

Micropropagación clonal de *Gmelina arborea* R.

Renny S. Meléndez e Idel Contreras G.

Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales,
Laboratorio de Cultivos Vegetales *in vitro*, Mérida-Venezuela.

Recibido 09-05-2000, Aceptado 09-07-2000

Resumen

Dada la importancia que actualmente tiene la *Gmelina arborea* en la industria del papel y cartón en Venezuela, se realizó una serie de ensayos para su propagación masiva *in vitro*, que pudiera satisfacer en parte la demanda de las empresas de plantaciones existentes en el país. Se comenzó con plantas de 1-2 años de edad relativa, obtenidas de semillas provenientes de huertos clonales y crecidas en condiciones de invernadero. Se cultivaron yemas axilares previamente esterilizadas, en medio nutritivo básico de Murashige y Skoog (MS) a la mitad de su fuerza iónica, con: (mg/l) inositol 100; tiamina 0,1; ácido nicotínico 0,5; piridoxina 0,5; glicina 2,0; sacarosa 30.000 y agar (B&T) 1,1%. Como reguladores hormonales fueron usados: Tiazurón (TDZ) 0,05-0,1; Bencil-Adenina (BA) 0,1-0,25 y Acido Naftalen-acético (ANA) 0,1 - 0,2; solos o en combinación auxina-citocinina. Los cultivos fueron incubados a 27 ± 2 °C y luz continua de 1.200 lux. Se obtuvieron de 2-7 yemas adventicias directamente por explante cultivado entre las 6 y 10 semanas, estas yemas fueron enraizadas posteriormente en ANA 0,1 mg/l; y luego las plantas se transfirieron a sustrato estéril de tierra y arena en proporción 2:1 y fueron aclimatizadas. Un lote de estas plantas fue llevado a Ospino, Estado Portuguesa y están siendo utilizadas en otros métodos de propagación convencional, mantenidas en viveros por la Empresa Smurfit Cartón de Venezuela.

Palabras clave: *Gmelina arborea*, Micropropagación clonal rápida.

Abstract

Taking in account how important *Gmelina arborea* is for paper industry in Venezuela several assays were carried out to get its clonal propagation *in vitro*. In this order, axillary buds were used as explants, from 1-2 years old plants, coming from seeds. These buds, previously sterilized, were cultured on a half strength ionic MS medium, adding (mg/l): myo-inositol 100; thiamine 0,10; nicotinic acid 0,5; piridoxin 0,5; glycine 2,0; sucrose 30,000, and agar (B & T) 1,1 %. Thidiazuron (TDZ): 0,05-0,1, bencil-adenine (BA): 0,1 0,25, and naftalen acetic acid (NAA): 0,1-0,2 were used as plant growth regulators, separately or combined. Cultures were incubated at 27 ± 2 °C and continuous light (1200 lux). Adventitious buds, between 2 to 7 by explant were obtained after 6 weeks of culture. Rooting was induced on medium containing NAA 0,1 mg/l. Furthermore, *Gmelina* plants were transferred to steril substrate composed by black ground: sand (1:1) for hardening. A group of these plants were carried away to Ospino (Portuguesa Satate). There, they are used for conventional propagation methods by Smurfit Cartón de Venezuela.

Key words: *Gmelina arborea*, Rapid clonal micropropagation.

Introducción

La *Gmelina arborea*, es una especie de importante valor económico, pues su madera es utilizada para muebles, instrumentos musicales, puentes, barcos, papel, cartón y otros usos. Esta planta puede ser propagada por semillas, estacas o injertos, pero; mediante estas técnicas de propagación no pueden ser satisfechas totalmente las demandas de material para plantación. Las semillas pierden su viabilidad durante el almacenaje, este no es un método convencional apropiado para la multiplicación de esta especie a gran escala por lo tanto la micropropagación de esta especie es altamente deseable (Ambasta, 1986).

La *G. arborea* es originaria del Sur-Este Asiático, introducida en Venezuela desde Kenya, (Africa). Se desarrolla en un rango altitudinal de 0 a 800 msnm. En zonas con precipitación promedio entre 1000 y 2500 mm/año y temperatura entre 21 y 28 °C. Es de rápido crecimiento, probada en diversas partes del trópico latinoamericano, como particularmente apta para plantaciones de carácter industrial. Se estima un aprovechamiento comercial efectivo de 30m³ por Ha/año. (Centeno, 1987).

Esta especie está llamada a ser una de las especies maderables más importantes, por sus propiedades, su facilidad de utilización como especie de plantaciones de rápido crecimiento y por el éxito que hasta la ahora se ha obtenido en las plantaciones que se están desarrollando de esta especie en nuestro país específicamente en los Estados Barinas y Portuguesa (Villarroel y Vioria, 1990).

El potencial de obtener mayores ganancias mediante técnicas clonales se origina de su capacidad de retener, tanto los componentes genéticos aditivos como los no aditivos. Esto no se puede lograr mediante el uso de semillas, puesto que la reproducción sexual involucra segregación y recombinación genética y posibles pérdidas de las combinaciones alélicas específicas que determinan la expresión de superioridad. Mediante la selección de árboles superiores o de clones derivados de ellos, generalmente es posible lograr mejoras en la productividad y calidad de manera más rápida. La silvicultura clonal puede obtener una mayor ganancia genética en cuanto a la productividad y calidad, lo cual unido a una

mayor rentabilidad y la consecuente reducción en los ciclos de rotación de especies forestales hace más atractivo el cultivo de árboles (Balza y Suárez, 1994).

En nuestro país los cultivos *in vitro* son de reciente y escasa aplicación, tomando en cuenta la gran cantidad de especies de interés comercial, nativas o exóticas con que contamos y con las cuales se podrían establecer ensayos a través de estas técnicas. Los cultivos *in vitro* representan una alternativa en la propagación masiva de material genéticamente seleccionado, ya que se puede obtener una ganancia genética en cuanto a la productividad y calidad del material, así como también la mayor rapidez con que se pueden obtener las plantas en un menor tiempo, en comparación con la aplicación de otros métodos de propagación. Se justifica entonces la realización de este proyecto para la micropropagación de *G. arborea* usando explantes diversos. En todo caso se usa material seleccionado de procedencia conocida.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

El material vegetal seleccionado para la propagación lo aportó la empresa Smurfit Cartón de Venezuela, ubicada en Acarigua Estado Portuguesa; constituido por Semillas de *G. arborea* seleccionadas de los clones 8; 12; 13; 18; 21. Estas semillas fueron germinadas en condiciones estériles y colocadas en un cuarto de incubación a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, con intensidad lumínica de 1200 lux; el proceso de germinación ocurrió entre 30 - 60 días, luego las plántulas se transfirieron a vasos plásticos (con una mezcla de tierra y arena 2:1 previamente esterilizada) para su aclimatación; cuando las plántulas alcanzaron los 10 cm de longitud se transfirieron a bolsas de polietileno y se llevaron al invernadero. Entre los 6 - 7, meses las plantas obtuvieron un buen desarrollo fueron decapitadas para inducir una mayor proliferación de yemas axilares y a las 4 semanas fueron iniciados los cultivos *in vitro* usando diferentes explantes.

Esterilización de las Semillas para su Germinación

Se realizó un proceso de esterilización externa del material vegetal con varios procesos de lavado con agua destilada, Ampicilina 300 mg/l, y Cloruro de Mercurio al 1 %.

Explantes

Se utilizaron yemas axilares, extraídas de plantas madres. Estas se mantuvieron en el invernadero y fueron cuidadas aplicándoles riego cada dos días y fertilización mensual.

Esterilización de las Yemas Axilares

Se aplicó dos tratamientos de esterilización. El N° 1, con Hipoclorito de Sodio al 5,25% y el N° 2, con Cloruro de Mercurio al 0,05% y agentes antioxidantes como Acido Cítrico (100 mg/l), Acido Ascórbico (150 mg/l) y Polivinil-polipirrolidona (2 gr/l).

Preparación de los Medios de Cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el MS (Murashige & Skoog, 1962), modificando su concentración a la mitad de su fuerza iónica, esterilizado a 121°C y 1.05 Kg/cm² de presión, el cual se distribuyó a razón de 10 ml por tubo de ensayo, en medio sólido con agar B&T (1.1%) como medio de soporte y fueron almacenados en cuarto estéril.

Cultivo de los Explantes

Para la propagación clonal rápida se colectaron los explantes de las plantas germinadas en el Laboratorio; a éstos se les aplicó el método de esterilización superficial anteriormente descrito. Fueron cultivados en un medio suplementado con reguladores de crecimiento los cuales fueron: TDZ (0,05; 0,1 mg/l), AIB (0,1 ; 0,25 mg/l), ANA (0,1 ; 0,2 mg/l), BA (0,1 ; 0,25 mg/l) y un medio control sin reguladores. Durante las primeras 72 horas de incubación los explantes fueron mantenidos en oscuridad total, para minimizar los efectos de exudación fenólica y posterior necrosamiento. Luego fueron colocadas en luz con una intensidad de 1200

lux y 27°C ± 2 °C. Luego de cuatro semanas, se subcultivó en medios de multiplicación, para inducir la proliferación de los vástagos. Las yemas obtenidas, se subcultivaron en un medio sin hormonas por un periodo de tres semanas. Luego los explantes se subcultivaron en medios de enraizamiento, éstos al enraizar fueron transferidos a vasos plásticos que contenían sustrato semi-estéril de tierra y arena en proporción (2:1) para su posterior aclimatización.

Resultados y Discusión

La Esterilización del Material Vegetal

En los métodos ensayados para la esterilización de los explantes, se encontró que al aplicar el tratamiento N° 1, con Hipoclorito de Sodio al 5.25%, no fue efectivo, ya que en la primera semana de cultivo se oxidaron los explantes y surgieron agentes patógenos, que condujo a la muerte de los explantes. Esto pudo deberse a que todas las especies no responden de manera similar a los tratamientos de esterilización con Hipoclorito de Sodio. Investigadores como Silva y Texeira, (1993); han reportado un 100% de efectividad en el control de agentes patógenos en otras especies, al utilizar Hipoclorito de Sodio en concentraciones entre 1 y 10%.

En los cultivos *in vitro*, es más difícil obtener éxito con plantas leñosas que con plantas herbáceas, debido entre otros aspectos a la poca efectividad en la aplicación de técnicas de esterilización de la parte externa del material vegetal a cultivar para producirlos de forma aséptica. (Young *et. al.*, 1984). Los explantes obtenidos de tejidos vegetales que estén expuestos al suelo, así como de plantas que crecen en el campo y de plantas regadas en exceso, son muy difíciles y en algunos casos casi imposible de ser esterilizados (Leifert y Waites, 1990; citados por Angarita de Torres, 1995).

Con la aplicación del Tratamiento N° 2 sustituyendo el Hipoclorito de Sodio por Cloruro de Mercurio al 0.05%, se logró controlar la contaminación exógena de patógenos y se redujo la exudación fenólica con los antioxidantes. Este resultado fue exitoso al igual que el de Gupta *et. al.* (1981), quienes utilizaron el Cloruro de Mercurio al 0.05% como tratamiento de esterilización superficial

en yemas axilares y terminales, reportando un 100% de efectividad.

Bonga y Von Aderkas, (1992), reportaron que el Cloruro de Mercurio es más efectivo que el Hipoclorito de Sodio, en la desinfección de ápices de *Populus*.

La exudación fenólica se redujo en un alto porcentaje con los antioxidantes utilizados (Acido Citrico, Acido Ascórbico, PVP).

El material vegetal más joven, da mejores resultados que el material más viejo y leñoso posiblemente por el menor contenido de fenoles. La liberación de estos compuestos durante el cultivo *in vitro* en la mayoría de las especies leñosas, causa la muerte de los explantes los primeros días de cultivo, posiblemente debido a los efectos tóxicos de esos compuestos liberados en los medios de cultivo. Los fenoles deben ser eliminados o neutralizados para tener éxito en el establecimiento de los explantes cultivados (Jacquot, 1950).

En la Tabla 1, se muestra como fue la Sobrevivencia y Mortalidad de los explantes, bajo los tratamientos de esterilización, después de una semana de cultivo del material proveniente del Laboratorio y del Invernadero.

Esterilización interna de los explantes de *G. arborea*

La esterilización interna es muy importante ya que se combaten microorganismos que no son visibles al ojo humano, que están presentes dentro de la planta y no pueden ser eliminados con la esterilización externa. (Young *et al*, 1984).

Para evitar las infecciones internas de los explantes se decidió utilizar Acido Láctico y no antibióticos, ya que la adición de éstos a los cultivos

in vitro de las plantas superiores no es recomendable, pues conduce generalmente a fenómenos fitotóxicos, porque se necesitan concentraciones altas de antibióticos y estas inhiben el crecimiento y desarrollo de la planta y pueden conducir a la selección de microorganismos resistentes (Pierik, 1990).

La acción del Acido Láctico añadido al 20% resultó positiva para controlar la proliferación de bacterias de procedencia endógena en los medios.

Medina, (1996), probó el efecto de la aplicación de antibióticos sobre el porcentaje de contaminación bacteriana en *Eucaliptus grandis* x *E. urophylla*, con 6 concentraciones de antibióticos: ampicilina, cloranfenicol y kanamicina; obteniendo porcentajes de contaminación mayores del 50% en los explantes; concluyendo de la poca efectividad en la adición de antibióticos al medio de cultivo para el control de la contaminación bacteriana de origen endógeno; a bajas concentraciones no causaron ningún efecto a las bacterias y en altas concentraciones causaron daños a los tejidos y demás estructuras cultivadas.

Propagación clonal rápida

Se obtuvo la mejor multiplicación de los explantes, dando un promedio superior el medio que contenía TDZ 0,05 mg/l, en cada uno de los clones (Figura 1), excepto el clon 21, donde no hubo ningún rebrote por explante; estos rebrotes se produjeron en un período entre 4-5 semanas luego de su cultivo; al ser subcultivados e individualizados las hojas eran débiles, se desprendían y los explantes morían.

La Tabla 2, muestra el efecto de la concentración de TDZ y BA a diferentes concentraciones usando el medio sin reguladores del crecimiento (MSRC) como control, sobre la inducción de la multiplicación de yemas por explante, en los diferentes clones ensayados.

Tabla 1.
Sobrevivencia y mortalidad (%) de los explantes de *G. arborea* frente a dos agentes esterilizantes.

Agente esterilizante %	Procedencia	Nº de yemas	Sobrevivencia %	Mortalidad %
Cloruro de Mercurio 0,05	Laboratorio	147	85,7	14,3
	Invernadero	29	0	100
Hipoclorito de Sodio 5,25	Laboratorio	18	0	100
	Invernadero	49	0	100

Tabla 2.
Proliferación de yemas adventicias en clones de *G. arborea* usando Tidiazuron (TDZ) y Bencil-Adenina (BA).

Concentración del regulador Mg/l	Número promedio de yemas por explante				
	Clon 8	Clon 12	Clon 13	Clon 18	Clon 21
MSRC	0,6	1,5	1,83	2,4	0,4
TDZ 0,05	3	4	3	3	0
TDZ 0,1	0	1	0	2	0
BA 0,1	0	1,5	0	1	0
BA 0,25	0	0,5	1	0,3	0



Figura 1. Explante con vástagos, cultivado en Medio Multiplicador 1 con TDZ 0,05 mg/l.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Yang, Tsay, Chung y Chen, (1993), quienes indujeron la proliferación de yemas en explantes de *G. arborea*; pero con una combinación de ANA (0,01 mg/l) + BA (5 mg/l), promediando 3,5 yemas por explante.

Cuando se usó el medio con BA, la multiplicación fue muy baja, siendo sin embargo, un poco más

efectiva la concentración con BA (0,1 mg/l), con lo que se pudo observar que al aumentar su concentración disminuyó la proliferación de yemas. Esto concuerda con Warrag y Lesney, (1990), quienes señalan que al aumentar la concentración de BA, disminuye la multiplicación de las yemas.

El medio control (MSRC) usado para observar el comportamiento de los explantes ante los medios con reguladores, mostró muy poca producción de yemas, mostrando que la especie necesita de la adición de citocininas para la multiplicación de vástagos. Pierik (1990), dice que en el cultivo de plantas superiores los reguladores de crecimiento juegan un papel muy importante y dependiendo del tipo de explante se necesita o no la adición de reguladores.

Enraizamiento de los vástagos obtenidos

La mayor parte de las plantas necesitan auxinas para lograr el enraizamiento, siendo las más eficaces el AIB y el ANA. En especies arbóreas, resulta ser más difícil el enraizamiento *in vitro* que en especies herbáceas. Para lograr un alto porcentaje de enraizamiento en los explantes, se ensayo con cuatro concentraciones de auxinas, se utilizó ANA 0,1 ; AIB 0,1; AIB 0,25 y ANA 0,2 mg/l. (Tabla 3)

El medio con ANA 0,1 resultó ser el más efectivo en los clones ensayados ya que se obtuvo un enraizamiento del 100%, luego de cuatro (4) semanas; mientras que con los otros medios se obtuvo menos del 50 % de enraizamiento.

El uso de auxina ANA a baja concentración fue exitoso para el enraizamiento, concordando con Pierik (1990), el cual señala que con una baja concentración de auxina, predomina la formación de

Tabla 3.
Proliferación de raíces en clones de *G. arborea* utilizando ANA 0,1 mg/l y AIB 0,1 mg/l

Concentración	Nº Yemas Ensayadas	Nº de explantes Enraizados por clon					Total explantes Enraizados	% de enraizamiento
		08	12	13	18	21		
ANA 0,1	19	3	5	5	4	2	19	100
AIB 0,1	7	0	1	1	1	0	3	42,85
AIB 0,25	12	0	2	0	2	0	4	33,33
ANA 0,2	19	1	3	1	2	0	7	41,18

raíces, mientras que con altas concentraciones no se producen o se producen muy pocas. Sin embargo estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Yang *et. al.* (1993), quienes lograron un enraizamiento satisfactorio aplicando AIB a una concentración de 4 mg/l con el que alcanzaron un 75 % de sobrevivencia.

Las plántulas luego de enraizadas (Figura 2), fueron transferidas a sustrato semi-estéril (tierra y arena, en proporción 2:1), el tiempo de permanencia de estas plantas en el cuarto de incubación fue de tres semanas para su aclimatización, luego fueron sembradas en bolsas de polietileno y llevadas al invernadero para su posterior establecimiento en el campo. (Figura 3).

Conclusiones

- Se estableció una metodología de esterilización para los explantes de *G. arborea*, logrando controlar la contaminación patógena de la parte externa de los explantes, este método de control se logró con cloruro de mercurio (HgCl₂) al 0,05 % ya que al comienzo se presentó contaminación con la aplicación del método con hipoclorito de sodio al 5,25 %.
- Con la aplicación de antioxidantes Acido Cítrico, Acido Ascórbico y PVP, se logró controlar la exudación fenólica de los explantes cultivados.
- Para inhibir la proliferación bacteriana endógena, la adición de Acido Láctico al medio resultó ser muy efectiva para controlar la aparición de bacterias endógenas en el cultivo, debido a que la acidificación del medio inhibe la proliferación de las mismas.

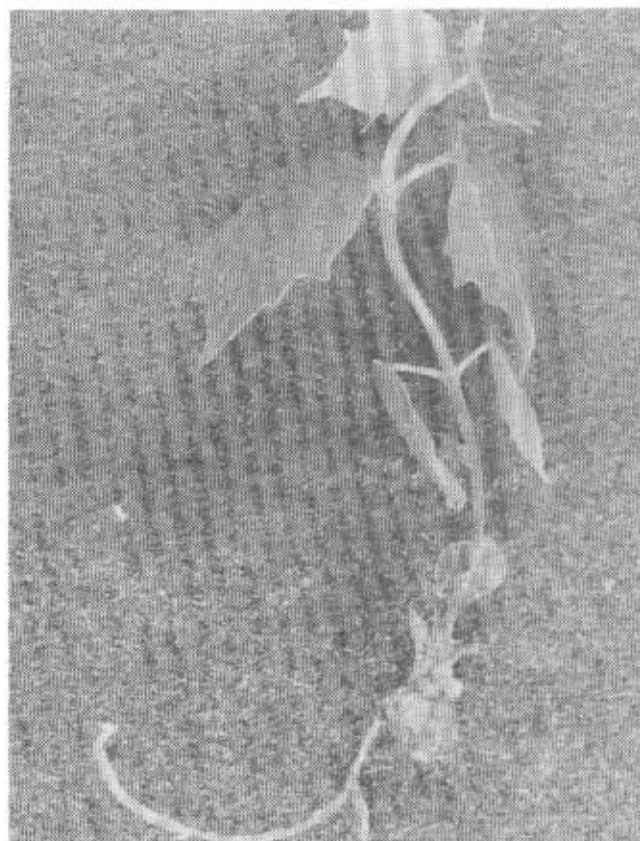


Figura 2. Explante enraizado listo para su transferencia al vaso con tierra y arena.

- La optimización de la propagación clonal rápida, se produjo utilizando como explantes yemas axilares de plantas jóvenes, lo cual permite incluir esta técnica en el desarrollo de los planes de mejoramiento genético que se vienen presentando en nuestro país en materia de plantaciones, asegurando con esto un flujo continuo de material.

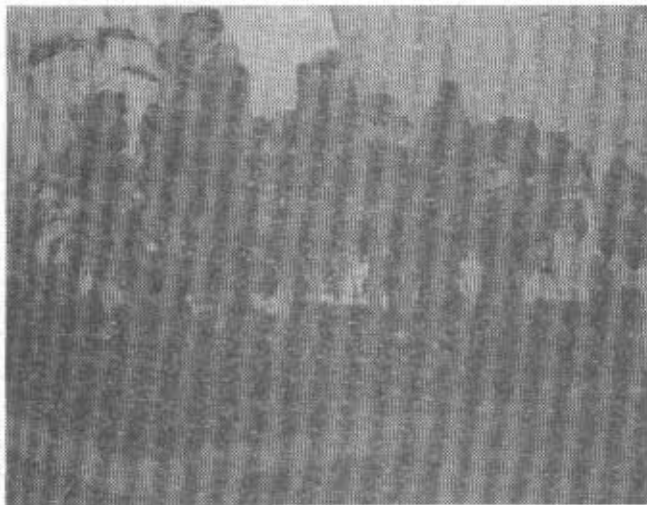


Figura 3. Plantas transferidas a bolsas de polietileno para su posterior traslado al campo.

- La multiplicación clonal rápida se logró en un periodo entre 4 - 5 semanas, con la adición de TDZ 0,05 mg/l al medio de cultivo, obteniéndose hasta 7 yemas por explante.
- En el enraizamiento, la concentración que mejor resultó fue ANA 0,1 mg/l con la cual se obtuvo un 100 % de efectividad.
- Plantas de estos clones fueron llevadas a Smurfit cartón de Venezuela y de acuerdo a lo informado crecen excelentemente mantenidas en viveros y están siendo utilizadas para otros métodos de propagación tradicional.
- Se considera que se ha estandarizado una metodología para la micropropagación de esta especie; pero esto no quiere decir que no se establezcan otros ensayos ya que este es solo el comienzo del trabajo con *Gmelina* en nuestro país.

Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes, por financiar el proyecto, código FO-464-00-01-F.

Referencias bibliográficas

- AMBASTA, S. P. 1986. The Useful Plants of India. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi.
- ANGARITA, N. 1995. Ensayos de Micropropagación in vitro de *Cedrela odorata* L. Centro de Estudios Forestales de Postgrado. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. 59 p.
- BALZA, O. y J. SUAREZ. 1994. Informe de Pasantías Realizado en las Fincas Tacamajaca, La Joya, El Hierro, Bumbi y Morador de la Empresa Smurfit División Forestal, Acarigua Estado Portuguesa. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela 39 p.
- BONGA, J. y P. Von ADERKAS. 1992. *In vitro* Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 236 p.
- CENTENO, J. 1987. *Melina (Gmelina arborea)*. Instituto Forestal Latinoamericano. Mérida, Venezuela. 76 p.
- LEIFERT, C. y W. WAITES. 1990. Contaminants of Plants Tissue Culture Newsletter, 60:2-13.
- MEDINA, R. 1996. Propagación in vitro de *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla*. Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. 66 p.
- PIERIK, R. 1990. Cultivo in vitro de las Plantas Superiores. Department of Horticulture, Agricultural University Wageningen, The Netherlands. 326 p.
- SILVA, L. y S. TEXEIRA. 1993. *In vitro* Clonal Propagation of *Eucalyptus grandis* Hill. Ex Maiden from Nodal Segments and Epicormic Shoots. *Ceres*, 40: 390-396.
- VILLARROEL, A. y L. VILORIA. 1990. Ensayos Preliminares para la Fabricación de Muebles con *Melina (Gmelina arborea)* Proveniente de Plantaciones. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. 48 p.
- WARRAG, E. y M. LESNEY. 1990. Micropropagation of Field Tested Superior *Eucalyptus grandis* hybrid. *New Forest*. 4: 67-79.
- YANG, J.; J. TSAY.; J. CHUNG. y Z. CHEN. 1993. IN VITRO Clonal Propagation and Cell Suspension Culture of *Gmelina arborea* R. *Taiwan For. Res. Inst. New Series*. 8: 1-9
- YOUNG, P.; A. HUTCHINS. y M. CANFIELD. 1984. Use of Antibiotics to Control Bacteria in Shoot Cultures of Woody Plants. *Plant. Sci. Lett.* 34: 203-209.