

COMUNICACIÓN

Micropropagación de *Aloysia polystachia* (Verbenaceae)

Sansberro, P.A. y L.A. Mroginski

RESUMEN

Se describe una técnica que permite la regeneración *in vitro* de plantas de *Aloysia polystachia* (Gris) Mold. mediante el cultivo de segmentos nodales conteniendo 1-3 yemas axilares. Los mejores resultados se obtuvieron con medio de cultivo semisólido de Murashige y Skoog, diluido 4 veces, con 0,5 % de sacarosa y desprovisto de reguladores de crecimiento. Los explantes fueron cultivados a $27 \pm 2^\circ$ C y 14 hs de fotoperíodo (10 W/ m²). El mejor explante fue el que contenía 3 yemas axilares. Las plantas obtenidas fueron exitosamente transferidas a macetas con una sobrevivencia de más del 80 %.

Palabras clave: micropropagación, cultivo de tejidos, *Aloysia polystachia*, *Verbenaceae*, planta medicinal.

Sansberro, P.A. y L.A. Mroginski, 1995. Micropropagation of *Aloysia polystachia* (Verbenaceae). *Agriscientia* : 83-86.

SUMMARY

A technique for plant regeneration from nodal segments of *Aloysia polystachia* (Gris) Mold. is described. Explants containing 1-3 axillary buds were regenerated in plantlets when aseptically cultured on 1/4 strength Murashige and Skoog (plus 0,5 % sucrose) semisolid medium devoid of hormones. The experimental conditions were $27 \pm 2^\circ$ C and 14 hs. photoperiod (10 W/m²). The best explants were those having three axillary buds. Plantlets regenerated were successfully transferred to pots with a survival rate of more than 80 %.

Key words: micropropagation, tissue culture, *Aloysia polystachia*, *Verbenaceae*, medicinal plant.

P.A. Sansberro y L.A. Mroginski, IBONE, Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE). C.C. 209, (3400) Corrientes, Argentina.

Aloysia polystachia (Verbenaceae) es un arbusto que crece espontáneamente en Bolivia y en Argentina (Provincias de Salta, San Juan, La Rioja, Catamarca, San Luis y Córdoba) donde se lo conoce como "poleo real", "poleo de Castilla", "poleo riojano", "palo de Castilla", "té de burro" y "burrito" (Botta, 1979; Fester *et al.*, 1961).

El "burrito" es económicamente importante por su utilización en la medicina humana (Amorin, 1988), dado que sus hojas contienen derivados terpénicos (Fester *et al.*, 1961), los cuales hacen que las infusiones de las mismas posean propiedades tónicas, carminativas (Domínguez, 1928) y especialmente digestivas (Hieronymus, 1882; Martínez Crovetto, 1981).

Las técnicas del cultivo *in vitro* de tejidos brindan interesantes herramientas que permiten la micropropagación de un gran número de especies vegetales (Redenbaugh, 1991; Villalobos y Thorpe 1991). Sin embargo, no hay referencias bibliográficas referidas a *A. polystachia*. En cambio, se encuentra un trabajo vinculado con estudios sobre morfogénesis *in vitro* en *A. gratissima* (Korocho y Trippi, 1993).

En este trabajo se informa sobre un procedimiento que posibilita la micropropagación masiva y rápida de plantas de *Aloysia polystachia*.

Se trabajó con *Aloysia polystachia* (Gris) Mold. Este material —cedido gentilmente por el Establecimiento "Las Marías S.A.C.I.F.A."— creció, en macetas, en un invernadero del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE)

Los explantes utilizados (segmentos de tallo con uno, dos o tres nudos, según el experimento) fueron previamente desinfectados en una solución de agua de lavandina comercial (conteniendo 1,2 % de NaOCl) durante 15 min. y, finalmente, enjuagados varias veces con agua destilada estéril.

Los explantes fueron cultivados en tubos de vidrio de 11,5 cm de longitud por 2,0 cm de diámetro (1 explante/tubo) conteniendo 10 ml de medio de cultivo. El medio de cultivo estaba compuesto de las sales minerales, vitaminas y sacarosa, tal como lo formularan Murashige y Skoog (1962). A este medio, en adelante se lo denominará MS. También se utilizó este medio diluido 2 veces (MS/2); 4 veces (MS/4); 8 veces (MS/8); 16 veces (MS/16) y 32 veces (MS/32). Asimismo se cultivaron explantes en únicamente agua bidestilada ("medio 0"). Los medios fueron líquidos (estáticos, sin agitación) o semisólidos (0,6 % de agar). En un experimento, las sales minerales y las vitaminas del medio MS fueron diluidas 4 veces y se agregaron concentraciones de sacarosa de 0,1 %, 0,5 %, 1 % y 3 %. El pH de los medios fue ajustado, antes del agregado del agar,

a 5,8 con KOH y/o HCl. Los medios fueron esterilizados en autoclave a 1 atm durante 20 min.

Se cultivaron 10 tubos por tratamiento, realizándose 3 repeticiones. Los cultivos fueron incubados en un cuarto climatizado a $27 \pm 2^\circ \text{C}$, con un fotoperíodo de 14 hs (10 W/m^2).

Las plantas obtenidas fueron transferidas a macetas conteniendo un sustrato compuesto de tierra de monte, perlita y turba (2: 1: 1 v/v)

Luego de la primer semana de cultivo se comenzaron a apreciar las diferentes respuestas morfogenéticas. En muchos de los cultivos hubo un rápido ennegrecimiento de los tejidos especialmente cuando más concentrado era el medio de cultivo utilizado. Con MS completo el porcentaje de explantes establecidos que permanecían verdes o con las yemas hinchadas o que comenzaban a brotar fue muy bajo, a tal punto que en algunas repeticiones fue nulo. En cambio, a medida que se diluía el MS (e incluso



Figura 1. Regeneración de planta de *Aloysia polystachia* mediante el cultivo de segmentos trinodales en 1/4 MS. La barra indica 1 cm

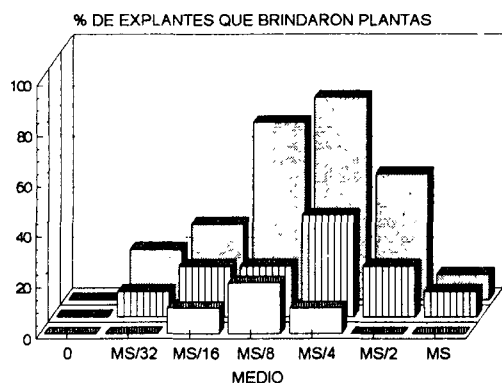


Figura 2. Efecto de la concentración del MS sobre la regeneración de plantas, luego de 40 días de cultivo, de segmentos uninodales □, binodales ▨ y trinodales ▩ de *Aloysia polystachia*.

ve en el medio "0" que solamente tenía agua bides-tilada) el ennegrecimiento de los explantes fue menor y el porcentaje de explantes exitosamente establecidos aumentaba. Asimismo, el efecto nocivo del ennegrecimiento fue mayor en los segmentos uninodales que en los bi y trinodales. En éstos, el ennegrecimiento se manifestó especialmente en las yemas próximas al medio de cultivo, mientras que las yemas más alejadas, en general no ennegrecieron, por el contrario, brotaron y produjeron plantas completas (las raíces se generaban directamente de los vástagos, sin formación previa de callos) (Fig. 1) Por este motivo en todos los experimentos posteriores se utilizaron como explantes a los segmentos trinodales. Los resultados luego de 40 días de cul-

tivo (Fig. 2) muestran que el cultivo de segmentos trinodales en el medio MS/4 posibilitó la obtención del mayor número de plantas.

La regeneración de plantas también fue afectada por la consistencia del medio de cultivo. Luego de 40 días de cultivo se aprecia que el porcentaje de explantes que brindaron plantas fue de hasta 200 % superior cuando se empleó un medio de cultivo semisólido (0,6 % de agar) que cuando los cultivos fueron hechos en medio líquido estacionario (Fig. 3). Además en los medios líquidos se obtuvieron hasta un 30 % de plantas vitrificadas y no se pudieron transferir al suelo.

La concentración de sacarosa del medio de cultivo afectó marcadamente la producción de plantas completas. Luego de 40 días se puede apreciar que los porcentajes más elevados de explantes que brindaron plantas fueron los cultivados con 0,5 % y 1 % de sacarosa.(Fig. 4).

Las plantas obtenidas fueron exitosamente transferidas a tierra con una sobrevivencia superior al 80 %.

Los resultados de este trabajo muestran que es factible regenerar plantas de *Aloysia polystachia* mediante el cultivo de segmentos nodales preferiblemente trinodales, en el medio semisólido de Murashige y Skoog (1962) diluido 4 veces (MS/4), con 5 gr/L de sacarosa e incubar los cultivos a una temperatura constante de $27 \pm 2^\circ \text{C}$ y 14 hs de fotoperíodo (10 W/m^2). A los 10 días se obtienen vástagos, un alto porcentaje de los cuales, a los 20-25 días forman raíces y pueden ser transferidos al suelo.

Estos resultados, en general, son similares a los obtenidos en la micropropagación de varios géne-

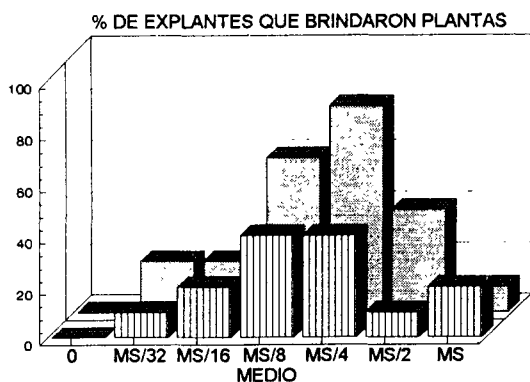


Figura 3. Efecto de la concentración del MS y de la consistencia del medio sobre la obtención de plantas mediante el cultivo de segmentos trinodales de *Aloysia polystachia* ▨ medio líquido, estacionario, ▩ medio semisólido (agar 0,6 %)

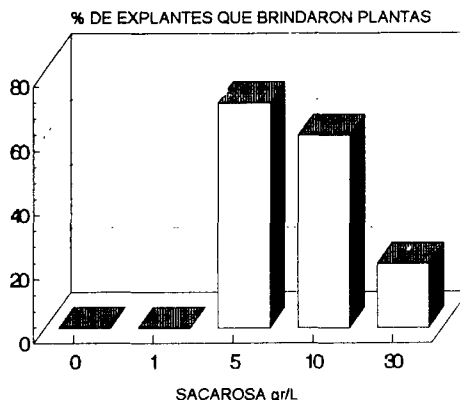


Figura 4. Efecto de la concentración de sacarosa (suplementada al medio 1/4 MS) sobre la regeneración de plantas mediante el cultivo de segmentos trinodales de *Aloysia polystachia*.

ros de plantas (Krikorian, 1991; Redenbaugh, 1991; Villalobos y Thorpe, 1991). El empleo de medios básicos diluidos es un hecho común en especies leñosas (Thorpe *et al.*, 1991). Sin embargo, en la literatura no es frecuente encontrar especies en las cuales los mejores resultados, en cuanto a obtención de plantas a partir de yemas y/o meristemas, se obtengan con el empleo de medios de cultivo constituidos sólo con sales minerales, vitaminas y sacarosa, y totalmente desprovistos de reguladores de crecimiento (Evans *et al.*, 1981). Algunas excepciones lo constituyen la obtención de plantas mediante el cultivo de meristemas de caupí, *Vigna unguiculata*, (Kartha *et al.*, 1981), el cultivo de segmentos de tallo de *Cordyline terminalis* (Evaldsson and Welander, 1985) y el cultivo de segmentos nodales de *Salix babilonica* (Daguin and Letouze, 1986).

Otro aspecto llamativo de este sistema desarrollado para *Aloysia polystachia* es la alta capacidad rizogénica de los vástagos obtenidos. Además, las raíces adventicias se generan a través de organogénesis directa (Hicks, 1987), es decir que se diferencian directamente desde el vástago, sin la formación intermedia de callo. Este modelo es ideal para la micropropagación porque contribuye a la sobrevivencia de las plantas regeneradas.

Mayores estudios son necesarios para la optimización de los distintos factores que afectan la eficiencia en la regeneración de plantas de *Aloysia polystachia* lo que contribuirá a una rápida aplicación en la micropropagación comercial.

BIBLIOGRAFÍA

- Amorin, J.L., 1988. Guía taxonómica de plantas de interés farmacéutico. Colegio de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal 80 pp.
- Botta, S.M., 1979. Las especies argentinas del género *Aloysia* (Verbenáceas). Darwiniana 22 (1-3) : 67-107
- Daguin, F. and R. Letouze, 1986. Ammonium induced vitrification in cultured tissues. Physiol. Plant 66 : 94-98.
- Domínguez, J.A., 1928. Contribuciones a la Materia Médica Argentina. Trabajos del Instituto de Botánica y Farmacia (Facultad de Ciencias Médicas UBA) 44 : 117.
- Evaldsson, I.E. and N. T. Welander, 1985. The effects of medium composition on *in vitro* propagation and *in vivo* growth of *Cordyline terminalis* Cv "Atoom" J. Hort Sci. 60 : 525-530.
- Evans, D.A., W.R. Sharp and C.E. Flick, 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In Thorpe, T. A. (ed.) Plant Tissue Culture Academic Press, New York, pp. 45-113.
- Fester, G., E.A. Martinuzzi, J.A. Retamar y A.I. Ricciardi, 1961. Aceites esenciales de la República Argentina Academia Nacional de Ciencias de Córdoba : 38-40
- Hicks, G.H., 1987. Adventitious rooting of apple microcuttings *in vitro*: an anatomical study. Can. J. Bot. 65 1913-1920.
- Hieronymus, J., 1882. Plantal dioforicae florum argentinæ Bs. As. pp. 221.
- Kartha K.K., K. Pahl, N.L. Leung and L.A. Mroginski, 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes. soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean. Can. J. Bot. 59: 1671-1679.
- Koroch, A.R. y V.S. Trippi, 1993. Efectos de la cinetina sobre la morfogénesis a partir de tejidos caulinares cultivados *in vitro* de *Aloysia gratissima*. En Actas II Simposio Argentino de Biotecnología Vegetal, Huerta Grande (Cba.) C. 24.
- Krikorian, A.D., 1991. Propagación clonal *in vitro*. En: Roca, W.M. y L.A. Mroginski (eds.) Cultivo de tejidos en la Agricultura. CIAT, Colombia 95-125
- Martínez Crovetto, R., 1981. Las plantas utilizadas en la medicina popular en el NO de Corrientes (Rep. Argentina). Fundación Miguel Lillo, Tucumán. Misc 69 : 89.
- Murashige, T. and F.A. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.
- Redenbaugh, K., 1991. Applications of micropropagation for agronomic crops. In Debergh, P. C. and R. H. Zimmerman (eds.) Micropropagation. Kluwer Academic Publ. the Netherlands pp. 285-310
- Thorpe, T.A., I.S. Harry, and P.P. Kumar, 1991. Application of micropropagation to forestry. In Debergh, P. C. and R. H. Zimmerman (eds.) Micropropagation. Kluwer Academic Publ. the Netherlands pp. 311-336
- Villalobos, V.M. y T.A. Thorpe, 1991. Micropropagación: conceptos metodología y resultados. En: Roca, W. y Mroginski, L. A. (eds.). Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia. pp. 127-141.