

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Magnolia Hernandezii* (MOLINILLO) A PARTIR DE HOJAS

Magnolia Hernandezii (MILL) *IN VITRO* PROPAGATION FROM LEAVES

José Steven Cardozo Pinzón¹, Bryan Steven Marín Valencia¹, Juan Sebastián Godoy Castaño¹, Rocío Stella Suárez Román²

-
- ¹. Estudiante Programa de Biología, Universidad del Quindío, Integrantes del semillero de investigación en Biotecnología, del grupo de Investigación en Biodiversidad y Biotecnología (CIBUQ) de la Universidad del Quindío.
². Profesora Licenciatura en Biología y Educación Ambiental, Grupo CIBUQ. Universidad del Quindío.
-

Recibido: Agosto 1 de 2017

Aceptado: Octubre 2 de 2017

*Correspondencia del autor: Rocío Stella Suárez Román, Grupo CIBUQ.
Universidad del Quindío, E-mail: rociosuarez@uniquindio.edu.co

RESUMEN

Se planteó una metodología para el cultivo *In vitro* de embriones cigóticos de *Magnolia hernandezii*, no obstante la escases de semillas durante el período 2016 – 2017-I, como consecuencia del aborto floral y de frutos ocasionado por los intensos períodos de sequía en el 2015 a causa del fenómeno del niño, obligaron el replanteamiento del proyecto y se optó, por la desinfección, establecimiento *In vitro* y producción de callos de este árbol endémico colombiano, actualmente en estado de amenaza. En tal sentido, se emplearon como explantes discos y fragmentos de hoja y segmentos de peciolo (1 cm aproximadamente). Como medio de establecimiento se empleó MS modificado al 50%, suplementado con 1 mg/L de AIA y BAP. Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de incubación con condiciones controladas de luz (16 horas luz, 2000 lux), humedad relativa (76-78%) y temperatura (25°C+/-2) durante 15 días, luego se sometieron a oscuridad total durante 15 días y posteriormente al fotoperiodo indicado (16/8 horas luz/oscuridad). Al cabo de dos meses se observó la formación de callos a partir de los explantes de peciolos. Los callos obtenidos fueron de consistencia friable, traslúcidos y pequeños, de 1 a 5 milímetros; algunos agrupados y otros sueltos.

Palabras claves: *Magnolia hernandezii*, explantes, *In vitro*, callos.

ABSTRACT

A methodology was proposed for the *in vitro* culture of cigotyc embryos of *Magnolia hernandezii*, notwithstanding the lack of seeds during the period 2016 - 2017-I, as a consequence of the floral and fruit abortion caused by intense periods of drought in 2015 a cause of the phenomenon of the child, forced the rethinking of the project and it was decided, by the disinfection, establishment *in vitro* and callus production of this Colombian endemic tree, currently in a threatened state. In this sense, discs and leaf fragments (approximately 1 cm) and petiole segments were used as explant. 50% modified MS supplemented with 1 mg / L BAP was used as the setting medium. Cultures were maintained in an incubation room with controlled conditions of light (16 h, 2000 lux), relative humidity (76-78%) and temperature (25 ° C +/- 2) for 15 days, then subjected to darkness Total for 15 days and subsequently to the indicated photoperiod (16/8 light / dark hours). At the end of two months the callus formation was observed from the petiole explants. Corns are friable in consistency, translucent and small, from 1 to 5 millimeters; some grouped and others loose.

Keywords: *Magnolia hernandezii*, explants, *In vitro*, callus.

INTRODUCCIÓN

El género *Magnolia* evolutivamente es considerado uno de los más basales de las angiospermas (Cronquist, 1973). La especie *M. hernandezii* es un árbol de dosel y emergente de hasta 40 m de alto, exclusiva de Colombia; localizado en un rango altitudinal entre los 1700 y los 2600 m.s.n.m. (Calderón, 2012), en las zonas de vida bosque húmedo montano y bosque húmedo premontano (Toro, 2011). Se desarrolla en fragmentos residuales de bosques primarios, generalmente en cumbres de montañas y laderas de bosques interandinos, aunque también se encuentran algunos aislados en potreros, condiciones para clasificarlas como plantas heliófilas durables, pues requieren de altos niveles de luz solar para establecerse y sobrevivir (Gallegos, 2008).

Presenta una cantidad casi constante de flores abiertas y en botón durante gran parte del año, observándose una leve disminución en la producción de estas, en los meses de junio y julio, cuando hay disminución de lluvias (Toro, 2011). Tradicionalmente, el eje central del fruto (placenta) ha sido empleado durante muchos años en la fabricación de molinillos, utilizados en la cocina. Su madera es de importancia para la carpintería, ebanistería y para la construcción de viviendas. La especie tiene además gran potencial como ornamental, por su bello porte, follaje brillante y el tamaño de sus flores (Toro, 2011).

Por lo anterior, sus poblaciones se han reducido en más del 80% en el último siglo y solo se tienen datos de ubicación en 20 localidades; se considera en estado crítico y el antiguo INDERENA, estableció veda Nacional

indefinida desde 1975, por tanto no puede ser objeto de aprovechamiento, excepto con fines de investigación o cuando se trate de rodales o plantaciones debidamente registradas (CARDER, 1997).

Los pocos estudios sobre esta especie en nivel de conservación, son un impedimento para comprender la naturaleza real que conlleva el proceso de extinción de una especie evolutivamente antigua. La extinción es un proceso natural que ha ocurrido a lo largo de la evolución de la vida en la tierra. Sin embargo en la actualidad, los procesos de aislamiento y extinción de especies se han incrementado aceleradamente por las inmensurables actividades humanas.

Frente a esta situación, la biotecnología, ofrece una alternativa para la propagación a partir de la obtención de embriones somáticos u organogénesis, pasando o no por el estado de callos; de igual forma, permiten el estudio del control del desarrollo y de los eventos bioquímicos que controlan la morfogénesis (Litz y Jarret, en Roca et al., 1993).

La técnica del cultivo *In vitro* para la obtención de especies forestales, ha sido lenta y, en Colombia se han realizado pocos trabajos. Según Ramos (2012), cabe destacar los trabajos en forestales de bosque húmedo tropical realizados por la Universidad Católica de Oriente (Castro, 1992), en abarco (*Cariniana pyriformis*), almendrón (*Terminalia catappa*), guayacán (*Tabebuia serratifolia*) y comino (*Aniba perulitis*) y el trabajo de Hodson (1998), en aliso (*Alnus acuminata*); Defelipe, (2011) en quina (*Cinchona pubescens*); Schuler et al., (2005) en ocobo (*Tabebuia rosea*) y nogal cafetero (*Cordia allio-*

dora); Marulanda *et al.*, (2000) en aliso (*Alnus acuminata*) y nogal cafetero (*Cordia alliodora*); Pedroza *et al.*, (2007), en escobo (*Hipericum goyanessii*); en encenillo (*Weinmannia tomentosa*) y rodamonte (*Escallonia myrtilloides*), Villamizar (2005); en guadua (*Bambusa vulgaris*), Ocampo y Núñez (2007); en flormorado (*Tabebuia rosea Bertold DC*) Suárez, *et al.*, (2006); en teca (*Tectona grandis L.*), Castro *et al.*, (2002).

En este sentido, el presente trabajo tuvo como propósito fundamental explorar la posibilidad del establecimiento *In vitro* de explantes somáticos de *Magnolia hernandezii*, como elemento alternativo para la conservación de especies endémicas.

Materiales y Métodos

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Estudios e Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología de la Universidad del Quindío, CIBUQ; el material vegetal, se colectó en el campus de la Universidad del Quindío y el Jardín Botánico del Quindío, a partir de especímenes juveniles.

Como explantes se emplearon discos de hoja de 1 cm x 1 cm y segmentos de peciolo de igual tamaño, que se sometieron a un tratamiento preliminar de desinfección que consistió en inmersión en una solución de Benlate® al 2% durante 60 minutos, seguido de lavado con detergente comercial, y enjuague con agua destilada.

Para la desinfección se empleó Tween 40 durante 10 minutos, NaClO al 14% por 20 minutos y alcohol al 70% por 15 minutos; seguido de tres lavadas con agua destilada. Luego se sumergieron en ácido ascórbico al 20% hasta el momento de la siembra.

Como medio de cultivo se empleó MS (Murashige & Skoog, 1962) al 50%, semisólido, suplementado con 2% de sacarosa, 0,8 gr de Phytigel®, 1 mg/L de BAP y 1 mg/L AIA. El pH se ajustó a 5,8 y se esterilizó por calor húmedo en autoclave a 120°C a 15 lb de presión durante 15 minutos. Una vez realizada la siembra en recipientes de vidrio con 20ml de medio, se incubaron en cuarto de crecimiento con temperatura de 24 ±2°C, bajo fotoperiodo de 16 horas luz, con lámparas de luz blanca a una intensidad lumínica de 2000 lux aproximadamente. Quince días después se sometieron a oscuridad y luego se expusieron nuevamente al fotoperiodo.

Resultados y Discusión

El protocolo de desinfección empleado permitió obtener 80% del material sin contaminar, lo cual sugiere la efectividad del protocolo. Abdelbour y Escalant (1994), señalan que la contaminación está ligada a la concentración del desinfectante pero no al tiempo de inmersión, indicando que cuando se utilizan bajas concentraciones de NaClO y corto tiempo de inmersión, se obtiene el mayor porcentaje de explantes no contaminados. García *et al.*, (2015) destacan la importancia de emplear agentes biocidas como el hipoclorito de calcio, cloruro de mercurio o fungicidas que actúen rápido; por su parte, Hurtado y Merino (1988) atribuyen la efectividad de estas sustancias químicas al tipo de explantes y de planta, ya que en el caso de las leñosas tienen un lento crecimiento, y por tanto, pasan mucho tiempo expuestas a microorganismos que en ocasiones son difíciles de erradicar. Para Pedroza *et al.*, (2008) (en Ramos 2012), el pretratamiento con Benlate también fue efectivo.

En cuanto al establecimiento, el logro más significativo del trabajo, fue la obtención de callos a partir de peciolo, en un 12,5% de los explantes cultivados (Figura 1). Implícitamente, todos los tejidos vegetales tienen capacidad para formar callos *In vitro*; sin embargo, relativamente pocos explantes tienen la habilidad para producir callos embriogénicos; ello se atribuye al genotipo de la planta.

En plantas leñosas la selección del explante, para inducción de callos, se hace en forma muy restringida; así, se ha estimulado el desarrollo de callos embriogénicos a partir de varios tipos de explantes como embriones cigóticos, hojas jóvenes, inflorescencias, ápices radiculares y retoños en palma datilera (Litz y Jarret, 1993, en Roca *et al.*, 1993).



Figura 1. Callos obtenidos por cultivo *in vitro* a partir de fragmentos de peciolo de *Magnolia hernandezii*.

Como lo indican varios autores citados por Ramos (2012), los explantes que ofrecen mejores respuestas son aquellos tomados de las plantas jóvenes (López, 2010; Mroginski *et al.*, 2002; Roque y Ardisana, 2006; Collado *et al.*, 2004; Marquínez, 1998), debido a que el desarrollo de la morfogénesis (capacidad de regenerar órganos y tejidos a partir de un explante inicial) es más rápido; aspecto que coincide con este trabajo, donde se emplearon hojas jóvenes de especímenes juveniles.

Otros autores entre ellos Karunaratne *et al.*, (1991) y Villalobos *et al.*, (1993), han encontrado que la edad del explante es importante y crítico en el desarrollo *In vitro* de las especies maderables; la micropropagación es más fácil empleando tejidos juveniles, y más difícil, con tejidos de plantas maduras.

Además, según la revisión de Ramos (2012) para cultivo *In vitro* de especies leñosas, el tamaño del explante es importante porque cuanto más grande sea, mayores serán las posibilidades de obtener proliferación callosa. Existe un tamaño mínimo del explante, variable según el material vegetal, por debajo del cual no se obtienen respuestas deseables. Lo anterior indica que fragmentos de un centímetro, constituyen un tamaño propicio para la formación de callos en el molinillo.

Con relación al medio, se ha usado, entre otros, el MS o su modificación (Evans *et al.*; 1981 en Litz y Jarret, 1993), cuya composición de sales y suplementos estimula la formación de callos o embriogénesis somática en especies leñosas.

La presencia de Auxina (AIA) y Citocinina (BAP) en el medio de cultivo empleado en este experimento, favorece la formación de callos, ya que estimulan tanto la capacidad de división celular como la de producir agrandamiento y alargamiento celular (Krikorian, 1993 en Roca *et al.*, 1993). La presencia de BAP en el medio de cultivo, se ha reportado con éxito en la organogénesis de especies forestales (Gamboa & Abdelnour 1999). Su formación, también está asociada a la presencia de auxinas exógenas, la fuente de nitrógeno y otras sustancias como la sacarosa (Villalobos y Thorpe, 1993 en Roca *et al.*, 1993).

De otra parte, Litz y Jarret (1993 en Roca *et al.*, 1993), señalan que el fotoperiodo puede afectar los niveles internos de los reguladores del crecimiento; así, un fotoperiodo de 12 a 16 horas con 1000 a 3000 Lux es suficiente para inducir la organogénesis, mientras un

cambio en la intensidad lumínica puede causar organogénesis. Lo anterior indica, que la oscuridad influyó en la formación de callos.

Con respecto a la consistencia del medio de cultivo, Litz y Jarret (1993 en Roca *et al.*, 1993) citando a White (1939) y Brown *et al.*, (1979), señalan que la forma física del medio tiene una profunda influencia en las respuestas morfogenéticas. Las concentraciones altas de agar crean un medio con mucho estrés para las plantas, lo cual reduce la formación de meristemoides. En este sentido, se ratifica la necesidad del medio semisólido en el resultado obtenido.

Finalmente, en cuanto a las características de los callos desarrollados en los fragmentos de peciolo de molinillo, puede indicarse que fueron friables y blancos (Figura 2), lo cual coincide con Rodríguez *et al.*, (2005) y Ortega *et al.*, (2013) quienes describen los callos de tipo embriogénico en especies leñosas de textura friable y traslúcidos. La ausencia de oxidación en estos, ofrece oportunidades para continuar con la diferenciación embriogénica u organogénica.



Figura 2. Características macro-mórfológicas de callos obtenidos por cultivo *In vitro* a partir de fragmentos de peciolo de *Magnolia hernandezii*.

La regeneración de plantas a partir de cultivo *In vitro* de ciertas especies leñosas, exige la búsqueda de técnicas complejas (Perugorría, 2005). Estas deben permitir a las plantas sobrevivir a los problemas de oxidación, heterogeneidad de respuesta y sobre todo a la ambientación cuando son trasplantadas a un sustrato y expuestas a las condiciones naturales. Los explantes cultivados en condiciones *In vitro* pueden dar dos tipos de respuesta: una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células denominada callo o una respuesta morfogénica por la cual o se forman órganos (organogénesis) o embriones (embriogénesis somática) (Hurtado y Merino, 1987; Galaz, 2005).

Conclusiones

Se empleó un protocolo de desinfección que permitió el cultivo *In vitro* de *M. hernandezii* con bajos niveles de contaminación.

Se logró la obtención de callos friables y blancos, a partir de explantes de peciolo, cultivados en medio MS semisólido suplementado con BAP y AIA, lo cual ofrece oportunidades para continuar con la diferenciación embriogénica u organogénica como alternativa para estudiar y conservar esta especie.

Agradecimientos

Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad del Quindío.

Facultad Ciencias Básicas y Tecnologías, Universidad del Quindío.

Grupo de Investigación Centro de Estudios en Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología CIBUQ. Universidad del Quindío.

Magister Marly Grajales A., Directora laboratorio de Biotecnología, Universidad del Quindío.

Jardín Botánico del Quindío.

Edier Florez Henao, auxiliar de campo, Herbario Universidad del Quindío.

REFERENCIAS

- Abdelnour, A. & Escalant, J. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales . Centro agronómico de investigación y enseñanza (CATIE) disponible en : <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A6525E/A6525E.PDF>
- Calderón, S, E. (2012) Evaluación Preliminar del estado poblacional del molinillo (*Talauma Hernandezii*, Magnoliaceae) en el viejo caldas y norte del valle, Colombia. Bogotá; Instituto Alexander Von Humboldt. Disponible en: <http://araneus.humboldt.org.co/conservacion/amenazadas/molinillo.html> Consultado: Marzo 13 de 2017.
- CARDER. (1997). Resolución N° 177. Por la cual se regula el uso y aprovechamiento de los bosques situados en el territorio de jurisdicción de la CARDER. Risaralda, Pereira. Consultado: www.carder.gov.co/intradocuments/.../resolucion_carder_177_de_1997_16538
- Cronquist, A. 1973. Botánica Básica. México, D.F. C.E.C.S.A. 587 p.
- Gamboa, J. & Abdelnour, A. 1999. Micropropagación de melina (*Gmelina arborea* ROXB). Agronomía costarricense, 23(1), 69-76. Disponible en: http://www.mag.go.cr/rev_agr/v23n01_069.pdf. Consultado Febrero de 2017.
- Galaz G., M. del C. 2005. Obtención de células en suspensión a partir de callos de *Olneya tesota*. Tesis Ingeniería Biotecnológica. Instituto Tecnológico de Sonora. México. 102 Pp. Disponible en: http://biblioteca.itson.mx/dac_new/tesis/71_maria_galaz.pdf Consultado: Abril 12 de 2017.
- García Lozano, D. L., Mesa López N., Ocampo Guerrero, M. L. Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. Rev.Colomb.Biotecnol., Volumen 17, Número 2, p. 76-84, 2015. ISSN electrónico 1909-8758. ISSN impreso 0123-3475. Disponible en: <http://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/54277/54113> Consultado: Marzo 22 de 2017.
- Hurtado, D. & Merino, M. (1988). Cultivo de tejidos vegetales. México: Editorial Trillas. Pag. 94-95
- Karunaratne, S.; Gamage, C. & Koor, A. Leaf maturity, a critical factor in embryogenesis. J. Plant Physiol. 1991. Vol. 139. P. 27-31
- Krikorian, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. Pags. 41-77. En: Roca, W.M. & Mroginski, L.A. Ed. 1993. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali.
- Litz, R.E. & Jarret, R.L. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. Pags.144-172.En: Roca, W.M. & Mroginski, L.A. Ed. 1993. Cultivo de tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali.

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Ortega, G.; Soria, N.; Taípe, M. & Reyes, C. 2013. Inducción al proceso de calogénesis *In vitro* a partir de cotiledones y ejes embriogénicos de semillas madura de Guarango (*Cesalpinia spinosa*) como coadyuvante para su preservación en el Distrito Metropolitano de Quito. Disponible en: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/6285/1/AC-BIO-ESPE-038474.pdf>. Consultado. Abril 11 de 2017.
- Pedroza Manrique, J. A.; Montes-Villegas, M. V. Micropropagación de *Hypericum goyanesii*, una especie en vía de extinción. *Revista Científica*, [S.l.], n. 10, p. 109-118, nov. 2007. ISSN 2344-8350. Disponible en: <<http://revistas.udistrital.edu.co/ojs/index.php/revcie/article/view/300>>. Fecha de acceso: 12 jun. 2017
- Ramos Amaya, J.E. Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas. Especialización en Biotecnología. Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD. Noviembre 2012. Bogotá. 83 p.
- Rodríguez, R.; Álvarez, C.; Centeno, M.; Berros, B.; & Rodríguez, A. 2005. Embriogénesis somática y estrategias para superar las limitaciones en plantas leñosas. En: Sánchez M. & Ríos D. (Eds.) Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción. Chile. Pp. 63-67.
- Perugorría L., M. 2005. Desarrollo de una técnica para la micropropagación de especies leñosas en biorreactores. Universidad de la república. Facultad de Ciencias. Maestría en Biotecnología. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Uruguay. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/3974/1/uy24-15708.pdf> Consultado: febrero 10 de 2017