

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PILÓN (*Hyeronima alchorneoides*)

Lisette Valverde Cerdas

Instituto de Investigaciones y Servicios Forestales
Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

RESUMEN

Se obtuvieron plantas *in vitro* de pilón (*Hyeronima alchorneoides*) a partir de explantes de nudo de plántulas germinadas *in vitro*. Los explantes fueron cultivados en un medio básico MURASHIGE y SKOOG (1962) solo o suplementado con benciladenina, carbón activado y caseína hidrolizada. Para el crecimiento de las microestacas, la mejor respuesta se obtuvo con un medio suplementado con caseína hidrolizada. El enraizamiento de éstas se logró sin necesidad de adicionar auxinas al medio de cultivo. La proliferación de brotes fue mayor en un medio con BA. Estos brotes a su vez, fueron subdivididos en segmentos de nudo para incrementar la tasa de multiplicación. Después de un período de 60 días, las plantas fueron transferidas a condiciones de invernadero para su aclimatación. No obstante, bajo las condiciones evaluadas se obtuvo un porcentaje muy bajo de sobrevivencia.

ABSTRACT

Bully tree plants (*Hyeronima alchorneoides*) were obtained *in vitro* from nodal explants of seedlings germinated *in vitro*. Nodes were cultured in MS basal medium alone or supplemented with benzyladenine (BA), activated charcoal, or hydrolysate casein. For microcuttings growth the medium supplemented with hydrolysate casein gave the best results. Rooting was achieved without addition of auxins. Shoot proliferation was higher in the medium with BA. Nodal segments taken from these *in vitro*-proliferated shoots developed into plants when they were transferred to the best medium above mentioned. Microcuttings remained in basal medium for 60 days, after which they

were transferred to the greenhouse but the survival was low.

INTRODUCCION

El pilón (*Hyeronima alchorneoides*) es una especie maderable nativa del bosque tropical húmedo y muy húmedo. Es un árbol de mediano crecimiento, posee una madera de color café-rojizo relativamente pesada con un peso específico de 0,60 y una densidad de 0,79 g/cm³ (CARPIO 1992). Se caracteriza por su fácil y rápido secado a la sombra, resistencia a la intemperie y por sus cualidades físico-mecánicas que la hacen adecuada para cualquier tipo de trabajo, ya sea en ebanistería o construcción. En los últimos años, esta especie ha adquirido importancia debido a su gran adaptabilidad al campo abierto, que la convierte en una especie apropiada para ser utilizada en plantaciones forestales y en programas de reforestación (VALVERDE 1998).

El pilón presenta una alta producción de semilla y en promedio hay alrededor de 26.450 semillas por kilogramo. FLORES (1992) menciona que su viabilidad es de 10-15 días en condiciones de humedad y temperatura adecuadas y que el porcentaje de germinación es de 60 y 70%, pero varía mucho según la procedencia y madurez del árbol progenitor. La propagación vegetativa de esta especie ha sido poco estudiada y se menciona un 48% de sobrevivencia en el campo de plantas producidas a partir de pseudoestacas (ULATE 1996).

El cultivo de tejidos ha llegado a ser una importante herramienta en la propagación masiva y

para la preservación de varias especies de plantas y se ha empleado con éxito en la propagación de árboles maderables como *Tectona grandis* (BON y MONTEUUIS 1996). El objetivo de este trabajo fue estudiar el comportamiento *in vitro* de esta especie.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Investigaciones y Servicios Forestales de la Universidad Nacional. Las semillas de pilón (*Hyeronima alchorneoides*) provenían de un árbol de padres seleccionados y fueron suministradas por la Organización de Estudios Tropicales (OET). Las semillas en estado maduro e inmaduro, se lavaron en agua con jabón y se enjuagaron en alcohol de 95° por 5 minutos. Posteriormente se dejaron en cloro comercial (5,5% i.a.) en agitación durante 30 minutos. En la campana de flujo laminar se les extrajo el embrión y se distribuyeron en viales conteniendo un medio MURASHIGE y SKOOG (1962) (MS), suplementado con 3% de sacarosa y 1.8 g/L de gelrite. Los medios se ajustaron a un pH 5,7 antes de la esterilización y fueron distribuidos en viales de 11 cm de largo x 8 cm de diámetro. Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de crecimiento, con una temperatura de 27 °C, una humedad relativa de 87%, un fotoperíodo de 16 horas luz y una intensidad lumínica de 2000 lux.

A los 42 días de cultivo, cada planta fue seccionada y los nudos fueron distribuidos en un diseño irrestricto al azar en cuatro tratamientos: un MS completo, un MS más 0,1 g/L de carbón activado, un MS suplementado con 500 mg/L de caseína hidrolizada y un MS suplementado con 0,5 g/L de BA. Los cultivos fueron evaluados cada ocho días por un período de 60 días. Se evaluó el número de yemas por explante y el número de explantes que desarrollaron su parte aérea y radicular constituyéndose en plantas completas. El estudio de los datos se hizo con análisis de varianza y la comparación de medias con la prueba Tukey. Se utilizaron 20 repeticiones por tratamiento y cada vial representa una unidad experimental.

A los dos meses de cultivo, las plantas fueron transferidas al invernadero, para ello se les eliminó los residuos de medio de su sistema radical y se

colocaron en bolsas plásticas de polietileno, conteniendo una relación de arena, tierra y abono orgánico de 3:1:1.

RESULTADOS Y DISCUSION

Alrededor de un 10% de las semillas de pilón contenían más de un embrión y el máximo de embriones observado por semilla fue de tres. El 35% de las semillas utilizadas para este estudio, se perdió debido a que al realizar la disección de éstas para extraer el embrión, se hallaron larvas en diferentes estados de desarrollo e individuos adultos de la avispa *Eurytoma sp.*. Al parecer la avispa ovoposita el fruto y la larva se alimenta del embrión causándole la muerte, lo que podría relacionarse con una disminución en los porcentajes de germinación. Según datos de COSEFORMA (1998), existen diferencias entre los porcentajes de germinación entre frutos de diferentes árboles y el daño de los frutos por avispa de esta familia es mayor en la primera cosecha del año.

El porcentaje de germinación de los embriones en el medio de cultivo evaluado fue de un 100%. Estos inician su crecimiento desde los tres días de cultivo y a los 35 días ya se obtienen plántulas con 5 a 7 nudos. Se ha observado que en condiciones *in vivo* con tratamientos pregerminativos, el tiempo de inicio de la germinación puede disminuirse en 17 a 20 días en vez de 25 a 30 días sin tratamiento (COSEFORMA 1998). En contraste con estos datos, realizando la germinación *in vitro* de los embriones, no sólo se logró reducir el período germinativo de 15,5 a 24,5 días, según el método con que se compare, sino que además nos aseguramos la germinación de todas las plántulas.

De acuerdo con el análisis de los datos presentados en el cuadro 1, se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos al 5% de significancia. La respuesta observada en el medio de cultivo suplementado con BA mostró diferencias con el resto de los tratamientos. Este medio no favoreció el desarrollo de los nudos en plantas, pero sí la proliferación de brotes en cada yema y además inhibió la formación de raíces en los explantes.

Los tratamientos que contenían un MS completo, MS más carbón activado y MS más caseína

Cuadro 1.

Efecto de cuatro tratamientos sobre el desarrollo de microestacas de pilón (*Hyeronima alchorneoides*)

Tratamiento	Número total de nudos desarrollados en plantas	Número total de yemas
MS	11a	25,7ab
MS + carbón activado	10a	19,2a
MS + caseína hidrolizada	14a	24,4ab
MS + BA	0b	37,2b

Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia estadística significativa al 5% de significancia.

hidrolizada no presentaron diferencias entre ellos. En general estos tratamientos sí favorecieron el crecimiento de los nudos, tanto de área foliar como radicular a diferencia del tratamiento con BA. Sin embargo, las plantas que crecieron en el medio que contenía caseína hidrolizada, mostraron un mejor desarrollo foliar que los otros tratamientos y también un color más verde en las hojas. Por tanto, se definió este tratamiento como el mejor para el crecimiento de microestacas de pilón. RAGHAVAN y SRIVASTAVA (1982), consideran que el efecto promotor del crecimiento por parte de la caseína hidrolizada, se debe a su alta presión osmótica.

En varias especies de leguminosas, como por ejemplo cenízaro, el carbón activado mostró tener un efecto positivo sobre el desarrollo de brotes (VALVERDE *et al.* 1997). Este efecto del carbón sobre el crecimiento de las plantas no está bien comprendido, pero se ha asociado con la absorción de compuestos del medio de cultivo que pueden inhibir el crecimiento (GEORGE y SHERRINGTON 1984). DUMAS y MONTEUUIS (1995) sugieren que el carbón activado contiene poliaminas que pueden jugar un papel muy importante en eventos morfogénicos.

Por su parte, el medio de cultivo MS (1962), se caracteriza por ser rico en nutrientes, principal-

mente en nitrógeno y la favorable respuesta de los nudos aún sin la presencia de suplementos adicionales nos indica la gran respuesta *in vitro* que posee esta especie.

A pesar de que la mayoría de las microestacas de especies forestales del trópico requieren de la presencia de una auxina para su enraizamiento (LEE y RAO 1988, RAMESH y YOGESH 1996), las microestacas de pilón no necesitaron una fase de inducción de enraizamiento debido a que mostraron una alta respuesta a la formación de raíces, aún en el medio de cultivo no suplementado y solamente fue inhibida cuando se adicionó benciladenina al medio.

Para la variable número de yemas, no se observaron diferencias significativas entre el medio que contenía caseína hidrolizada y el testigo (MS completo), pero sí entre el medio que contenía benciladenina y carbón activado. El mayor número de yemas (37,2) se obtuvo con el tratamiento que contenía benciladenina. La benciladenina es una de las citocininas más utilizadas para la proliferación de brotes en especies forestales ya que en la mayoría de los casos ha mostrado mejores resultados cuando se la ha comparado con otras (PRADHAN *et al.* 1998) y ha denotado una amplia respuesta a una gran diversidad de especies (RAMESH y YOGESH 1996, VALVERDE *et al.* 1998, DESHPANDE *et al.* 1998). La cantidad de yemas obtenidas en los otros tratamientos fueron: 25,7 19,2 y 24,4 en el tratamiento MS, MS con carbón activado y MS con caseína, respectivamente.

Cada uno de los brotes formados se transfirió a un medio con caseína para su alargamiento y cada nueva planta fue subdividida en segmentos de nudos y de esta manera se logró incrementar la tasa de multiplicación. La posición del nudo en la plántula fue un factor que no se consideró en el estudio, sin embargo, influyó sobre los resultados obtenidos ya que la yema más próxima a la zona radicular, presenta un menor desarrollo y una mayor tendencia a la formación de yemas con tallos muy delgados y hojas muy pequeñas.

Una vez que las plantas tenían entre 5 y 7 nudos, aproximadamente a la sexta u octava semana, fueron llevadas al invernadero, pero al ser

transferidas a estas condiciones, mostraron bajos porcentajes de supervivencia. Este aspecto se considerará en un segundo estudio ya que puede deberse a factores físicos que no se están considerando, y que pueden estar relacionados con la fase de aclimatación de las plantas.

Aunque en un primer ensayo no se logró un buen porcentaje de sobrevivencia de las plantas producidas por microestaca, estos primeros resultados nos permiten derivar que dada la respuesta *in vitro* que presenta el pilón, la propagación masiva de esta especie a partir de semilla mejorada será un aporte significativo a la forestería y a su manejo silvicultural así como a la conservación de la especie.

REFERENCIAS

- Bon, M. y O. Monteuis. 1996. Biotechnologies forestières au Sabah. Bois et Forêts des Trop. 248:31-42.
- Carpio, I. 1992. Maderas de Costa Rica, 150 especies forestales. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 338 p.
- Cooperación de los sectores forestales y maderero (COSEFOR-MA). 1998. Pilón en la Zona Norte de Costa Rica. 20 p.
- Deshpande, S.R., P.C. Josekutty y G. Prathapasenan. 1998. Plant regeneration from axillary buds of a mature tree of *Ficus religiosa*. Plant Cell Rep. 17:571-573.
- Dumas, E. y O. Monteuis. 1995. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. Plant Cell Tissue Organ Cult. 40:231-235.
- Flores, E. 1992. Pilón. Trees and Seeds from the Neotropics 2:53-73.
- George, F. y D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics, London. 177 p.
- Lee, S.K. y A.N. Rao. 1988. Plantlet Production of *Swietenia macrophylla* King through tissue Culture. Gard. Bull. Sing. 41:11-18.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-479.
- Pradhan, C., S. Kar y P.K. Chand. 1998. Propagation of *Dalbergia sisso* Roxb. through *in vitro* shoot proliferation from cotyledonary nodes. Plant Cell Rep. 18:122-126.
- Raghavan, V. y P. Srivastava. 1982. Embryos Culture. Experimental Embryology of Vascular Plants. Ed. by B.M. Johri, New York, Springer Verlag, p.195-230.
- Ramesh, K.V., y T.J. Yogesh. 1996. Micropropagation of *Gmelina arborea*. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 46:269-271.
- Ulate, C. 1996. Métodos de producción y respuesta inicial en plantación de *Hyeronima oblonga* y *Vochysia ferruginea*. Tesis de Licenciatura en Ciencias Forestales. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. 112 p.
- Valverde Cerdas, L., M. Dufour y V. Villalobos. 1997. *In Vitro* Propagation of *Pithecellobium saman* (Raintree). In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 33:38-42.
- Valverde Cerdas, L., M. Dufour y V. Villalobos. 1998. *In Vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla*. Rev. Biol. Trop. 46:43-46.
- Valverde Cerdas, L. 1998. Embriogénesis somática en pilón (*Hyeronima alchorneoides*). In: Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. RED-BIO/FAO, La Habana, Cuba. Junio 1-5.