

# PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL SAUCE LLORÓN (*Salix Babilonica* Lin.) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES

## IN VITRO PROPAGATION OF WEEPING WILLOW (*Salix Babilónica* Lin.) FROM NODAL SEGMENTS

Mario René López Vera <sup>(1)</sup>, Francisco Rodolfo Solórzano Murillo <sup>(1)</sup>, Darwin Pomagualli <sup>(2)</sup>,  
Tania María López Vera <sup>(1)</sup>, Guilber Enrique Vergara Vélez <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratorio de Microbiología área Agroindustrial, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí  
Manuel Félix López, Calle 10 de agosto N°82 y Granda Centeno, Calceta, Manabí, Ecuador. Email: mrene782@gmail.com

<sup>(2)</sup>Departamento de investigación, Universidad Estatal de Bolívar, Campus Laguacoto vía San Simón. CP 092.  
Guaranda, Bolívar, Ecuador. Email: dpomagualli@ueb.edu.ec

**Resumen:** El objetivo de este estudio fue obtener un protocolo de propagación *in vitro* del sauce llorón (*S. babilónica*) a partir de segmentos nodales. El diseño experimental empleado para las tres fases fue el completamente aleatorizado, se realizó la prueba de Tukey para la comparación de las medias bajo los niveles de probabilidad de  $P \leq 0,05$ . Los tratamientos en la primera fase fueron: tres dosis de hipoclorito de sodio (1, 2 y 3%) y una combinación con tres tiempos de desinfección (5, 10 y 15 minutos), sometidos a evaluación *in vitro* a los 21 días bajo condiciones controladas de laboratorio. Se evaluaron las variables: Número de explantes contaminados por hongos y bacterias. El 90% de los cultivos se presentaron libres de gérmenes en el tratamiento combinado con hipoclorito de sodio al 2% y 15 minutos. Los tratamientos de la fase de multiplicación *in vitro* fueron: la combinación tres dosis de Bencilaminopurina (BAP), ácido naptalenoacético (ANA), y acidogiberelico (AG3). Se evaluaron las variables: número y longitud (mm) de brotes por explante. Obteniéndose el mayor número y longitud de brotes por explante en el tratamiento de  $0,045 \text{ mg/L}^{-1}$  de BAP +  $0,020 \text{ mg/L}^{-1}$  de ANA +  $0,050 \text{ mg/L}^{-1}$  de AG3, con 5,6 y 12,4 mm. Los tratamientos de la fase de enraizamiento *in vitro* fueron: tres tipos de auxinas, de las cuales se seleccionó al ácido naptalenoacético (ANA), Acidoindolbutirico (AIB) y Acidoindolacetico (AIA), en concentraciones estándar ( $1 \text{ mg/L}^{-1}$ ). Se evaluaron las variables: número y longitud de raíces. Llegando a obtener un rendimiento considerable de la eficacia con la fitohormona Acido indolacético (AIA) con un crecimiento promedio de cuatro raíces y una longitud promedio de seis mm por vitroplanta.

**Palabras claves:** *Salix babilónica*, establecimiento *in vitro*, multiplicación *in vitro*, reguladores de crecimiento, supervivencia.

**Abstract:** The aim in this study was to determinate a protocol for *in vitro* propagation of the weeping willow tree (*S. babilónica* Lin), from nodal segments. The experimental design was completely randomized with three replicates and it was realized a Tukey test for the comparison in mediums using the range of  $P \leq 0,05$ . In the establishment of explants under *in vitro* conditions were evaluated three doses of sodium hypochlorite (1, 2 and 3%) and three times with a combination of disinfection of explants (5, 10 and 15 minutes), evaluated at 21 days under lab conditions, the variable to evaluate was number of explants diseased, by bacteria and fungus, getting up to (90 %) of free cultures effects of contaminants in the combination of 2% and 15 minutes as the most effective treatment. The next phase consist in replication *in vitro* and we evaluated three doses of Bencilaminopurina (BAP), naptalenoacetic acid NAA and giberilic acid (GA3) and the number and growth

sprouts per explant, getting the longest sprouts (12,4mm) and numbers of nodal segments (5,6) in the concentration of 0,045 (1 mg/L<sup>-1</sup>) BAP + 0,020 (1 mg/L<sup>-1</sup>) NAA + 0,050 (1 mg/L<sup>-1</sup>) GA3. We also evaluated the efficiency of different auxins (NAA), Indolacetic acid (IAA) and Indolbutiric acid (IBA) at standard concentrations (1 mg/L<sup>-1</sup>) in the *in vitro* rooting phase. Coming to obtain significant performance efficiency with phytohormone indole acetic acid (AIA) with an average growth of (4) roots and average length (1 mg /L<sup>-1</sup>) by vitroplant.

**Keywords:** *Salix babilónica*, *in vitro* establishment, *in vitro* propagation, growth regulators, Survival.

Recibido: 20 - 05 - 2016

Aceptado: 15 - 09 - 2016

Publicado como artículo científico en Revista de Investigación Talentos III (2) 22-29

## I. INTRODUCCIÓN

El género *Salix*, sauces, junto con los pópulos o álamos pertenecen a la familia de las salicáceas. La distribución de los sauces es muy amplia, el género se originó en las zonas tropicales del este de Asia, ampliándose más tarde su distribución hacia el norte hasta llegar a las regiones frías de Europa y Norteamérica. Por eso es posible encontrar especies de sauces que se adaptan a cualquier tipo de habitat. Aunque el género está asociado a suelos húmedos de climas fríos y templados, existen varias especies de sauces que se han adaptado a sitios secos, incluyendo zonas alpinas y de altas latitudes árticas (Adema et al., 2008).

Smart et al., (2005), Los sauces juegan un papel importante en el desarrollo de paisajes y en el mantenimiento del balance ecológico de los ecosistemas. Existen diversos proyectos de mejoramiento de sauces ya que pueden ser utilizados como material para obtener bioenergía, principios activos, biorremediación y estabilización de sitios. Su tasa de transpiración es relativamente alta y su resistencia a inundaciones estacionales, con sus raíces que se extienden a varios metros por el terreno, son ventajas particularmente en tierras húmedas, donde el control de la escorrentía freática es esencial para reducir la contaminación.

La mayoría de los sauces pueden ser propagados fácilmente, existen algunas especies o clones con dificultades para enraizar. Para superar este inconveniente, el uso de nuevas técnicas de propagación permite la multiplicación de individuos o clones selectos. Una vez localizados los ejemplares seleccionados por sus características deseables, es posible reproducirlos en todo sus rasgos, obteniendo clones a partir de dos técnicas básicas: la producción de estacas o micropropagación y el cultivo de tejidos *in vitro* o micropropagación.

El cultivo de tejidos es una herramienta que sirve para propagar diferentes especies vegetales incluido al sauce, y además esta técnica basa su accionar en el uso de un medio de cultivo específico suplementado con componentes tales como: sales minerales, vitaminas y reguladores de crecimiento apropiados para hacer que una célula totipotente pueda diferenciarse para obtener una planta completa libre de gérmenes (Chung y Carrasco, 2008). Los estudios de la multiplicación encontrado sobre el sauce llorón *S. babilónica* están dirigidos casi exclusivamente a la multiplicación de forma asexual por método de esqueje, algo que limita su aplicación al proceso de multiplicación masiva y de conservación (Rivera y Galliusi, 2006). En este trabajo se presenta la obtención de los protocolos de establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* del sauce llorón *S. babilónica* a partir de segmentos nodales.

## II. MATERIALES Y METODOS

### A. Ubicación geográfica donde se efectuó la investigación

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Carrera de Agrícola de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López (ESPAM MFL), ubicada en la cabecera cantonal del cantón Bolívar, de la provincia de Manabí, Ecuador. Situada geográficamente entre las coordenadas 00° 50' 39" Latitud Sur, 80° 09' 33" Longitud Oeste y una Altitud de 15,5940 msnm. Las características climáticas de la zona son: Temperatura media anual de 25,6 °C, Precipitación medio anual de 838,7 mm, Humedad relativa media de 78%, T. heliofanía de 1.158 horas sola °C al año y Evaporación de 1.365,2 cm (Vera, 2006).

### B. Material vegetal

La recolección de *S. babilónica*, se realizó de plantas adultas de 20 años de edad. El explante obtenido fue a partir de varetas de 15 cm de longitud y 8 mm de diámetro, fueron colectados y transportados en caja térmica de aclimatación, se rotularon con cintas adhesiva, registrada con un código que se incluyó en los detalles de la siembra. Las varetas fueron sumergidas diez minutos en una solución antiséptica de benomyl en dosis de 2,5 g/L, al que se le añadió tres gotas de tween 20 por cada 100 mL solución y a continuación se le realizó enjuagues con agua destilada por dos veces. En vivero se sumergió las varetas en una solución de (AIA) durante 10 minutos, y finalmente se procedió a sembrarlas en un sustrato compuesto por tierra, arena y materia orgánica, se dejó enterrado una yema de la vareta y dos expuestas al ambiente con riego abundante en la mañana y en la tarde durante 30 días, su manejo preventivo de enfermedades, se lo realizó con el mismo fungicida cada 72 horas y con la misma dosis.

### C. Establecimiento aséptico del cultivo

Los explantes de *S. babilónica*, fueron sumergidos en los siguientes tratamientos: tres concentraciones de hipoclorito de sodio al 5, 10 y 15 % de cloro activo

al que se le añadió tres gotas de Tween 20 por cada 100 mL de solución combinadas con tres tiempos de exposición de 5, 10 y 15 minutos. En la cabina de flujo laminar se volvió a enjuagar con suficiente agua destilada estéril por dos veces. Antes de obtener el explante todos los materiales disección fueron pasados por alcohol al 97% y rápidamente fueron flameados. Inmediatamente los explantes se transfirieron a los medios de establecimiento *in vitro* de *S. babilónica*, el medio estuvo conformado por las sales y vitaminas M&S (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con el 3% (p/v) de sacarosa, gelificado con 0,6% (p/v) de Phytigel. Se determinaron las siguientes variables: número explantes contaminados por hongos y bacterias.

### D. Multiplicación *in vitro*

Luego del periodo de adaptación en condiciones controladas por 21 días, los explantes sanos fueron transferidos a los siguientes tratamientos: BAP 0,022 mg/L<sup>-1</sup> + ANA 0,010 mg/L<sup>-1</sup> + AG3 0,025 mg/L<sup>-1</sup>, BAP 0,045 mg/L<sup>-1</sup> + ANA 0,020 mg/L<sup>-1</sup> + AG3 0,050 mg/L<sup>-1</sup> y BAP 0,068 mg/L<sup>-1</sup> + ANA 0,030 mg/L<sup>-1</sup> + AG3 0,075 mg/L<sup>-1</sup>, el medio de cultivo M&S estuvo conformado por el 100% de la concentración de sus sales y vitaminas, suplementado con 3% (p/v) de sacarosa, gelificado con 0,6% (p/v) de Phytigel. Se midieron las siguientes variables: número de brotes por explante y longitud de los brotes (mm).

### E. Enraizamiento *in vitro*

Los brotes fueron transferidos a los siguientes tratamientos: 1,0 mg/L<sup>-1</sup> de ANA, AIB y AIA, el medio de cultivo M&S se redujo su concentración al 50% de las sales y vitaminas, suplementado con 3% (p/v) de sacarosa, gelificado con 0,6% (p/v) de Phytigel, los medios en las tres fases fueron distribuidos en frasco de vidrio pequeño (6,5 cm de altura x 5,5 cm de diámetro) con 20 mL. Los cultivos en las tres fases, se incubaron a temperatura de 25±2 °C, la cual estuvo conformada con luz artificial de lámparas fluorescentes reguladas automáticamente en 16/8 horas de foto periodo y escotoperiodo, con una intensidad luminosa de aproximadamente 252-500 lux (3,15-6,25 μmol.m<sup>2</sup> .s). Se utilizó un diseño

experimental al azar (DCA) unifactorial con 9 réplicas por cada tratamiento; cada unidad experimental fue de 3 frascos, se determinaron las siguientes variables: número y longitud de raíces (cm). Los datos de las variables en las tres fases, se analizaron mediante un análisis de varianza y separación de medias a través de la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), para las medias con valores cero se transformaron según  $x1 = \sqrt{(x+0,5)}$ , se usó del paquete estadístico InfoStat versión 2008 Di Rienzo, *et al.* (2008), y la graficación de los resultados el Microsoft Excel (López, 2005).

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### A. Establecimiento *in vitro*

En la Tabla I, se observa el número de explantes contaminados por hongos a los 21 días ver Fig. 1, después de inoculado el explantes en M&S, alcanzando su mayor número de explantes contaminados por hongos el T1, T5 y T9 con 1,09; 0,87 y 1,04; igualmente, se puede apreciar, que los tratamientos en los cuales se obtuvo éxito en el control de la contaminación por hongos fueron el T3, T4 y T6 con 0,70 explantes contaminados, que equivale a cero contaminación.

TABLA I.  
EFECTO DE HIPOCLORITO DE SODIO EN LA DESINFECCIÓN DE SEGMENTOS NODALES DE (*S. babilónica* L.)

Tratamiento	Número de explantes contaminados por hongos	Número de explantes contaminados por bacterias
T1: 1% NaClO *5 min	1,09 a	1,16 bc
T2: 1% NaClO *10 min	0,87 a	0,87 bc
T3: 1% NaClO *15 min	0,70 a	0,87 bc
T4: 2% NaClO *5 min	0,70 a	1,34 ab
T5: 2% NaClO *10 min	0,87 a	1,04 bc
T6: 2% NaClO *15 min	0,70 a	0,70 c
T7: 3% NaClO *5 min	0,87 a	0,99 bc
T8: 3% NaClO *10 min	0,87 a	0,87 bc
T9: 3% NaClO *15 min	1,04 a	0,99 bc
T10: Testigo	1,87 b	1,87 a
CV%	31,37	31,13

CV%= Coeficientes de variación, Promedio con distintas letras difieren estadísticamente, según Tukey ( $P \geq 0,05$ ).

En la Tabla 1, se observa el número de explantes contaminados por bacterias a los 21 días Fig. 1, después de inoculado el explantes al medio de cultivo M&S, alcanzando su mayor número de explantes contaminados por bacterias el T1 y T5 con 1,16 y 1,04; igualmente, se puede apreciar, que los tratamientos en los cuales se obtuvo éxito en el control de la contaminación por hongos fueron el T6, T7 y T8 con 0,70; 0,99 y 0,87 explantes contaminados por bacterias que equivale a cero contaminación.

El T6 resultó ser el mejor con cero número de explantes contaminados en ambas variables analizadas ver Fig. 1. Estos resultados permiten establecer que el hipoclorito de sodio es funcional en la desinfección de los segmentos nodales de *S. babilónica*, lo que permitió el establecimiento *in vitro* de la especie, que concuerdan totalmente en cuanto a la concentración de hipoclorito de sodio a los obtenidos por Garay et al., (2005), quienes en su investigación de micropropagación *in vitro* de clones de sauce, indican que el T6 resultó eficiente en la desinfección de los segmen-

tos nodales de sauce, sin embargo, el tiempo de desinfección utilizado por estos autores fue superior comparado con el tiempo empleado en esta investi-

gación; estableciendo una diferencia de 15 minutos más de exposición.

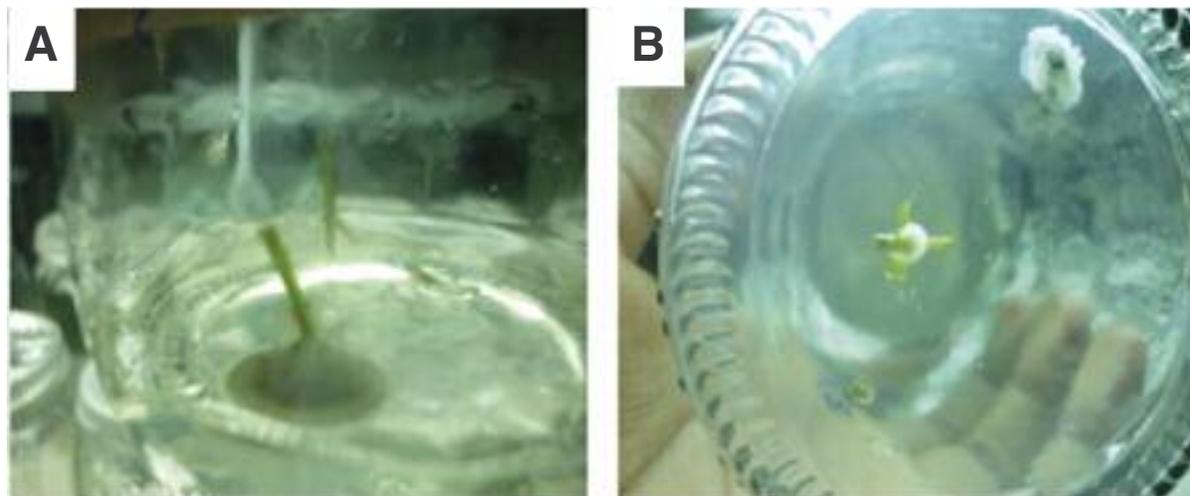


Fig. 1. Explantes de *S. babylonica*: a los 21 días de haber iniciado el cultivo (A) tratamiento infectado por Hongos y, (B) tratamiento infectado por bacterias, visto desde abajo.

### B. Multiplicación *in vitro*

En la Tabla II, se observa el número de brotes por explante de *S. babylonica* a los 30 días, después de transferido el explantes al medio de cultivo M&S suplementado con los reguladores de crecimientos, alcanzando su mayor número y longitud de brotes explantes en el T2 con 5,6.

TABLA II.  
NÚMERO Y LONGITUD DE BROTES OBTENIDOS EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE (*S. babylonica* L.)

TRATAMIENTO	Numero de brotes por explante. NS	Longitud de Brotes (mm) NS
T1	4,9	12,3
T2	5,6	12,4
T3	5,2	12,2
CV%	16,53	15,21

CV%= Coeficientes de variación, Promedios con letras iguales en una misma fila no difieren estadísticamente, según Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Estos resultados nos permiten establecer que las concentraciones bajas de las fitohormonas utilizadas: BAP, ANA y AG<sub>3</sub> son eficientes en la fase de multiplicación *in vitro* de esta especie ya que promovieron mayor número de brote y longitud por explante ver Fig. 2, resultados se asemejan con los obtenidos por Betancourt (2002), en su investigación de propaga-

ción *in vitro* de Lulo la Selva (*Solanum quitoense* L.) Detallando que el mejor medio de cultivo para la regeneración meristemática es suplementado con BAP 0.040 mg/L<sup>-1</sup>, ANA 0,022 mg/L<sup>-1</sup>, AG<sub>3</sub> 0,050 mg/L<sup>-1</sup> conocido como medio Yuca y desarrollado por (Roca *et al.*, 1991).

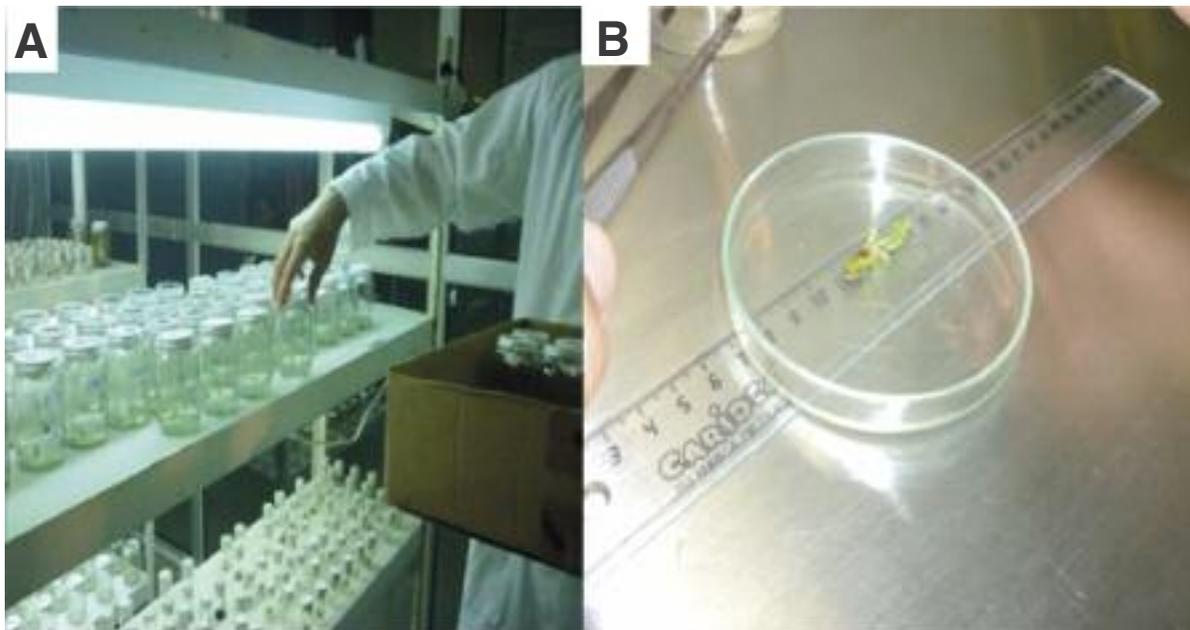


Fig. 2. Explantes de *S. babilónica* en la fase de multiplicación: (A) Explantes en incubación controlada y, (B) Longitud de brote.

### C. Enraizamiento *in vitro*

En la Tabla III, se observa el número y longitud de raíces por vitroplanta de *S. babilónica* a los 30 días ver Fig. 3, después de transferido el explantes al

medio de cultivo M&S al 50% de su concentración de sus sales y suplementado con los reguladores de crecimientos, alcanzando su mayor número y longitud de raíces por vitroplanta en el T3 con 2,19 y 2,41.

TABLA III.  
NÚMERO Y LONGITUD DE RAÍZ OBTENIDOS EN LA FASE DE ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE (*S. babilónica* L.)

TRATAMIENTO	NUMERO DE RAÍZ	LONGITUD DE RAÍZ *
T1	1,95 b	2,24 ab
T2	1,85 b	1,85 b
T3	2,19 a	2,41 a
CV%	21,52	37,16

CV%= Coeficientes de variación, Promedio con distintas letras difieren estadísticamente, según Tukey ( $P \geq 0,05$ ).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el T3 con  $1 \text{ mg/L}^{-1}$  de AIA, resultó ser el mejor, estos resultados nos permiten establecer, que la concentración de la fitohormona AIA, es eficiente en la fase de enraizamiento *in vitro* de esta especie, ya que promovieron mayor número y longitud de raíces. Estos resultados concuerdan a los obtenidos por Álvarez et al. (2011),

quien sostiene en su investigación, que los reguladores de crecimiento vegetal en la organogénesis de *Gmelina arbórea*, usando  $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$  de AIA, existe una relación directa entre la concentración de auxina y el desarrollo de la raíz; destacando que a mayor dosis, la longitud y el número de raíces se incrementan.



Fig. 3. Explantes de *S. babilónica* en la fase de Enraizamiento: (A) Número de raíces por vitroplanta y, (B) Longitud de raíces por vitroplanta.

## V. CONCLUSIONES

En la fase establecimiento *in vitro*, el 90% de los cultivos se presentaron libres de gérmenes en el tratamiento combinado con hipoclorito de sodio al 2% y 15 minutos. En la fase de multiplicación *in vitro*, se obtuvo el mayor número y longitud de brotes por explante en el tratamiento de  $0,045 \text{ mg/L}^{-1}$  de BAP +  $0,020 \text{ mg/L}^{-1}$  de ANA +  $0,050 \text{ mg/L}^{-1}$  de AG<sub>3</sub>, con 5,6 y 12,4 mm. En la fase de enraizamiento *in vitro* se alcanzó un rendimiento considerable de la eficacia con la fitohormona ácido indolacético (AIA) con un crecimiento promedio de cuatro raíces y una longitud promedio de seis mm por vitroplanta.

## V. BIBLIOGRAFÍA

- Adema, M., S. Sharry, G. Ciocchini, y W. Abedini, (2008): Propagación por Enraizamiento de estacas y Multiplicación *in vitro* de *Salix Spp*. Revista internacional de Sivilcultura e Industria Forestales. 57: 2 pp.
- Álvarez, J., P. Beltrán, M. Diana, y L. Meza, (2011): Evaluación de reguladores de crecimiento vegetal en la organogénesis de gemelina arbórea roxb. Revista tumbaga 6:107-124.
- Betancourt, V., (2002): Informe de actividad laboratorio de cultivo de tejidos ICA - Manizales, Proyecto producción *in vitro* de papa de las variedades regionales: Argentina y Salentuna. Texto de trabajo.
- Chung, P. y B. Carrasco, (2008): Micropropagación de *Salix spp.* a través de meristemas foliares. Instituto forestal de Chile. 6: 12 pp.
- Di Rienzo, J., F. Casanoves, M. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, y C. Robledo, (2008): InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Garay, M, Nosedá, E., Cortizo, S., Mujica, G., Franzoni, P. y Rios, R. (2005): Cultivo *in vitro* de Salicáceas. III Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano. Corrientes. Argentina.
- López, M., (2005): Obtención de protocolos para el establecimiento aséptico y multiplicación *in vitro* de meristemas apicales en plátano variedad dominico hartón (*Musa sp.* SIMMONDS). Tesis Ing. Agri. Ecuador. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí/Calceta. 68 p.
- Rivera, S. y E. Galliusi, (2006): El vivero Forestal. Boletín de divulgación técnica N°3. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP.
- Roca, W. y L. Mroginski, (1993): Cultivo de tejido en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. 20 -36 p
- Smart, L., T. Volk, J. Lin, R. Kopp, I. Phillips, K. Cameron, E. White, y L. Abrahamson, (2005): Mejora genética de los cultivos de sauce (*Salix spp*) con fines bioenergético y medioambientales en los Estados

Unidos. Revista Internacional de Silvicultura Industrias Forestales 56: 1 p.

Vera, A., (2006). Determinación de curvas de retención de agua en suelos agrícolas del campus de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. Tesis de Grado. Manabí Ecuador. Pag. 37.