

Micropropagación de la enredadera nativa *Mutisia subspinosa* Cav.

Native climbing *Mutisia subspinosa* Cav. micropropagation

María Teresa Ponce¹
Mónica Elizabeth Guiñazú¹
Miguel Cirrincione¹

María Eugenia Videla²
Celeste Arancibia³

Originales: Recepción: 07/05/2010 - Aceptación: 29/09/2011

Nota científica

RESUMEN

La especie nativa *Mutisia subspinosa* es una enredadera perenne, resistente a heladas, con hermosas flores anaranjadas que presenta gran interés como ornamental. En trabajos previos de propagación a través de semillas o estacas se obtuvieron escasos resultados, lo que justificó el uso de la micropropagación. Para el establecimiento *in vitro* se utilizó el medio de Murashige Skoog (MS) diluido a la mitad. Se evaluó la adición de 6-bencilaminopurina (BAP) sola o en combinación con thidiazurón (TDZ) y un testigo sin hormonas. En la etapa de multiplicación se utilizó el mismo medio basal y se probaron dos auxinas: los ácidos indol butírico (AIB) y naftalén acético (ANA), además del uso de carbón activado. La composición del medio de cultivo más adecuada para el establecimiento fue la del testigo, mientras que para la multiplicación los mejores resultados se obtuvieron con la adición de 4 $\mu\text{moles.L}^{-1}$ de ANA. El agregado de 1 g.L^{-1} de carbón activado al medio de cultivo con 2,7 $\mu\text{moles.L}^{-1}$ mejoró la tasa de multiplicación y el enraizamiento.

ABSTRACT

The native species *Mutisia subspinosa* is a frost resistant perennial climbing plant with beautiful orange flowers. In previous works, propagation by seeds and cuttings have not performing well, thus micropropagation protocols were evaluated. Half strength Murashige Skoog basal medium was used for *in vitro* establishment, with the addition of 6-benzilaminopurine (BAP) alone or in combination with thidiazuron (TDZ); the control had not got any hormones. The same basal medium with, indol butyric acid (IBA); naphthalenacetic acid (NAA) and activated charcoal were assayed in the multiplication stage. The culture medium more appropriate for the *in vitro* establishment was the control treatment while the best results in the multiplication were obtained with the addition of 2.7 $\mu\text{moles.L}^{-1}$ of NAA. The inclusion of 1 g.L^{-1} of activated charcoal in the medium improved the multiplication rate and the rooting.

1 Cát. Fisiología Vegetal. Dpto. de Ciencias Biológicas. mponce@fca.uncu.edu.ar

2 Cát. Espacios Verdes. Dpto. de Producción Agropecuaria.

3 Pasante Cát. Fisiología Vegetal. Dpto. de Ciencias Biológicas.

Facultad de Ciencias Agrarias. UNCUYO. Alte. Brown 500. Chacras de Coria. Mendoza. Argentina. M5528AHB.

Palabras clave

cultivo de tejidos • plantas nativas
• reguladores del crecimiento •
granadilla

Keywords

tissue culture • native plants • growth
regulators • granadilla

INTRODUCCIÓN

En la Facultad de Ciencias Agrarias se trabaja desde el año 2000 en el estudio de especies nativas con interés ornamental. En la Cátedra de Fisiología Vegetal se han realizado trabajos de micropropagación de especies nativas tales como *Lippia integrifolia* (8), varias especies del género *Glandularia* (4, 9) y *Lecanophora hetherophylla* (10), entre otras.

Dentro de este contexto presenta gran interés la especie *Mutisia subspinosa* Cav., enredadera perenne de tallos muy ramificados y resistente a heladas. Su interés ornamental radica en la vistosidad de sus capítulos anaranjados y la presencia de zarcillos en sus hojas que le confieren hábito trepador (foto 1, pág. 242). Podría usarse como cubre muros o enredadera en rejas, glorietas o pérgolas, como colgante en balcones y macetas o cubriendo declives pronunciados.

Es endémica del centro-oeste de Argentina, se la cita para las provincias de La Rioja, San Juan y Mendoza. También ha sido hallada en el centro de Chile, donde parece ser muy rara. Vegeta entre los 1500 y 2500 m de altitud. En Mendoza se la encuentra en zona de montaña, en los departamentos de Las Heras, Luján, San Carlos y Tunuyán (11).

Para evaluar el uso como ornamental de *M. subspinosa* en jardines con bajo consumo de agua es necesario contar con una gran cantidad de plantas. Trabajos previos, tanto los ensayos de germinación como los de propagación por estacas, mostraron escasos resultados (13), lo que justifica el desarrollo de métodos alternativos de multiplicación vegetativa. Bajo la hipótesis de trabajo que es posible micropropagar *M. subspinosa* se planteó el objetivo de desarrollar un protocolo de micropropagación que permita obtener un gran número de plantas en poco tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS**Establecimiento *in vitro****Material vegetal*

Se utilizaron plantas de 2 meses de edad, obtenidas de semillas y cultivadas en macetas, en cámara de crecimiento con 16 h de luz y 8 h de oscuridad, intensidad lumínica de 150 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ y temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. En el momento de la extracción de los explantos, en las plantas se observaba crecimiento ahilado y tallos tiernos.

Medio de cultivo

El medio basal consistió en los macro y micronutrientes del M-S diluidos a la mitad y el hierro y las vitaminas completos (6), ph 5,8-5,9, suplementado con 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa y 7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar.

Esterilización y siembra

Los brotes se extrajeron de las plantas madres, se lavaron con abundante agua con Tween al 0,1%. Posteriormente, previo tratamiento con alcohol 70% durante 30 segundos, se sumergieron en lavandina comercial (55 g.L⁻¹ de Cl activo) al 15% por 15 minutos y luego se enjuagaron tres veces, en el flujo laminar con agua estéril. Para la siembra se cortaron estacas uninodales de 1 cm, se eliminó parte de la hoja y se plantaron en forma vertical en el medio de cultivo.

Tratamientos

Se ensayaron tres concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) 0,1 - 2,5 - 5 $\mu\text{moles.L}^{-1}$ solas o en combinación con 0 ó 1 $\mu\text{moles.L}^{-1}$ de thidiazuron (TDZ). Se utilizaron tubos de vidrio de 15 x 2 cm con 20 ml de medio, se introdujeron 10 estacas por tratamiento y el ensayo se repitió dos veces.

Multiplicación

Material vegetal

Se utilizaron plantas *in vitro* provenientes del ensayo anterior.

Medio de cultivo

Se utilizó el mismo medio que en la etapa de establecimiento.

Tratamientos

Se realizaron dos ensayos: en el primero se evaluaron dos concentraciones de ácido naftalén acético (ANA) 2,7 y 5,4 $\mu\text{moles.L}^{-1}$, dos de ácido indol butírico (AIB) y un testigo sin auxinas. En un segundo ensayo, se evaluaron las siguientes concentraciones de ANA: 1,3; 2,7 y 4,0 $\mu\text{moles.L}^{-1}$, incluyéndose un tratamiento con 2,7 $\mu\text{moles.L}^{-1}$ de ANA y 1 g.L⁻¹ de carbón activado.

En los dos ensayos se utilizaron frascos de vidrio de 250 ml de capacidad con 50 ml de medio (6-8 frascos por tratamiento) y se sembraron 5 estacas por frasco.

Condiciones de cultivo

Los tubos y frascos utilizados se sellaron con "Resinite" y se incubaron en cámara de crecimiento con 16 h de luz y 8 h de oscuridad, intensidad lumínica de 70 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y temperatura de 26 \pm 2°C.

Variables evaluadas y tratamiento estadístico

Después de cinco semanas de iniciado el cultivo se determinaron los porcentajes de explantos que presentaron crecimiento (cuando la yema brotó y dio origen a uno a más tallos), enraizamiento y/o vitrificación, la altura de las plántulas, número de brotes y/o nudos por explanto y número de raíces.

Los datos de porcentajes se compararon a través de la Prueba de Comparación de Proporciones; el resto de las variables se evaluaron por el ANOVA, realizando transformación de variables cuando fue necesario. Las medias se compararon con el test LSD. En todos los casos se utilizó el software Statgraphics Plus Versión 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan los porcentajes de explantos con crecimiento, enraizamiento y vitrescencia, en la etapa de establecimiento *in vitro* de *M. subspinoso*. El porcentaje de explantos establecidos fue alto y crecieron por igual en todos los tratamientos. Por otra parte no se observó enraizamiento, resultado que indicaría un contenido endógeno de auxinas insuficiente para promover la formación de raíces y justificaría la adición de este regulador en el medio de micropropagación. La vitrescencia (aspecto translúcido de los explantos) varió entre el 40 y el 100%, se presentó en todos los tratamientos, aun en aquellos explantos con buen crecimiento.

Tabla 1. Efecto de 6-bencilamainopurina (BAP) y el thidiazuron (TDZ) sobre el porcentaje de explantos con crecimiento, con raíces y vitrescencia durante el establecimiento *in vitro* de *M. subspinoso* Cav.

Table 1. Effect of 6 benzylaminopurine (BAP) and thidiazuron TDZ on percentage of explantes with growth, roots and vitrescencia during *in vitro* establishment of *M. subspinoso* Cav.

Reguladores del crecimiento		N° de explantos establecidos (n inicial - infeccines)	Explantos con crecimiento *	Explantos con raíces (%)	Explantos vitrescentes (%)
BAP µmoles.L ⁻¹	TDZ µmoles.L ⁻¹				
0	0	10	100	0	40
0	1	9	100	0	67
1	0	10	100	0	80
1	1	8	100	0	63
2,5	0	6	83	0	100
2,5	1	10	90	0	50
5	0	9	100	0	78
5	1	10	80	0	90
Significancia			NS	NS	NS

Letras distintas indican diferencias significativas para un $p \leq 0,05$.

* Calculado sobre la base de explantos establecidos.

Differents letters indicate significantly different at $p \leq 0.05$.

* Calculated on the basis of established explants.

Si bien la vitrescencia estaría altamente relacionada con la presencia en el medio de cultivo de citocininas (2, 4), en este caso se podría atribuir al genotipo ya que este fenómeno también se presentó en el testigo sin reguladores. En la foto 2 (pág. 242) se observan brotes *in vitro* provenientes de estacas uninodales obtenidos en la etapa de establecimiento del cultivo.

Aunque el efecto de las citocininas en la inducción y crecimiento de nuevos brotes está suficientemente demostrado, bajo las condiciones de este ensayo, las citocininas no promovieron la formación de yemas adventicias ni la generación de múltiples brotes. Se obtuvieron plantas con un único vástago con cuatro nudos y una altura de 0,8 cm, ambos valores corresponden a la media general de cada variable (datos no presentados).

Tanto el BAP como el TDZ redujeron significativamente la altura de las plantas (figura 1). La disminución en la altura de las plantas por parte de algunas citocininas es un hecho conocido (12) y se debe a una disminución del largo de los entrenudos, situación que puede ser perjudicial en el momento de realizar el sub-cultivo.

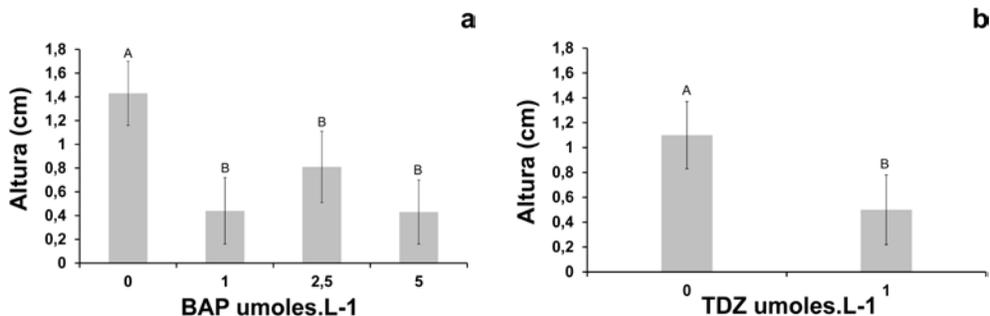


Figura 1. a) Efecto de la bencilaminopurina (BAP) y **b)** el tiadiazuron (TDZ) en la altura de las plantas, durante el establecimiento *in vitro* de *M. subspinosa* Cav.
Figure 1. a) Effect of 6 benzylaminopurine (BAP) and **b)** thiadiazuron TDZ on plant length during *in vitro* establishment of *M. subspinosa* Cav.

En el primer ensayo con auxinas el porcentaje de explantos con crecimiento varió entre el 39 y el 57%; estos valores no arrojaron diferencias significativas (tabla 2). La pérdida de plantas se debió a la oxidación de los explantos que se observó en todos los tratamientos, pero que fue significativamente mayor en el tratamiento con 2,7 $\mu\text{moles.L}^{-1}$ de ANA (tabla 2).

Tabla 2. Efecto del ácido naftalén acético (ANA) y el ácido indol butírico (AIB) en el crecimiento, enraizamiento y en la presencia de oxidaciones durante la multiplicación *in vitro* de *M. subspinosa* Cav.
Table 2. Effect of naphthalene acetic acid (NAA) and indole-3-butyric acid (IBA) on growth, rooting and oxidation during *in vitro* multiplication of *M. subspinosa* Cav.

Regulador del crecimiento $\mu\text{moles.L}^{-1}$		N° explantos	Explantos con crecimiento (%)	Explantos Oxidados (%)	Explantos enraizados (%)*
Testigo	0,0	36	53 a	28 b	10 b
ANA	2,7	28	39 a	64 a	64 a
ANA	5,4	28	57 a	36 b	19 b
AIB	2,5	28	57 a	29 b	19 b
AIB	5,0	28	46 a	46 b	8b

Letras distintas indican diferencias significativas para un $p \leq 0,05$.
 * El porcentaje de enraizamiento se calculó en base a los explantos que crecieron.

Differents letters indicate significantly different at $p \leq 0.05$.
 * The rooting percentage was calculated based on explants that grew.

La oxidación *in vitro* de material vegetal que conduce a la muerte de la planta tiene diversas causas, entre las que se mencionan la exudación de compuestos fenólicos, el subcultivo prolongado, la caída del pH del medio de cultivo, la presencia de reguladores del crecimiento, la deficiencia de calcio, la composición mineral del medio y el genotipo (5). En el presente ensayo la oxidación estaría afectada tanto por la presencia de ANA como por el medio basal utilizado.

Las auxinas desempeñan un rol fundamental en el enraizamiento, siendo los ácidos naftalenacético e indol butírico, las fitohormonas más empleadas (1). Al analizar el porcentaje de enraizamiento, los resultados obtenidos reflejan que el ANA fue más efectivo en promover el enraizamiento que el AIB, ya que este último no se diferenció del testigo a las dosis evaluadas. El mejor enraizamiento se obtuvo con 2,7 $\mu\text{moles.L}^{-1}$ de ANA en el cual el 64% de los explantos desarrollaron raíces (tabla 2, pág. 239).

En la tabla 3 se presentan los valores promedio de altura de planta, número de nudos y de raíces por planta. Tanto el ANA (2,7 $\mu\text{moles.L}^{-1}$) como el IBA (5 $\mu\text{moles.L}^{-1}$) estimularon el crecimiento de los explantos produciendo plantas con mayor altura y mayor número de nudos; no obstante, el máximo número de raíces por planta se alcanzó en el tratamiento con 2,7 $\mu\text{moles.L}^{-1}$ de ANA.

Tabla 3. Efecto del ácido naftalén acético (ANA) y el ácido indol butírico (AIB) sobre la altura de planta, número de nudos y de raíces durante la multiplicación *in vitro* de *M. subspinosa* Cav.

Table 3. Effect of naphthalene acetic acid (NAA) and indole-3-butyric acid (IBA) on plant length, number of nodes and number of roots during *in vitro* multiplication of *M. subspinosa* Cav.

Regulador del crecimiento $\mu\text{moles.L}^{-1}$		N° de explantos que crecieron	Altura de planta (cm)	Número de nudos por planta	Número de raíces por planta
Testigo	0,0	15	3,9 b	9,5 b	0,2 b
ANA	2,7	8	6,4 a	18,6 a	1 a
ANA	5,4	12	4,1 b	10,8 b	0,2 b
AIB	2,5	15	3,9 b	11,2 b	0,2 b
AIB	5,0	10	6,4 a	15,5 a	0,1 b

Letras distintas indican diferencias significativas para un $p \leq 0,05$.

Differents letters indicate significantly different at $p \leq 0.05$.

Teniendo en cuenta el crecimiento, el porcentaje de enraizamiento y el número de raíces por planta, los mejores resultados se obtuvieron utilizando ANA con una concentración de 2,7 $\mu\text{moles.L}^{-1}$.

Al evaluar el efecto de distintas dosis de ANA se encontró que el aumento en la concentración del mismo incrementó significativamente el porcentaje de explantos que crecieron y éstos presentaron un mayor número de nudos (tabla 4, pág. 241).

Tabla 4. Efecto del ácido naftalén acético (ANA) en el porcentaje de explantos con crecimiento, altura de planta y número de nudos durante la multiplicación *in vitro* de *M. subspinosa* Cav.

Table 4. Effect of naphthaleneacetic acid (NAA) on percentage of explants with growth plant length and number of nodes during *in vitro* multiplication of *M. subspinosa* Cav.

ANA $\mu\text{moles.L}^{-1}$	N° de explantos	Explantos con crecimiento %	Altura de planta (cm)	N° de nudos
1,3	36	31 b	3,7 a	6,2 ab
2,7	36	33 b	3,1 a	4,5 b
4,0	21	71 a	5,3 a	9,1 a

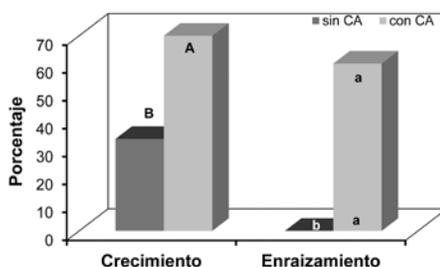
Letras distintas indican diferencias significativas para un $p \leq 0,05$.

Differents letters indicate significantly different at $p \leq 0.05$.

Sin embargo, no se encontraron diferencias en el porcentaje de enraizamiento ni en el número de raíces por planta (datos no presentados). Se puede afirmar que las auxinas promueven el crecimiento debido a su acción sobre la división y alargamiento celular, la diferenciación de yemas, el establecimiento y fuerza de los destinos, etc. (3); esto podría explicar por qué las plantas *in vitro* presentaron mayor crecimiento, expresado en un mayor número de nudos, en el tratamiento con 4,0 $\mu\text{moles.L}^{-1}$ de ANA aumento que implica una duplicación de la tasa de multiplicación (tabla 4).

En la foto 3 (pág. 242) se presentan plantas obtenidas *in vitro* de *M. subspinosa* Cav. en la etapa de multiplicación.

El carbón activado suele utilizarse para promover el crecimiento y el enraizamiento como así también disminuir oxidaciones, debido a la adsorción de sustancias exudadas al medio, causantes en algunos casos de la muerte por oxidación (7). En el presente trabajo la presencia de carbón activado aumentó el porcentaje de explantos que crecieron y enraizaron (figura 2) y produjo plantas más altas y con mayor número de raíces (tabla 5, pág. 242).



Letras distintas indican diferencias significativas para un $p \leq 0,05$.

Differents letters indicate significantly different at $p \leq 0.05$.

Figura 2. Efecto del carbón activado en el porcentaje de estacas con crecimiento y enraizamiento durante la multiplicación *in vitro* de *M. subspinosa* Cav.

Figure 2. Effect of activated charcoal on percentages of explants with growth and rooting during *in vitro* multiplication of *M. subspinosa* Cav.

Tabla 5. Efecto del carbón activado (CA) en la altura de planta, número de nudos y número de raíces durante la multiplicación *in vitro* de *M. subspinosa* Cav.

Table 5. Effect of activated charcoal on plant length, number of nodes and number or roots, during *in vitro* multiplication of *M. subspinosa* Cav.

Tratamiento	N° de explantos	Altura de planta (cm)	Número de nudos	Número de raíces
Sin CA	36	3,6 b	5,6 a	0 b
Con CA	36	5,8 a	7,3 a	0,82 a

Letras distintas indican diferencias significativas para un $p \leq 0,05$.

Differents letters indicate significantly different at $p \leq 0.05$.

Al evaluar las respuestas obtenidas se observa que esta especie muestra cierta dificultad para el enraizamiento *in vitro*, por lo tanto, es necesario continuar los ensayos con el objeto de mejorar los porcentajes de enraizamiento y la calidad de las raíces. Las plántulas obtenidas se rustificaron rápidamente, observándose crecimiento a partir de la tercera semana. El porcentaje de sobrevivencia fue del 90 %.



Foto 1. *M. subspinosa* Cav. en flor.
Photo 1. *M. subspinosa* Cav. blossoms.

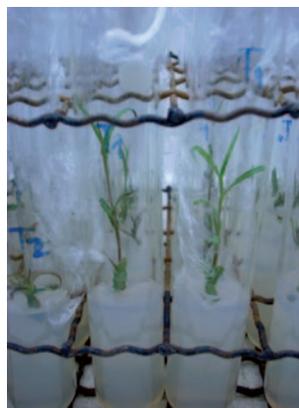


Foto 2. Brotes obtenidos *in vitro* a partir de estacas uninodales de *M. subspinosa*.
Photo 2. *In vitro* *M. subspinosa* shoots obtained from one node cuttings.



Foto 3. Plantas de *M. subspinosa* obtenidas *in vitro* en la etapa de multiplicación en el medio suplementado con distintas concentraciones y tipo de auxinas.

Photo 3. *M. subspinosa* plants obtained during *in vitro* multiplication in media supplemented with different concentrations and kind of auxins.

CONCLUSIONES

Es posible establecer *in vitro* plantas de *M. subspinoso* cultivando estacas uninodales en el medio de cultivo de Murashige Skoog con macro y micronutrientes diluidos a la mitad, suplementado con 20 g.L⁻¹ de sacarosa, 7 g.L⁻¹ de agar y sin reguladores del crecimiento. La multiplicación se puede realizar en el mismo medio basal con el agregado de 4 μmoles.L⁻¹ de ANA y se propone un repique a medio 2,7 μmoles.L⁻¹ de ANA y 1 g.L⁻¹ de carbón activado para estimular el enraizamiento. El carbón activado mejoró los porcentajes de sobrevivencia y de enraizamiento como así también la calidad de las raíces.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blakesley, D. 1994. Auxin metabolism and adventitious root formation. In: Davies, T. D.; Haissig, B. E. (Eds.) Biology of adventitious root formation. New York, Plenum Press. p. 143-154.
2. Kataeva, N. V.; Alexandrova, I. G.; Butenko, R. G.; Dragavtceva, E. V. 1991. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. Plant cell tissue and organ culture. 27, 149-154.
3. Machakova, I.; Zazimalova, E.; George, E. F. 2008. Plant growth regulators: introduction, auxins, their analogues and inhibitors. In George, E.; Hall, M.; Klerk, G. J. (Eds.) Plant propagation by tissue culture. p. 175-204.
4. Marino, C.; Ponce, M. T.; Videla, M. E.; Fioretti, S.; Cirrincione, M. 2003. Micropropagation of *Glandularia perakii* Cov. et Schn. (Verbenaceae), a native specie with ornamental potential. Biocell. 27, 57-60.
5. Martin, K. P.; Zhang, C.; Slater, A.; Madassery, J. 2007. Control of shoot necrosis and plant death during micropropagation of banana and plantains (*Musa spp.*). Plant cell tiss organ cult. 88: 51-59
6. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15, 473-497.
7. Pan, M. J.; Van Staden, J. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture - A review. Plant growth regulation. 26, 155-163.
8. Passera, C. B.; Ambrosetti, J. A. 1999. *In vitro* propagation of "Incauyuyo", *Lippia integrifolia* (Gris.) Hier. (Verbenaceae), a medicinal and aromatic plant of monte phytogeographical province, Argentina. Acta Horticulturae. 502, 319-324.
9. Ponce, M. T.; Videla, E.; Fioretti, S.; Galat, E. 2006. Propagación de *Lecanophora heterophylla*. Especie nativa con potencial ornamental. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 38(2): 91-100.
10. Ponce, M. T.; Guiñazú, M. E.; Fioretti, S.; Cirrincione, M. 2010. Micropropagación de *Glandularia*, género nativo con potencial ornamental. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 42(2): 161-170.
11. Ruiz Leal, A. 1972. Flora popular mendocina. Deserta, 3.
12. Van Staden, J.; Zazimalova, E.; George, E. F. 2008. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In: George, E.; Hall, M.; Klerk, G. J. (Eds.). Plant propagation by tissue culture. p. 205-226.
13. Tonda, M. 2007. Estudios sobre propagación de *Mutisia subspinoso* Cav. En: Informe final de beca para graduados de la SECTYP-UNCUYO. Disponible en Cátedra de Espacios Verdes. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCUYO. p. 25-27.

Agradecimiento

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto BIANUAL SECTYP-UNCUYO 06/A271 y por el Proyecto INTA 1837.