
Propagación vegetativa de *Toona ciliata* M. Roemer

Vegetative propagation of *Toona ciliata* M. Roemer

Tarnowski, Christian¹; Vitoria, Rosario¹; Vieira de Souza, Jonicélia C. Araújo²

¹Laboratorio de Biotecnología, INTA Yuto (Jujuy) - tarnowski.christian@inta.gov.ar

²Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias de la UNL.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad para clonar el cedro australiano a través de diversas técnicas. Se emplearon tres métodos: acodamiento aéreo, enraizamiento de estacas y cultivo in vitro. Se logró hasta un 88% de acodos enraizados a los 60 días; estacas basales fueron colocadas en tres sustratos: en arena enraizaron 44%, en turba el 53% y el máximo fue 75% en grava. No hubo diferencias en el número de raíces, siendo el promedio de 4,25 por estaca. En el medio de cultivo ¼ MS + 0,05 mg/L BAP + 0,01 mg/L AIB brotaron el 95% de los explantos y 35% de ellos superaron 10 mm de altura a los 30 días. Con 1 mg/L IBA se registraron 9,8 raíces/explanto. El acodamiento demostró ser apto para clonar plantas adultas; un sustrato aireado favorece el enraizamiento sin hormona; AIB sólo y en altas concentraciones podría generar vitroplantas viables.

Palabras claves: meliácea, cultivo in vitro, acodo aéreo, enraizamiento de estacas.

Abstract

The aim of this study was to determine the ability to clone the Australian cedar through various techniques. Three methods were used: air layering, rooting cuttings and in vitro culture. It was achieved up to 88% of rooted layers after 60 days. It was observed that basal cuttings, placed on three substrates: sand, peat and gravel, produced 44%, 53% and 75% of rooted cuttings, respectively. There were no differences in the number of roots per cutting, with an average of 4.25. In the culture medium ¼ MS + 0.05 mg/L BAP + 0.01 mg/L IBA sprouted 95% of the explants and 35% of them exceeded 10 mm high at 30 days. In the medium with addition of 1 mg/L IBA, 9.8 roots/explant were recorded. Aerial layers proved to be suitable for cloning adult plants; an aerated substrate promotes rooting without hormone; AIB alone and in high concentrations could generate viable plantlets

Key words: meliaceae, in vitro culture, air layering, rooting cuttings.

Introducción

Toona ciliata M Roem. var *australis* (F. Muell) CDC, conocido vulgarmente como cedro australiano, pertenece a la familia de las meliáceas y es la especie exótica de madera valiosa más utilizada en plantaciones en macizo y enriquecimientos en el NOA. Fue introducido al país a principios de la década de 1970 y se caracteriza por su resistencia al ataque del barrenador de los brotes (*Hypsiphyla grandella*), una plaga forestal que causa considerables daños en los cedros nativos. Su madera es muy similar a la del cedro orán (*Cedrela balansae*), con las mismas características tecnológicas, de color rojizo brillante, grano recto, atractivo vetado y fácil de trabajar, con un peso específico de 0,57 Kg/dm³ (Varela et al, 2004). Es excelente para mueblería, construcción de marcos, puertas, ventanas, carrocerías, trabajo de tornos. Con un buen manejo silvicultural, el turno de corta se estima en 20-25 años y diámetros de 50–55 cm que permiten obtener un volumen maderable aproximado de 300 m³/ha. (Zapater et al, 2005).

Sin embargo, las plantas originadas a partir de material seminal exhiben gran variabilidad fenotípica y por consiguiente las plantaciones comerciales suelen ser muy heterogéneas debido a que el crecimiento del plantío no es uniforme. Además, no existe una fuente de semillas de calidad, su disponibilidad es estacional y presentan corta viabilidad.

Una alternativa viable para resolver estos problemas serían las técnicas de propagación vegetativa. Una de las ventajas más importantes es que las plantas obtenidas presentarían las mismas características que la planta donante (clon) y la disponibilidad de material sería constante durante todo el año.

Existen muchos antecedentes sobre la macropropagación vegetativa de meliáceas. Díaz-Maldonado (1991) describe una técnica sencilla y eficaz para enraizar estacas juveniles de *Cedrela odorata* utilizando un propagador de baja tecnología. En *C. fissilis* se observó que la miniestaca caulinar proveniente de material seminal producía el mejor enraizamiento y sobrevivencia (Xavier et al., 2003). Con respecto a *Toona*, se comprobó que el uso de diferentes tipos y orígenes de miniestacas son aptos para el enraizamiento (Gomes de Moraes et al., 2014) y manteniéndolas en condiciones de humedad relativa mayor al 80% y temperatura media de 27°C, el enraizamiento es del 100% sin el agregado de AIB (Souza et al., 2009).

El acodamiento, en cambio, es un método de propagación por el cual se induce la formación de raíces adventicias en la rama de un árbol cuando aún permanece unida a la planta madre (Hartmann & Kester, 1987). Una variante de esta técnica, el acodo en montículo, fue usada en plantas de 12 meses de edad criadas en el vivero de la Estación Experimental de Cultivos Tropicales Yuto del INTA, donde se obtuvieron 100% de acodos enraizados con un promedio de 6,54 raíces, sin usar regulador de crecimiento (Tarnowski, 2007).

Por otro lado, la micropropagación es una técnica que consiste en cultivar *in vitro* cualquier parte de una planta (explanto). Cuando se utilizan explantos provenientes de árboles adultos, surgen algunos inconvenientes como ser altos índices de contaminaciones de los cultivos, oxidación de los tejidos y difícil capacidad rizogénica, tal como se menciona en el trabajo de Mroginski et al. (2003) con brotes epicórmicos de ramas de 10 años de edad de *Toona*. Otras experiencias reportan la obtención de propágulos a partir de explantos proveniente de plantas jóvenes o seminales (Daquinta et al., 2005; Da Costa Nunes et al., 2002). Hay una gran variedad de factores que influyen en el desarrollo y el crecimiento *in vitro*: la consistencia del medio de cultivo, temperatura y fotoperiodo, así como también el tamaño del explanto, la polaridad, tipo y posición dentro de la planta madre, y la edad fisiológica y ontogénica (Thorpe, 1994; Litz & Jarret, 1991; Pierik, 1990).

El objetivo de este trabajo fue adoptar y ajustar tres técnicas de propagación vegetativa: acodo aéreo, estaqueo y cultivo *in vitro*, a fin de poder evaluar su potencial uso y eficiencia de aplicación.

Materiales y Métodos

Acodamiento aéreo: En febrero de 2014 se procedió a cortar cinco árboles de diferentes edades a una altura de entre 150-180 cm. A los dos meses fueron seleccionados para acodar los brotes mayores a 15 cm de longitud y 5 mm de diámetro. Esta tarea se realizó nuevamente en febrero de 2015 en los mismos cinco árboles. Se probaron dos tipos de contenedores del sustrato: bolsitas, en el primer año, y vasitos Rooterpot® en el segundo. El sustrato consistió de una mezcla de turba y arena (3:1 v/v).

Se realizó un descortezado de 2 cm de ancho y se colocó en esa zona el sustrato humedecido dentro de los contenedores. Después de 60 días se verificaron los acodos enraizados. Los brotes acodados fueron rotulados y acondicionados en macetas. Fueron evaluados el número de acodos enraizados por tratamiento y el porcentaje de plantas vivas luego de un mes de colocadas en macetas.

Enraizamiento de estacas: El jardín clonal consistió de 130 minicepas de tres años de edad acondicionadas en vivero bajo media sombra 80%, recepadas en verano a una altura de 20 cm y la colecta de estacas basales se realizó a los tres meses. Las estacas tenían 6 cm de longitud con un par de hojas enteras. Fueron sumergidas por 30 min en Carbendazim 50% (1 ml/L) y estaqueadas en bandejas de 40 celdas con 90 cm³ de capacidad conteniendo diferentes tipos de sustratos, como tratamientos: turba (T), arena (A) y grava (G). La parcela experimental consistió de 10 estacas con 4 repeticiones por tratamiento bajo un diseño completo al azar (DCA). El ensayo fue instalado a mediados de mayo y conducido en invernadero; para mantener una alta humedad fueron cubiertas con plástico. A los 40 días se registraron los porcentajes de estacas vivas y enraizadas; número de raíces por estaca; altura y diámetro de los brotes producidos. Se realizó el análisis de la varianza y la diferencia de medias se testó con Tukey ($\alpha=0,05$) mediante el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo et al, 2015).

Cultivo *in vitro*: Se usaron 70 plantas madres de 3 años de edad recepadas a 20 cm de altura para forzar la brotación. El explanto consistió de segmentos uninodales subapicales de 10-15 mm de longitud y de 15-20 días de edad. La desinfección se realizó mediante un cepillado suave en una solución de hipoclorito de sodio 5%, inmersión en Carbendazim 0,3% por 30 min, enjuague con etanol 70% por 1 min; y dentro de la cámara inmersión en solución de hipoclorito de sodio 25% + 2 gotas Tween por 20 min y enjuagues con agua estéril. Se utilizó el medio basal MS diluido a ¼ de su concentración al cual se agregaron ácido indolbutírico (AIB), bencilaminopurina (BAP), diatomea líquida (0-10%) y 3% de sacarosa. El pH fue ajustado a 5,8 antes de la adición de 0,7% de agar-agar

y esterilizados en autoclave a 1 atm durante 20 min. La parcela experimental consistió de 8 explantos con 3 repeticiones por tratamiento bajo un diseño completo al azar (DCA). Los cultivos permanecieron 40 días en sala de incubación a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ con fotoperiodo de 16 hs luz y luego fueron evaluadas las variables de explantos brotados, contaminados/oxidados, altura de brotes, porcentaje de enraizamiento y número de raíces/explanto después de un mes de cultivo.

Resultados

Acodo aéreo: En el primer año se contabilizaron en los cinco árboles cortados un total de 87 brotes de los cuales 20 tenían las medidas adecuadas para ser acodados. Lograron enraizar muy pocos y luego de un mes en maceta, no sobrevivió ninguna (Tabla 1). En el segundo año se contaron un total de 113 brotes y se seleccionaron 45 para acodar con vasitos. El porcentaje de enraizamiento fue superior al 60% en cuatro árboles. Los acodos del árbol N°3 tuvieron el mayor porcentaje de sobrevivencia después de un mes de trasplantadas a maceta (87,5%).

Tabla 1. Resultado del acodamiento aéreo de los brotes surgidos en cinco árboles de *Toona ciliata*.

Table 1. Results of the aerial layers on five trees of *Toona ciliata*.

N° de árbol	Año 1			Año 2		
	N° acodos realizados	% Acodos enraizados	% Plantas vivas al mes	N° acodos realizados	% Acodos enraizados	% Plantas vivas al mes
1	7	57,1	0	10	70	42,8
2	6	66,6	0	10	60	66,6
3	2	0	0	10	80	87,5
4	3	33,3	0	9	88,8	62,5
5	2	50	0	6	16,6	16,6
Total	20			45		

Enraizamiento de estacas: Se colectaron en total 120 brotes. A los 40 días se observó una mayor cantidad de estacas vivas en el sustrato G (92,5%) en comparación con A (85%) y T (75%), aunque la diferencia no fue significativa. La prueba de Tukey si detectó diferencias ($p < 0,05$) en el porcentaje de enraizamiento, siendo del 75% en G mientras que en los sustratos A (44%) y T (53%) fueron iguales. Con respecto a la altura promedio de los brotes, en los sustratos T y A fueron iguales (1,68 cm y 1,69 cm, respectivamente) y mayores que en G (1,18 cm) (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados obtenidos del enraizamiento de estacas basales de *Toona ciliata* en tres tipos de sustratos después de 40 días de ensayo.

Table 2. Results obtained of *Toona ciliata* rooting cuttings on different substrates after 40 days of trial.

	Turba	Arena	Grava
% estacas vivas	75 a	85 a	92,5 a
% estacas enraizadas	53 b	44 b	75 a
N° raíces por estaca	3,69 a	4,73 a	4,33 a
altura brotes (cm)	1,68 a	1,69 a	1,18 b
diam brotes (cm)	0,19 a	0,2 a	0,23 a

Cultivo in vitro: Durante todo el periodo de experimentación se observó que las minicepas tuvieron un 10% de mortalidad. En la tabla 3 se muestran los resultados de las concentraciones probadas de BAP y AIB por separado y sus combinaciones:

Tabla 3. Resultados de los nueve tratamientos evaluados a los 40 días de iniciado el ensayo.

Table 3. Results of the nine treatments evaluated after 40 days of assay.

BAP mg/L	0,05	0,5	1				0,05			0,5			1		
AIB mg/L				0,01	0,1	1	0,01	0,1	1	0,01	0,1	1	0,01	0,1	1
brotados (%)	90	95	95	100	95	70	95	70	75	50	55	65	90	55	30
brotos (mm)	4,6	5,47	4,89	5,1	5,0	4,1	6,89	5,79	7,07	3,10	4,91	5,62	6,44	4,00	4,00
contamin (%)	10	5	5	5	5	5	0	0	10	15	25	10	5	10	15
oxidados (%)	0	0	0	0	0	0	5	30	15	35	20	25	5	35	55

A los 40 días de iniciado el cultivo, el porcentaje de explantos brotados entre los tratamientos varió entre el 30% y 100%. Al cabo de dos semanas se observaron pérdidas de hasta el 55% de los explantos por causa de la oxidación del tejido vegetal, y hasta un 25% debido a la contaminación bacteriana y/o fúngica. De las nueve combinaciones ensayadas, el medio de cultivo ¼ MS + 0,05 mg/L BAP + 0,01 mg/L AIB generó 35% de brotes mayores a 10 mm. En el medio con 1 mg/L AIB se registró un 87% de explantos enraizados los cuales tenían en promedio 9,8 raíces adventicias.

Posteriormente, a este medio de cultivo se agregaron diferentes concentraciones de diatomea líquida para evaluar su efecto sobre la capacidad de enraizamiento (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del cultivo en el medio ¼ MS + 1 mg/L AIB + % de diatomea líquida.

Table 4. Results of the culture in the medium ¼ MS + 1 mg/L AIB + % of diatom liquid.

1 mg/L AIB + % diatomea	0	2	4	6	8	10
promedio altura brotes (mm)	4,14	4,27	5,50	4,74	4,13	3,67
% explantos brotados	70	91,6	91,7	95,8	95,8	75
% explantos contaminados	5	0	0	4	4	0
% explantos oxidados	0	8,3	8,3	0	0	0
N° promedio de raíces / explanto	9,79 a	7,68 ab	10,33 a	5,11 b	8,81 ab	10,64 a
% de explantos enraizados	87,5	91,6	81,8	87	91,3	91,6

En todos los tratamientos el porcentaje de explantos enraizados fue superior al 80% y no se evidenciaron diferencias en cuanto al número de raíces por explanto con respecto al testigo, excepto en el tratamiento con 6%. Sin embargo hubo mucha variación en la respuesta rizogénica dentro de todos los tratamientos (Fig 1), lo cual puede ser debido al origen del segmento uninodal. La topósis es la variación de crecimiento de las estacas tomadas de diferentes lugares a lo largo del brote original. Esta característica modifica el enraizamiento debido a un desbalance hormonal interno entre los explantos apicales, subapicales y basales, todos ellos utilizados en este trabajo.

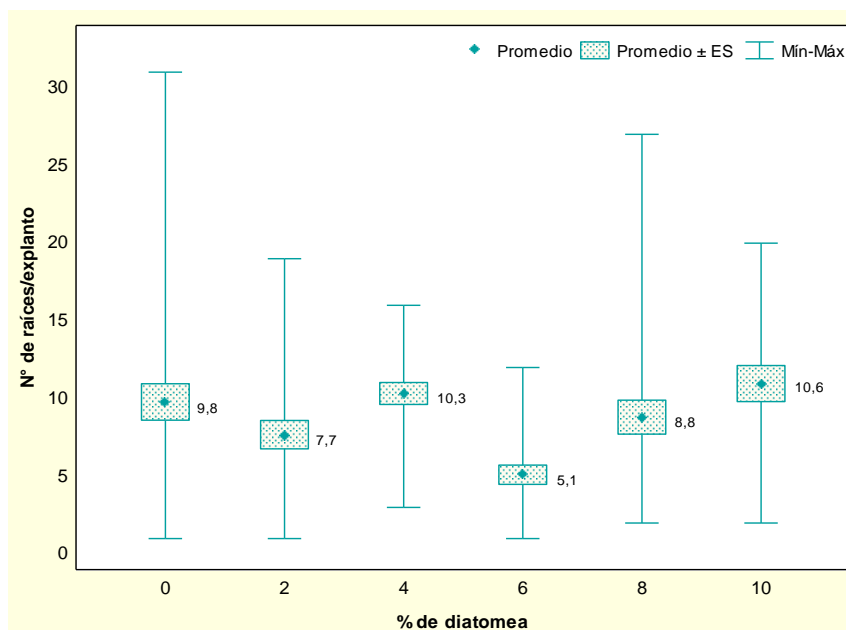


Fig 1. Número de raíces por explanto en función del % de diatomea en el medio de cultivo.

Fig 1. Number of roots per explant as a function of % diatom in culture medium.

Conclusiones

Acodamiento: Si bien las plantas obtenidas a través de esta técnica con vasitos no superaron el 50% de sobrevivencia, resulta muy promisorio como método de clonación de árboles adultos ya que es útil para producir plantas grandes en poco tiempo e incorporarlas rápidamente a un jardín clonal para continuar la multiplicación vía estaca o por micropropagación. Este tipo de experiencias con especies forestales son muy escasas o casi nulas, por lo tanto sería interesante continuar con los estudios para definir la mejor época de colecta.

Enraizamiento: El enraizamiento de estacas en el sustrato G parece ofrecer mayor oxigenación y drenaje del agua para que las raíces puedan desarrollarse y crecer más rápidamente, en comparación a T y A, donde la retención de agua sería mayor y favorecería la pérdida de estacas por podredumbre. No obstante, resta aún evaluar las características de las raíces adventicias para poder determinar la eficacia de los sustratos utilizados. Al igual que con el método de acodamiento, es necesario probar en diferentes épocas del año y usar hormonas enraizantes.

Cultivo in Vitro: se logró superar satisfactoriamente la etapa del establecimiento *in vitro* del material vegetal (desinfección). Los datos hasta ahora registrados son insuficientes para definir una estrategia de multiplicación in vitro, no obstante se pudo determinar que el enraizamiento es altamente eficaz.

Agradecimiento: A la UCAR por el financiamiento de este trabajo mediante el PIA 12046

Bibliografía

- Da Costa Nunes, E.; De Castilho, CV; Moreno, FN; Viana, AM (2002) In vitro culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 259-268.
- Daquinta, M.; Lezcano, L.; Cid, M.; Pina, D.; Rodríguez, R. 2005. In vitro morphogenesis of *Toona ciliata* from young leaf rachis using thidiazuron. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. VII No. 2: 5-9.
- Díaz-Maldonado, E. 1991. Técnicas de enraizado de estacas juveniles de *Cedrela odorata* L. y *Gmelina arborea* Linn. Tesis. Mag. Sc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, 93 p.
- Hartmann, H.T. y Kester, D.E. 1987. Propagación de plantas. Principios y prácticas. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., México, pp: 760.
- Litz, R.E.; Jarret, R.L. (1991) Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: *Cultivos de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. William M. Roca y Luis A. Mroginski (Ed. Técnicos), pp: 144-171. CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Mroginski, E.; Rey, HY; Mroginski, LA (2003) In vitro plantlet regeneration from Australian Red Cedar (*Toona ciliata*, Meliaceae). *New Forests* 25:177-184.
- Pierik, RLM (1990) Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp: 326.
- Souza, JCAV; Barroso, DG; Carneiro, JGA; Teixeira, SL; Balbinot, E. 2003. Propagação vegetativa de cedro-australiano (*Toona ciliata* M. Roemer) por miniestaquia. *R. Árvore*, Viçosa-MG, v. 33, n. 2 p: 205-213.
- Tarnowski, CG. 2007. Propagación agámica de *Toona ciliata* var. *australis* (Meliaceae) mediante acodo en montículo. *Actas XXII Jornadas Forestales de Entre Rios, Concordia*.
- Varela, R.C.; Del Castillo, E.M.; Suarez, C.; de Olsen, A. 2004. Ensayo de orígenes, procedencias y progenies de *Toona ciliata* M. Roem var. *australis* (F. Muell) CDC. Investigación Forestal al Servicio de la Producción II. Resultados aplicables al cultivo de bosques y la producción de madera en Argentina. SAGPyA. Proyecto Forestal de Desarrollo. Buenos Aires, Abril de 2004, pp: 191-200.
- Xavier, A.; Dos Santos, GA; De Oliveira, M.L. 2003. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). *R. Árvore*, Viçosa-MG, v. 27, n. 3, p: 351-356.

Zapater, M.A.; Delgado, S.; Caruso, G.; Osinaga, R.; Mattalía, C. 2005. El potencial forestal de Salta. Informe Técnico del Ministerio de la Producción y el Empleo. Secretaria de la Producción de Salta, pp: 24.