



**Facultad de Ciencias
FORESTALES**



Universidad Nacional de Misiones

JORNADAS PIAS 26 DE JUNIO 2015

Técnicas de propagación clonal para especies forestales nativas a la Selva paranaense en la Provincia de Misiones

PIA 10031

LABORATORIO DE PROPAGACION VEGETATIVA Y MEJORAMIENTO FORESTAL

FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES - UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES
ELDORADO MISIONES – FCF UNAM



Integrantes, Becarios y Colaboradores

- ▶ **Director:** Ing. Ftal. (Mgter) Fernando Niella (FCF UNaM –Lab. Propagacion Vegetativa)
- ▶ **Co-Director:** Ing Ftal. (**Mgter**) Sandra Patricia Rocha (FCF UNaM –Lab. Propagacion Vegetativa)
- ▶ **Integrantes y Colaboradores**
 - ▶ Ing .Ftal. Beatriz Eibl, (Mgter) . (FCF UNaM – Laboratorio de Semillas/Colecta /Fenología/Almacen)
 - ▶ Ing. Ftal. Alicia Bohren, (Mgter) (FCF UNaM – Histología y Disección de Tejidos)
 - ▶ Doctor Héctor Keller
- ▶ **Becarios Estudiantes de 4to y 5to año de la carrera de Ingeniería Forestal**
 - ▶ Lilian Ayala (Tesis de grado – Micropropagación vía Axilar *Acca sellowiana*)
 - ▶ Pablo Conti – (Tesis de grado - Respuesta a la Fertilización en el Manejo de Minicepas de Timbo y Caña fistola)
 - ▶ Peggy Thalmayr (Becaria CIN y Tesis de grado –Propagación vegetativa de *Eugenia involucrata*)
 - ▶ Abel Scherf (Becario y tesista de grado-Usó de bioreactores en la propagación de caña fistola)
 - ▶ Analia Romero – Ayudante de laboratorio
 - ▶ Marcelo Franco – Ayudante tareas de vivero

Objetivos

- ▶ Desarrollo de técnicas para la **conformación de un sistema de propagación vegetativa** de germoplasma local de:
 - ▶ *Peltophorum dubium* (Caña fistola),
 - ▶ *Enterolobium contortosiliquum* (Timbo),
 - ▶ *Eugenia involucrata* (Cerella o Cerezo nativo),
 - ▶ *Acca sellowiana* (guayabo nativo)
 - ▶ *Rheedia brasiliensis* (Pacuri)
- ▶ *Cordia Trichotoma*, *Helietta apiculata* e *Inciense* (PIA 10069 - Proyecto Plantaciones Energéticas)

**FIJADORAS DE NITROGENO,
Multipropósito**

PRODUCTOS NO MADERABLES



Problemas

- ▶ Hábitat Fragmentado con cada vez menos individuos en edad reproductiva por hectárea en procesos de selección disgénica:
Erosión Genética
- ▶ Alta Diversidad Especifica y *Baja Diversidad Genética* en la Selva paranaense
- ▶ *Subutilización* del potencial genético, especies silvestres no domesticadas
- ▶ *Cosecha de semillas* cada vez mas difícil y cara

Solución

- ▶ *Necesidad de Mejoramiento Genético para incorporarlas al sistema productivo*
 - ▶ Insumo para los programas de mejora: Diversidad Genética de la Especie
 - ▶ Necesidad de Ensayos Procedencias/Progenie y Conformación de Poblaciones Base para Inicio Ciclos de Mejora
- ▶ *Formas de reproducción alternativas* para la producción operativa de plantas
 - ▶ *Técnicas de Propagacion Vegetativa para rescate y aumento disponibilidad de germoplasma*

Solución

- ▶ **Proyecto PIA 10031:** Desarrollo y Aplicación de las Técnicas de Propagación
- ▶ **Proyecto SILVA 17:** Conformación de Red Arboles Semilleros en su Área de Distribución Natural



Cosecha de
semillas en su
área de
distribución
natural
(SILVA 17)

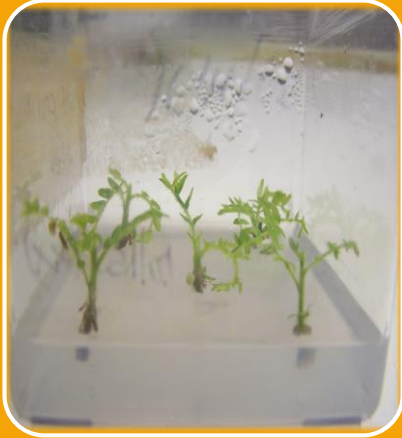


Desarrollo de
Técnicas de
Propagación
Vegetativa
In vitro y Ex vitro
(PIA 10031)



Aumento de
disponibilidad
Conservación y
Producción





PROPAGACION IN VITRO

- MULTIPLICACION VIA AXILAR
- ORGANOGENESIS
- EMBRIOGENESIS



PROPAGACION EX VITRO

- MANEJO DE MINICEPAS
- SISTEMA SEMI-HIDROPONICO
- ENRAIZAMIENTO DE MINIESTACAS

RESULTADOS



SISTEMA DE PROPAGACION EX VITRO

PROYECTOS PIA 10031 Y 10069

Etapas Tecnología Ex Vitro

- ▶ Formación *Minicepas* (Plantas Madres)
- ▶ *Manejo Minicepas* para Producción de *Miniestacas* (Sustrato, Fertilización, Condiciones ambientales)
- ▶ *Pre-tratamiento* de Miniestacas
- ▶ *Enraizamiento* Miniestacas

Formación de Planta con Ideotipo adecuado para llevar a Campo y/o reconversión a plantas madres



Minicepas Caña fistola

Minicepas Timbo



Ensayos de formación de minicepas considerando los factores **genotipos** y fertilización: F1: 3 gr/planta de Plantacote®, cada 6 meses; F2: 12 gr/planta Plantacote®, cada 6 meses; F3: 4 gr/planta Plantacote®, cada 2 meses.



Caña fistola

Timbo

Comportamiento diferencial de Minicepas de *Caña fistola* y *Timbo*.
Necesidad de generar ambiente con *sistemas foggers para sistemas minicepas-miniesticas en Timbo*



Limitaciones de espacio y dificultades en la sectorización cuando se trabaja con especies y procesos distintos como cria de minicepas, enraizamiento de minicuttings o aclimatizaciende material in vitro

CONDICIONES DE CRIA DE MINICEPAS



Manejo de Minicepas

- Densidad de 60 plantas/m², en invernáculo con media sombra del 80 % (Intensidad lumínica promedio: día soleado: 13.000 lux/día nublado: 2000 lux), en condiciones semi-controladas de humedad (microaspersión) (Promedios periodo Septiembre-Marzo, Temperatura: 29° C. Humedad Relativa (HR): 73%)



Manejo de Minicepas

- ▶ Los plantines fueron decapitados a una altura no inferior a 6 cm
- ▶ Podas sucesivas cada 45, 60 y 90 días
- ▶ Cada 6 meses re-aplicaciones del fertilizante en una concentración de 3g/maceta



Enraizamiento

- ▶ Del rebrote obtenido de las mincepas, se cosecharon miniestacas uni o binodales, de una longitud promedio de 5 cm, y un diámetro no menor a 3mm.



Los tratamientos inductivos de las miniestacas

- ▶ Aplicación de auxinas (Acido indol butírico - AIB): Inmersión de las bases de la estaca en una solución AIB 400 ppm, pH 5.7, por 24 hs, seguido de una inmersión en fungicida Zineb® (20g/l) por 20 minutos,
- ▶ Sin aplicación de auxinas-inmersión en agua 24 horas (AGUA): Inmersión de las bases de la estaca en agua por 24 hs, seguido de una inmersión de las bases en fungicida Zineb® (20g/l) por 20 minutos,
- ▶ Sin aplicación de auxinas-inserción directa(DIRECTA): Inmersión de las bases de la estaca en fungicida Zineb® (20g/l) por 20 minutos.
- ▶ Otros factores estudiados fueron: presencia de hojas en la estaca y posición de la estaca en el brote

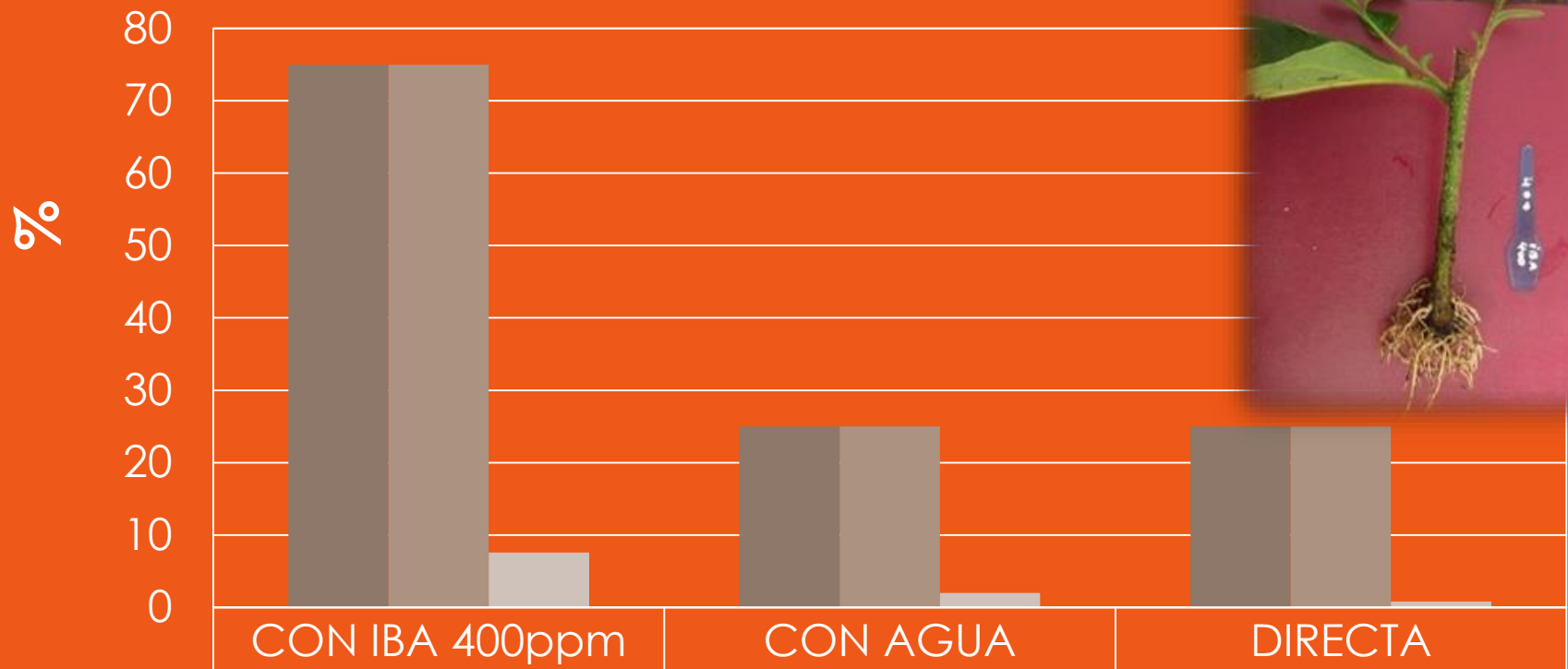
RESULTADOS

Producción de estacas de minicepas de *Cordia trichotoma*

- ▶ Supervivencia promedio de 70%
- ▶ Promedio de 4.3 ± 3.10 estacas/minicepas, cada 60 días
- ▶ Producción promedio anual de 770 estacas/m²,
- ▶ Considerando 3 cosechas anuales (en octubre, diciembre y febrero).



Efecto de los tratamientos de inducción en miniestacas de *Cordia trichotoma*



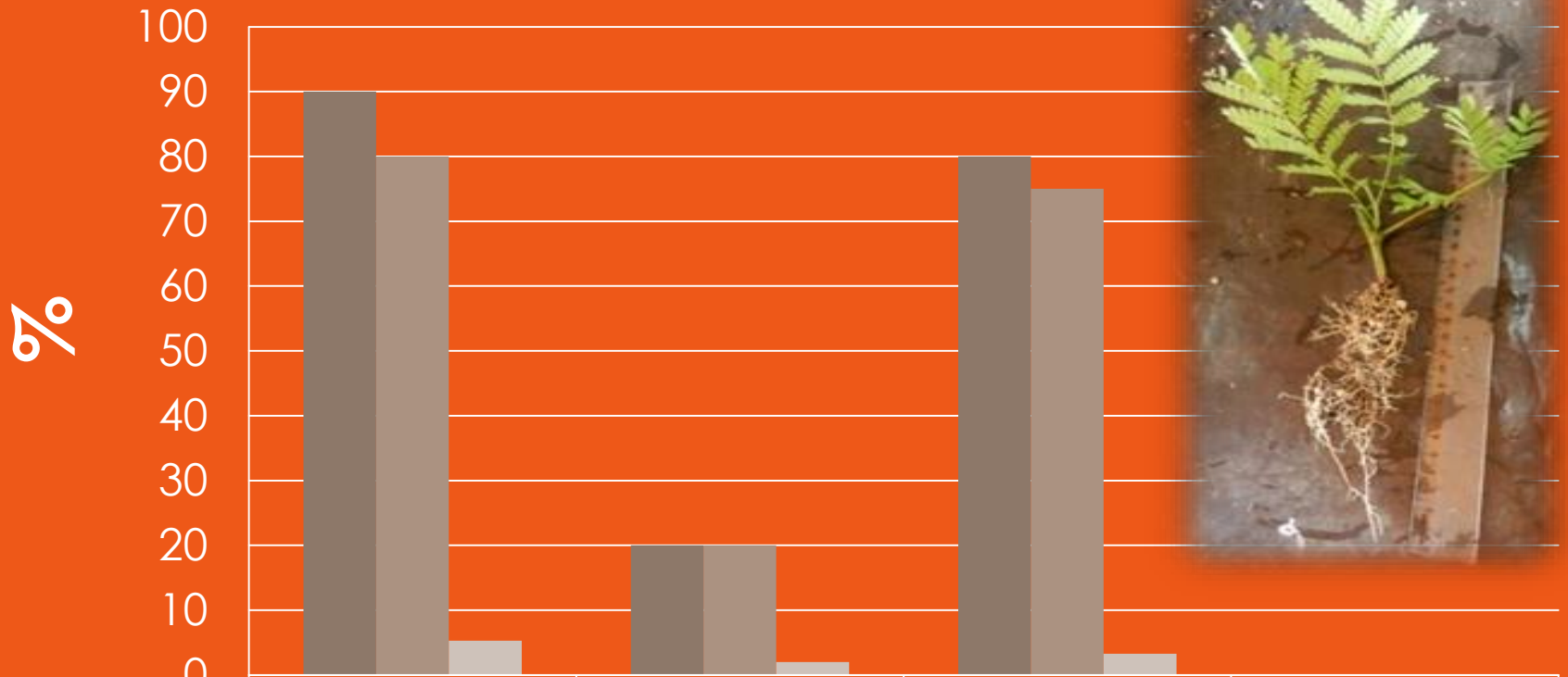
■ SOBREV (%)	75	25	25
■ ENRAIZ (%)	75	25	25
■ RP (No.)	7,6	2	0,8

Producción de estacas de minicepas de *Peltophorum dubium*

- ▶ Sobrevivencia promedio de 85%
- ▶ Promedio de $5,148 \pm 2,27$ estacas/minicepas, cada 60 días
- ▶ Producción promedio anual de 927 estacas/m²,
- ▶ Considerando 3 cosechas anuales (en octubre, diciembre y febrero).



Efecto de los tratamientos de inducción en miniestacas de *Peltophorum dubium* (Caña



■ SOBREV (%)	90	20	80	0
■ ENRAIZ (%)	80	20	75	0
■ RP (No.)	5,3	2	3,3	0

Producción de estacas de minicepas de *Myrocarpus frondosus*

- ▶ Sobrevivencia promedio de 90%
- ▶ Promedio de 5.0 ± 3.61 estacas/minicepas, cada 60 días
- ▶ Producción promedio anual de 900 estacas/m²,
- ▶ Considerando 3 cosechas anuales (en octubre, diciembre y febrero).



Efecto de los tratamientos de inducción en miniestacas de *Myrocarpus frondosus* (Incienso)



	CON HOJA S/IBA	CON HOJA C/IBA	SIN HOJA S/IBA	SIN HOJA C/IBA
■ SOBREV (%)	90	40	0	0
■ ENRAIZ (%)	90	40	0	0
■ RP (No.)	5,6	6,25	0	0

ENSAYO COMPARATIVO DE CRIA DE PLANTA MADRE EN MACETAS Y SEMIHIDROPONIA



CAÑA FISTOLA



CERELLA



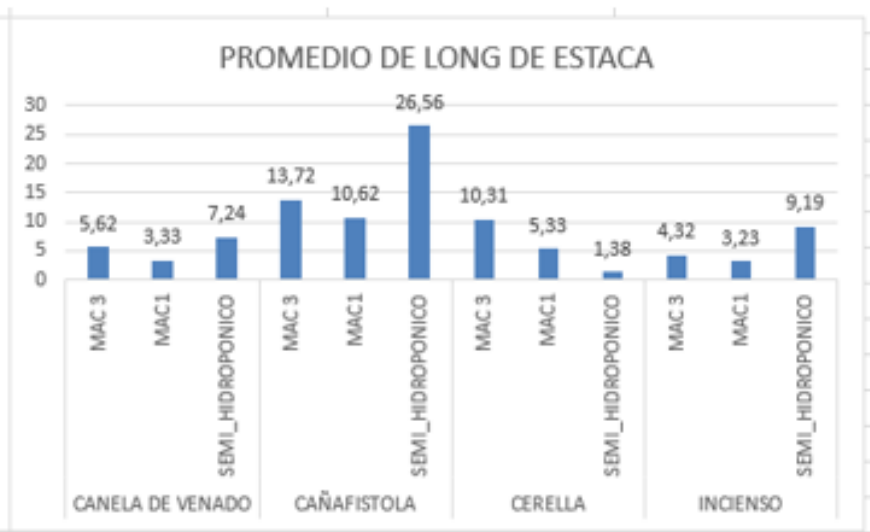
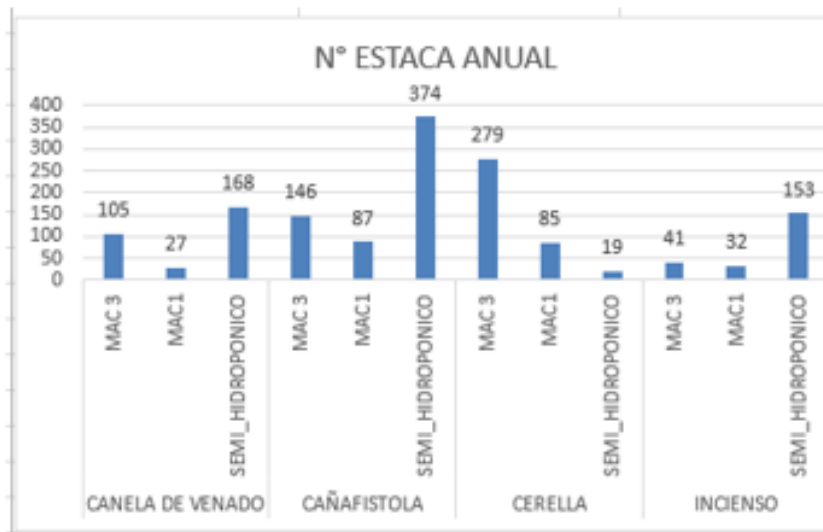
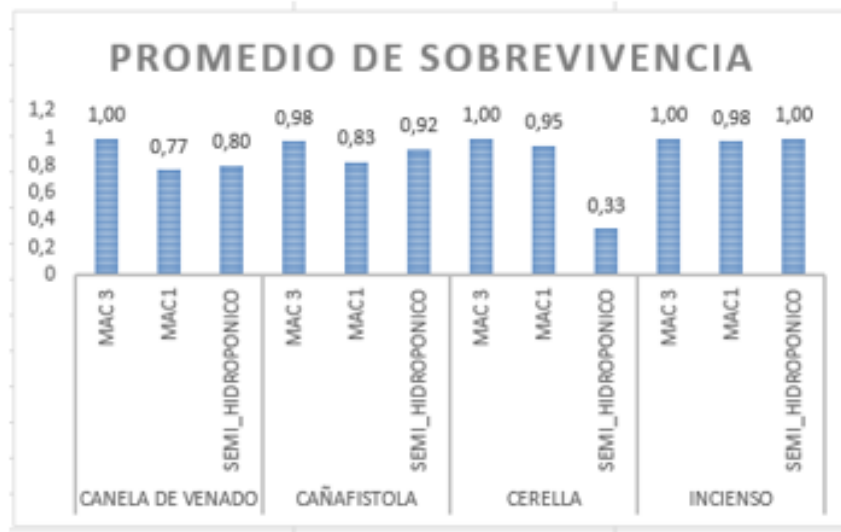
INCIENSO



CANELA DE VENADO

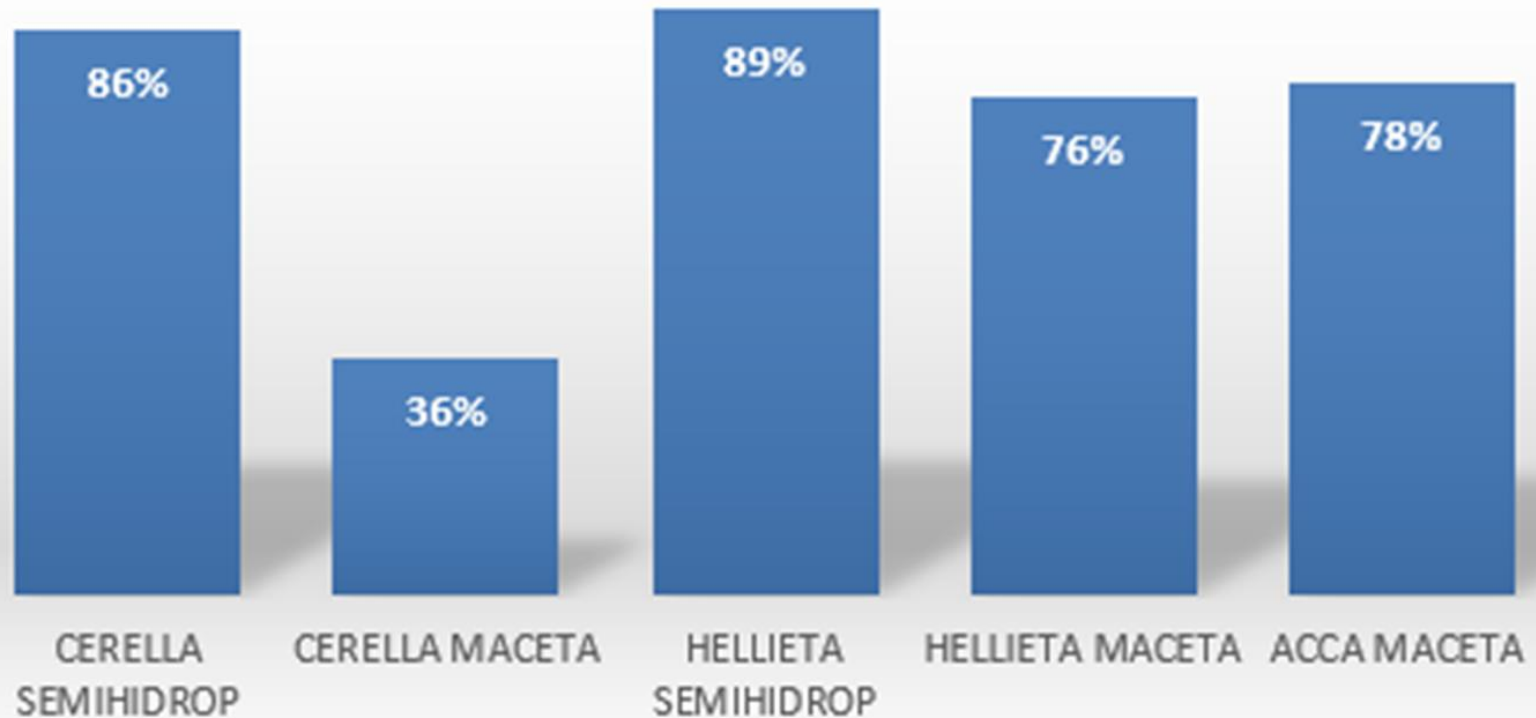


RESULTADOS DEL ENSAYO COMPARATIVO

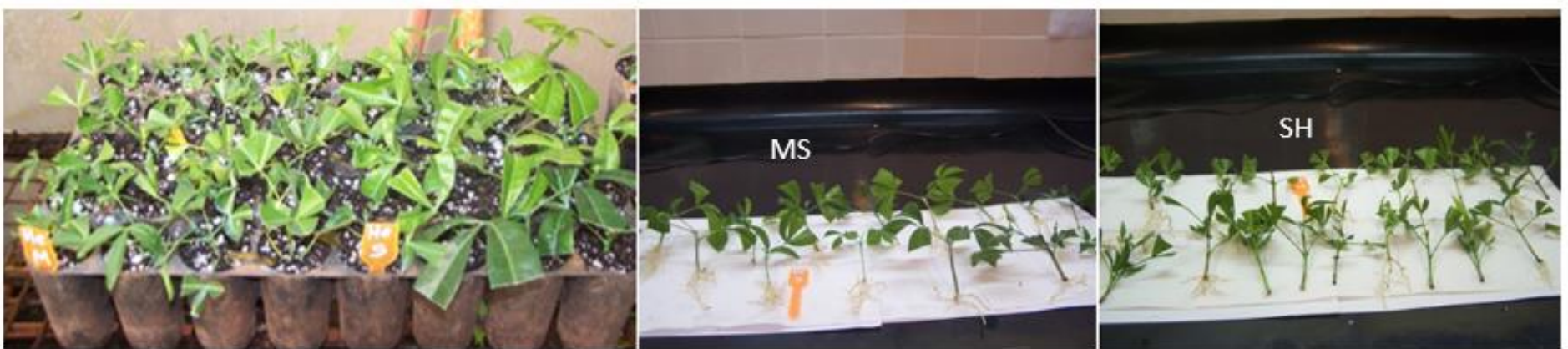


ENRAIZAMIENTO

ENRAIZAMIENTO



ENRAIZAMIENTO CANELA DE VENADO



ENRAIZAMIENTO DE MINESTACAS DE CANELA DE VENADO OBTENIDO DE PLANTINES CRIADOS EN MACETA A PLENO SOL (MS) Y EN SEMIHODROPONIA (SH)

ENRAIZAMIENTO CERELLA



ENRAIZAMIENTO DE MINIESTACAS DE CERELLA PROVENIENTE DE PLANTINES CRIADOS EN MACETA A PLENO SOL (SOL); MEDIA SOMBRA (MS) Y EN MACETAS A PLENO SOL CON APLICACIÓN DE FUNGICIDAS Y BACTERICIDAS (CUI)



TABLA 1: Datos de sobrevivencia, estacas/plantas, cosechas, plantas/m2, % de enraizamiento, estacas/m2, costo total y costo unitario, de las diferentes especies según tratamiento de manejo de minicepas.

Tratamiento	Especie	% <u>sobrev.</u>	N° estacas/ planta/ cosecha	N° cosechas	Plantas/ m2	% <u>enraiz.</u>	N° estacas/m2	C. total (S)	C. unit./ <u>plantin</u> logrado
<u>semi-hid</u>	Canela	100	5	17	48	89	3631,2	2079	0,57
	<u>Cerella</u>	33	1,75	17	48	86	405,3	2083	5,14
	<u>Caña fist.</u>	92	9,5	17	48	100	7131,8	2080	0,29
	Incienso	100	5	17	48	100	4080,0	2079	0,51
Mac. 1 litro	Canela	75	1,2	17	49	76	569,8	1151	2,02
	<u>Cerella</u>	100	3	17	49	36	899,6	1158	1,29
	<u>Caña fist.</u>	83	4,08	17	49	80	2256,7	1152	0,51
	Incienso	92	1,4	17	49	75	804,7	1152	1,43
Mac. 3 litros	Canela	100	3	17	36	76	1395,4	1135	0,81
	<u>Cerella</u>	100	10,33	17	36	36	2275,9	1140	0,50
	<u>Caña fist.</u>	100	5,83	17	36	80	2854,4	1136	0,40
	Incienso	100	1,75	17	36	75	803,3	1135	1,41

ENRAIZAMIENTO ACCA



78% DE ENRAIZAMIENTO

ENRAIZAMIENTO DE MINIESTACAS DE ACCA OBTENIDAS DE PLANTINES CRIADOS EN MACETA A PLENO SOL

Establecimiento ensayo minicuttings de *Rheedia braziliensis* (pacuri)



Aun cuando los porcentajes son bajos en las condiciones ensayadas, **la Miniestacas Uninodales** de *Rheedia brasiliensis* han demostrado capacidad de enraizamiento

CONCLUSIONES

► El presente estudio demostró:

- El potencial de la técnica de minicepas y miniestacas para la producción masiva de clones de *Cordia trichotoma* (Peteribi o loro negro); *Peltophorum dubium* (Caña fistola); *Myrocarpus frondosus* (Incienso); *Hellieta apiculata* (Canela de venado); *Eugenia involucrata* (Cerella); *Acca selowiana* (Acca).
- La posibilidad de su extensión a pequeños o medianos viveros.
- Requiriendo infraestructura de baja complejidad y de fácil implementación.
- Se debe continuar estudiando las condiciones de manejo de minicepas y de enraizamiento para *Enterolobium contortisiliquum* (Timbo) y *Reedhia braziliensis* (Pacuri).



SISTEMA DE PROPAGACIÓN IN VITRO

Etapas Tecnología In Vitro

Etapa 1:

Desinfección y Establecimiento In Vitro

Etapa 2:

Definición del Explanto Apropriado. Respuesta a Medios Nutritivos y Concentración y tipo de Hormonas y/o Suplementos en la Formación de Brotes, Organogénicos y/o Embriones Somáticos

Etapa 3:

Aclimatización y producción de plantas listas para llevar a campo o reconversión en plantas madre.



Etapa 1: Obtención de explantos libres de contaminación y vigorosos

DESARROLLO DE PROTOCOLOS DE DESINFECCION
PARA SEMILLAS Y BROTES PROVENIENTES DE CAMPO

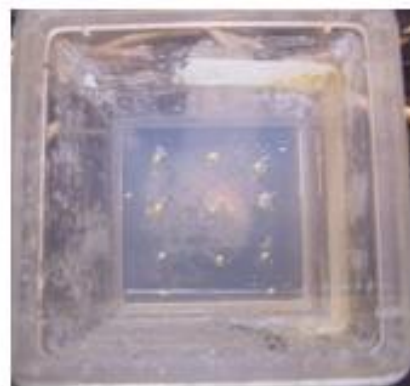
Protocolo de desinfección y germinación in vitro para:



✓ **Caña fistola** con un **90%** de semillas desinfectadas y germinadas.



✓ **Timbo**, con un **70%** de semillas desinfectadas , y **80%** de germinación

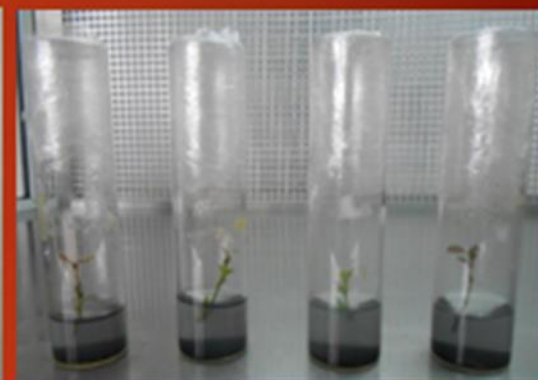


✓ **Acca** con un 100% de semillas desinfectadas y germinadas.



✓ **Reedhia**, con un 30% de semillas desinfectadas , y 100% de germinación

Protocolo de desinfección de brotes obtenidos de plantas madres criadas en macetas



Protocolo de desinfección de brotes obtenidos de plantas madres criadas en macetas, que contempla pre-tratamientos de la planta madre y la desinfección de los brotes. Obteniéndose en el caso de

✓ **Cerella** un 80% de explantos sobrevivientes, libres de contaminación

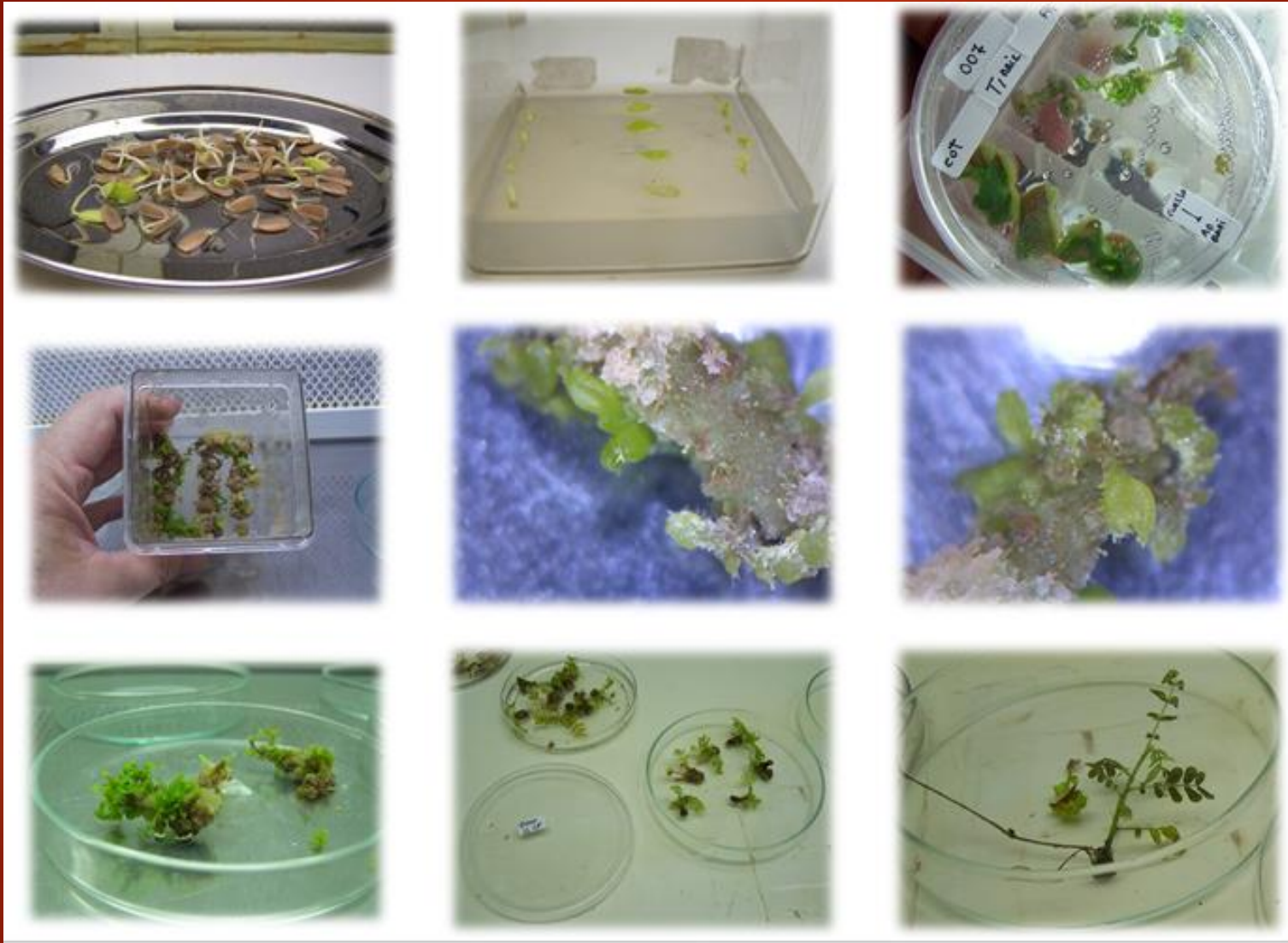
Etapa 2:

PROTOSCOLOS DE INDUCCIÓN DE TEJIDOS ORGANOGÉNICOS O EMBRIOGÉNICOS Y PROPAGACIÓN VÍA AXILAR

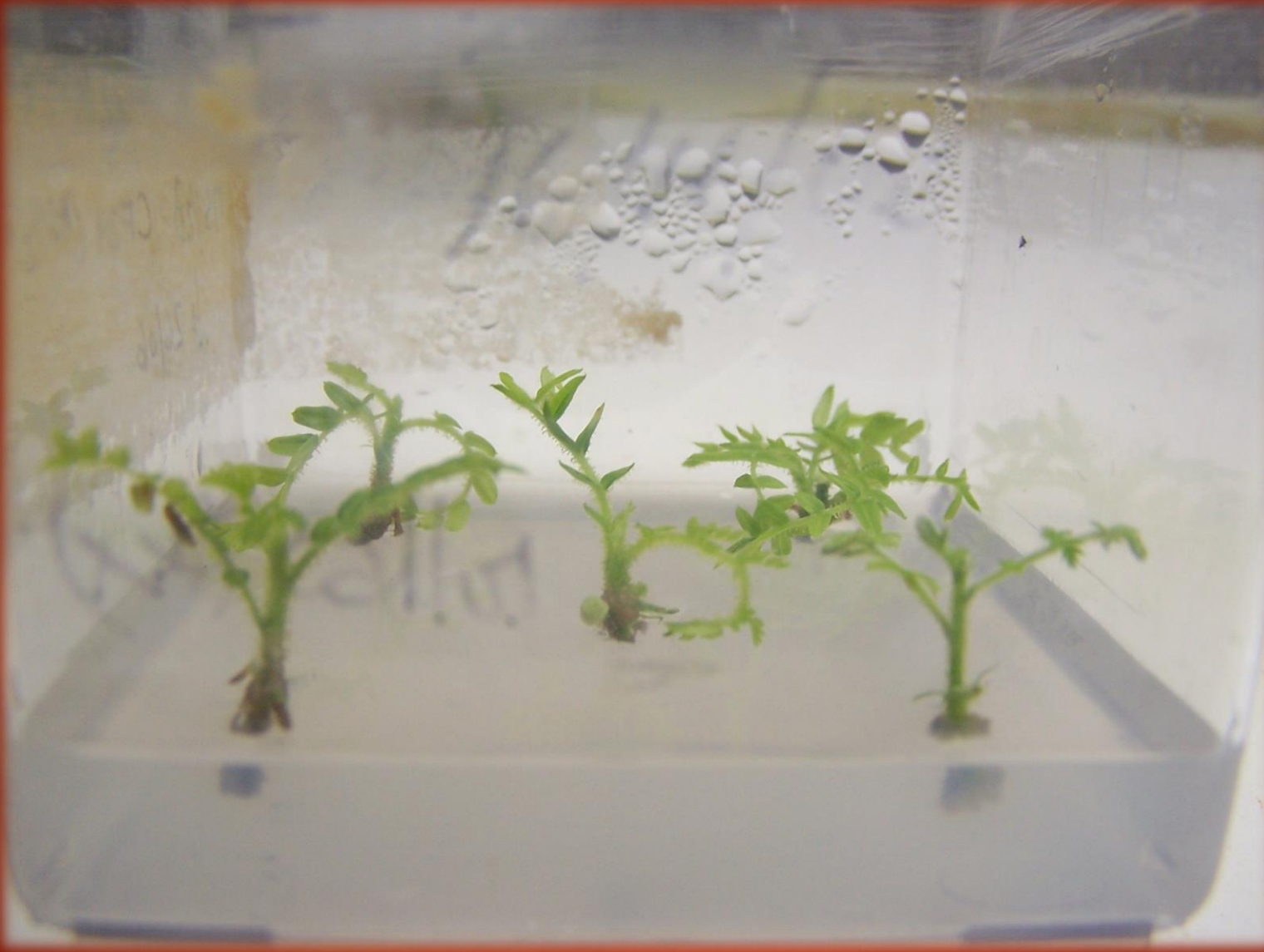
Etapa 3:

ACLIATIZACIÓN Y PRODUCCIÓN DE PLANTAS LISTAS PARA LLEVAR A CAMPO O RECONVERSIÓN EN PLANTAS MADRE.

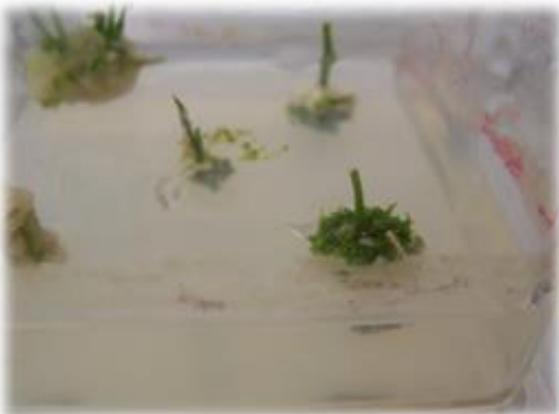
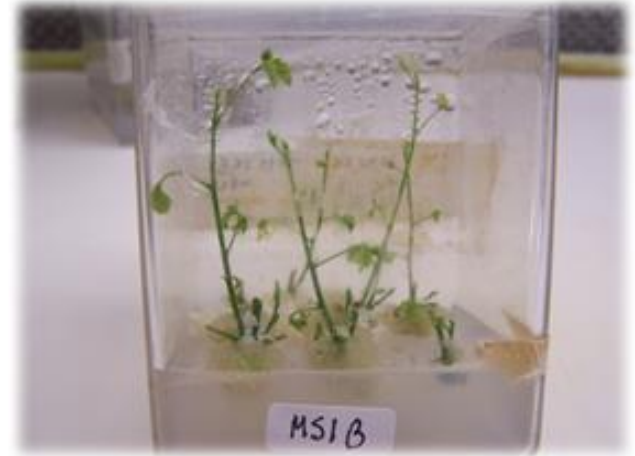
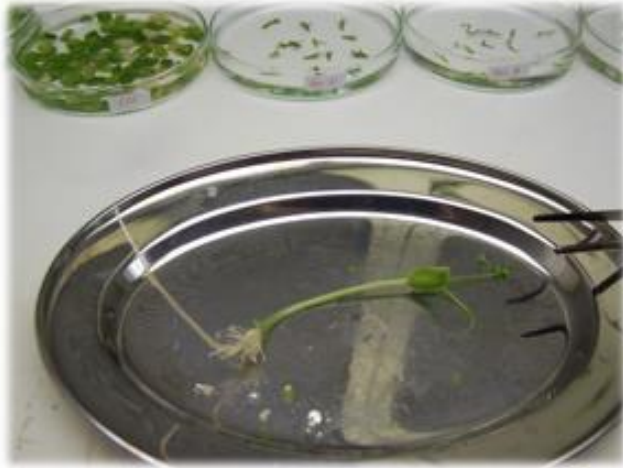
CAÑA FISTOLA



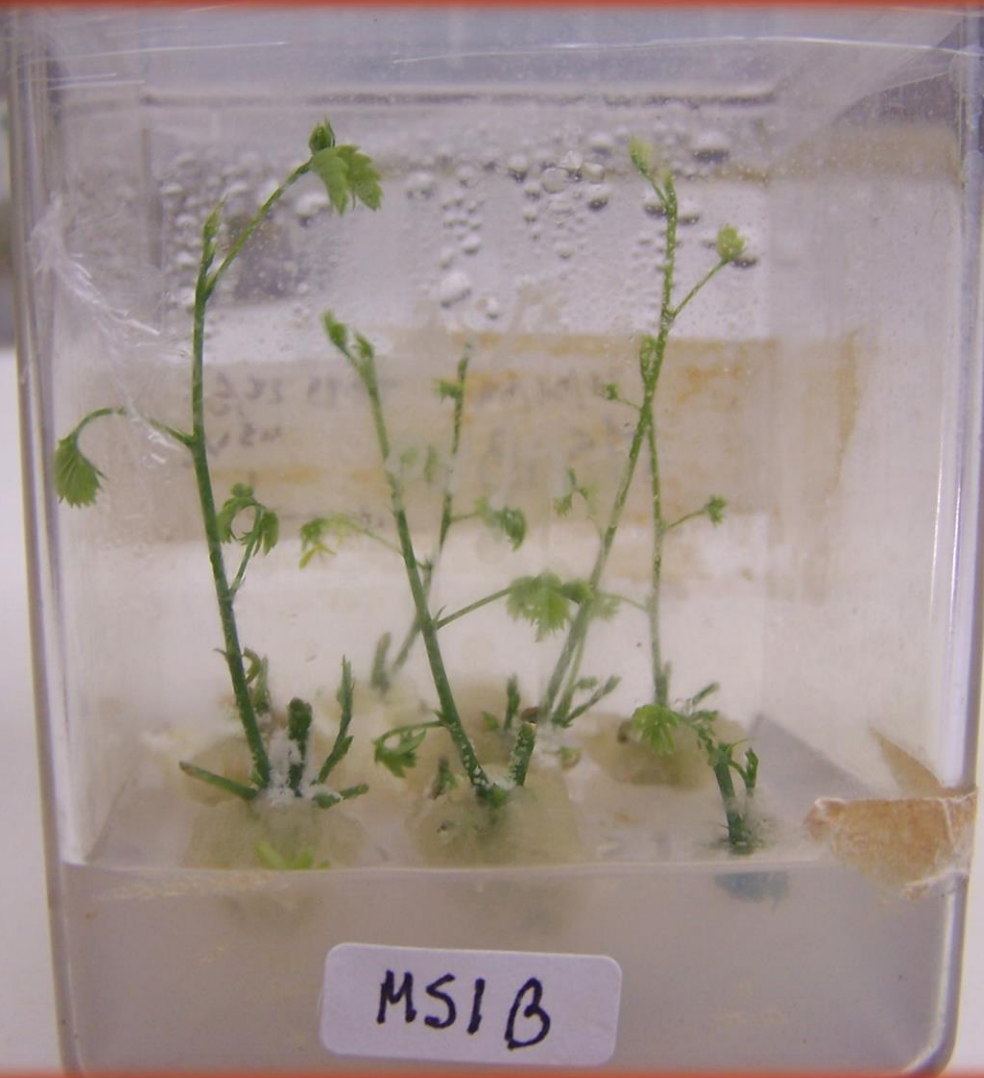
Método de Generación de Brotes Adventicios (Organogénesis Somática) y embriones somáticos a partir de Segmentos Nodales, Apicales y Cotiledonares: 100% de Brotes Inducidos



Brotes organogénicos de caña fistola provenientes de segmentos nodales y apicales en elongación. Tasa de multiplicación: 4-6 brotes/explanto



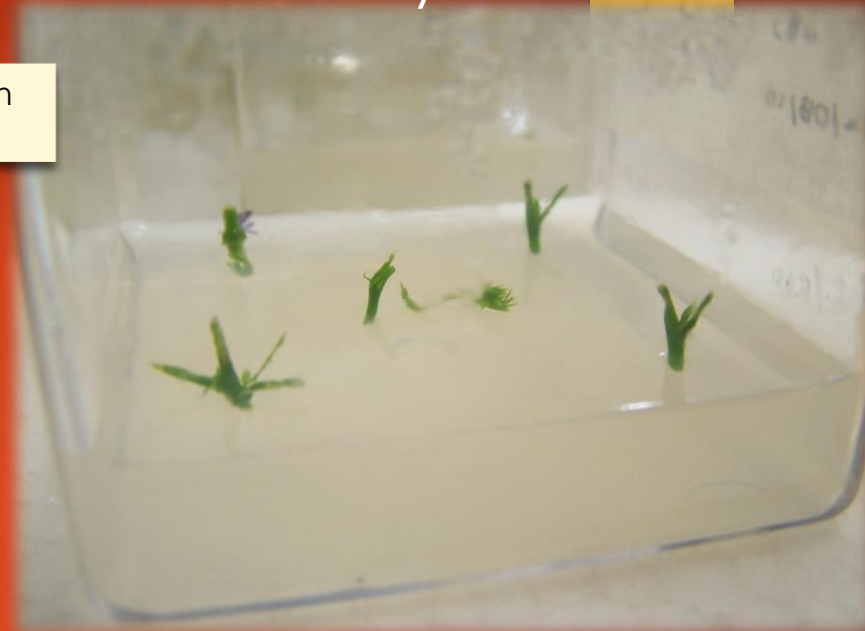
Método de Generación de Brotes Adventicios (Organogénesis Somática) a partir de Segmentos Nodales, Apicales y Cotiledonares: 100% de explantos Inducidos



Brotos organogénicos de timbo listos para donar nuevos segmentos nodales para **re-multiplicación**, formación de una planta madre ex vitro. Tasa de multiplicación: 4 brotes/explanto

Estrategia de propagación para caña fistola y timbo

Se **reinicia el ciclo** de multiplicación a partir de segmentos nodales



Brotos organogénicos de caña fistola in vitro listos para ser **re-multiplicados o convertidos a minicepas**

Se **convierte en planta donante** de brote para Multiplicación ex vitro (minicepas/minicuttings)



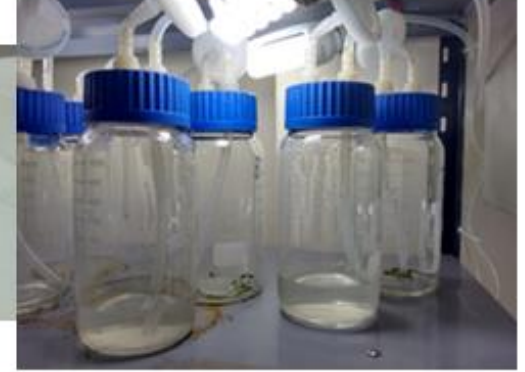
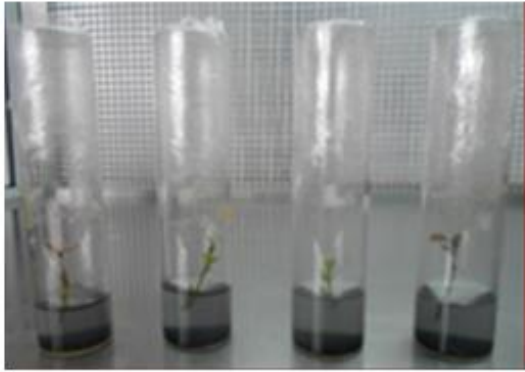
REEDHIA (PACURI)



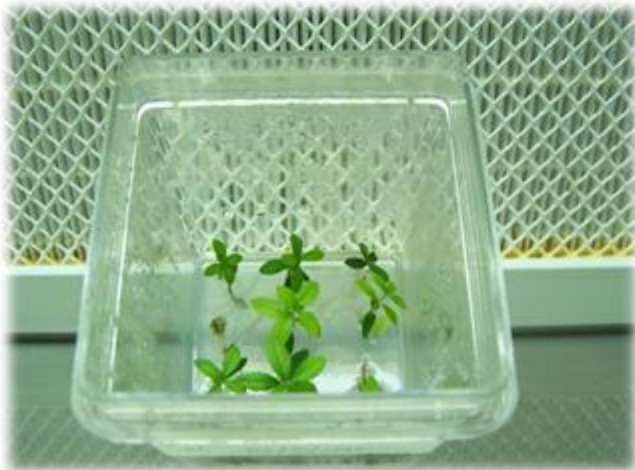
Alta capacidad de germinación In Vitro: 100%

Difícil desinfección y los porcentajes de establecimiento en asepsia no superan el 30%

Los explantos ensayados han demostrado recalcitrancia a la propagación in vitro en las condiciones ensayadas



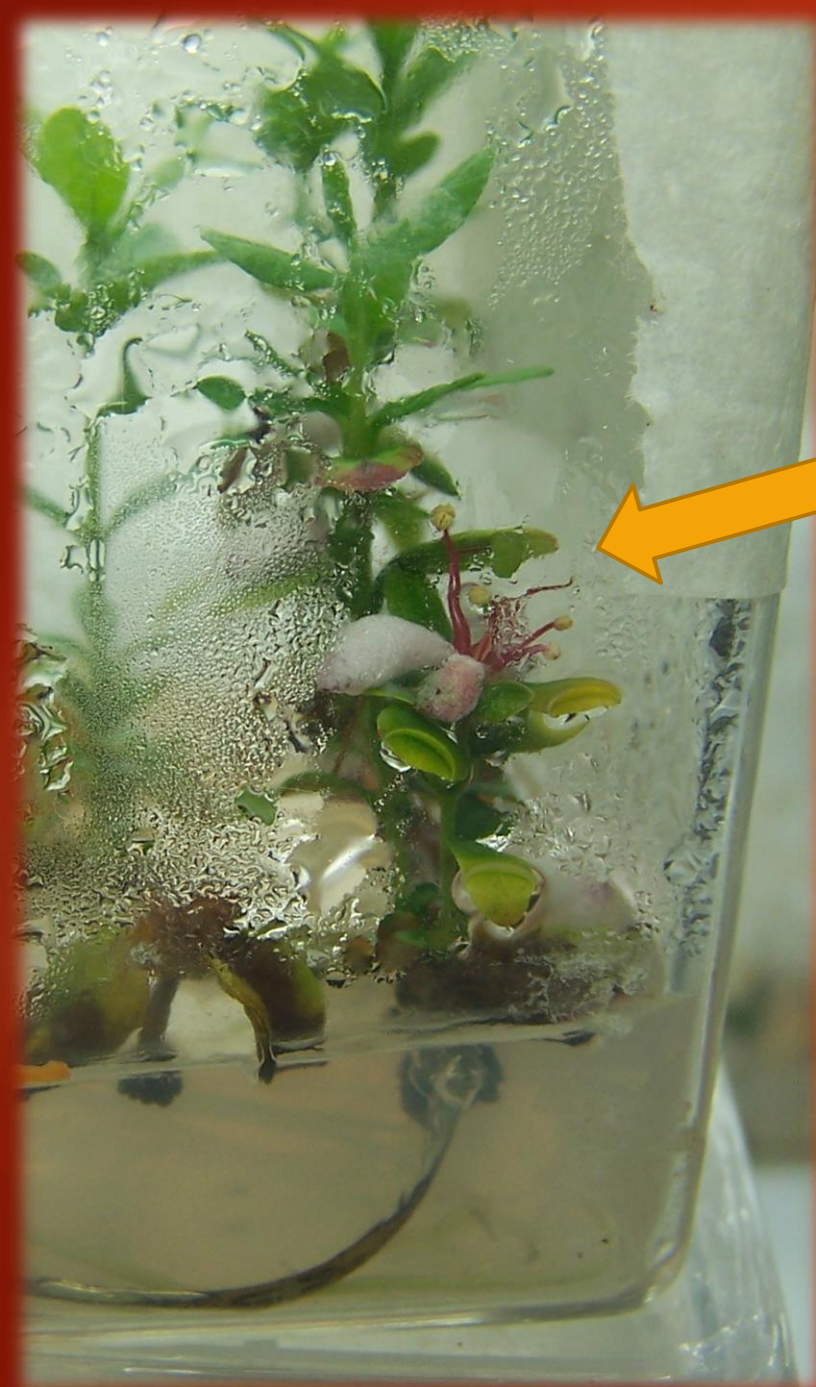
Sobrevivencia del 60% para segmentos apicales y nodales con producción de 2-3 brotes por explanto. Se obtuvo formación de raíces en un 30% de los brotes adventicios. Demuestra facilidad para la aclimatización. En la actualidad se optimiza condiciones de cultivo en medio sólido y en bioreactores.



Respuesta del 100% para segmentos apicales y nodales en la elongación del brote principal generando así un mínimo de 3-4 nuevos brotes (segmento uninodales) por explanto en un periodo de 45 a 60 días.



Aclimatización de un lote de plantines clonales producidos in vitro, con un 70% de sobrevivencia



Floración Temprana en segmentos nodales in vitro en elongacion (60 dias)

CONCLUSIONES

- ▶ El presente estudio demostró:
 - ▶ El potencial de la **propagación in vitro** para *Peltophorum dubium* (Caña fistola); *Enterolobium contortosiliquum* (Timbo); *Acca selowiana* (Acca) y *Eugenia involucrata* (Cerella)
 - ▶ La posibilidad de su extensión a laboratorios comerciales, como es el caso de BioMiSA
 - ▶ Se debe continuar optimizando las condiciones cultivo in vitro para *Eugenia involucrata* (Cerella) y *Peltophorum dubium* (Caña fistola), en ensayos comparativos de cultivo en medio líquido en bioreactores y medio sólido.

AGRADECIMIENTOS

- ▶ Proyecto Manejo Sustentable de Recursos Naturales. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA) – (BIRF 7520 AR)/Proyecto PIA 10031 Y PIA10069.
- ▶ Secretaría General de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Misiones (Convocatoria Especial 2011-Desarrollo Sostenible y Educación).
- ▶ Unidad Ejecutora: Autoridades, Colegas y Estudiantes FCF UNaM