

# Informe de Trabajo Final de Carrera

*Carrera de Ingeniería Forestal*



## Aplicación del cultivo de tejidos *in vitro* (CTV) para la propagación de especies leñosas.

Modalidad: Participación en el proyecto acreditado de Investigación y Extensión: “Propagación vegetativa de especies leñosas: análisis de los procesos y mecanismos que la determinan.”  
Código: 11/A303.

Directora: Sandra Sharry

Codirector: Rodrigo Altamirano

Fecha de Entrega: 8 de Octubre de 2018.

## AGRADECIMIENTOS

*Principalmente a mis padres quienes dan su vida por mi hermano y por mí a diario, quienes me enseñaron a amar mi tierra y mis raíces y me permitieron crecer con la libertad de elegir mi futuro guiándome, aconsejándome y ayudándome a enfrentar cada adversidad.*

*A mi hermano, por pelearme constantemente pero siempre tener un abrazo listo.*

*A mi Padrino “El tío Elio” porque nunca me faltaron sus palabras de aliento y su ayuda siempre que lo necesité, espero algún día poder devolverte todo ese amor que siempre das.*

*A Pablo, mi esposo y compañero de aventuras desde siempre. Gracias por aguantar mis nervios, mis locuras, mis noches de insomnio... Gracias por siempre ayudarme en cada cosa que hago, sin pedirme nada a cambio.*

*A mis abuelos, conservaré siempre sus enseñanzas y sus abrazos en mi corazón.*

*A mis profesores y compañeras de la facultad, a mi Familia Forestal Feliz quienes me hicieron parte de un hermoso grupo.*

*A mi mejor amiga Ayelén, por darle color a mi vida con su incondicionalidad y compañerismo sin que nunca nos falte un mate o un tereré. A mi amigo Ichu, gracias por el ahijado hermoso que me diste y por confiar en mí siempre!. A Vivi y Julián, por siempre estar y a todos mis amigos de la vida. A mi madrina María y a Fran y Leti, por enseñarme a siempre seguir adelante. A la genia de Mari Basiglio por enseñarme cómo manejarme en el laboratorio. A todos los que ya no están, pero me dejaron sus enseñanzas.*

*A Tati, por ser tan buena compañera de laboratorio como cuñada.*

*A Silvina, extraño tu luz y alegría todos los días.*

*A Rodrigo, mi Co-Director, por su buena predisposición, sus consejos, la buena onda y la buena música.*

*A Sandra, mi Directora, principalmente por brindarme tu confianza y ayuda, por IUFRO; gracias por compartir tus consejos y experiencias, espero que nuestra amistad siga en pie y madure con el tiempo, como los árboles.*

*A Sebastián y Marcela, dos evaluadores de lujo, por su rápida corrección, predisposición y consejos.*

## ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Descripción de las especies bajo estudio.....	17
MATERIALES Y METODOS.....	21
Viraró ( <i>Pterogyne nitens</i> Tul.).....	24
Fresno americano ( <i>Fraxinus pennsylvanica</i> Marshall).....	27
Palo borracho ( <i>Ceiba</i> sp.).....	30
Alcornoque ( <i>Quercus suber</i> L.).....	31
Tomillo del campo ( <i>Acantholippia seriphioides</i> (A.Gray) Moldenke).....	33
RESULTADOS y DISCUSION.....	36
Viraró ( <i>Pterogyne nitens</i> Tul.).....	36
Fresno americano ( <i>Fraxinus pennsylvanica</i> Marshall).....	38
Palo borracho ( <i>Ceiba</i> sp.).....	39
Alcornoque ( <i>Quercus suber</i> L.).....	40
Tomillo del campo ( <i>Acantholippia seriphioides</i> (A.Gray) Moldenke).....	41
CONCLUSIONES.....	45
ANEXOS.....	47
ANEXO 1.....	47
ANEXO 2:.....	48
ANEXO 3:.....	49
BIBLIOGRAFIA.....	51

## RESUMEN

Los recursos genéticos forestales (RGF) son el material hereditario que se encuentra en y entre las especies de plantas leñosas y árboles, que tienen un valor social, científico, ambiental o económico. Según FAO (2014), de las 8000 especies forestales que se comercializan a nivel mundial, solo 2400 están bajo algún tipo de manejo, pero sólo hay plantaciones de 700 especies.

Para la introducción de cualquier especie vegetal a su cultivo *in vitro*, es necesario superar algunas barreras, fundamentalmente la contaminación por microorganismos que conviven con ellas (Perla González, 2007). La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos, los cuales pueden destruir tales cultivos.

En el presente Trabajo Final de carrera se desarrollaron tareas de investigación en el marco del proyecto 11/A303: *Propagación vegetativa de especies leñosas: análisis de los procesos y mecanismos que la determinan*". El **objetivo general** fue aplicar técnicas de cultivo de tejido *in vitro*, para establecer explantes axénicos e inducir morfogénesis, de diferentes especies leñosas contempladas en el Proyecto. Como **objetivos específicos**: determinar y acondicionar plantas madres; acondicionar y desinfectar explantes; establecerlos *in vitro* e inducir respuestas morfogénicas *in vitro*.

En este trabajo se siguió la metodología tradicional del Cultivo de tejidos *in vitro* (Levitus et.al, 2010), trabajando con Viraró, Tomillo del campo, Alcornoque, Palo borracho y Fresno americano.

En algunos casos (Tomillo del campo y Viraró), el cultivo *in vitro* se mostró como un método eficaz para mejorar la respuesta a la germinación. Este hecho es de gran importancia para la conservación y propagación. El Palo borracho dio una buena respuesta a la desinfección y se encuentra actualmente en proceso de diferenciación de callos. Finalmente, el Fresno americano y el Alcornoque no respondieron bien a las desinfecciones, como el resto de las especies realizadas.

## INTRODUCCIÓN

Los recursos genéticos forestales (RGF) son el material hereditario que se encuentra dentro de y entre las especies de plantas leñosas y árboles, que tienen un valor social, científico, ambiental o económico real o potencial. Incluye los bosques, las tierras boscosas y los árboles fuera del bosque. Los RGF son esenciales para la adaptación y protección de nuestros ecosistemas, paisajes y sistemas de producción, sin embargo, se encuentran sujetos a crecientes presiones y a una utilización insostenible (Yanchuk, 2002). Según FAO (2014), de las 8000 especies forestales que se comercializan a nivel mundial, solo 2400 están bajo algún tipo de manejo. De esta cantidad, sólo se realizan plantaciones de 700 especies y un número similar está bajo planes de manejo. La demanda mundial de productos y subproductos de origen forestal, tales como madera, papel, resina, etc., ha aumentado considerablemente en los últimos años, mientras que las reservas existentes de árboles y áreas con formaciones leñosas son cada vez menores (Keenan et al., 2015). A principios de este siglo la Argentina contaba con aproximadamente cien millones de hectáreas de bosques naturales nativos. Para el año 2002 se calculó que había en el país 33,2 millones de hectáreas de bosques nativos -de cuya superficie solo sería económicamente aprovechable un 50% y 1,1 millones de bosques plantados (Fracassi et al. 2013). Es decir, los RGF están desapareciendo. En este contexto, son necesarias estrategias combinadas e integrales para revertir el proceso. A su vez, a medida que aumenta la población y sus demandas de productos forestales, las tierras disponibles para la producción disminuyen, por lo que se necesitan esfuerzos coordinados para conseguir la sostenibilidad de la producción forestal. Aunque los sistemas tradicionales de silvicultura y mejoramiento genético continúan siendo importantes en las actividades forestales actuales, los programas convencionales de mejoramiento genético se ven limitados por el largo ciclo de desarrollo de los árboles forestales y la dificultad para distinguir entre la expresión genotípica y los efectos ambientales (Martínez et al., 2003).

El uso de material genéticamente mejorado, la plantación de material clonal y la fertilización han traído como consecuencia aumentos importantes en la productividad forestal (Torres & Buitrago, 2013). Sin embargo, dos características de las especies leñosas hacen que las mismas presenten una mayor dificultad para mejorarlas y seleccionarlas. En primer lugar, Villalobos & Thorpe (1991) indican que tienen un

tiempo de generación muy largo (años o décadas) desde la germinación a la floración, y, en segundo lugar, a veces demuestran cambios temporales en la tasa de crecimiento y en su morfología. Esto último significa que la selección de muchas características deseables (tales como volumen y forma) no puede realizarse cuando el individuo tiene pocos años porque a esa altura de su desarrollo se desconocen estas características. Es necesario impulsar el conocimiento sobre los sistemas de reproducción y propagación asexual de RGF de interés actual y potencial, para traspasar los caracteres no heredables. Las especies leñosas se reproducen en la naturaleza tanto por semillas como asexualmente (Vazquez Yañes et al., 1997).

Las especies forestales tienen muchos problemas de propagación que responden más a las peculiaridades fisiológicas de las semillas de las plantas leñosas, que a la variabilidad genética de las especies (Barbón, 2011). En algunas especies leñosas la propagación es más fácil, más rápida y más económica por medios vegetativos que por semillas (Rivera & Galliusi, 2006). Tal el caso de los álamos y los sauces, que se pueden propagar fácilmente mediante estacas (Roussy & Abedini, 2012).

La propagación vegetativa o asexual comprende una amplia variedad de técnicas que incluyen la manipulación de los tejidos vegetales (por ejemplo, secciones de tallos, hojas, raíces, semillas o incluso cultivos celulares), lo que en definitiva permite la producción de "variedades" clonales o líneas (Yanchuk, 2002). Es posible porque, en algunas plantas, los órganos vegetativos tienen capacidad de formar nuevas raíces y a su vez regenerar un nuevo tallo (Roussy & Abedini, 2012). La multiplicación de especies leñosas se efectúa de forma convencional por medio de semillas y por estacas, injertos o acodos. Estas vías de propagación son limitadas, aún más cuando se desea introducir las plantas a gran escala en sistemas integrales de producción con respuesta directa a la industria. Por otro lado, el éxito de una plantación forestal es fuertemente dependiente de la calidad de las plantas que se utilicen. En este sentido, la calidad de una planta está definida por su comportamiento final en el terreno, el que está regulado por sus atributos morfológicos y fisiológicos y por su interacción con el ambiente del sitio de plantación (Navarro & Palacios, 2004; Quiala et al., 2012).

Los métodos de propagación vegetativas deben ser aún ajustados para varias especies leñosas, sobre todo las no comerciales o especies nativas de uso potencial. Por ende, es necesario avanzar en el conocimiento del sistema de propagación de cada especie, ya que cada una tiene requerimientos diferentes.

La biotecnología ofrece nuevas técnicas que complementan a las metodologías tradicionales de propagación y del mejoramiento genético forestal. Los avances importantes de la técnica de cultivo de tejidos vegetales y la biología molecular que han tenido lugar en las últimas décadas se encuentran en la base del desarrollo de campos como la crio-conservación y la regeneración masiva de plantas (expresión de la totipotencia celular), los marcadores de ADN, la genómica de árboles y la transformación genética. En el ámbito de los recursos genéticos, los marcadores de ADN permiten caracterizar la naturaleza, amplitud y distribución de la variabilidad genética de especies vegetales y, por tanto, facilitan la toma de decisiones sobre qué y cómo conservar. La crio-conservación y la regeneración de plantas *in vitro* se están utilizando para conservar y micropropagar material vegetal específico, a fin de llevar a cabo la conservación ex situ y permitir el desarrollo de la silvicultura clonal (Martínez et al., 2003).

La biotecnología abarca una vasta gama de técnicas que utilizan organismos vivos, o partes de los mismos, para obtener o modificar ciertos productos. Según el *Convenio sobre Diversidad Biológica* de 1992, la biotecnología podría definirse como "*toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos*". La biotecnología aplicada a especies leñosas puede agruparse en cuatro grandes categorías (Sharry et al., 2015):

1. Propagación: Cultivo de tejidos-Micro propagación
2. Biotecnologías basadas en marcadores moleculares
3. Modificación genética de especies forestales (árboles transgénicos)
4. Ómicas y edición génica

Los métodos de cultivo *in vitro* constituyen una vía de propagación con resultados satisfactorios en los coeficientes de multiplicación y por las posibilidades de éxito de las plantaciones forestales en campo. Los principales avances del cultivo *in vitro* de tejidos han permitido la multiplicación de especies de interés mediante organogénesis y embriogénesis somática (ES) (Daquinta et al., 2000; Barbón, 2011).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (CTV) podrían superar muchos de los problemas citados anteriormente. Clones selectos de árboles pueden ser propagados en gran escala y a bajo costo, para obtener plantas que puedan ser

utilizadas directamente en plantaciones para asegurar el fenotipo seleccionado. Por otro lado, un sólo árbol sirve como planta madre y un gran número de explantes pueden ser acomodados en un área pequeña. Estas técnicas ofrecen una serie de ventajas como la posibilidad de producir un elevado número de plantas homogéneas y de una muy alta calidad fitosanitaria, en un menor plazo de tiempo y en espacios reducidos (Sharry et al., 2015).

La propagación clonal *in vitro* o micropropagación, posibilita la producción en gran escala de copias idénticas de una planta, ya que todos los árboles que se obtengan por estos métodos son clones. Por medio de esta tecnología también es posible obtener en forma masiva, en condiciones de laboratorio y en cualquier época del año, plantas de sanidad controlada, si se utiliza como explante el meristema. Hay dos objetivos principales para desarrollar técnicas de micropropagación de especies forestales, en primer lugar, ajustar un sistema de clonación viable a gran escala para árboles selectos y, en segundo lugar, son necesarios protocolos reproducibles para ser utilizados en modificación genética (Harry & Thorpe, 1994).

Este método de propagación se fundamenta en la teoría de la totipotencialidad celular que constituye el principio rector de estas técnicas (Sharry et al., 2015). Este término proveniente del latín -totuspotens-: totus (todo) y potens (poder o habilidad), es comúnmente utilizado en biología que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl & Paul, 2000).

Podemos decir que el término CTV involucra diferentes técnicas de cultivo de tejidos, órganos o células vegetales y consiste en regenerar plantas a partir de explantes o explantos bajo condiciones de luz y temperatura controlada, cultivados en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica (Sharry et al., 2015). El CTV también puede definirse como “*cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial*” (Castillo, 2004). El explante es el órgano, tejido o segmento de tejido vegetal que va a ser utilizado para iniciar el cultivo. En teoría puede utilizarse cualquier parte de la planta que contenga células vivas (ápices de raíces o de tallos, primordios de hojas, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados,

embriones maduros o inmaduros, segmentos de tallo o de hojas, ovarios, óvulos, anteras y polen).

Los diferentes explantes bajo condiciones de CTV pueden dar lugar a una masa de células no organizadas denominada callo (desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral), o bien generar una respuesta morfogénica por la cual se forman órganos (organogénesis) o embriones (embriogénesis somática) (López, 1996). Es decir, la propagación *in vitro* abarca dos vías de regeneración de plantas completas (morfogénesis): la embriogénesis somática y la organogénesis (Levitus et al., 2010).

De acuerdo a Roca & Mroginski (1991) y George & Sherrington (1984), las vías morfogénicas pueden ser (*Figura 1*):

a) organogénesis directa, que consiste en la multiplicación de brotes provenientes de yemas axilares, terminales o laterales. El tejido inicial utilizado es meristemático.

b) organogénesis indirecta, en este caso la formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en el callo; éste ha derivado inicialmente de un órgano, tejido u otra parte escindida de la planta. El tejido usado como inicial es parenquimático.

c) embriogénesis somática, los embriones pueden formarse directamente en el explante primario, o indirectamente de células cultivadas en suspensión o en un medio líquido.

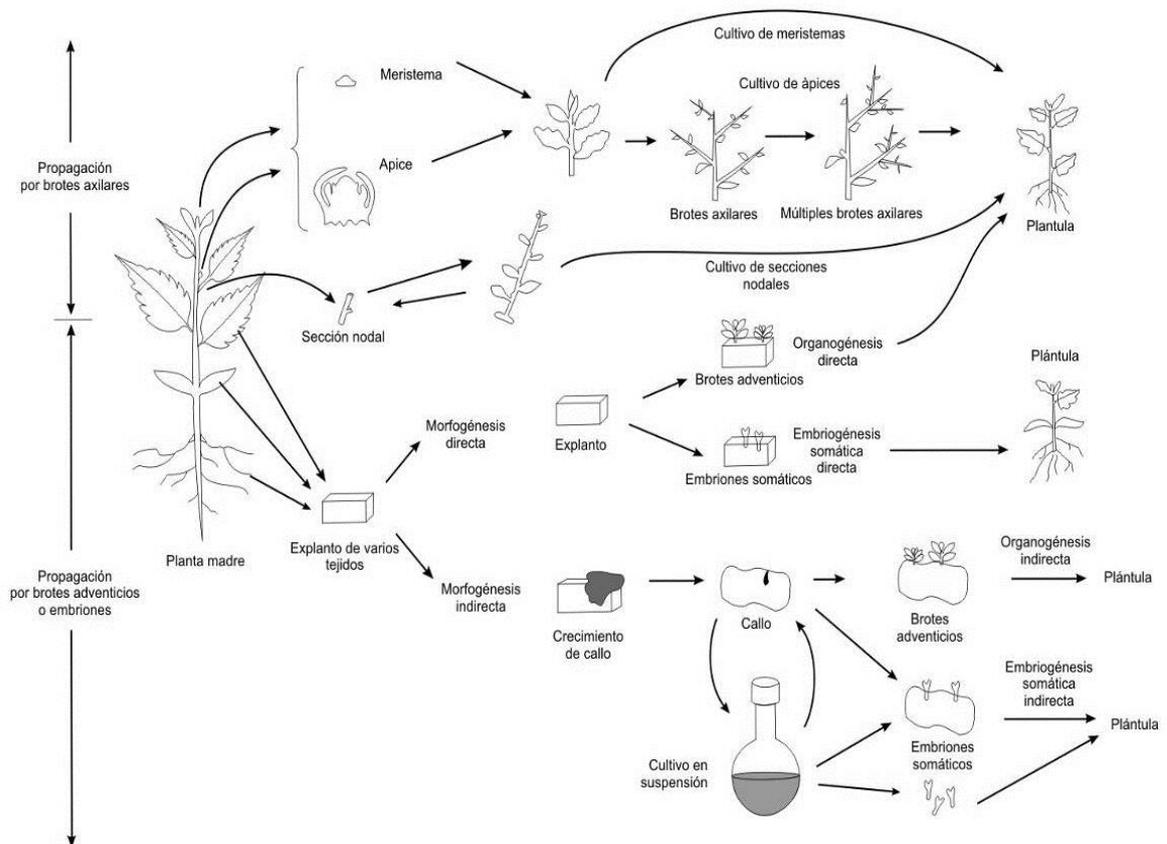


Figura 1. Vías de regeneración de plantas por CTV. Esquema modificado por Boeri P. (2017) a partir de Lindsey y Jones, 1989, en *Plant Biotechnology in Agriculture*. p 59.

Los cultivos *in vitro* en general tienen dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de microorganismos contaminantes como los hongos y bacterias), y el control de los factores que afectan el crecimiento, como las condiciones ambientales de cultivo (Sharry et al., 2015).

Para la introducción de cualquier especie vegetal a su cultivo *in vitro*, es necesario superar algunas barreras previas, fundamentalmente la contaminación por microorganismos que conviven con las plantas (Perla González, 2007). La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo (Mroginski & Roca, 1991). De ser posible, se deben cultivar explantes de plantas donantes que crecen en condiciones de invernadero (controladas), con ello se reduce sustancialmente las tasas de contaminación. Dos son

las principales fuentes de contaminaciones: a) microorganismos presentes en el interior o en la superficie de los explantes y b) fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio. La correcta detección de estas fuentes y del tipo de microorganismo son aspectos importantes para el éxito de los cultivos (Levitus et al., 2010). Es muy complejo poder obtener un cultivo completamente aséptico, pero para lograrlo, según Roca & Mroginski (1991) es conveniente que se trabaje en ambientes adecuados, esterilizar los medios de cultivo y desinfectar superficialmente los explantos. A esto puede agregarse que la persona sentada en el flujo laminar entienda el funcionamiento del mismo y pueda actuar acorde para evitar lo más posible una contaminación por mal manejo en la siembra. Como se enunció previamente, es difícil conseguir cultivos estrictamente asépticos dado que en la mayoría de los casos es altamente probable que los mismos contengan virus y fitoplasmas, por lo que, en la práctica, cuando se refiere a cultivos asépticos, en general se quiere significar que son cultivos donde no se produce la proliferación de hongos y bacterias (Sharry et.al., 2015). Hay una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizado el empleo de etanol (70 %v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) contenido en productos de uso doméstico (Mroginski & Roca, 1991). Este procedimiento debe realizarse evitando dañar en demasía los explantes. El protocolo de desinfección es muy importante, ya que de él depende el establecimiento *in vitro* del explante (INIFAP, 2007).

Los avances desarrollados en el campo de la biología experimental en los últimos años han permitido el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular y han traído consigo la posibilidad de reproducir todos los factores que pueden incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones de laboratorio (Sharry & Abedini, 2014). Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el ambiente de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados (Castillo, 2004). Estos factores corresponden a las horas de luz, temperatura y nutrientes del explante. Los frascos que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de una cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz (Castillo, 2004). El sustrato en el que se colocan los explantos se denomina Medio de cultivo y corresponde a soluciones acuosas donde se desarrollan microorganismos o células o tejidos

vegetales y/o animales (Boeri, 2017). La composición del medio de cultivo dependerá de la especie y de la etapa del proceso en el que se encuentre, y debe ser muy parecido a las condiciones nutricionales que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural (Sharry et al, 2015). Siempre debe contarse con la presencia de componentes principales del medio: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y hormonas o reguladores de crecimiento (Perea & Tirado, 2011).

Otros factores determinantes de la respuesta *in vitro* son la planta madre, el tipo de explante, el medio de cultivo y las condiciones de aclimatación. En base a esto, podemos definir 5 etapas para realizar la micropropagación de especies leñosas.

#### *Etapa 0. Elección y acondicionamiento de las plantas madre*

La selección de las plantas donantes es la iniciación de todo proceso de cultivo de tejidos y sólo tiene sentido cuando se emplea un material de partida adecuado. La constitución genética de la planta donante es el primer factor a evaluar. Para la mayoría de las plantas propagadas *in vitro*, el material inicial es una planta élite seleccionada por características fenotípicas especiales (Sharry & Abedini, 2018). El estado fisiológico de la planta donante es un factor de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, reportándose diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales cuando los tejidos provienen de plantas con diferente edad fisiológica (Villalobos & Thorpe, 1991). La planta madre se mantiene bajo condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo, 2004). Generalmente, se utilizan plantas en estado de crecimiento activo, vigoroso y sano (Sharry et al, 2015).

#### *Etapa 1- Elección, acondicionamiento y desinfección del explante*

El éxito de un sistema de micropropagación está determinado por la calidad del explante a utilizar. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantos (Levitus et al., 2010).

La desinfección superficial incluye varios pasos que son usuales en el cultivo de tejidos como el lavado de los explantos con agua corriente, el empleo de etanol al 70%

por segundos o minutos, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio con unas gotas de tensioactivos para favorecer su penetración y actividad. Posteriormente, los explantes deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril. Es recomendable que la desinfección y el lavado de los explantes se realicen bajo campana de flujo laminar. Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general, estos patógenos incluyen los patógenos superficiales del material vegetal, los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo en laboratorio (Levitus et al., 2010). También se observarán patógenos remanentes de una no eficiente desinfección. La forma más común de esterilizar los explantes es someterlos a tratamientos con soluciones esterilizantes (hipoclorito de calcio, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno, cloruro de mercurio y nitrato de plata, entre otras). Se debe de obtener la máxima esterilidad posible con la máxima sobrevivencia de tejido vegetal o con el menor daño potencial. Es recomendable determinar el método de esterilización más adecuado para cada tipo de tejido vegetal, esto depende de varios factores: la concentración de la solución, la duración de la exposición a la solución y el daño mínimo de las células en contacto directo con la solución (Hernández & González, 2010). Respecto a los explantes, estos se determinan según el objetivo del cultivo (estudios básicos, micropropagación, entre otros), la posibilidad de contaminación con microorganismos, la edad fisiológica, el tamaño (a mayor tamaño, mayor complicación en la desinfección) y la época del año.

#### *Etapa 2- Introducción del material seleccionado in vitro, o establecimiento de los cultivos*

La finalidad de la Etapa 2 es que, una vez obtenida la desinfección adecuada para ese explante, el mismo pueda introducirse en el medio de cultivo y dé las respuestas que se están buscando (con ausencia de oxidación fenólica o muerte). Esta etapa involucra el inicio de la morfogénesis. En esta etapa es fundamental el Medio de cultivo, que contiene las sustancias necesarias para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. Un medio de cultivo es una solución en donde se encuentran disueltas sales minerales que aportan los elementos esenciales Macronutrientes (N, P, K, S, Ca y Mg) y Micronutrientes (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, y Co). Normalmente es imprescindible una fuente de carbono, generalmente la sacarosa, debido a la escasa actividad fotosintética de los tejido *in vitro*, agua y agar. Además, el medio puede ser

enriquecido con aminoácidos, vitaminas y reguladores de crecimiento, siendo estos últimos reemplazantes de las hormonas vegetales. La composición y tipo de medio de cultivo depende de la especie vegetal, de la etapa y del tipo de propagación que esté empleándose.

### *Etapa 3- Multiplicación*

Se utilizan diferentes balances de reguladores de crecimiento con la finalidad de multiplicar el material, por ejemplo, inducción de brotes adventicios.

### *Etapa 4- Enraizamiento y la obtención de plantas completas*

Se utiliza un balance de reguladores de crecimiento, aunque diferente al de la etapa anterior ya que se busca una buena cantidad de raíces, pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (auxinas) para promover la rizogénesis (Levitus et al., 2010).

### *Etapa 5- Aclimatación y rusticación de las plantas obtenidas*

La aclimatación debe realizarse de manera secuencial. Se sabe que las plantas obtenidas *in vitro* no poseen desarrollada la cutícula y los estomas no son funcionales, dado que no los precisan por tener todos los nutrientes facilitados en el medio de cultivo. Esto determina una alta tasa de transpiración que puede ocasionar la muerte por deshidratación (Levitus et al., 2010). Entonces, en esta etapa tenemos que lograr que los órganos funcionales entren en trabajo y realicen el proceso que no se da estando *in vitro* y es de vital importancia para la supervivencia de la planta: la fotosíntesis. Esto debe lograrse bajando el contenido de humedad de manera gradual, de lo contrario la planta morirá por no poder regular el ritmo transpiratorio. Por lo mencionado anteriormente es importante señalar que la aclimatación es una de las etapas más críticas de la micropropagación, porque es preciso cambiar de la condición heterótrofa del cultivo *in vitro* a la autótrofa in vivo; es decir, su trasplante al suelo donde se puede presentar estrés hídrico, y, en consecuencia, es importante considerar el ambiente y sustrato a los que se destinen (Villavicencio Gutiérrez et al., 2012). Por último, la rusticación es cuando se considera que las plantas están adaptadas a las condiciones ambientales normales y preparadas para sus adversidades.

Por lo expuesto anteriormente, podemos decir que existen tres principios básicos en los que se basa el CTV, los cuales deben ser comprendidos para ejercer una correcta manipulación de los mismos y poder así tener éxito en los trabajos que se emprendan en este campo. Los principios son:

*La correcta elección del explante.* Hay que tener siempre presente que el explante seleccionado determina, en gran parte, la respuesta obtenida; se debe de tener en cuenta el tipo de cultivo que se va a iniciar, el propósito del cultivo propuesto y las especies vegetales a utilizarse. Generalmente entre más joven y menos diferenciado sea un tejido, más fácil será su adaptación y respuesta al cultivo *in vitro*. Se debe de tener en cuenta que extraer un fragmento de tejido vegetal, de cualquier planta, conlleva obviamente, la ruptura de las relaciones con otros órganos, tejidos y células de la misma. Por lo que estas relaciones son de alguna manera subsanadas por el medio y las condiciones de cultivo (George et al., 2008; Pérez Molphe Balch et al., 1999).

*La elección del medio y las condiciones de cultivo.* La elección y formulación del medio de cultivo son otros factores importantes que determinan la respuesta del explante y el éxito del CTV. Se puede considerar que los medios de cultivo están formados, principalmente, por dos grupos de componentes: los esenciales y los opcionales. Los esenciales son los nutrientes que los tejidos vegetales necesitan para su desarrollo (nutrientes minerales, fuente de carbono y vitaminas). Los opcionales no son indispensables, ya que no se necesitan para mantener vivo al tejido vegetal, pero influyen en gran medida en la respuesta de los cultivos *in vitro*, aquí encontramos a los reguladores de crecimiento vegetal (RCV). Otros factores a tener en cuenta, porque también influyen en la respuesta del explante, son las condiciones físicas del cultivo (luz, fotoperiodo, temperatura y humedad) (Pérez Molphe Balch et al., 1999).

*Las condiciones asépticas.* Los medios que se usan en el CTV tienen alto contenido de carbohidratos, lo que los vuelve el medio ideal para el desarrollo de microorganismos y dado que los microorganismos y las células vegetales tienen requerimientos nutricionales muy parecidos se debe de esterilizar el medio de cultivo y los explantes utilizados para excluir cualquier organismo contaminante. Esto es de suma importancia porque las bacterias y los hongos se desarrollan mucho más rápido que los tejidos vegetales, provocando una serie de daños a los cultivos como pueden ser: que los cultivos vegetales sean cubiertos por microorganismos, los

microorganismos pueden consumir la mayoría de los nutrientes del medio y también pueden excretar sus productos metabólicos dañando los tejidos vegetales (Endress, 1994; Pérez Molphe et al., 1999)

Sin duda la investigación en biotecnología forestal, sus aplicaciones y programas de mejoramiento genético han permitido masificar la producción y aumentar la calidad de variedades no solo de especies exóticas sino también nativas de alto interés comercial; sin embargo, son los países desarrollados los de mayor actividad en biotecnología forestal, mientras que en Argentina los conocimientos son limitados y esto es causa para que no se logre el potencial deseado. Desde el año 1980 se desarrollan en la FCAYF trabajos de propagación de especies forestales, aromáticas, medicinales, ornamentales, frutales y alimenticias. Los ensayos correspondientes a este Trabajo Final de Carrera se realizaron en la FCAYF, en el ex CEProVe (Centro Experimental de Propagación Vegetativa) perteneciente al Laboratorio de Investigación en Maderas (LIMAD) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, creado en el año 1983 como resultado de un convenio con el Ministerio de la Producción-Dirección de Desarrollo Forestal de la Provincia de Buenos Aires con el 1er Programa nacional de Biotecnología y con el apoyo de la CIC y UNLP con la finalidad de aplicar técnicas de reproducción asexual para la producción masiva de especies forestales, frutales, medicinales y aromáticas, nativas y exóticas. El Proyecto de Investigación en el cual se encuadra este trabajo denominado "*Propagación vegetativa de especies leñosas: procesos que la determinan*", tiene por objetivo general profundizar el conocimiento científico de los mecanismos y procesos de la propagación asexual de plantas leñosas nativas y exóticas de importancia actual o potencial para diferentes usos.

En el CEProVe se ha trabajado con muchas especies, algunas se incluyen en la *Tabla 1*. Algunos de los resultados obtenidos están publicados (Galarco et al., 2018; Sharry & Abedini, 2014; Sharry et al., 2011; Rivas et al., 2004; Abedini et al., 2000).

NATIVAS		EXÓTICAS
<i>Acacia caven</i>	<i>Araucaria sp.</i>	<i>Melia azederach</i>
<i>Erythrina crista-galli</i>	<i>Podocarpus parlatoreii</i>	<i>Eucalyptus viminalis</i>
<i>Parkinsonia aculeata</i>	<i>Pterogyne nitens</i>	<i>Pinus canariensis</i>
<i>Celtis tala</i>	<i>Gomesa bifolia</i>	<i>Fraxinus pennsylvanica</i>
<i>Scutia buxifolia</i>	<i>Sapindus saponaria</i>	<i>Quercus suber</i>
<i>Schinus molle</i>	<b>OTRAS</b>	<i>Miltonia sp.</i>
<i>Nothofagus sp.</i>	Estragón	<i>Brachychiton populneus</i>
<i>Phyllanthus sellowianus</i>	Malva	
<i>Jodinia rombifolia</i>	Poleo	
<i>Acantholippia seriphioides</i>	Menta	

Tabla 1. Algunas de las especies trabajadas en el CEProVe desde sus inicios a la actualidad.

Para cumplir con el propósito del Trabajo Final de carrera (promover la integración y ampliación de los conocimientos adquiridos con un perfil interdisciplinar para favorecer el desarrollo de competencias vinculadas a la actividad agroforestal características de la futura intervención profesional) se desarrollaron tareas de investigación en el marco del proyecto 11/A303 titulado "*Propagación vegetativa de especies leñosas: análisis de los procesos y mecanismos que la determinan*" (Directora: Sandra Sharry), entre los años 2017 y 2019. El propósito general fue participar en tareas de investigación en el marco del mencionado proyecto, para adquirir competencias y destrezas para trabajar en un laboratorio de CTV como ser, aplicar los pasos del método científico; aprender a trabajar bajo condiciones de bioseguridad en laboratorios, organizar planes de trabajo; comunicar los resultados en eventos, participar en capacitaciones (extensión), asistir a eventos, entre otros.

Para ello se realizaron ensayos exploratorios con material vegetal proveniente de las siguientes especies o RGF: viraró (*Pterogyne nitens* Tul.), fresno americano (*Fraxinus pennsylvanica* Marshall), palo borracho (*Ceiba sp.*), alcornoque (*Quercus suber* L.) y tomillo del campo (*Acantholippia seriphioides* (A.Gray) Moldenke).

## Descripción de las especies bajo estudio

El *Viraró* o *Tipa colorada* (*Pterogyne nitens* Tul.) crece en nuestro país en la formación subtropical Tucumano-Boliviana (Provincia Fitogeográfica de las Yungas), en Misiones (Provincia Fitogeográfica Paranaense) y Parque Chaqueño (Tortorelli, 1956). Pertenece a la familia *Fabaceae*, subfamilia *Caesalpinoideae*. Crece hasta 25 m. de altura, posee hojas caducas compuestas, por lo general pseudo-imparipinadas de color verde brillante en el haz y verde opaco en el envés. Sus flores pequeñas se reúnen en inflorescencias axilares que luego fructificarán en sámaras de ala rígida que se tornan de un color castaño claro brillantes cuando se secan. La semilla es de un color marrón oscuro. La madera de esta especie nativa es muy buscada por su durabilidad, resistencia y el hermoso veteado espigado que presenta, siendo similar a la Caoba (Tortorelli, 1956). Entre sus usos se mencionan el empleo de la madera para la fabricación de muebles de estilo (Dimitri et al., 2000). Otra aplicación muy importante que se destaca en el trabajo de Duarte et. al. (2010) ha demostrado que dos alcaloides aislados de *Pterogyne nitens* (Pterogynina y Pterogynidina) inducen la apoptosis en células de cáncer de mama. En el país no se realizan plantaciones de esta especie, por lo cual toda la madera existente en el mercado es proveniente de extracciones de bosque nativo, recurso que va en detrimento. Debido a la importancia económica, de conservación y difusión de esta especie, el estudio de la ES constituye un aporte al conocimiento, tendiente a generar protocolos viables de propagación (Molina et al., 2015), y lograr la callogénesis podría ser un camino para la extracción de compuestos de interés. Se han registrado antecedentes en el cultivo de tejidos de esta especie (Avilés et al., 2009; Molina et al., 2015) donde se efectuaron la propagación y el estudio de los compuestos presentes en el viraró. Para la realización de este informe se tomaron estos antecedentes como base para iniciar los experimentos.

El *Fresno americano* (*Fraxinus pennsylvanica* Marshall), es un árbol perteneciente a la familia *Oleaceae* de tamaño mediano nativo del centro y este de Estados Unidos de América y Canadá. Se encuentra en las riberas de ríos, a lo largo de ensenadas, en bordes de pantanos y en una amplia gama de tipos de suelo de su zona de distribución natural (Linford, 2009). Esta especie diclino-dioica alcanza una altura total aproximada de 18 m. Es un árbol caducifolio, rústico y de crecimiento rápido, que

presenta un tronco recto y cilíndrico. Las hojas son compuestas e imparipinadas y miden de 20 a 30 cm de largo, con siete o nueve folíolos de entre 10 y 15 cm. Su copa es de silueta circular, textura media y su follaje verde claro a intermedio, tornándose amarillo en época otoñal (Benassi et al., 2006). Las flores son pequeñas dispuestas en racimos y carecen de carácter ornamental. El fruto es una sámara y son muy abundantes (Luque, 2009). En arbolado público, los ejemplares masculinos de *F. pennsylvanica* presentan ciertas características tipológicas que lo hacen más interesante, como una copa más compacta, mayor uniformidad en el amarillo otoñal y mayor densidad de follaje (Serra, 2017). También son útiles para plantaciones donde no se cuenta con la interferencia de la semilla, el fresno puede tornarse una plaga por su gran dispersión y germinación. Es por esto que el uso de ejemplares femeninos en el arbolado urbano presenta ciertas dificultades, dado que producen frutos en grandes cantidades y causan la obstrucción de cañerías de desagüe, canaletas, y a su vez, generan residuos en la vía pública (Serra, 2017). Para poder disponer de fenotipos selectos de ejemplares masculinos de Fresno, es necesario ajustar técnicas de propagación vegetativa que permitan reproducir ejemplares en forma rápida y eficiente. Los trabajos publicados por Kim et al. (1998) y Van Sambeek et al. (2007) sobre propagación *in vitro* de Fresno americano y otras especies, sirvieron como base para este trabajo.

El *Yuchán o Palo borracho (Ceiba sp.)* es un árbol muy característico que presenta un abultamiento en su tronco que le hace tomar forma de barril. Crece diseminado en el Parque Chaqueño oriental y en la Selva Tucumano-Boliviana (Tortorelli, 1956). Es cultivado más que nada por sus características ornamentales, su tronco abultado y lleno de agujones es una de sus atracciones principales, siendo no menor sus hermosas flores que, dependiendo la especie, pueden ser de color rosado o blanco-amarillentas. Posee hojas digitadas con 5 folíolos de borde aserrado. El fruto es una cápsula dehiscente grande de hasta 15 cm. de longitud que posee numerosas semillas atrapadas dentro de una especie de algodón denominado "paina", de color blanco ligeramente amarillento que puede tener aplicaciones textiles. No se han encontrado antecedentes del CTV de esta especie, por lo cual es de importancia desarrollar protocolos de propagación *in vitro*.

El *Alcornoque* (*Quercus suber* L.) es un árbol que crece hasta 20 m. de altura, autóctono de la región mediterránea en el oeste del continente europeo. Se ha cultivado desde siempre por la gruesa y esponjosa corteza fisurada, de color gris anaranjado de la cual se obtiene el corcho. Esta puede desprenderse sin que el árbol se vea perjudicado, puesto que la renueva al cabo de unos pocos años (Linford, 2009). Las hojas son simples, de color verde oscuro brillante en el haz y verde opaco en el envés, con forma aovada-oblonga, borde dentado y de disposición alterna. Las flores masculinas y femeninas están en el mismo pie y difieren morfológicamente entre sí. Los frutos son bellotas. Si bien esta especie no es nativa de nuestro país y su estado de conservación no presenta ningún peligro de extinción, dos ejemplares son particularmente importantes para la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Facultad de Periodismo y Comunicación Visual de La Plata, dado que el botánico y micólogo Italiano Carlos Luis Spegazzini trajo bellotas de Alcornoque de su lugar de origen y plantó dos árboles de esa procedencia en nuestra ciudad, uno de ellos está situado en la Facultad de Periodismo y C.V. y el otro en el jardín de la memoria que comparten las restantes facultades arriba mencionadas. Conservar progenie de estos dos ejemplares es importante no solo para preservar el genotipo sino también por el aprecio de nuestra facultad hacia los aportes realizados por Carlos Spegazzini. Los antecedentes del cultivo de alcornoque *in vitro* establecidos por Manzanera (1990) y Toribio, & Celestino (2000), entre otros, involucran los pasos para la propagación y hasta mejoramiento genético para la conservación de esta especie, principalmente en su área de distribución natural. Las descripciones de las técnicas empleadas para su propagación se siguieron detalladamente para iniciar los experimentos de este informe.

El “*Tomillo del campo*” (*Acantholippia seriphioides* (A. Gray) Moldenke) pertenece a la familia Verbenaceae. *Acantholippia* deriva del griego *akantha*: espina, *púa* y *lippia*: limón, verbena, que a su vez es el nombre de un género de esta familia colocado en honor a Agustín Lippi, botánico francés del siglo XVII; se desconoce el significado del nombre *seriphioides*. Es un arbusto leñoso popularmente conocido como “tomillo de campo”, alcanza alturas de entre 30 y 60 cm., postrado y se desarrolla en suelos rocosos de las regiones áridas de Argentina, más precisamente en las Provincias de San Juan, Mendoza, San Luis, La Pampa, Neuquén, Chubut y Santa Cruz. Con ramas rígidas, espinescentes, ásperas y glandulosas, verdosas y peludas cuando jóvenes y

de color castaño oscuro cuando viejas, con la corteza que se desprende en fajas longitudinales. Hojas de 2 a 4,5 x 1 a 2 mm, trilobuladas, con margen notablemente revoluto y densamente cubiertas de pelos, especialmente en la cara inferior. Inflorescencias de 1 a 2,5 cm, globosas, en los ápices de las ramas. Flores blancas, de unos 6 a 6,5 mm con forma de tubo que se abre en 5 lóbulos notables. Fruto seco que se divide en 4 mericarpos de 2 mm. Florece a fines de primavera y principios de verano (Parques nacionales, 2018). Es una planta aromática de amplio uso en varias regiones de la Argentina, muy apreciada por los pobladores locales como medicinal y saborizante, en forma similar al tomillo europeo (*Thymus vulgaris* L.), se lo usa en infusión o agregado al mate para trastornos gastrointestinales y para condimentar carnes. Se ha determinado el poder antioxidante y conservante de su aceite esencial en hamburguesas comerciales de carne vacuna, conservadas a  $4 \pm 0.5$  °C (González et al., 2016). No se han encontrado antecedentes de propagación *in vitro*. Teniendo en cuenta la condición vulnerable en la cual se encuentra el Tomillo del Campo, toda aproximación a encontrar otra metodología de propagación o conservación es muy importante.

En base a lo expuesto, el **objetivo general** de este Trabajo Final de Carrera fue aplicar técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*, para establecer explantes axénicos e inducir morfogénesis, de diferentes especies leñosas contempladas en el Proyecto de Incentivos 11/A303.

Los **objetivos específicos** fueron:

- Determinar y acondicionar plantas madres como fuentes donantes de explantes
- Acondicionar y desinfectar distintos tipos de explantes.
- Establecer *in vitro* los diferentes explantes
- Inducir respuestas morfogénicas *in vitro*
- Comunicar los resultados obtenidos en los diferentes ensayos.

## MATERIALES Y METODOS

En este trabajo se siguió la metodología tradicional del Cultivo de tejidos *in vitro* que contempla las siguientes etapas (Levitus et al., 2010):

- 0: Selección y Preparación de la planta madre
- 1: Selección y acondicionamiento de los explantes
- 2: Introducción del material seleccionado *in vitro*, o *establecimiento de los cultivos*
- 3: Multiplicación del material
- 4: Enraizamiento y obtención de plantas completas.
- 5: Aclimatación y rusticación de las plantas obtenidas

### *Etapas 0: Plantas madres*

Se seleccionaron plantas madres con sanidad y buenas condiciones fisiológicas de fresno americano, palo borracho, viraró, alcornoque y tomillo del campo. Las plantas madres de fresno americano se mantuvieron en condiciones controladas de invernadero, siendo rociadas con fungicida Captan (1 cápsula polvo mojable/litro de agua) 3 veces por semana. Respecto al tomillo del campo se seleccionaron plantas a campo en la provincia de Rio Negro georreferenciadas con los números 001, 003, 004 y 031 de la Imagen 1 en las cercanías de la ciudad de Viedma. Para el resto de las especies, las plantas madres corresponden a árboles adultos del arbolado urbano.



Imagen 1. Puntos donde se tomaron las muestras de *Acantholippia serphioides*. Fuente: Google earth.

#### Etapa 1. Explantes.

Para la realización de este trabajo se utilizaron semillas, porciones de hojas, secciones nodales y botones florales.

#### Etapa 2. Establecimiento *in vitro*

Los explantes desinfectados se colocaron en medios de cultivo, bajo condiciones ambientales controladas. Los diferentes medios de cultivo se prepararon pesando sus componentes en balanza analítica de alta precisión Sartorius Handy H51, los cuales se homogeneizaron mediante la dilución en microondas en vasos de precipitado de plástico resistente a altas temperaturas con un volumen final de 500 ml. El medio de cultivo fue dispensado en frascos de vidrio de distinto volumen con y sin tapa y se colocaron en autoclave Chamberland durante 20 minutos a 120 °C y 1 atm. de sobrepresión para lograr asepsia en el interior del frasco y, por lo tanto, en el medio de cultivo. También se autoclavó el medio en botellas de vidrio resistentes para luego ser

dispensado bajo flujo laminar en placas de Petri estériles. Esto se realizó no solo para utilizar placas de Petri como envase, sino también cuando se quiso colocar en el medio de cultivo algún regulador de crecimiento que es termo-sensible y no resistiría las temperaturas que se generan en el proceso de autoclavado. Una vez que el medio de cultivo estuvo solidificado y a temperatura ambiente se llevó a campana de flujo laminar, donde los explantos desinfectados se sembraron con la ayuda de bisturí N° 20 estéril y pinzas bayoneta, finalmente se taparon con film plástico estéril o Parafilm®.

Cabe aclarar que todo el material utilizado bajo campana de flujo laminar debe estar previamente esterilizado. Tanto el material de vidrio de diferentes volúmenes, pinzas, algodón para limpieza en la cámara, papel tissue, como los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave; las placas de Petri de plástico utilizadas ya vienen selladas y estériles de fábrica.

Una vez en el flujo laminar con todo el material estéril, se utilizaron cofia y barbijo. Las manos fueron rociadas cada vez que se ingresó a trabajar y toda la superficie de la mesada con alcohol 70°.

Las *condiciones ambientales* fueron: temperaturas controladas entre 23 y 27 °C con un fotoperíodo de 16 horas con luz y 8 en oscuridad donde se utilizaron lámparas LED marca Philips de 18 Watts (potencia equivalente: 130 Watts) y 2000 lúmenes de intensidad.

Como envases para rusticar las especies se utilizaron vasos de plástico de diferentes volúmenes, perforados en su base y una bolsa de nylon transparente sostenida con una bandita elástica para generar condiciones de invernadero y proceder con la rusticación (*Imagen 2*). El sustrato utilizado en general fue una mezcla de turba, perlita y vermiculita en proporción 1:1:1, humedecidas con 24 hs. de anticipación.



*Imagen 2. Plántula en rusticación en vaso de plástico con sustrato y bolsa que conserva la humedad.*

Una vez transferidas las plántulas al sustrato se colocaron en mesadas del laboratorio con luz natural que atraviesa las ventanas.

En esta investigación se hizo énfasis en las etapas 0, 1 y 2. Se realizaron estudios exploratorios para la elección y acondicionamiento de explantes (desinfección) y posterior introducción en medios de cultivo, ya que, como se mencionó anteriormente, para algunas de las especies estudiadas, no se encontraron antecedentes para su introducción *in vitro*. Las etapas 3, 4 y 5 se aplicaron sólo a algunas de las especies bajo estudio.

Se describen a continuación el tipo de planta madre, explante, desinfección y medio de cultivo utilizados para cada especie, según corresponda.

*Viraró (Pterogyne nitens Tul.)*

*Etapas 0:* el estudio comenzó con la recolección del material proveniente de plantas adultas situadas en la entrada del Museo de Ciencias Naturales de La Plata. (*Imagen 3*).



*Imagen 3. Ejemplar adulto de viraró, fuente de semillas.*

*Etapa 1:* como explanto se usaron **semillas limpias**. Se descartaron los frutos vanos o vacíos. De los frutos seleccionados para la propagación se extrajo el material seminal quedando la sámara por un lado y las semillas por otro (*Imagen 4*).



*Imagen 4. A la izquierda, semillas de Pterogyne nitens limpias. A la derecha, fruto sámara.*

**Desinfección:** Se siguió el protocolo citado por Molina et al. (2015) que consiste en la desinfección superficial de las semillas mediante lavado en una solución de detergente y agua en agitación a una velocidad de 250 rpm durante 30 min, enjuagándose con agua corriente; posteriormente, una inmersión en alcohol etílico al 70 % (v/v) durante 2 min, seguida de inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10 % (p/v) con el agregado de tres gotas de Tween 20® por litro de solución durante 10 min.

#### Medio de Cultivo

Las semillas esterilizadas se colocaron en un medio de cultivo compuesto por las sales de Murashige & Skoog (1962) a la mitad de la concentración, modificado según la *Tabla 2* en ausencia de reguladores de crecimiento y con 1 g/l de carbón activado. La composición del medio de cultivo de Murashige & Skoog sin modificar puede encontrarse en el *ANEXO N° 1*.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Unidades</b>
Sacarosa	20	gramos/litro
Agar	8	gramos/litro
Myo-Inositol	0,25	gramos/litro
Solución madre de Micronutrientes	50	mililitros/litro
Solución madre de Macronutrientes	50	mililitros/litro
Quelato de hierro	50	mililitros/litro
Vitaminas	50	mililitros/litro
pH 5,8-6,2		

Tabla 2: Componentes del medio Murashige&Skoog modificado.

*Fresno americano (Fraxinus pennsylvanica Marshall)*

Etapa 0: plantas madres de entre 3 y 4 años de edad se obtuvieron por macropropagación de ejemplares masculinos en el invernadero de la Cátedra de Dasonomía y de individuos masculinos que crecen en el arbolado público de la Ciudad de La Plata (*Imagen 5*). El material recolectado de las plantas con buen estado sanitario se seccionó en estacas de 15-20 cm. de longitud y finalmente se colocó en solución de 20 ppm de AIB (ácido indol-3-butírico) y de 20 ppm de 6-BAP (6-n-bencil aminopurina) a 50% v/v.



*Imagen 5: Invernáculo de Dasonomía, FCAyF, UNLP.*

Se implementó la técnica *Forced-Flushing* (Meier-Dinkel, et.al; 1993) empleada para forzar la aparición de brotes adventicios a partir de yemas. Se colocaron estacas de 1cm. de diámetro y 15-20 cm. de largo en forma horizontal sobre una mezcla de sustrato (40% turba, 40% perlita y 20% vermiculita) y en bandejas (*Imagen 6*). Las estacas se rociaron una vez por semana con fungicida Kasumyn comercial y una solución de 300 ppm de citocininas.



*Imagen 6: Rama de F. pennsylvanica con un brote en Forced-Flushing*

*Etapas* **1:** los explantes fueron **segmentos nodales** provenientes de los brotes correspondientes al crecimiento anual y los obtenidos mediante estacas en solución y *Forced-Flushing*. La recolección de estos se llevó a cabo mediante la utilización de tijeras de podar. Los brotes, previamente envueltos en papel de diario mojado, se colocaron en una bolsa de polietileno negra para su transporte. Dicho material se lavó

con cepillo y jabón blanco bajo agua corriente. Luego se desinfectaron en superficie mediante la utilización de diferentes protocolos (*Tabla 3*). La desinfección se realizó en tubos de ensayo estériles para segmentos de 7 a 10 cm de longitud.

Desinfección		H2O+Jabón Blanco+Detergente	Fungicida	H2O2	Etanol	NaClO	Antibiótico
1	Porcentaje/Tipo	-	Captan	-	70%	30%	-
	Tiempo	15'	1h 30'	-	3'	40'	-
2	Porcentaje/Tipo	-	Captan	-	70%	30%	Kanamicina
	Tiempo	15'	1h 30'	-	3'	40'	30'
3	Porcentaje/Tipo	-	Captan	-	70%	30%	-
	Tiempo	20'	1h 30'	-	3'	40'	-
4	Porcentaje/Tipo	-	Captan	-	70%	30%	Amoxicilina
	Tiempo	15'	1h 30'	-	3'	40'	30'
5	Porcentaje/Tipo	-	Captan	-	70%	30%	Kanamicina
	Tiempo	15'	1h 30'	-	5'	40'	1h
6	Porcentaje/Tipo	-	Captan	-	70%	40%	-
	Tiempo	15'	1h 30'	-	5'	40'	-
7	Porcentaje/Tipo	-	Captan	10 vol.	70%	30%	-
	Tiempo	30'	45'	1'	2'	40'	-

*Tabla 3: Diferentes protocolos de desinfección para F. pennsylvanica.*

**Medio de Cultivo:**

Se utilizaron diferentes medios de cultivo con el agregado de reguladores de crecimiento en distintas concentraciones y combinaciones (*Tabla 4*) de acuerdo con lo reportado por Kim et al (1998).

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Regulador de Crecimiento</b>
<i>Aislamiento</i>	Completo	-
<i>MS</i>	A la mitad	-
<i>Inducción de brotes adventicios</i>	A la mitad	-
<i>WPM</i>	A la mitad	-
<i>WPM</i>	A la mitad	TDZ 1ppm.
<i>WPM</i>	A la mitad	TDZ, ANA, BAP (1ppm.)

*Tabla 4: Medios de cultivo que se utilizaron para F. pennsylvanica.*

*Palo borracho (Ceiba sp.)*

Etapa 0: las plantas madres fueron seleccionadas al azar del arbolado público de la Ciudad de La Plata, siguiendo las recomendaciones para plantas madres del manual "*Plantas de probeta*" (Sharry et al., 2015).

Etapa 1: como explante se utilizaron los **botones florales** cerrados, recolectados en el mes de marzo de 2018 (*Imagen 7*).



*Imagen 7: Botones florales de Ceiba sp.*

Los botones florales se bañaron en Etanol 96° y con ayuda de pinzas bayoneta se esterilizó la superficie flameándolos inmediatamente en el mechero por 3 segundos, girando el explante arriba y abajo una vez por segundo. Para apagar la llama se los sumergió en un frasco con agua estéril. Todo esto se realizó bajo campana de flujo laminar.

Etapa 2. Se realizó la disección de los botones en androceo y gineceo. Se colocaron en medio de *cultivo de aislamiento*, el cual contiene únicamente agar, azúcar y agua en condiciones estandarizadas, durante una semana. Luego se repicaron a un medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) cuya composición se detalla en el ANEXO N°2 a la mitad de la concentración suplementado con 1,5 ppm.

de ácido 2,4-Diclorofenil acético y 1 g/L de carbón activado. El medio se dispensó en placas de Petri como se enunció anteriormente. Luego se colocaron en oscuridad para la inducción de formación de callos y posible embriogénesis somática.

*Alcornoque (Quercus suber L.)*

Etapa 0: las planta madres fueron dos árboles adultos en la ciudad de La Plata ubicados uno en el jardín de la memoria sito entre las facultades de Ciencias Veterinarias y Ciencias Agrarias y Forestales, y otro en la Facultad de Periodismo y C.V. de la UNLP (*Imagen 8*).



*Imagen 8: A la izquierda: ejemplar de la Facultad de Periodismo. A la derecha: ejemplar del Jardín de la memoria.*

Se recolectaron ramas gruesas, las cuales fueron seccionadas según diámetro a las cuales se les realizaron diferentes tratamientos con la finalidad de obtener brotes de yemas epicórmicas o yemas axilares. Inicialmente todas fueron lavadas con cepillo y jabón blanco bajo agua de la canilla. Las ramas más gruesas y las medianas, sin hojas, se colocaron de manera horizontal en bandejas con perlita previamente esterilizada en autoclave según indica la técnica de *Forced-Flushing* (Meier-Dinkel, et al.; 1993) y las ramas más finas, con hojas, se sumergieron las bases en una solución

con mezcla de 6-BAP en una concentración de 1ppm y ANA en la misma concentración, en agua destilada (*Imagen 9*).



*Imagen 9: A la izquierda, estacas en Forced-Flushing. A la derecha, estacas en solución.*

A todas las ramas se las asperjó con fungicida 1 cápsula Captan® comercial en un litro de agua destilada y la solución 6-BAP&ANA 1ppm. dos veces por semana, 15 gatilladas por cada bandeja y por cada solución. Luego de aproximadamente un mes se obtuvieron los brotes que fueron acondicionados en el paso siguiente.

*Etapa 1:* El tipo de explante utilizados fueron **brotes de un mes** (Fernández-Guijarro et al., 1995). Para ello se realizaron una serie de desinfecciones que se presentan en la *Tabla 5*. Una vez en el flujo laminar y previo a la introducción *in vitro*, los explantos se enjuagaron mínimo tres veces con agua destilada estéril.

Desinfección	Con contaminación			Sin contaminación
	Hongos	Bacterias	Hongos y Bacterias	
30'agua+jabón blanco+detergente, 45' fungicida, 1' agua oxigenada 10 vol., 2' Etanol 70º y 40' NaClO 30%	20	-	-	-
30'agua+jabón blanco+detergente, 40' fungicida, 5' Etanol 70º y 40' NaClO 30%	23	-	-	7*
30'agua+jabón blanco+detergente, 40' fungicida, 10' Etanol 70º y 40' NaClO 30%	20	1	-	5*
30'agua+jabón blanco+Tween 80, 30' fungicida, 1' Etanol 70º y 15' NaClO 30%	30	-	-	-
Lavado con agua, cepillo y detergente, 70' fungicida, 1' Etanol 70º y 40' NaClO 30%	80	8	-	-

\*: cuando se cambiaron de medio de aislamiento a uno mas complejo proliferó la contaminación.

Tabla 5: Número de explantes contaminados luego de los diferentes protocolos de desinfección empleados para *Q. suber*.

Se utilizó el medio WPM a la mitad de la concentración suplementado con 0,5 ppm. de Thidiazurón (TDZ) que es una citocinina empleada para inducir la formación de brotes adventicios y promover la proliferación axilar. El medio fue dispensado en placas de Petri de plástico estériles.

*Tomillo del campo (Acantholippia seriphioides (A. Gray) Moldenke).*

Etapa 0: se utilizaron cinco plantas madres seleccionadas al azar situadas en un establecimiento privado sobre la Ruta Provincial N° 51 en la localidad de Río Negro (*Imagen 1, pág. 21*). El material recolectado incluía las semillas en sus respectivas cápsulas e impurezas.

Etapa 1: como explanto se utilizaron las **semillas** (*Imagen 9*). Las mismas se seleccionaron descartándose las que poseían coloración marrón oscuro ya que se

encuentran vanas o secas y se utilizaron las que presentan colores verdosos. Estas semillas fueron acondicionadas mediante la remoción de cápsulas, a mano y con pinzas. Una vez las semillas estuvieron listas se procedió a realizar la desinfección propiamente dicha.



*Imagen 10: A la izquierda, cápsulas con semillas de A. seriphioides. A la derecha, semilla limpia, sin cápsula.*

De acuerdo con protocolos ya ajustados para otras especies dentro del proyecto de investigación, se probaron diferentes protocolos de desinfección resumidos en la *Tabla 6*. Finalmente, las semillas se lavaron tres veces con agua estéril y se procedió a la siembra en el medio de cultivo y en condiciones asépticas.

- 2 hs. Agua caliente -1' Etanol 70º -15' Hipoclorito de Sodio 5%	16
- 2 hs. Agua caliente -1' Etanol 70º -15' Hipoclorito de Sodio 10%	16
- 2 hs. Agua caliente -1' Etanol 70º -15' Hipoclorito de Sodio 15%	16

-1 h. Agua caliente+ 1 gota detergente+ jabón blanco -1' Etanol 70º -15' Hipoclorito de sodio 20%	16
-1 h. Agua caliente+ 1 gota detergente+ jabón blanco -1' Etanol 70% -15' Hipoclorito de sodio 25%	16
-1 h. Agua caliente+ 1 gota detergente+ jabón blanco -1' Etanol 70º -15' Hipoclorito de sodio 30%	16
-1 h. Agua caliente+ 1 gota detergente+ jabón blanco -1 Noche en fungicida Captan polvo mojable -1' Etanol 70º -5' Hipoclorito de sodio 15%	16
-1 día fungicida Captan polvo mojable -20' Hipoclorito de sodio 2%	16
- 36 hs. AG3 3ppm. -3hs. Fungicida -5' Hipoclorito de sodio 1%	16
- 3 días AG3 3ppm. -1 noche Fungicida -5' Hipoclorito de sodio 1%	16
- 3 días AG3 3ppm. -1 noche Fungicida -30' Agua +Jabón blanco -1' Etanol 70º -5' Hipoclorito de sodio 1%	16
- 3 días AG3 3ppm. -1 noche Fungicida -30' Agua +Jabón blanco -1' Etanol 70º -25' Hipoclorito de sodio 2%	8
- 3 días AG3 3ppm. -1 noche Fungicida -30' Agua +Jabón blanco -1' Etanol 70º -3' Hipoclorito de sodio 1%	16
- 3 días AG3 3ppm. -1 noche Fungicida -30' Agua +Jabón blanco -1' Etanol 70º -2' Hipoclorito de sodio 1%	32

- 3 días AG3 3ppm. -1 noche Fungicida -30' Agua +Jabón blanco -1' Etanol 70º -2' Hipoclorito de sodio 1%	16
- 3 días AG3 3ppm. -1 noche Fungicida -30' Agua +Jabón blanco -1' Etanol 70º -5' Hipoclorito de sodio 1%	16
- 3 días AG3 3ppm. -30' Agua +Jabón blanco -1 h. Fungicida -1' Etanol 70º -5' Hipoclorito de sodio 1%	16
-1 noche mezcla de fungicidas (1ml. De Kasumyn+1 capsula Benomil polvo mojable en 500ml de agua destilada) +Tween80® - 20' BacterAction -30" Etanol 70º - 1' Hipoclorito de sodio 1%+Tween80®	32

*Tabla 6: Diferentes protocolos de desinfección para A. seriphioides.*

Etapa 2. La siembra de las semillas esterilizadas se realizó en medio de cultivo de Murashige & Skoog (1962) a la mitad de la concentración y modificado según la *Tabla 2 (pág. 25)* en ausencia de reguladores de crecimiento. El medio fue dispensado en tubos de ensayos de vidrio.

## RESULTADOS y DISCUSION

*Viraró (Pterogyne nitens Tul.)*

Inicialmente se siguió el protocolo citado por Molina et al. (2015), sin embargo, el mismo no fue efectivo. Según Gratton & Fay (1990), de acuerdo con el genotipo y tipo de explante se han generado para el establecimiento aséptico diferentes protocolos de desinfección, esto implica que el genotipo, explante y podemos agregar también al ambiente en el que se encuentra la planta madre, tienen una alta incidencia

en el proceso de desinfección. Para buscar una solución se probaron variantes de la desinfección, detalladas en la *Tabla 7* siendo 100% efectiva el proceso que se describe a continuación: las semillas limpias fueron desinfectados sumergiéndolas dos noches en una mezcla de fungicidas (1ml/50ml de Kasumyn® y 1 cápsula Captan® comercial) con una gota de tensioactivo Tween80®, esta solución se cambió la noche previa a la siembra, luego se colocaron en etanol 70° durante un minuto y finalmente se pasaron a hipoclorito de sodio comercial (55% de cloro activo) al 10% por 5 minutos. Por último, se llevaron las semillas bajo flujo laminar dónde se realizaron tres lavados con agua estéril y se procedió a la siembra en medios de cultivo y en condiciones asépticas.

8	100%	-	
8	100%	-	
16	100%	-	
16	-	100%	

*Tabla 7: Diferentes protocolos de desinfección para P. nitens.*

A cinco días de la siembra comenzó la germinación de las semillas de las cuales emergieron plántulas vigorosas. Una vez expandido el primer par de hojas, las plántulas se pasaron a condiciones de *ex vitro*, para su rusticación. Las mismas, con las raíces libres de agar, se pasaron a envases con sustrato compuesto por perlita, turba y vermiculita en una proporción 1:1:1. Posteriormente se las cubrió con una bolsa transparente, que fue abriéndose lentamente para que la rusticación sea eficiente y evitar la muerte de la plántula.

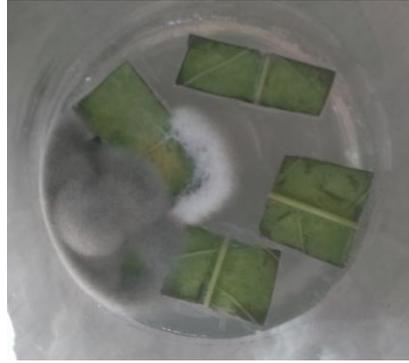
Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron ajustar un protocolo de desinfección de semillas, y posterior introducción *in vitro* para obtener plantas axénicas, que luego serán fuente de explantes para la multiplicación. Este es un primer paso para ajustar un protocolo de micropropagación.

Además, la germinación *in vitro* es una técnica que posibilita el rescate de especies que presentan dificultades para germinar a campo (Cantos et al., 2001).

Las técnicas de germinación *in vitro* son también una solución alternativa complementaria para el sector forestal en el corto plazo. Así, se ha demostrado que estas técnicas son importantes en los programas de protección y conservación de especies que presentan dificultades de propagación sexual, viabilidad, escasez de semillas, cruzamientos interespecíficos, latencia prolongada y problemas de recalcitrancia (Shibu & Gillespie, 1998; Benson, 2000; Azofeifa, 2009)

#### *Fresno americano (Fraxinus pennsylvanica Marshall)*

Los protocolos de desinfección aplicados a los explantes de fresno, no dieron resultados positivos. Desafortunadamente el 100% de los explantes provenientes de todos los protocolos de desinfección estuvieron infectados en un 43% por hongos y un 57% por bacterias (*Imagen 11*). Esto es muy común en el cultivo *in vitro* de leñosas. En primer lugar, no existe mucha información sobre el cultivo *in vitro* de *Fraxinus pennsylvanica* M. usando los segmentos nodales como explantes iniciales. Trabajos previos como el de Du & Pijut (2008) y Kim et al. (1997) parten de la obtención de plantas madre mediante la germinación de semillas previamente desinfectadas y sembradas *in vitro* en medios de cultivo, en condiciones controladas y completamente asépticas. El objetivo de usar directamente explantes nodales es que se buscaba clonar individuos masculinos, para plantaciones clonales. El uso de ejemplares masculinos presenta ciertas ventajas, principalmente como no producen frutos, no obstruyen cañerías de desagüe ni generan residuos en la vía pública. Al mismo tiempo presenta ciertas características tipológicas que lo hacen más interesante, como una copa más compacta, mayor uniformidad en el amarillo otoñal y mayor densidad de follaje (Serra, 2017).



*Imagen 11: Explantos de F. pennsylvanica contaminados.*

La contaminación de los explantes es algo común en CTV. Fuentealba Jara (2016), encontró que en el cultivo *in vitro* de yemas axilares de *Orites myrtoidea*, las mismas presentaron 100% de contaminación a los tres días de establecer el cultivo además de presentarse oxidación en todas las yemas. En relación al cultivo de hojas de *Orites myrtoidea* y *Maytenus chubutensis*, todas presentaron necrosis (Fuentealba Jara, 2016)

Otro factor que influye en la contaminación corresponde a la presencia de bacterias endófitas en las plantas madre, lo cual torna muy complicada la completa limpieza de los explantes. Las bacterias endófitas, pasan a ser vitropatógenos, una vez que se introduce el explante *in vitro*, compitiendo con éste en el uso de nutrientes y produciendo la necrosis.

#### *Palo borracho (Ceiba sp.)*

Los resultados obtenidos con el Palo Borracho fueron muy promisorios. La desinfección fue eficiente y después de 15 días de cultivo en oscuridad se formaron callos friables que pueden observarse en la *Imagen 12*. Estos callos se sub-cultivaron a un medio de cultivo de inducción de embriogénesis, compuesto por las sales de WPM (McCown, 1981) a la mitad de la concentración salina, donde se observó la formación de pro-embriones. Actualmente estos cultivos continúan en oscuridad, para inducir la proliferación y maduración de los ES.



Imagen 12: Formación de callos en explantes de *Ceiba* sp.

El uso de botones florales para inducir ES es poco común, pero se utiliza mucho para la propagación de cacao. Así, por ejemplo, Urrea Trujillo et al. (2011) indujeron ES a partir de explantes florales en dos clones de *Theobroma cacao*. La ES de palo borracho aún no ha sido reportada, por lo que este estudio exploratorio podría llevar al ajuste de un protocolo a partir de un explante no utilizado comúnmente en micropropagación.

#### *Alcornoque (Quercus suber L.)*

El objetivo de esta parte del trabajo fue clonar un ejemplar histórico del predio de UNLP. Se introdujeron explantes *in vitro* siguiendo el protocolo de Toribio et al. (2005) y nos contactamos con este grupo de trabajo para compartir la experiencia. Esta es una especie muy recalcitrante al CTV.

Los brotes obtenidos del *Forced-Flushing* siguiendo el protocolo aplicado en España, no pudieron ser desinfectados. Esto puede deberse a que existe interacción entre el genotipo y el ambiente, o sea, las condiciones ambientales son diferentes a los alcornoques propagados en España. En la *Imagen 13* se observan los explantes inmediatamente después de la introducción *in vitro*, luego de una semana sufrieron la contaminación con hongos, principalmente. Es conocido que muchos de los protocolos de CTV establecidos presentan baja reproducibilidad debido al genotipo, vía de regeneración, condiciones del explante y ambiente (Castañeda Castro et al., 2014). Por otra parte, otros autores reportaron que los medios minerales de bajas

concentraciones iónicas, como los de Sommer y Heller, han mostrado ser más adecuados para el crecimiento y proliferación de los explantos leñosos. La presencia de citoquininas (Bencil adenina) es necesaria en esta fase. La adición de auxina (ácido naftalen-acético ) mejora la tasa de multiplicación, especialmente en material de origen adulto. Es por esto, que aún continúan los trabajos para lograr establecer *in vitro* explantes de árboles maduros (de ejemplares históricos) de alcornoque.



Imagen 13: Explantes luego de la siembra.

*Tomillo del campo (Acantholippia seriphioides (A.Gray) Moldenke)*

Se evaluaron diferentes agentes y tiempos de desinfección y promotores de la germinación para obtener plántulas *in vitro* (Tabla 8).

16	100%	0%
16	100%	0%
16	100%	0%
16	100%	0%

16	100%	0%
16	100%	0%
16	100%	0%
16	100%	0%
16	100%	0%
16	100%	0%
16	90%	1%
8	100%	0%
16	100%	0%
32	100%	0%

16	100%	0%
16	100%	0%
16	88%	22%
32	0%	100%

*Tabla 8: Resultados para los protocolos de desinfección de A. seriphioides.*

El protocolo ajustado fue una mezcla de fungicidas (1ml/50ml de Kasumyn® y 1 cápsula/L. de Captan® comercial) con una gota de tensioactivo Tween80® por una noche. Luego se sumergieron en un bactericida de amplio espectro, de uso comercial para la industria alimenticia (BacterAction®) durante 20 minutos. Posteriormente, las semillas se sumergieron en Etanol al 70% durante 30 segundos, en agitación y como último paso se colocaron en una solución de Hipoclorito de Sodio al 1% durante un minuto, con una gota de Tween80®. Finalmente, las semillas se lavaron tres veces con agua estéril y se procedió a la siembra en el medio de cultivo y en condiciones asépticas.

El porcentaje de desinfección fue de  $95 \pm 2$  % y se obtuvieron plántulas por germinación *in vitro*, las cuales se mantuvieron en medio de cultivo MS  $\frac{1}{2}$  sin reguladores de crecimiento. El resultado es interesante, ya que hubo pérdida de dominancia apical y rejuvenecimiento, con proliferación de múltiples brotes por plántula. Esto permitiría escalar la propagación, observándose un aparente aumento en la producción de aceite esencial, lo que podría representar otro producto de interés comercial.

Las semillas de Tomillo del campo germinaron luego de una semana de siembra *in vitro*, (*Imagen 14*). El porcentaje de germinación fue bajo, solo un 2-4% de las semillas germinaron bajo las condiciones testeadas. Los posibles motivos de tan bajo porcentaje pueden deberse a la presencia de aceites aromáticos, que resultan oxidantes en el cultivo *in vitro*. González et al. (2016), marcan la presencia de los siguientes compuestos en el Tomillo del campo, variando su presencia/ausencia y grado de aparición según la procedencia: gamma terpineno - p-cimeno - timol – carvacrol, geraniol - linalol, limoneno - carveol - carvona - cis y trans dihidrocarvona. Otra de las posibles causas puede ser que la especie presente un bajo poder germinativo, para aseverar esto deberían realizarse test de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio.



*Imagen 14: Plántula in vitro de A. seriphioides*

El estudio de esta planta, arbusto leñoso nativo, se complementó con la macropropagación. Se establecieron estacas previamente sumergidas en fungicida durante 24 h y en una solución enraizante comercial a base de ANA. Las estacas se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente. Por el momento no produjo el enraizamiento. También se iniciaron estudios bioecológicos y fenológicos. Se detectó la presencia de al menos siete artrópodos parásitos (actualmente en determinación) y se logró optimizar la cosecha de semillas de esta especie mediante una metodología innovadora conservativa. Teniendo en cuenta que esta especie está actualmente en peligro de extinción, la presencia de estos artrópodos tiene una especial relevancia ecológica dado que parasitan, entre otros, los frutos y ello perjudica la reproducción de

esta especie en condiciones naturales por germinación. Estos organismos fueron enviados a un entomólogo especialista, para su identificación.

A modo de resumen se confeccionó la *Tabla 9* donde se presentan los resultados obtenidos en todas las especies que se trataron en este trabajo final.

ESPECIE	DESINFECCION		RESULTADO
	Si	No	
<i>Pterogyne nitens</i> Tul.	x		Germinado y en proceso de inducción de callos
<i>Fraxinus pennsylvanica</i> Marshall		x	No se superó la fase de desinfección.
<i>Ceiba sp</i>	x		En proceso de inducción de callos
<i>Quercus suber</i> L.		x	No se superó la fase de desinfección.
<i>Acantholippia seriphioides</i> (A.Gray) Moldenke	x		Germinada

*Tabla 9: Resultados finales de todas las especies realizadas.*

## CONCLUSIONES

Los recursos genéticos forestales, son de gran importancia económica, social y ambiental. En el caso de las plantas, para su propagación se utilizan diferentes vías, las cuales se relacionan con la especie, los recursos y las tecnologías disponibles. Este trabajo se realizó con el objetivo de aplicar diferentes métodos de propagación *in vitro* y para ello, se probaron diferentes explantes, protocolos de desinfección y medios de cultivo para cada una de las distintas especies. Se buscó superar el cuello de botella que implica la desinfección y establecimiento de los explantes en los medios de cultivo para lograr el establecimiento del cultivo. Se avanzó, también, en la inducción de callos embriogénicos, con la finalidad de obtener varios individuos por cada explanto. En algunos de los casos (Tomillo del campo y Viraró), el cultivo *in vitro* se mostró como un método eficaz para mejorar la respuesta a la germinación. Este hecho es de gran importancia para la mejor conservación y propagación de las mismas.

Actualmente se continúa trabajando en estas especies enmarcadas en el proyecto 11/A303. Es de gran importancia avanzar en las metodologías *in vitro*, en particular con las vulnerables como el Tomillo del campo, para contribuir a la conservación y propagación de los recursos genéticos forestales.

## ANEXOS

### ANEXO 1: Composición del medio de Murashige T. & Skoog S.

Compuesto	MS mg/lit (mM)
<b>Macro nutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 (20.6)
KNO <sub>3</sub>	1900 (18.8)
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370 (1.5)
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440 (2.99)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 (1.25)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	—
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—
<b>Micro nutrientes</b>	
KI	0.83 (0.005)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 (0.1)
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3 (0.13)
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6 (0.029)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25 (0.01)
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025 (0.0001)
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025 (0.0001)
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3 (0.1)
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8 (0.1)
NiSO <sub>4</sub> . 6H <sub>2</sub> O	—
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	—

**ANEXO 2:** Composición del Woody Plant Medium.

	WPM (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Nutrimento</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400
Mg SO <sub>4</sub>	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	96
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	556
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990
KNO <sub>3</sub>	
<b>Quelatos</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	37.2
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8
<b>Microelementos</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
Mn SO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6
Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.25

### ANEXO 3: Publicaciones, cursos y exposiciones realizadas.

- 2018. Selection and propagation of native tree species for improving ecological restoration. Galarco S; Romero Alves M; Boeri P. Roussy L., Adema A., Villarreal B., Briones MV; Basiglio Cordal MA; Cinquetti T., Ramilo D. and Sharry S. "Forest Conservation: Methods, Management and Challenges", in course by Nova Science Publishers, Long Island, USA ([www.novapublishers.com/catalog/index.php](http://www.novapublishers.com/catalog/index.php)). En prensa.
- 2018. Cinquetti T., Romero Alves M., Sharry S. *In vitro* germination of *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R.Br. Poster aceptado para presentar desde el 10 al 15 de Septiembre de 2018 en la 5ta. Conferencia internacional de IUFRO, división 2.09.02 "Árboles clonados en la era de la Bioeconomía" en Coimbra (Portugal).
- 2018. Romero Alves M., Cinquetti T. y Sharry S. Induction of somatic embryogenesis in *Chorisia speciosa* St. Hill. Poster aceptado para presentar desde el 10 al 15 de Septiembre de 2018 en la 5ta. Conferencia internacional de IUFRO, división 2.09.02 "Árboles clonados en la era de la Bioeconomía" en Coimbra (Portugal).
- 2018. Biotecnología y biodiversidad: dialogo de saberes, EDULP, Varios autores latinoamericanos Sharry S. Y Trujillo I. Eds.
- 2017. Oradora en el I Workshop rionegrino sobre métodos y tecnologías d propagación vegetativa en el marco del cambio climático. 21 de noviembre de 2017. Ciudad de S.C. de Bariloche.
- 2017. Histological analysis of somatic embryogenesis of *Melia azedarach* L. and *Prosopis alpataco* Phil". Boeri P, Arambarri A, Colares M, Romero Alves M, Dalzotto D, Rangel Cano R, Cabrera Ponce JL, Barrio D, Sharry S. *In: Proceedings Development and Application of Vegetative Propagation technologies in Plantation Forestry to Cope with a Changing Climate and Environment Yill-Sung Park & Jean-François Trontin* First published: Online edition. Disponible en: <https://www.iufro.org/es/science/divisions/division-2/20000/20900/20902/publications/>

- Exposición práctica sobre repique de orquídeas *in vitro* en la Expo Universidad, La Plata, 2017.
- 2017. Colaboradora en la parte práctica del Curso de introducción a la propagación vegetal. Ex CEProVe, FCAyF, UNLP.

## BIBLIOGRAFIA

- **Abedini, W.; Boeri, P.; Marinucci, L.; Scelzo, L.; Abedini, W. & Ruscitti, M.** 2000. Biotécnicas aplicada a especies forestales nativas. *INIA* 9(1):31-43.
- **Avilés, Z., Vacca Molina, M., & Bonomo de Villa, M. L. C.** 2009. Establecimiento *in vitro* de Tipa Colorada (*Pterogyne nitens* Tull.). In VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO-Argentina. pp. 20-24.
- **Azofeifa, A.** 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1):153 - 175.
- **Barbón, R., Borroto, I., Pérez, M., & La, O.** 2011. Embriogénesis somática de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. En medios de cultivo semisólidos. *Revista Forestal Baracoa*.
- **Benassi, A.H., Opel R.J., Frangi P.C., De Martino, C., Roussy L.M. & Piñol M.** 2006. El sitio. Planeamiento y Diseño del paisaje. Cátedra de planeamiento y diseño del paisaje, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. Buenos Aires, Argentina.
- **Benson, E. E.** 2000. Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance, an introduction. *In vitro Cell Dev. Biol Plant*. 36:141 - 148.
- **Boeri, P.** 2017. Bioprospección química y propagación de plantas nativas del monte patagónico como estrategias de conservación y uso sustentable. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP.
- **Cantos, M.; Liñán, J.; Troncoso, J. & Apa, A.** 2001. El cultivo *in vitro*, un método para mejorar la germinación de plantas con interés forestal en Andalucía. En: Sociedad Española de ciencias forestales, ed. Proceedings of the III Congreso Forestal Español on Montes para la Sociedad del nuevo milenio, 2001 septiembre 25-28. Granada, España. Available in [www.congresoforestal.es/fichero.php?t=41725&i=1778&m=2185](http://www.congresoforestal.es/fichero.php?t=41725&i=1778&m=2185).
- **Castañeda-Castro, O.; Gómez-Merino, F. C.; Trejo-Téllez, L. I.; Morales-Ramos, V.; González-Arno, M. T.; Martínez-Ocampo, Y. M.; Gámez-Pastrana, R.; Pastelín-Solano, M. C.** 2014. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar. *Agroproductividad*, vol. 7, no 2.

- **Castillo, A.** 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay. 8p.
- **Commission on genetic resources for food and agriculture organization of the United Nations.** 2014. The state of the world's forest genetic resources. Rome. E-ISBN 978-92-5-108403-8.
- **Daquinta, M.; Ramos L.; Lezcano Y.; Rodriguez R. & Escalona M.** 2000. Algunos elementos en la micropropagación de la teca. *Biotecnología vegetal* 1(1): 39-44.
- **Dimitri, M. J.; Leonardis, R. F.; Biloni, J. S.** 2000. El nuevo libro del árbol. Especies forestales de la Argentina oriental. Tercera edición. Tomo II. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, p120.
- **Duarte, R.A., Mello, E.R., Araki, C.; da Silva Bolzani, V.; Siqueira e Silva, D. H.; Regasini L. O.; Alves Silva T. G.; Cafundó de Moraes, M. C. & Farias Ximenes, V.** 2010. Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line. *Tumor Biol.* 31: 513. <https://doi.org/10.1007/s13277-010-0064-2>. Online ISSN 1423-0380. Springer Netherlands.
- **Du, N., & Pijut, P. M.** 2008. Regeneration of plants from *Fraxinus pennsylvanica* hypocotyls and cotyledons. *Scientia horticultrae*, 118(1), 74-79.
- **Endress, R.** 1994. *Plant cell biotechnology*. Germany: Springer-publishing Company.
- **Ferl, R., Paul A. L.** 2000. Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.
- **Fernández-Guijarro, B., Celestino, C., & Toribio, M.** 1995. Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 41(2), 99-106.
- **Fracassi, N. G.; Pereira, J. A.; Mujica, G.; Hauri, B. & Quintana, R. D.** 2017. Estrategias de conservación de la biodiversidad en paisajes forestales del Bajo Delta del Paraná-uniendo a los actores clave de la región. *Mastozoología neotropical*, vol. 24, no 1, p. 59-68.
- **Fuentealba Jara, I. S.** 2016. Germinación *in vitro* de *Orites Myrtoidea* (Proteaceae) y *Maytenus Chubutensis* (Celastraceae). *Especies vegetales*

insuficientemente conocidas de la Flora de Chile. Doctoral dissertation, Universidad de Concepción. 62 pp.

- **Galarco S.; Romero Alves M.; Boeri P.; Roussy L.; Adema A.; Villarreal B.; Briones M.V.; Basiglio Cordal M.A.; Cinquetti T., Ramilo D. & Sharry S.** 2018. Selection and propagation of native tree species for improving ecological restoration. "Forest Conservation: Methods, Management and Challenges", in course by Nova Science Publishers, Long Island, USA ([www.novapublishers.com/catalog/index.php](http://www.novapublishers.com/catalog/index.php)) in Press.
- **George, E. F., & Sherrington, P. D.** 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd.
- **Gonzalez S. B.; Guerra, P. E.; Van Baren, C. M.; Di Leo Lira, P. M. D.; Retta, D. S. & Bandoni, A. L.** 2016. Variabilidad química del "tomillo silvestre" (*Acantholippia seriphoides*, Verbenaceae) en la meseta Patagónica. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 15 (1): 61 - 68. ISSN: 0717 7917.
- **Gratton J., Fay M.F.** 1990. Vegetative propagation of cacti and other succulents *in vitro*. En: Pollard J.W., Walker J.M. (eds) Plant Cell and Tissue Culture. Methods in Molecular Biology™, vol 6. Humana Press. Online ISBN 978-1-59259-493-1.
- **Harry, I. S., & Thorpe, T. A.** 1994. *In vitro* culture of forest trees. In Plant cell and tissue culture (pp. 539-560). Springer, Dordrecht.
- **Hernández, Y., & González, M. E.** 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. Cultivos Tropicales, 31(4).
- **Keenan, R. J., Reams, G. A., Achard, F., de Freitas, J. V., Grainger, A., & Lindquist, E.** 2015. Dynamics of global forest area: Results from the FAO Global Forest Resources Assessment 2015. Forest Ecology and Management, 352, 9-20.
- **Kim, M. S., Schumann, C. M., & Klopfenstein, N. B.** 1997. Effects of thidiazuron and benzyladenine on axillary shoot proliferation of three green ash (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.) clones. Plant cell, tissue and organ culture, 48(1), 45-52.
- **Kim, M. S.; Klopfenstein, N. B.; Cregg, B. M.** 1998. *In vitro* and *ex vitro* rooting of micropropagated shoots using three green ash (*Fraxinus pennsylvanica*) clones. New Forests. Vol. 16, no 1, p. 43-57.

- **Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L.** 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. 258 p.
- **Linford, J.** 2009. Árboles. Ed. Parragon. ISBN: 978-1-4075-6772-3. 255 pp.
- **López, M.** 1996. Estudio de la expresión genética durante la embriogénesis somática en *Saccharum officinarum* y su relación con el ácido abscísico y la sequía. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Genética. España. 138 pp.
- **Luque, L. E., & Ravelo, A. C.** 2009. El cultivo de fresno (*Fraxinus pennsylvanica* Marshall) y roble (*Quercus robur* L.) en el valle de Calamuchita, Córdoba, Argentina.
- **Manzanera, J. A.** 1990. Propagación vegetativa de plántulas de alcornoque (*Quercus suber* L.) por cultivo *in vitro*. Investigación Agraria. Prod Prot Veg, 5(3), 371-382.
- **Martínez, R.; Azpiroz, H. S.; Rodríguez, J. L.; Cetina, V. M. & Gutiérrez, M. A.** 2003. Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente [en línea]. Fecha de consulta: 18 de agosto de 2018 Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62990103>> ISSN 2007-3828.
- **McCown, B. H.** 1981. Woody Plant Medium (WPM) a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species. Hort. Sci., 16, 453.
- **Meier-Dinkel, A., B. Becker & D. Duckstein.** 1993. Micropropagation and *ex vitro* rooting of several clones of late-flushing *Quercus robur* L. Ann. Sci. For. 50, Suppl. 1:319--322.
- **Molina, M. V., Avilés, Z., Bonomo, M. L. C., & Díaz, L.** 2015. Efecto del picloram en la inducción de embriogénesis somática en *Pterogyne nitens* Tul." tipa colorada "Picloram effect on the induction of somatic embryogenesis in *Pterogyne nitens* Tul." tipa colorada". International Journal of Innovation and Applied Studies, 11(3), 771.
- **Murashige T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum. Vol. 15, no 3, p. 473-497.
- **Navarro, R.M. & Palacios G.** 2004. Efecto de la calidad de planta, el procedimiento de preparación y la fecha de plantación en la supervivencia de

- una repoblación de *Pinus pinea* L. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales 17: 199-204.
- **Parques nacionales.** Ficha técnica *Acantholippia seriphioides* (A. Gray) Moldenke: [https://sib.gob.ar/ficha/PLANTAE\\*acantholippia\\*seriphioides](https://sib.gob.ar/ficha/PLANTAE*acantholippia*seriphioides). Ultimo acceso: 22 de agosto de 2018.
  - **Perea, M. & Tirado, A.** 2011. Cultivo de tejidos *in vitro*. Manual de prácticas de laboratorio. Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 157 pp.
  - **Pérez Molphe Balch, E. M.; Ramírez Malagón, R.; Núñez Palenius, H. G. & Ochoa Alejo, N.** 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
  - **Perla González H.** 2007. Evaluación de métodos de desinfección y tipos de explante de la especie vegetal *Piper oradendron* Trel. & Standl., para el establecimiento de su cultivo *in vitro*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias químicas y farmacia. Guatemala.
  - **Quiala, E.; Cañal M.J.; Meijón M.; Rodríguez R.; Chávez M.; Valledor L.; de Feria M. & Barbón R.** 2012. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109(2): 223 – 234.
  - **Ramos Amaya J. E.** 2012. Avances de la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas. Universidad Nacional Abierta a Distancia (UNAD). Bogotá. 83 pp.
  - **Rivas, C., Abedini W. & Sharry S.** 2004. Propagación y conservación de recursos genéticos forestales en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Recursos Genéticos Forestales* Nro. 31. Italia. FAO. ISSN 1020-444X
  - **Rivera, S. & Galliusi, E.** 2006. El vivero Forestal. Boletín de divulgación técnica N°3. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP. La Plata.
  - **Roca, W. M & Mroginski, L.A.** 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas. (Roca, W. M.; Mroginski, L. A. eds.). CIAT. Cali. pag. 19- 40.
  - **Roussy, L. & Abedini, W.** 2012. Propagación y plantación de álamos y sauces a partir de estacas. Artículo. *Contacto Rural*; no. 2. ISSN: 1853-4252. Pp. 4-5.
  - **Serra, C.** 2017. Determinación de un protocolo de propagación por estacas de ejemplares masculinos de *Fraxinus pennsylvanica* Marshall para arbolado urbano. Trabajo final de Carrera. UNLP. La Plata.

- **Sharry, S. & Abedini, W.** 2014. Estrategias biotecnológicas aplicadas en la conservación de especies forestales nativas bonaerenses. ISSN 2362-6526 AGUSVINNUS N° 0. pp 36-60.
- **Sharry, S.; Abedini W.; Basiglio Cordal, M.A.; Briones M.V.; Roussy L.; Stevani R.; Galarco S. & Adema M.** 2011. Food and medicinal value of some forest species from Buenos Aires, Argentina. Emirates Journal of Food and Agriculture. 23. 222-236.
- **Sharry, S.; Adema, M. & Abedini, W.** 2015. Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Coordinación general: Sandra Sharry; Marina Adema; Walter Abedini. - 1a ed. adaptada. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata. ISBN 978-950-34-1254-1. 240pp.
- **Shibu, J. & Gillespie, A. R.** 1998. Allelopathy in black walnut (*Juglans nigra* L.) alley cropping spatiotemporal variation in soil juglone in a black walnut– corn (*Zea mays* L.) alley cropping system in the midwestern USA. Plant Soil. 203:191 - 197.
- **Toribio M., Celestino C. & Molinas M.** 2005. Cork oak, *Quercus suber* L. En: Jain S.M., Gupta P.K. (Eds.) Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Forestry Sciences, Vol. 77. Chapter 35, pp 445-457. Springer, ISBN: 1-4020-2984-5.
- **Toribio, M., & Celestino, C.** 2000. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. Forest Systems, 9(4), 249-260.
- **Torres Romero F. & Buitrago G.A.** 2013. Biotecnología aplicada en especies forestales. Revista MM. Pp 28-34.
- **Tortorelli, Lucas A.** 1956. Maderas y bosques argentinos. pp. 910.
- **Urrea Trujillo, A. I.; Atehortúa Garcés, L. & Gallego Rúa, A. M.** 2011. Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad colombiana élite de *Theobroma cacao* L. Revista Colombiana de Biotecnología, [S.l.], v. 13, n. 2, p. 39-50. ISSN 1909-8758. Disponible en:<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/27916/3831> 7. Último acceso: 18 ago. 2018.
- **Van Sambeek, J. W., & Preece, J. E.** 2007. *In vitro* propagation of *Fraxinus species*. In Protocols for micropropagation of woody trees and fruits (pp. 179-192). Springer, Dordrecht.

- **Vázquez Yanes, C.; Orozco, A.; Rojas, M.; Sánchez, M. E. & Cervantes, V.** 1997. La reproducción de las plantas. semillas y meristemas. México. Fondo de Cultura Económica. 1997. 170 p.
- **Villalobos, V. M., & Thorpe, T. A.** 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, 127-141.
- **Villavicencio Gutiérrez, E. E.; González Cortés, A. & Carranza Pérez, M. A.** 2012. Micropropagación de *Epithelantha micromeris* (Engelm.) FAC Weber ex Britt. & Rose cactácea ornamental y recurso fitogenético del desierto chihuahuense. Revista mexicana de ciencias forestales, 3(14), 83-102.
- **Yanchuk A.** 2002. Papel e implicaciones de la biotecnología en el sector forestal. Recursos Genéticos Forestales. FAO.