

Estudios conducentes al establecimiento *in vitro* de Pílon *Hyeronima alchorneoides*, especie nativa de Costa Rica

Estudiante investigadora: Katty Gamboa Ibarra
Escuela de Ingeniería Forestal

Resumen

Pílon (*Hyeronima alchorneoides*), especie que posee un gran potencial económico por el uso que se le ha dado en la reforestación de las zonas bajas de Costa Rica. Pílon es una de las especies del bosque húmedo a muy húmedo tropical con un gran potencial ecológico y comercial. Su fruto es apetecido por muchas aves, su madera es muy colorida y de amplio uso en carpintería y construcción en general. Es una especie nativa muy promisoría para plantaciones; se comporta bien y crece rápidamente.

En este estudio se evaluó la respuesta a la desinfección y al establecimiento *in vitro* de *Hyeronima alchorneoides*; se utilizaron microestacas de distintos tamaños (2 cm y de 6-7 cm), se aplicaron diez tratamientos de desinfección y se logró disminuir a un 67% la contaminación. El único agente contaminante fue el hongo y el desinfectante que dio mejores resultados fue el cloruro de mercurio en intervalos cortos de tiempo (5-10 minutos) y a bajas concentraciones (0,095 - 0,5%).

Se obtuvieron resultados positivos en la inducción al desarrollo de estructuras ya que se produjo el rebrote, en 33% de los explantes, con la ventaja de que este material vegetativo se siguió desarrollando satisfactoriamente bajo condiciones *in vitro*. Para esta especie la adición de bencilaminopurina (BAP) al medio de cultivo

favoreció el rebrote y desarrolló yemas, al mismo tiempo se demostró que la reducción de sales minerales adicionadas no afectó el desarrollo del material.

Summary

Pílon *Hyeronima alchorneoides* is a native to the humid tropic forest. Its fruits are eaten by birds. The wood is colorful and broadly used in carpentry and general construction. This species is considered promising for reforestation of low-land areas of Costa Rica.

This study evaluated the response of Pílon to the establishment under *in vitro* conditions. Cultings (2 to 7 cm) from greenhouse plantlets were disinfected with Mercurium Chloride (0,095 % to 0.5 % a.i) or Calcium Chloride (2,4% to 8% a.i).

Explants were cultivated on Murashige & Skoog medium enriched with cytokinins (Bencyladenine (BA); Isopentenyladenine I6 Ade). The highest percentage of explants established under aseptic conditions (33%) was obtained with Mercurium Chloride at 0,095 % as disinfectant. The medium supplemented with 2,5 mg/L of BA favored the latter growth of explants. Initial explants of 6 to 7 cm long showed the best response to *in vitro* culture.

Introducción

El desarrollo de la actividad forestal en el país requiere de un fortalecimiento por medio de

programas científicos que respalden y aseguren la sostenibilidad en el uso de los recursos naturales. El germoplasma usado actualmente en la reforestación y con el manejo del bosque natural está en serio peligro de extinción ya que no se cuenta con programas integrados, que procuren su conservación, el mejoramiento genético y la producción de semillas o material vegetativo usado en la propagación masiva de la especie, cualquiera que sea.

Las especies que se reproducen por medios asexuales tienen hoy día una amplia posibilidad de mejoramiento y desarrollo de nuevas variedades gracias a la difusión de tecnologías muy avanzadas; debido a la versatilidad de estos sistemas de micropropagación se supone que este método sustituirá los sistemas convencionales de multiplicación y se logrará así el desarrollo de alternativas prometedoras para el campo forestal ya que por medio de esta técnica se podrían obtener y conservar especies de importancia ecológica y económica para la sociedad costarricense, las cuales se encuentran en peligro de extinción, o que en menor o mayor grado y por características propias de cada una, presentan problemas de reproducción, tanto a nivel de vivero como en su hábitat natural.

Objetivos

General

- Evaluar el comportamiento bajo condiciones *in vitro* de *Hieronyma alchorneoides* (Pilón).

Específicos

- Seleccionar el material idóneo para el establecimiento del proyecto.
- Evaluar varios métodos de desinfección del material para la especie.
- Desarrollar el protocolo para el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de los materiales.
- Valorar el comportamiento de los materiales y los factores que influyen en su desarrollo *in vitro*.

Materiales y métodos

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de cultivos de tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tuvo una duración de seis meses contados a partir de octubre de 1996.

- Material vegetal:

El material vegetativo empleado consistió en microestacas de diferentes tamaños, las cuales provinieron de plántulas y semillas que fueron donadas por el proyecto Especies nativas de la zona norte, ubicado en la Sede del Instituto Tecnológico de Costa Rica, en San Carlos.

Las plántulas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero donde fueron tratadas con benomil (benlate) a razón de 1gr/l más streptomycina (agrimicín 500) en igual concentración, ocho días antes de su uso en el experimento.

- Etapa de desinfección e inducción al desarrollo:

Para iniciar las pruebas de desinfección, se procedió a cortar cada uno de los explantes con un bisturí, de manera que quedarán explantes formados por el ápice y dos o tres nudos, se eliminó por completo la parte foliar. Después de haber realizado la respectiva desinfección del material, todos los explantes se colocaron en frascos de gerber con 20 ml de medio. Posteriormente se utilizaron explantes de mayor longitud (6-7 cm), por lo que se usaron tubos de ensayo con 10 ml de medio.

Para la desinfección se procedió a hacer un lavado con jabón y agua abundante para eliminar cualquier tipo de residuos que pudiesen estar adheridos a los explantes; este mismo procedimiento fue usado en todos los tratamientos que a continuación se describen:

Tratamiento 1: Los explantes se colocaron en una disolución de cloruro de mercurio al 0,25%, por espacio de 5 minutos en el agitador magnético. Los lavados en

la cámara de transferencia fueron tres, con agua destilada estéril para remover los residuos del desinfectante empleado. La inoculación del material se hizo en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con Bencilaminopurina (BAP), a razón 4 mg/l, más 0,6 g/l de carbón activado como antioxidante.

Tratamiento 2: Este tratamiento lo único que varía con respecto al anterior, es la concentración de Bencilaminopurina (BAP), en una proporción de 2 mg/l.

Tratamiento 3: La desinfección en este tratamiento se hizo con cloruro de mercurio al 0,5% por 5 minutos en agitación. Los tres lavados en cámara fueron con agua destilada estéril para luego inocular el explante en un medio Murashige y Skoog (1962), sin ninguna hormona.

Tratamiento 4: En este tratamiento se procedió a colocar las secciones del tallo (explantes) en agrimicín más benlate a razón de 1g/l de cada uno y en agitación por espacio de una hora, luego se lavaron con agua estéril y se colocaron en hipoclorito de calcio al 8% por 5 minutos en bomba al vacío. Transcurrido este lapso se desinfectaron nuevamente con hipoclorito de calcio al 4% por 4 minutos, ya en la cámara de transferencia se hicieron dos enjuagues con agua destilada estéril, y en el último enjuague los explantes se dejaron reposar en ácido ascórbico más ácido cítrico (50 mg/l de cada uno) por 20 minutos, para evitar la oxidación. El medio de cultivo usado fue Murashige y Skoog (1962), sin ningún regulador.

Tratamiento 5: El desinfectante empleado en esta etapa fue cloruro de mercurio al 0,1% por 5 minutos en agitación, pasado este tiempo se hicieron dos lavados con agua destilada estéril en la cámara de transferencia, el tercer lavado se hizo con ácido ascórbico más ácido cítrico (50mg/l de cada uno) como antioxidante. El medio fue Murashige y Skoog (1962) suplementado con la hormona Isopentenil adenina

⁶Ade (1mg/l) más carbón activado como antioxidante (0,6 g/l).

Tratamiento 6: La desinfección fue hecha con cloruro de mercurio al 0,075% por 7 minutos en agitación. El medio de cultivo usado fue Murashige y Skoog (1962), solo que los macroelementos, microelementos y la fuente de hierro se agregaron al 50%; los demás componentes fueron incluidos en la forma usual, además se suplementó con la hormona Isopentenil adenina ⁶Ade (1mg/l) más carbón activado como antioxidante (0,6 g/l).

Tratamiento 7: Lo único que varía con respecto al tratamiento anterior es que los componentes del medio de cultivo son agregados todos al 100%.

Tratamiento 8: Los explantes fueron colocados en alcohol de 70° por dos minutos, posteriormente se pusieron en Agrimicín más Benlate a razón de 1g/l de cada uno por una hora, pasado este tiempo los explantes se colocaron en hipoclorito de sodio al 40% por 6i, todos los pasos anteriores fueron en agitación. El lavado en cámara se efectuó con agua estéril en los dos primeros y el tercer lavado fue con ácido ascórbico más ácido cítrico (50mg/l de cada uno). El medio fue Murashige y Skoog (1962) más Isopentenil adenina ⁶Ade(1mg/l) y carbón activado como antioxidante (0,6 g/l).

Tratamiento 9: Los explantes se desinfectaron con cloruro de mercurio al 0,095% por un lapso de 5 minutos en agitación. Luego se llevaron a la cámara de transferencia donde se realizaron los lavados con agua destilada para posteriormente hacer la inoculación en el medio de cultivo que fue Murashige y Skoog (1962) suplementado con 2,5 mg/l de Bencilaminopurina (BAP) y 0,6 g/l de carbón activado como antioxidante.

Tratamiento 10: Lo único que varía con respecto al tratamiento anterior es en la concentración de BAP que en este caso fue de 5mg/l.

En general se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar de 10 tratamientos con cuatro réplicas y diez unidades experimentales por tratamiento, cabe mencionar que el análisis de varianza se realizó tomando en cuenta sólo los tratamientos en los cuales se produjo el rebrote de explantes, los tratamientos restantes se analizan de forma sencilla por medio de porcentajes de contaminación y sobrevivencia para los casos donde se dio. Se hicieron observaciones y evaluaciones semanalmente (hasta por seis semanas) con respecto al número de explantes contaminados y eventualmente la eficacia del desinfectante, así como los diferentes reguladores de crecimiento.

Nota: Inicialmente se pretendía trabajar con semillas de pilón pero debido al mal estado de las mismas, los experimentos se suspendieron.

Resultados y discusión

Etapa de desinfección e inducción al desarrollo

Durante la primera etapa de este proyecto se evaluaron varios desinfectantes en diferentes concentraciones, con los cuales no se obtuvieron resultados positivos. Es importante destacar que experimentalmente se pretendía evaluar tanto los desinfectantes como la hormona, claro está que no fue posible la evaluación de la hormona debido a que el método de desinfección no causó efecto.

En el cuadro 1, se presenta la información especificando el porcentaje de contaminación y mortalidad para cada uno de los tratamientos.

Como se muestra en este cuadro el cloruro de mercurio tuvo pocos efectos positivos ya que en todas las concentraciones en que fue aplicado se dio la pérdida total del material por contaminación fungica, o por necrosis: el explante fue tomando una coloración rojiza que posteriormente se tornó café hasta su muerte; en esta etapa se trabajó con el tamaño de explante más pequeño (5-6 cm), lo cual pudo haber provocado estas consecuencias.

En el caso de la desinfección con benlate más agrimicín e hipoclorito de calcio en dos concentraciones (4 y 8%) ocurrió lo contrario, a pesar de que el material se perdió; la contaminación fue muy rápida ya que a los tres días de haber iniciado la inoculación, el material ya estaba contaminado por hongos.

En todos los casos se trabajó tanto con parte apical como con yema lateral y el comportamiento fue igual; o sea no hubo diferencia alguna entre las partes usadas. Tomando en cuenta los resultados anteriores se procedió a hacer nuevos experimentos, bajando o aumentando las concentraciones según fuera el caso.

En la evaluación de estos cinco tratamientos de desinfección se observa que todos dieron respuestas positivas, ya que se presentó rebrote en cada uno de los casos. De acuerdo con los porcentajes de contaminación el mejor tratamiento fue el número nueve, en el cual se contaminó el 66,7% del material.

Cuadro 1
*Efecto del tratamiento de desinfección en el establecimiento in vitro de *Hyeronima alchorneoides*, CIB, 1997*

Tratamiento	Desinfectante	% Contaminación	% Mortalidad
1	Cloruro de mercurio al 0,25%.	0	100
2	Cloruro de mercurio al 0,25%.	0	100
3	Cloruro de mercurio al 0,5%.	0	100
4	Agrimicín + Benlate+Hip.calcio al 4y8%.	100	0
5	Cloruro de mercurio al 0,1%.	60	40

Cuadro 2

Datos experimentales obtenidos a partir de los desinfectantes que mejores resultados dieron en el establecimiento in vitro de *Hyeronima alchorneoides*, CIB, 1997

Tratamiento	Desinfectante	Hormona mg/l	Contaminación %	Rebote %
6	Cloruro de Mercurio al 0,075%***	1,0 i ⁶ Ade	79,16	20,8
7	Cloruro de Mercurio al 0,075%	1,0 i ⁶ Ade	83,3	16,7
8	Alcohol 70°+Agrimicin+			
	Benlate+Hip. sodio al 40%	1,0 i ⁶ Ade	95	5
9	Cloruro de Mercurio al 0,095%	5,0 BAP	66,7	33,33
10	Cloruro de Mercurio al 0,095%	2,5 BAP	73	27

Donde: BAP es Bencialaminopurina y i⁶Ade es Isopenteniladenina.

*** Para este caso el medio fue Murashige y Skoog (1962) con macroelementos, microelementos y fuente de hierro al 50%, los otros componentes fueron agregados en la forma usual.

En segundo lugar se encuentra el tratamiento 10, en el que el porcentaje de contaminación fue de un 73%; cabe destacar que estos dos resultados se obtuvieron usando el BAP como regulador en la inducción al desarrollo. Se obtuvieron otros resultados aceptables también en los tratamientos 6,7,8, aunque los porcentajes de contaminación fueron los más altos. Para estos tres casos la hormona empleada fue Isopentenil adenina; en general se puede destacar que para todos los tratamientos, la hormona más efectiva fue el BAP en la aplicación de mayor concentración donde se obtuvo el mayor porcentaje de rebrote ya que con esta sustancia los cambios en cuanto a crecimiento fueron más rápidos y se han seguido desarrollando en forma bastante favorable.

La prueba de análisis estadístico (ANDEVA) señaló al tratamiento nueve como el mejor. Esta evaluación, por lo tanto, permitió formular el siguiente protocolo de desinfección: Desinfección con cloruro de mercurio al 0,095% por 5 minutos, con el cual se obtuvo un 33,33% de rebrote.

Conclusiones

- La evaluación de los tratamientos de desinfección permitió determinar que el mejor protocolo de desinfección para Pílon es cloruro de mercurio al 0,095% por cin-

co minutos; este tratamiento permitió disminuir la contaminación en un 67%.

- El comportamiento de los explantes de Pílon bajo condiciones in vitro fue bueno. A pesar de que el porcentaje de contaminación presentado es alto, el material vegetativo no contaminado se sigue desarrollando satisfactoriamente.
- El mejor desinfectante fue el cloruro de mercurio.
- La hormona que propició el mayor porcentaje de crecimiento fue bencilaminopurina a razón de 5mg/l, en un medio Murashige y Skoog (1962); esto indica que al parecer la alta concentración de la hormona estimula el desarrollo del explante.
- Los hongos fueron los únicos agentes contaminantes encontrados.
- Los mejores resultados se obtuvieron al trabajar con explantes grandes (6-7cm).

Recomendaciones

- Se aconseja realizar todo tipo de pruebas para encontrar otro desinfectante que no sea tan tóxico como el cloruro de mercurio y para posteriores experimentos, ampliar el período de observaciones a más semanas.

- Se debe trabajar con explantes grandes, ya que, para el caso de las yemas, esto parece ser fundamental para disminuir oxidación y favorecer un rápido crecimiento.
- No se encuentra reportado ningún trabajo en cultivo de tejidos referente al género *Hyeronima* sp, por lo que se recomienda seguir la investigación acerca de los factores que se ven involucrados y que controlan el desarrollo in vitro de esta especie, hasta llegar a obtener un método para la propagación masiva para el uso en programas de reforestación.
- Se recomienda fomentar la investigación en especies nativas, con el fin de encontrarles métodos de propagación efectivos, debido a que existen muchas de ellas, de las que no se tiene información sobre su propagación.

Referencias bibliográficas

- Abdelnouor, A; Escalante, J.V. 1994. *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 38 pp.
- Ayerbe, L. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. 301 pp.
- Badilla, M, V.; Hidalgo, N.; Guevara, E.; Murillo, O.1992. *Cultivo in vitro de plántulas de jaúil (Alnus acuminata)* En: Tecnología en marcha. Costa Rica. Vol. 11, N° 3. p. 3-9.
- CATIE (Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza).1995. *Memoria. Avances en la producción de semillas forestales en América Latina*. ed. Rodolfo Salazar. Managua, Nicaragua. p. 298.
- CATIE (Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza). 1995. Afiche sobre *Hyeronima alchorneoides* Allemao. En: Revista Forestal Centroamericana. No. 10, Año 3.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).1991. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia. 339 p.
- Flores, E. 1993. *Árboles y Semillas del Neotrópico*. San José, Costa Rica, Museo nacional de Costa Rica/ Herbario Nacional de Costa Rica. Vol.2(2): p 53-73.
- Guevara, E.; Hidalgo, N.; Murillo, O.1992. *Cultivo in vitro de cedro dulce (Cedrela tonduzii)* En: Tecnología en marcha. Costa Rica. Vol. 11, N° 3. p 10-16.
- Gutiérrez, M. 1996. *Estudios para la micropropagación de teca (Tectona grandis): Su establecimiento in vitro*. Informe de práctica de especialidad. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 47 p.
- Mesén, F.; Leakey, R.; Newton, A. sf. *Hacia el desarrollo de técnicas de silvicultura clonal para el pequeño finquero*. En: El Chasqui. Turrialba, Costa Rica. N° 28. p. 6-18.
- Ochoa, N. 1990. *Establecimiento de cultivos in vitro*. En :Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales. eds. Rosell,C.; Villalobos,V. Organización de las naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). pp. 25-28.
- Orea, D.; Villalobos,V. 1990. *Micropropagación de especies forestales* En :Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales. eds. Rosell,C.; Villalobos,V. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). pp. 3-8.