable de análisis, indican que no son significativamente distintos dado $\alpha=0.05$ según comparación múltiple de medias de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los ensayos de desinfección y establecimiento realizados para el lote de semillas A y tras efectuar los análisis estadísticos, se observó que, existen diferencias significativas entre los tratamientos (p-value: 0,0330 para la variable contaminación y p-value: 0,0372 para la variable germinación). En lo que respecta a porcentaje de contaminación de los explantes, el porcentaje de

En los ensayos de desinfección y establecimiento realizados para el lote de semillas B y tras efectuar los análisis estadísticos, se observó que, para la variable contaminación de explante no existieron diferencias significativas (Tabla 4).

Sin embargo, en lo que respecta a la germinación de las semillas se observaron marcadas diferencias en los tratamientos evaluados (Tabla 5).

En el tratamiento 6 en el cual las semillas sufrieron una escarificación mecánica, la germinación fue acelerada, obteniéndose un 81% de semillas germinadas a los 15 días del establecimiento,

lográndose un máximo de germinación de 91,58 % a los 45 días del establecimiento. En los tratamientos 2 y 5, la germinación fue gradual durante todo el tiempo del ensayo (160 días).

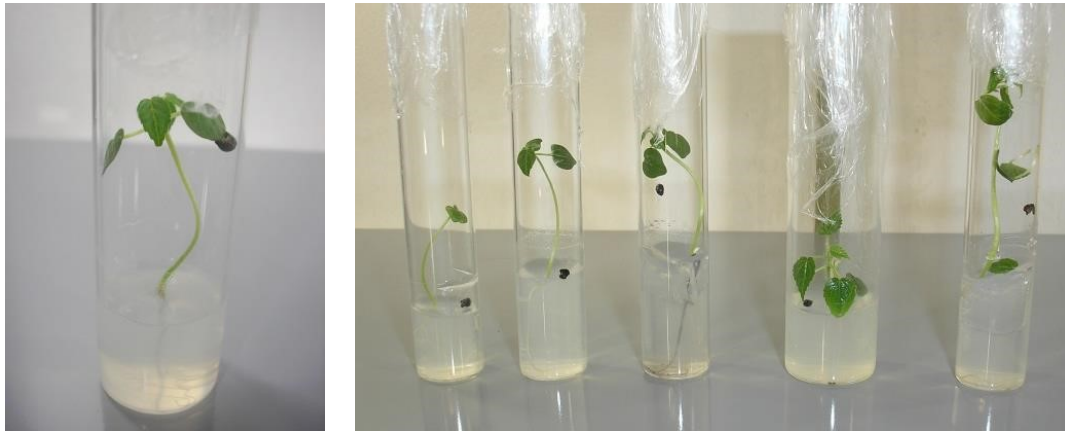


Figura 2. Semillas germinadas *in vitro*, estado de plantulas.
Figure 2. Young plants of *B. densiflora* developed in vitro.

Tabla 4. Porcentaje de contaminación de semillas luego de los tratamientos de desinfección. Lote de semillas B

Table 4. Percentage of seeds contamination after disinfection treatments. Seed batch B.

Evaluación	p-value	Ensayo 2		Ensayo 5		Ensayo 6
		% Contaminación		% Contaminación		% Contaminación
a los 15 días	0,1480	0	a	2	a	0,00
a los 30 días	0,1480	0	a	2	a	0,00
a los 45 días	0,3667	0	a	2	a	1,05
a los 60 días	0,3667	0	a	2	a	1,05
a los 85 días	0,3667	0	a	2	a	1,05
a los 160 días	0,3667	0	a	2	a	1,05

Para cada evaluación, ensayos identificados con letras iguales, indican que no son significativamente distintos dado $\alpha=0.05$ según comparación múltiple de medias de Duncan.

Tabla 5. Porcentaje de germinación de semillas luego de los tratamientos de desinfección. Lote de semillas B
Table 5. Percentage of seeds germination, after disinfection treatments. Seeds batch B.

Evaluación	p-value	Ensayo 2	Ensayo 5	Ensayo 6
		% Germinación	% Germinación	% Germinación
a los 15 días	<0,0001	29,47	38,67	81,05
a los 30 días	<0,0001	45,26	58,00	89,47
a los 45 días	0,0003	68,42	74,67	91,58
a los 60 días	0,0008	70,53	75,33	91,58
a los 85 días	0,0060	74,74	78,00	91,58
a los 160 días	0,0200	77,89	79,33	91,58

Para cada evaluación, ensayos identificados con letras iguales, indican que no son significativamente distintos dado $\alpha=0.05$ según comparación múltiple de medias de Duncan.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten arribar a las siguientes conclusiones.

Todos los tratamientos de desinfección evaluados mostraron bajos o nulos porcentajes de contaminación de las semillas establecidas, no mostrando diferencias entre los tratamientos de simple y doble desinfección.

El mayor porcentaje de semillas germinadas se logró con la escarificación mecánica, asimismo el tiempo necesario para la germinación de las semillas se logra disminuir gracias a la ruptura mecánica de la cubierta seminal.

BIBLIOGRAFÍA

EIBL, B.; Vera, N.; Mendez, R. 2003. Silvicultura de 10 especies arbóreas nativas con potencialidades para la producción de madera y otros usos alternativos. SAGPyA-PEA / FCF, UNaM.

EIBL, B.; Barth, S.R.; Montagnini, F.; Palavecino, J.; Lopez, M. A.; Dreyer, N. 2012. Especies nativas de uso múltiple en áreas de restauración en la provincia de Misiones. Actas 15as Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Facultad de Ciencias Forestales, UNaM - EEA Montecarlo, INTA.

EIBL, B.; González, C.; Otegui, M. y Dreyer, N. 2012. Protocolos tentativos para la propagación de 20 especies nativas de interés productivo de la selva misionera. Actas 15as Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Facultad de Ciencias Forestales, UNaM - EEA Montecarlo, INTA.

MIRANDA, D. E; Keller, H. A.; Amarilla, W. B; Ritter, L; Insaurrealde, C. F. 2012. Recursos apibotánicos en zona de apiarios Misiones, Argentina. Actas 15as Jornadas Técnicas Forestales y

Ambientales. Facultad de Ciencias Forestales, UNaM. EEA Montecarlo, INTA.

MIRANDA, D.; Aquino, D.; Pellizzer, N.; Vier, F.; Vier, L.; Insaurrealde, C.; Almada, C. y Salgado, C. 2013. Caracterización polínica de mieles de *Apis mellifera*. Producidas en Misiones, Argentina. Actas Jornadas Científicas Tecnológicas, 40º aniversario UNaM.

MONTAGNINI, F.; Eibl, B.; Fernandez, R. y Brewer, M. 2006. Estrategias para la restauración de paisajes forestales. Experiencias en Misiones, Argentina. Actas II Congreso Forestal Latinoamericano IUFRO. Chile, Talca.

MURASHIGE T. y Skoog F. 1962. Arevised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue. *PhysPlant*. 15: 473-493.