

CONSERVACIÓN *in vitro* DE GERMOPLASMA DE TÉ (*Camellia sinensis*)

SANDRA PATRICIA MOLINA

**Tesis presentada para optar al Grado Académico de Doctor en Recursos Naturales de
la Universidad Nacional del Nordeste**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

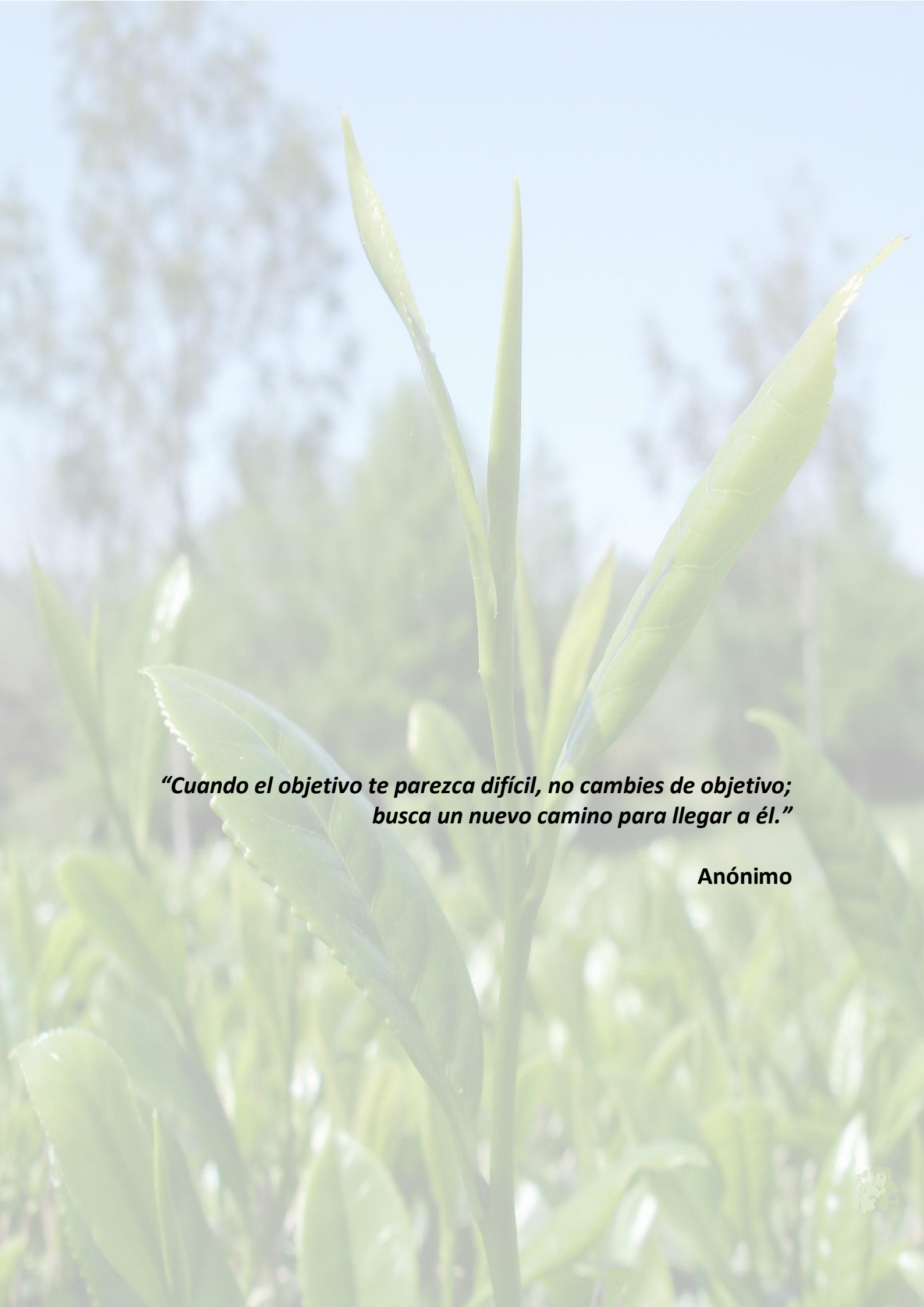
DIRECTOR: ING. AGR. LUIS A. MROGINSKI

CO-DIRECTORA: DRA. HEBE Y. REY

**Facultad de Ciencias Agrarias
Departamento de Botánica y Ecología
Cátedra Fisiología Vegetal**

Corrientes, Argentina - 2014

A mi familia,
por su continuo apoyo y confianza



***“Cuando el objetivo te parezca difícil, no cambies de objetivo;
busca un nuevo camino para llegar a él.”***

Anónimo

PUBLICACIONES

En revistas con referato

Molina, S.P.; Pérez, M.L.; Rey, H.Y.; Mroginski, L.A. 2013. Regeneración de plantas de té (*Camellia sinensis*) por cultivo *in vitro* de meristemas, yemas axilares y segmentos uninodales. Rev. FCA UNCUYO 45(1):127-134.

En redacción

Molina, S.P.; Pérez, M.L.; Rey, H.Y.; Mroginski, L.A. Crioconservación de germoplasma de té en Argentina.

Disertaciones

Sobre cultivo *in vitro* y conservación *in vitro* de germoplasma de té:

- Ante el Coord. del Programa Nacional de Cultivos Industriales, Coordinadores de Proyectos Integrados y Proyectos Específicos de Cultivos Industriales (INTA) – Septiembre 2009.
- Ante los Coord. de los Programas Nacionales de INTA – Mayo 2010.
- Ante el Coord. Nacional del Programa de Biotecnología (INTA) – Octubre 2010.
- Ante el Coord. del Programa Nacional de Cultivos Industriales, Coordinadores de Proyectos Integrados y Coordinadores y participantes de Proyectos Específicos de Cultivos Industriales (INTA) – Diciembre 2010.
- Reunión Técnica del Grupo de Yerba Mate y Té de la EEA Cerro Azul (INTA) – Septiembre 2011.

Charlas

Sobre cultivo *in vitro* y conservación *in vitro* de germoplasma de té:

- Ante Biotecnólogos de la Universidad Nacional de Tucumán – Noviembre 2013.
- Estudiantes universitarios de UNNE, UNaM, UNER, UNL, UNC, UNCuyo.

Comunicaciones en Congresos Internacionales

Molina, S.P.; Rey, H.Y.; Mroginski, L.A. 2009. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de té (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze): resultados preliminares. Actas del VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO-Argentina. II Congreso Internacional REDBIO-Argentina: 100; 2009. Del 20 al 24 de Abril de 2009. Rosario, Santa Fe, Argentina.

Presentaciones en Reuniones Científicas

Molina, S.P.; Kuzdra, H.J.; Rey, H.Y.; Mroginski, L.A. 2008. Explantes con capacidad embriogénica en té (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). XIX Reunión de Comunicaciones Científicas, Técnicas y de Extensión. Del 5 al 7 de Agosto de 2008. Corrientes, Argentina.

Molina, S.P.; Pérez, M.L.; Rey, H.Y.; Mroginski, L.A. 2010. Crioconservación de ejes embrionales de dos clones de té (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) seleccionados en Argentina. XXI Reunión de Comunicaciones Científicas, Técnicas y de Extensión. Del 4 al 6 de Agosto de 2010. Corrientes, Argentina.

Molina, S.P.; Pérez, M.L.; Rey, H.Y.; Mroginski, L.A. 2010. Efecto de la deshidratación de explantes en la crioconservación de dos clones de té (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) seleccionados en Argentina. Actas de la

XXVIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal: 85; 2010. Del 26 al 29 de Septiembre de 2010. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Molina, S.P.; Pérez, M.L.; Rey, H.Y.; Mroginski, L.A. 2011. Conservación a baja temperatura de segmentos uninodales de té. XXII Reunión de Comunicaciones Científicas, Técnicas y de Extensión. Del 3 al 5 de Agosto de 2011. Corrientes, Argentina.

Premio

Mejor Trabajo de Investigación “Crioconservación de ejes embrionales de dos clones de té (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) seleccionados en Argentina”. Presentado en la XXI Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas y Reunión de Extensión, Corrientes, Argentina. Agosto de 2010.

PREFACIO

Esta tesis es presentada como requisito para acceder al Grado Académico de Doctor en Recursos Naturales, de la Universidad Nacional del Nordeste. La misma ha sido realizada en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de la EEA Cerro Azul (INTA Regional Misiones) y en el Departamento de Botánica y Ecología de la Facultad de Ciencias Agrarias, perteneciente a la Universidad Nacional del Nordeste. Ha recibido financiación de INTA, a través de una Beca de Posgrado y del Proyecto Específico “Manejo Integrado Sustentable y Gestión Ambiental en Cultivos Industriales” del Programa Nacional de Cultivos Industriales. Además, recibió financiación de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

La tesis está dividida en seis capítulos.

El Capítulo 1, contiene una descripción general del cultivo de té, la importancia de su conservación, su problemática y los objetivos e hipótesis planteadas para este trabajo.

El Capítulo 2, desarrolla las metodologías de desinfección de explantes de té para su posterior introducción *in vitro*.

El Capítulo 3, describe la regeneración de plantas a partir de segmentos uninodales, yemas axilares y meristemas de té.

El Capítulo 4, presenta la regeneración de plantas a través de la embriogénesis somática de té, a partir de diferentes explantes.

El Capítulo 5, desarrolla la conservación *in vitro* de germoplasma de té a corto y mediano plazo.

El Capítulo 6, describe la conservación *in vitro* a largo plazo, evaluando semillas, embriones, ejes embrionales, segmentos uninodales y meristemas caulinares de té.

La bibliografía citada en el texto, se encuentra al final del manuscrito, en orden alfabético de autores.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento:

- A mi Director de Tesis, Ing. Luis Mroginski, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza y paciencia, fundamentales para la concreción de este trabajo. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora.

- A mi Co-Directora de Tesis, Dra. Hebe Rey, por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.

- A la Ing. María Laura Pérez, “Lala”. Por su valiosísima colaboración y compañerismo, por brindarme su amistad y abrirme las puertas de su casa.

- A todos los integrantes de la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), profesionales y técnicos y muy especialmente al Lic. Pablo Klusacek, Dr. Ricardo Medina, Dra. Natalia Dolce y técnicas Laura y Francisca, por facilitarme la integración y hacerme sentir una compañera más durante estos años de desarrollo de mi tesis.

- A la Dra. Ana Maria Gonzalez, de la Cátedra Morfología de Plantas Vasculares de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE), por disponer de su valioso tiempo enseñándome la metodología para realizar los cortes histológicos de embriones somáticos y su interpretación.

- A todos mis compañeros de trabajo de la EEA Cerro Azul (INTA), en especial a los Sres. José Carlos Giménez y Eduardo Verón por la realización de las tareas a campo y al Téc. Hipólito Kuzdra por su colaboración en laboratorio.

- Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, por financiar mi formación de Doctorado, a través de la Beca de Posgrado y otorgar los fondos para la realización de la tesis, a través del Proyecto Específico

“Manejo Integrado Sustentable y Gestión Ambiental en Cultivos Industriales” del Programa Nacional de Cultivos Industriales.

- A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) que financiaron parcialmente algunas actividades realizadas en esta tesis.

- Deseo también expresar todo mi agradecimiento a mi familia, por su apoyo incondicional a lo largo de este trayecto. Por último, dar las gracias a mis amigos y compañeros de trabajo que, de un modo u otro, han respaldado este esfuerzo.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue establecer protocolos que permitan la regeneración *in vitro* de té, a partir de diferentes explantes y que permitan la conservación de germoplasma a corto/mediano y largo plazo.

Debido a los problemas de contaminación, comunes en especies leñosas, fue necesario realizar previamente numerosos ensayos de desinfección, para lograr el éxito del establecimiento *in vitro*. Los resultados obtenidos mostraron que un factor muy importante fue la calidad de las plantas madre, las cuales deben ser manejadas mediante un estricto control nutricional y químico preventivo, evitando el mojado de la parte aérea de las plantas para disminuir la contaminación bacteriana.

La regeneración de plantas fue factible mediante el cultivo *in vitro* en medios muy simples de: meristemas, yemas axilares y segmentos uninodales. Para la obtención de los máximos valores de regeneración, fue necesaria la adición de por lo menos BAP, y/o CIN y/o AG₃, dependiendo del clon y del explante que se cultiva.

La mayoría de los clones evaluados fueron capaces de generar embriones somáticos, los cuales germinaron y permitieron obtener plantas. El único explante evaluado que demostró capacidad embriogénica fue la lámina de cotiledón. Para que se produzca la germinación de los embriones somáticos, fue necesaria la presencia en el medio de cultivo de hemisulfato de adenina y ácido L-glutámico, como fuente de nitrógeno orgánico.

La conservación de germoplasma a corto/mediano plazo, mediante la reducción de temperatura, fue posible hasta los 150 días con porcentajes de supervivencia relativamente altos. Los segmentos

uninodales y yemas axilares resultaron ser los explantes con mejores respuestas. En medios sub-óptimos, se podría conservar germoplasma de té hasta 120 días, sin que la capacidad de regeneración se vea afectada.

Para la conservación de germoplasma a largo plazo se desarrolló un procedimiento que permitió la conservación de ejes embrionales a través de la técnica de deshidratación. La técnica de vitrificación logró la regeneración de germoplasma crioconservado cuando se utilizaron ápices como explante.

ABSTRACT

The objective of this study was to establish protocols for *in vitro* regeneration from different explants of tea and short/medium and long term preservation of germplasm.

Due to contamination problems in woody species, many trials disinfection were required to achieve successful *in vitro* establishment of tea. The results showed that the quality of greenhouse plants was an important factor which should be managed by strict nutritional and chemical preventive. To reduce bacterial contamination it was important to avoid irrigation of the aerial part of the plants.

Plant regeneration was possible through *in vitro* culture of meristems, axillary buds and uninodal segments. For obtaining maximum values of regeneration the addition of BAP, and/or CIN and/or GA₃ was necessary, depending on explant and clone.

Most of the clones tested were able to generate somatic embryos which germinated and allowed to obtain plants. The only explant assessed with embryogenic capacity was slice of cotyledon. To germinate the somatic embryos, adenine hemisulfate and L-glutamic acid as a source of organic nitrogen in the culture medium was required.

Short/medium term preservation of germplasm by reducing temperature was possible with relatively high survival rates up to 150 days. Uninodal segments and axillary buds explants were the best explants. In suboptimal media, germplasm of tea could be conserved up to 120 days without any effect on the regeneration capacity.

For germplasm long-term preservation a procedure which allowed the preservation of embryonic axes through dehydration technique was

developed. Vitrification technique allowed regeneration of cryopreserved germplasm when shoot apical were used as explant.

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AG ₃	Ácido giberélico
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido α-naftalenacético
BAP	6-bencilaminopurina
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CIN	Cinetina
CIP	Centro Internacional de la Papa
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Eje embrional
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
EEC	Eje embrional con cotiledón
ES	Embrión somático
FAA	Formalina, ácido acético y etanol 70%, en las proporciones 5:5:90
HCl	Ácido clorhídrico
IBPGR	International Board for Plant Genetic Resources
INASE	Instituto Nacional de Semillas
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPGRI	International Plant Genetic Resources Institute
KOH	Hidróxido de potasio
MS	Sales minerales y vitaminas del medio de Murashige y Skoog
½ MS	MS diluido a la mitad
¼ MS	Un cuarto de la concentración del MS

NaClO	Hipoclorito de sodio
N ₂	Nitrógeno líquido
PEG	Polietilenglicol
PF	Peso fresco
PPM	Plant Preservative Mixture (biocida de amplio espectro)
PS	Peso seco
PVS2	Solución de vitrificación (glicerol 30%, DMSO 15%, etilenglicol 15% y sacarosa 0,4 M)
2,4-D	2,4-diclorofenoxiacético
% H _{PF}	Humedad en base al peso fresco

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES DE <i>Camellia sinensis</i>	1
1.1.1. Ubicación taxonómica y distribución geográfica	1
1.1.2. Descripción morfológica	3
1.1.3. Cultivo	12
1.1.4. Importancia	15
1.2 CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA	17
1.3 OBJETIVOS	26
1.3.1 Objetivo General	26
1.3.2 Objetivos Particulares	26
1.4 HIPÓTESIS	27

CAPÍTULO 2

2. DESINFECCIÓN DE EXPLANTES

2.1 INTRODUCCIÓN	28
2.2 MATERIAL Y MÉTODOS	29
2.2.1 Material vegetal	29
2.2.2 Protocolos de desinfección	31
2.2.3 Diseño experimental y análisis de los resultados	34
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
2.4 CONCLUSIONES	43

CAPÍTULO 3

3. REGENERACIÓN DE PLANTAS A PARTIR DE SEGMENTOS UNINODALES, YEMAS AXILARES Y MERISTEMAS

3.1 INTRODUCCIÓN	45
3.2 MATERIAL Y MÉTODOS	46
3.2.1 Material vegetal	46
3.2.2 Cultivo de explantes	47
3.2.3 Diseño experimental y análisis de los resultados	49
3.2.4 Enraizamiento de los vástagos regenerados	50

3.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
	50	
3.3.1	Cultivo de segmentos uninodales de té	50
3.3.2	Cultivo de meristemas y yemas axilares de té	56
3.3.3	Enraizamiento de vástagos regenerados <i>in vitro</i>	63
3.4	CONCLUSIONES	65

CAPÍTULO 4

4. REGENERACIÓN DE PLANTAS POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

4.1	INTRODUCCIÓN	66
4.2	MATERIAL Y MÉTODOS	68
4.2.1	Material vegetal	68
4.2.2	Origen y cultivo de explantes	68
4.2.3	Germinación de embriones somáticos	73
4.2.4	Diseño experimental y análisis de los resultados	74
4.2.5	Estudios histológicos	75
4.2.6	Transplante	75
4.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
4.3.1	Respuestas morfogénicas de los explantes extraídos de plantas adultas de 20 años de edad	76
4.3.2	Respuestas morfogénicas de los explantes obtenidos de plantas establecidas <i>in vitro</i>	83
4.3.3	Respuestas morfogénicas de los explantes obtenidos de plantas de 2 años de edad	84
4.3.4	Germinación de embriones somáticos	87
4.4	CONCLUSIONES	93

CAPÍTULO 5

5. CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE GERMOPLASMA – CONSERVACIÓN A CORTO/MEDIANO PLAZO

5.1	INTRODUCCIÓN	95
5.2	MATERIAL Y MÉTODOS	97
5.2.1	Material vegetal	97
5.2.2	Origen y cultivo de explantes	97
5.2.3	Técnicas de conservación	98

5.2.4	Diseño experimental y análisis de los resultados	100
5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
5.3.1	Conservación a baja temperatura	101
5.3.2	Conservación en medios sub-óptimos	105
5.4	CONCLUSIONES	107

CAPÍTULO 6

6. CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE GERMOPLASMA – CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO

6.1	INTRODUCCIÓN	109
6.2	MATERIAL Y MÉTODOS	111
6.2.1	Material vegetal	111
6.2.2	Origen y cultivo de explantes	111
6.2.3	Técnicas de conservación	113
6.2.4	Diseño experimental y análisis de los resultados	118
6.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	118
6.3.1	Conservación de semillas, embriones y ejes embrionales por el método de deshidratación	118
6.3.2	Conservación de meristemas por el método de vitrificación	130
6.4	CONCLUSIONES	135
	BIBLIOGRAFÍA	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Producción mundial de té en millones de kg.	3
Fig. 2. Plantación de té clonal (material seleccionado en la EEA Cerro Azul – INTA)	4
Fig. 3. Diferencias morfológicas de las hojas en las tres variedades de té.	6
Fig. 4. Diferencias en la morfología y tamaño de las hojas en variedades de té.	7
Fig. 5. Características de la flor de té	8
Fig. 6. Características del fruto de té	9
Fig. 7. Características de la semilla de té	10
Fig. 8. Partes de la planta de <i>Camellia sinensis</i>	11
Fig. 9. Detalle de una plantación joven de té y la protección contra la radiación.	13
Fig. 10. Cosecha de té.	14
Fig. 11. Tratamientos para la desinfección de segmentos uninodales de té.	36
Fig. 12. Desinfección de segmentos uninodales de té (cv. CH 14 INTA).	37
Fig. 13. Desinfección de segmentos uninodales de té (10 cultivares).	38
Fig. 14. Efecto de tratamientos de desinfección en el explante y en el medio de cultivo.	40
Fig. 15. Desinfección de segmentos uninodales de 10 cultivares de té.	41
Fig. 16. Contaminación bacteriana endógena en segmentos uninodales de té.	42
Fig. 17. Explantes uninodales de té en establecimiento.	43
Fig. 18. Aislamiento y cultivo de explantes de <i>Camellia sinensis</i> .	49
Fig. 19. Efecto del uso de 6-bencilaminopurina (BAP) en altas concentraciones.	52
Fig. 20. Tasa de multiplicación (número de brotes/explante) de segmentos uninodales, en 8 cultivares de té.	52
Fig. 21. Tasa de multiplicación a partir de segmentos uninodales, durante 3 ciclos de multiplicación en 8 cultivares de té.	53
Fig. 22. Efecto de reguladores de crecimiento sobre la regeneración de vástagos a partir de segmentos uninodales.	54
Fig. 23. Crecimiento de vástagos, a partir de segmentos uninodales.	56
Fig. 24. Efecto de reguladores de crecimiento sobre la regeneración	

de vástagos a partir de yemas axilares.	58
Fig. 25. Efecto de reguladores de crecimiento sobre la regeneración de vástagos a partir de meristemas.	60
Fig. 26. Crecimiento de los vástagos en medio de cultivo a partir de los diferentes explantes en té.	62
Fig. 27. Plantas de <i>Camellia sinensis</i> provenientes del cultivo <i>in vitro</i> de segmentos uninodales.	64
Fig. 28. Embriogénesis (%) en láminas de cotiledón de té, obtenidas a partir de semillas.	78
Fig. 29. Número promedio de embriones somáticos/explante en láminas de cotiledón de té.	80
Fig. 30. Embriones somáticos generados en láminas de cotiledón.	81
Fig. 31. Aspecto de callos obtenidos a partir del cultivo de pétalos de té.	83
Fig. 32. Formación de callos a partir del cultivo de hojas maduras provenientes de plantas establecidas <i>in vitro</i> .	84
Fig. 33. Respuestas morfogénicas en el cultivo de hojas inmaduras de té concentraciones de 2,4-D.	86
Fig. 34. Emisión de la raíz en embriones somáticos de té, generados a partir de láminas de cotiledón maduro.	88
Fig. 35. Corte histológico de embriones somáticos.	88
Fig. 36. Embriones somáticos de té, obtenidos a partir de láminas de cotiledón, en distintos estados de desarrollo.	90
Fig. 37. Obtención de plantas enteras a partir de embriones somáticos.	91
Fig. 38. Vástagos formados en segmentos uninodales de té, conservados a baja temperatura.	104
Fig. 39. Supervivencia promedio de segmentos uninodales de té, conservados en medios sub-óptimos.	106
Fig. 40. Longitud de vástagos generados a partir de segmentos uninodales de té conservados en medios sub-óptimos.	106
Fig. 41. Metodología de vitrificación.	117
Fig. 42. Curvas de deshidratación de explantes.	119
Fig. 43. Técnica de crioconservación por deshidratación de ejes embrionales y ejes embrionales con cotiledón.	121
Fig. 44. Técnica de crioconservación por deshidratación de semillas.	122
Fig. 45. Plantas logradas a partir de ejes embrionales y ejes embrionales con cotiledón crioconservados.	124
Fig. 46. Desarrollo de plantas a partir de explantes crioconservados.	126
Fig. 47. Supervivencia y plantas logradas a partir de embriones	

crioconservados.	127
Fig. 48. Germinación y plantas logradas a partir de semillas enteras crioconservadas.	129
Fig. 49. Generación de vástagos en meristemas crioconservados por la técnica de vitrificación, sin pre-cultivo en sacarosa.	132
Fig. 50. Generación de vástagos en meristemas crioconservados por la técnica de vitrificación, con 2 días de pre-cultivo.	133
Fig. 51. Generación de vástagos en meristemas crioconservados por la técnica de vitrificación, con pre-cultivo completo.	133
Fig. 52. Plantas dadoras de explantes, para la técnica de vitrificación, expuestas a bajas temperaturas (4°C).	134

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los cultivares de té.	30
Tabla 2. Ensayo 1: Tratamientos de desinfección aplicados a segmentos uninodales de té.	32
Tabla 3. Ensayo 2: Tratamientos de desinfección aplicados a segmentos uninodales de té.	33
Tabla 4. Ensayo 3: Tratamientos de desinfección aplicados a segmentos uninodales de té.	33
Tabla 5. Reguladores de crecimiento para la regeneración de Vástagos a partir de diferentes explantes.	48
Tabla 6. Longitud de vástagos regenerados a partir de segmentos uninodales.	55
Tabla 7. Longitud de vástagos regenerados a partir de yemas axilares.	59
Tabla 8. Longitud de vástagos regenerados a partir de meristemas.	61
Tabla 9. Embriogénesis somática en especies del género <i>Camellia</i> .	68
Tabla 10. Reguladores de crecimiento utilizados para la inducción de embriogénesis somática en distintos explantes de té.	72
Tabla 11. Medios de cultivo para la embriogénesis somática a partir de láminas de cotiledón de té.	74
Tabla 12. Efecto de reguladores de crecimiento en las respuestas morfogénicas de ejes embrionales de té.	77
Tabla 13. Efecto del ambiente en la formación de callos a partir de hojas inmaduras en medio líquido.	85
Tabla 14. Efecto del ambiente en la formación de callos a partir de hojas inmaduras en medio semi-sólido.	85
Tabla 15. Conservación a corto plazo en distintas especies.	97
Tabla 16. Medios y condiciones de cultivo en la conservación a corto plazo de segmentos uninodales de té.	100
Tabla 17. Supervivencia de segmentos uninodales, meristemas y yemas axilares de té conservados a baja temperatura.	102
Tabla 18. Formación de vástagos a partir de diferentes explantes conservados a baja temperatura.	103
Tabla 19. Longitud de vástagos formados a partir de diferentes explantes conservados a baja temperatura.	105
Tabla 20. Metodología de deshidratación de ejes embrionales y ejes embrionales con porción de cotiledón.	114
Tabla 21. Metodología de deshidratación de embriones y semillas enteras.	115

Tabla 22. Efecto del tiempo de deshidratación sobre la regeneración a partir de EE y EEC conservados a -196°C.	123
Tabla 23. Efecto del explante conservado a -196°C sobre la regeneración de plantas enteras.	125
Tabla 24. Efecto del tiempo de aclimatación en meristemas crioconservados por el método de vitrificación.	132
Tabla 25. Efecto del tiempo de exposición al PVS2 en meristemas crioconservados por el método de vitrificación.	135

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES DE *Camellia sinensis*

1.1.1 Ubicación taxonómica y distribución geográfica

El género *Camellia*, perteneciente a la familia Theaceae, contiene más de 325 especies (Mondal, 2002) y su alto grado de polinización cruzada origina gran variabilidad genética existiendo actualmente más de 600 variedades cultivadas (Mondal *et al.*, 2004; Ghanati e Ishka, 2009).

La importancia económica del género *Camellia* es atribuida primariamente al té (Luna y Ochoterena, 2004; Mondal, 2007), cuyo nombre botánico es *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Es un importante cultivo comercial en más de 50 países (Phukan y Mitra, 1990; Akula *et al.*, 1997). En sus inicios, el té fue utilizado como medicinal (Sharma, 2012). Con sus brotes se prepara una infusión que, después del agua, es considerada la bebida no alcohólica más popular en el mundo (Kato, 1989; Mondal *et al.*, 2002a; Mondal *et al.*, 2004), destacándose por su calidad nutricional y por ser una de las bebidas más económicas (Fontana *et al.*, 1990; AL-Oud, 2003; Sharma, 2012).

El té se originó en el sudeste de Asia, específicamente en una zona ubicada al nordeste de India, norte de Burma, sudeste de China y Tibet (Sataka, 1984; Islam *et al.*, 2005; Mondal, 2007). Desde este centro de origen, la planta fue introducida a más de 50 países (Mondal, 2007; Sharma, 2012).

La introducción del té en nuestro país se remonta al año 1925, con semillas provenientes de Georgia (Rusia), pero adquiere importancia como cultivo a mediados de la década del 50. En ese lapso se realizaron introducciones de semilla provenientes de distintas partes del mundo, por parte de particulares como también por organismos estatales (Sataka, 1984; Prat Kricun, 1990). El centro productor más importante en América está situado en la Argentina, concentrado en la provincia de Misiones (92%) y noreste de Corrientes (8%) (Zanino, 1993; De Bernardi y Prat Kricun, 2002).

Según datos del Annual Bulletin of Statistics (International Tea Committee, 2008) (Fig. 1), China es el mayor país productor con 1165 millones de kilos, lo que representa un 30.3% de la producción mundial. Le siguen en importancia India (24.6%), Kenia (9.06%), Sri Lanka (7.9%), Turquía (4.6%), Indonesia (3.9%), Vietnam (3.8%), Japón (2.6%), Argentina (2.3%) y Bangladesh (1.5%). El continente americano es el más nuevo en

este cultivo, representado principalmente por Argentina siguiendo en orden de importancia Brasil, Perú, Ecuador y Bolivia (Prat Kricun, 1990; Singh *et al.*, 2011).

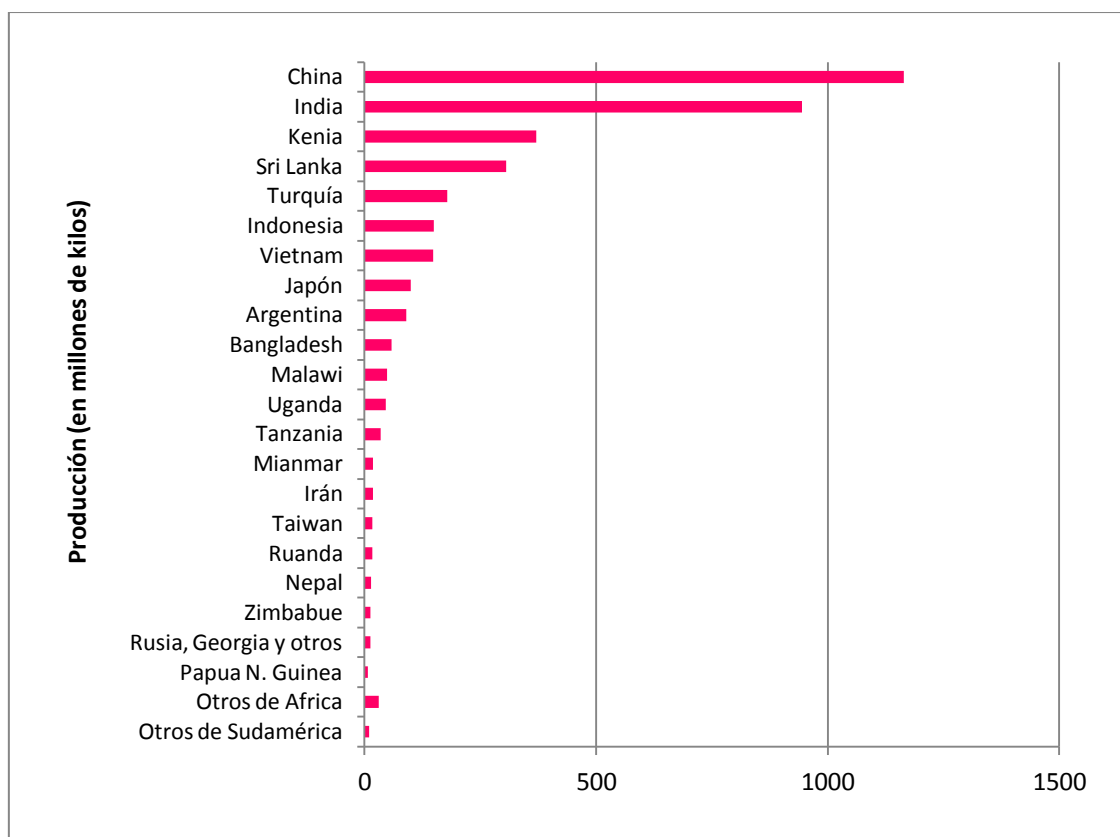


Figura 1. Producción mundial de té en millones de kg (Fuente: International Tea Committee. Annual Bulletin of Statistics. 2008).

1.1.2 Descripción morfológica

La planta de té es una especie leñosa perenne de polinización cruzada que puede alcanzar hasta 10 ó 15 m de altura en estado salvaje, pero la planta bajo cultivo se poda para limitar su altura (0.60-0.80 m), favoreciendo la generación de nuevos brotes y hojas y facilitando la

cosecha (Mondal, 2007) (Fig. 2). El sistema radical del té se compone de una raíz pivotante, ramificada en secundarias y terciarias (León, 2000).



Figura 2. Plantación de té clonal (material seleccionado en la EEA Cerro Azul – INTA)

Sus hojas son persistentes, de 5 a 15-20 cm de largo, gruesas, lanceoladas, elípticas, alargado-ovaladas, puntiagudas en la punta y en la base, verde oscuro brillante en el haz, con bordes dentados, pubescentes cuando muy jóvenes y luego glabras, alternas con nervadura prominente y pecíolo corto (Figs. 3 y 4). El tamaño de la hoja es el principal criterio usado para la clasificación. Dos variedades son principalmente usadas, la variedad china (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) de hojas chicas (Figs. 3 a y 4

a) y la variedad asámica (*Camellia sinensis* var. *assamica*) de hojas grandes (Figs. 3 b y 4 b). Un tercer tipo, caracterizado por hojas de tamaño intermedio, es comúnmente conocido como tipo Camboyano (Figs. 3 c y 4 c) (Mutinelli, 1964; Sataka, 1984; Islam *et al.*, 2005; Mondal, 2007; Borchetia *et al.*, 2009). Existen grupos o cultivares híbridos que se originan de cruces entre tipos chinos y asámicos o entre asámicos (León, 2000) (Fig. 4d).

El botón floral es esférico, dispuesto sobre un pedúnculo generalmente curvo de 1 cm de largo (León, 2000). Sus flores son hermafroditas, blancas, con tintes amarillo y rosado, axilares, solitarias o en grupos de 2 a 5 sobre un pedúnculo largo (Mondal, 2007). Aparecen a fines de otoño-comienzos de invierno; presentan 5 sépalos verdes largos y 6-8 pétalos desiguales con ápice redondeado. Los estambres son numerosos, amarillos, llamativos y largos (Figs. 5 a y b, 8). Esta especie exhibe autoincompatibilidad (protoginia) (León, 2000; Chen *et al.*, 2007).



Figura 3. Diferencias morfológicas de las hojas en las tres variedades de té: **(a)** variedad china, **(b)** variedad asámica y **(c)** variedad camboyana.

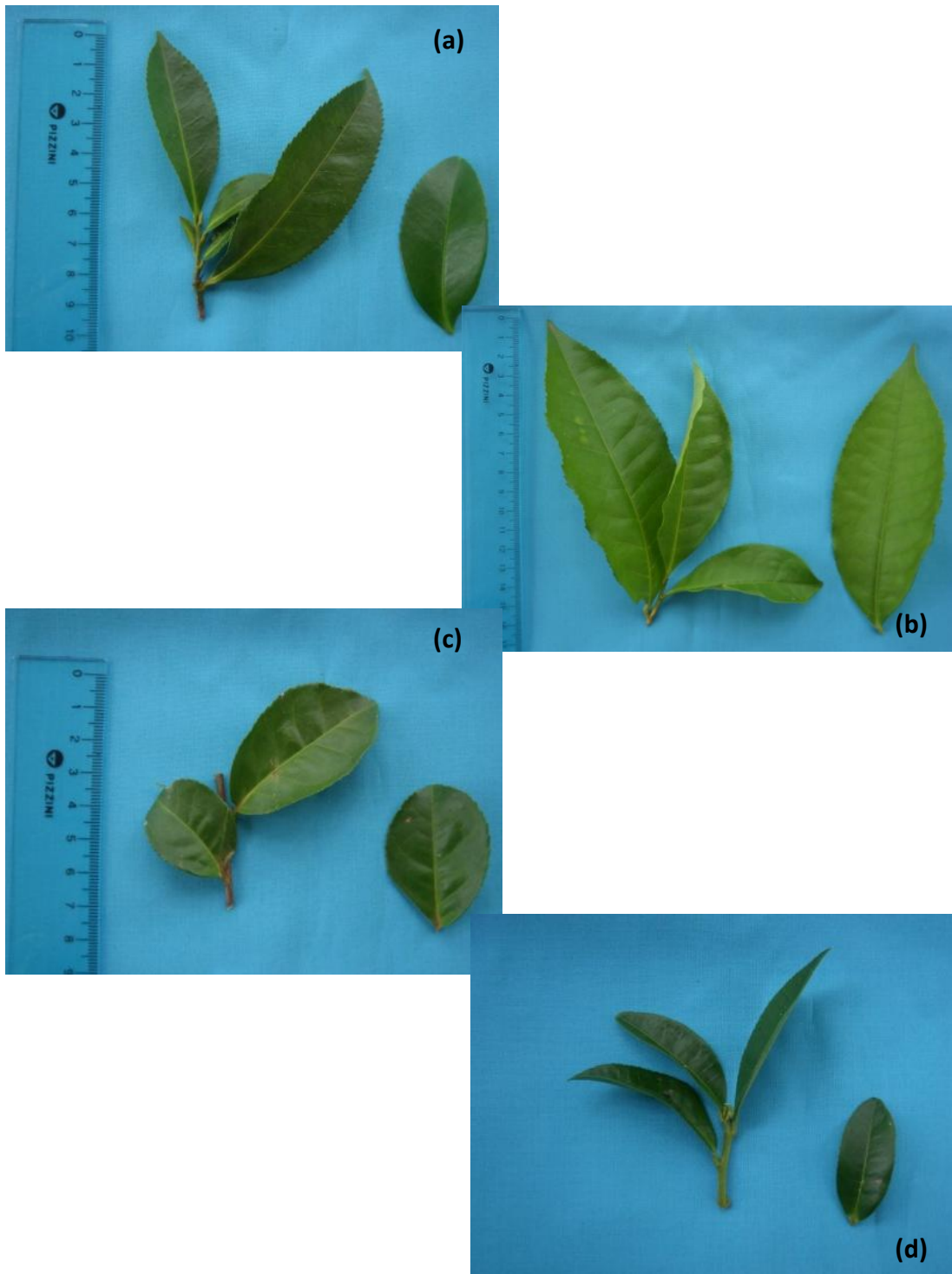


Figura 4. Diferencias en la morfología y tamaño de las hojas en variedades de té: **(a)** variedad china, **(b)** variedad asámica, **(c)** variedad camboyana y **(d)** híbrido.



Figura 5. Características de la flor de té: **(a)** Flores axilares agrupadas de a 3; **(b)** Detalle de la flor con los pétalos blancos y los estambres largos.

Su fruto es una cápsula verde dehiscente, mono-bi y trilocular, de 1.5-3.0 cm de diámetro, con una semilla en cada lóculo (Fig. 6 a y b, 8). Las semillas son globosas, de 5-15 mm de diámetro, con dos grandes cotiledones cubiertos con tegumento oscuro y duro (Mutinelli, 1964; Bala Sheti, 1965; León, 2000; Luna y Ochoterena, 2004; Mondal, 2007) (Fig. 7 a y b).



Figura 6. Características del fruto de té: **(a)** Fruto unilocular; **(b)** Fruto trilocular en dehiscencia.

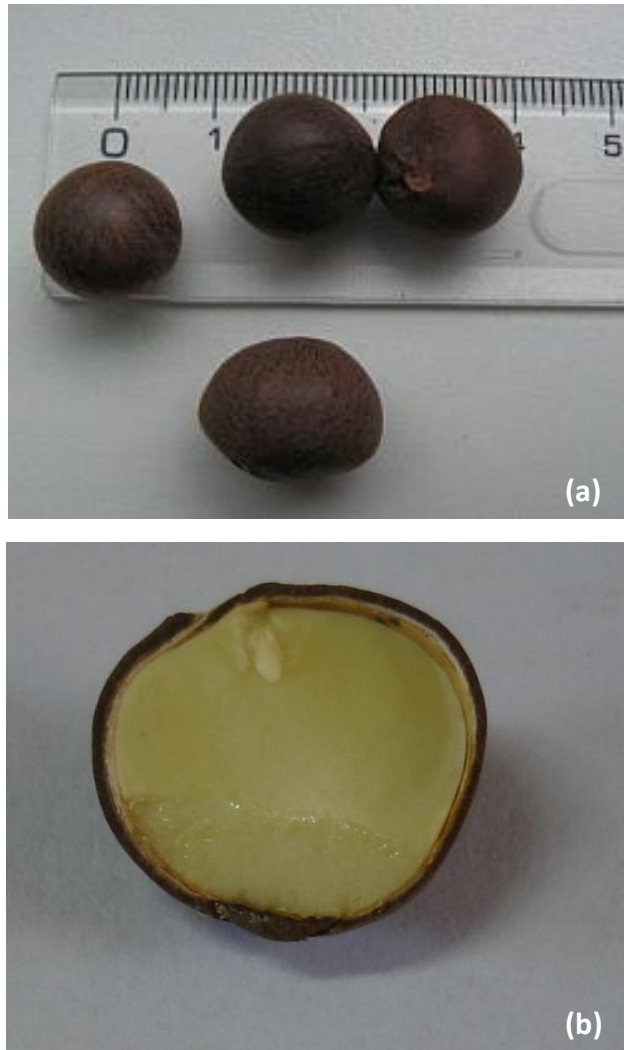


Figura 7. Características de la semilla de té: **(a)** Semillas maduras; **(b)** Corte transversal de la semilla mostrando el cotiledón y el eje embrional.

El té generalmente es diploide ($2n=30$, $x=15$), sin embargo en poblaciones naturales han sido identificados genotipos triploides como los cvs. TV-29, HS-10 A y UPASI-3, tetraploides, pentaploides y aneuploides (Mondal, 2007).



Figura 8. Partes de la planta de *Camellia sinensis*. **A:** vista general (rama con hojas y flores axilares). **1:** corte transversal de la flor. **2:** estambres. **3:** corte transversal del gineceo. **4:** gineceo. **5:** fruto con semillas. **6:** fruto trilobular. **7:** semilla. **8:** corte transversal de semilla. **9:** cotiledones y eje embrional (Fuente: www.plant-pictures.de. Imagen procesada por Thomas Schoepke).

1.1.3 Cultivo

Es una especie que crece generalmente en regiones de clima tropical y subtropical húmedo, isohídrico, con precipitaciones entre 1800 a 2200 mm anuales, regulares durante todo el año. Se cultiva con éxito desde el nivel del mar hasta los 2200 m de altitud, lográndose los mejores resultados, en términos de calidad de producto, en zonas con alturas superiores a los 1200 metros. Crece mejor en suelos con pH ácido (4.5-5.5), profundos y bien drenados. Los más recomendados para el cultivo pertenecen al orden de los Ultisoles, Alfisoles y Oxisoles, aptos para la producción de cultivos perennes (Prat Kricun, 2007).

Las plantas pueden ser propagadas por vía sexual o asexual a través de estacas. Las primeras plantaciones se realizaron a partir de introducciones de semillas provenientes de distintas partes del mundo, lo que condujo a una elevada heterogeneidad (Prat Kricun, 1990; Fernández Jardón *et al.*, 2005).

Hoy prácticamente la totalidad del té se produce a partir de estacas, dada la facilidad de la especie para enraizar, sin la necesidad de utilizar reguladores de crecimiento. Además, de esta manera se pueden multiplicar materiales con características destacadas en rendimiento y

calidad de taza, resultado del trabajo de mejoramiento realizado en la Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul (INTA) (Prat Kricun, 1990).

La plantación se realiza entre los meses de abril y septiembre. Inmediatamente después se coloca una protección al plantín, con orientación noroeste, con el objetivo de protegerlo de la alta radiación (Prat Kricun y Píccolo, 1983) (Fig. 9).



Figura 9. Detalle de una plantación joven de té y la protección contra la radiación.

En Argentina, la cosecha comienza al 4° año de implantado. Se realiza durante el período de crecimiento de la planta que se extiende de septiembre a abril. La recolección del brote verde es mecánica (Fig. 10 a), a diferencia de los grandes países productores donde en su mayor parte es

manual, lo que permite una mejor selección del brote cosechado. La cosecha se realiza cada 10-15 días, en función de la brotación (Prat Kricun, 2007) (Fig. 10 b).



Figura 10. Cosecha de té. **(a)** Cosecha mecánica en Argentina y **(b)** detalle del brote a cosechar.

1.1.4 Importancia

La importancia económica del género *Camellia* es atribuida al té (Islam *et al.*, 2005). Las hojas contienen más de 700 compuestos químicos relacionados con la salud humana, entre los cuales se encuentran flavonoides (con propiedades anti-inflamatorias y anti-alérgicas), aminoácidos, vitaminas (C, E y K), cafeína y polisacáridos. El té juega un rol importante en el mejoramiento de la microflora intestinal benéfica, además de proveer protección contra desórdenes intestinales y evitando daños oxidativos en las membranas celulares. Previene las caries dentales debido a la presencia de flúor, es normalizador de la presión sanguínea, actúa en la prevención de enfermedades coronarias y diabetes al reducir la actividad de la glucosa en sangre. Posee actividad germicida y germistática contra numerosas bacterias patogénicas humanas gram positivas y gram negativas. Las infusiones de té verde y negro contienen antioxidantes, principalmente catequinas con propiedades anti-carcinogénicas, anti-mutagénicas y anti-tumorales (Mondal, 2007). El té contiene un aminoácido, llamado L-teanina, que tiene propiedades relajantes en el hombre, siendo capaz de mejorar la atención, la memoria y la capacidad intelectual.

En un estudio publicado en 2007 (Devine *et al.*, 2007), realizado en mujeres menopáusicas mayores de 70 años, se compararon los efectos del consumo diario de té sobre la densidad ósea y la incidencia de fracturas. En comparación con las mujeres que no consumieron té durante el estudio, la densidad ósea fue significativamente mayor en las bebedoras de té y la pérdida de masa ósea y la incidencia de fracturas fue significativamente menor. Los autores atribuyen estos efectos beneficiosos del té al flavonoide (-)-epigallocatequina-3-galato, que ha demostrado aumentar la expresión de los genes osteogénicos, la concentración de marcadores de la actividad ósea y la mineralización de las células madre del parénquima de la médula ósea del ratón.

Los extractos de té administrados por vía oral, o aplicados en forma de compresas o cataplasmas, son remedios muy eficaces en una variedad de enfermedades dermatológicas que van desde la picadura de insectos hasta quemaduras y heridas (Fernández Jardón *et al.*, 2005).

En Argentina se elaboran y comercializan suplementos dietarios para aumentar la energía y bajar de peso, con extractos tanto de té verde, como blanco, negro y rojo (Fernández Jardón *et al.*, 2005). Entre otras aplicaciones, el té también está presente en la composición de productos alimenticios tan diversos como chicles, yogur y galletitas (Parra, 2006).

1.2 CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA

Las posibilidades de diferenciación por calidad y las bondades del producto, tales como sus conocidas características nutricionales y efectos antioxidantes, determinan un permanente crecimiento de los mercados mundiales (Wiseman *et al.*, 1997; De Bernardi y Prat Kricun, 2002). Paralelamente es necesario un trabajo continuo de mejoramiento genético con el objetivo de generar nuevos cultivares. En este contexto, la conservación de germoplasma de *Camellia sinensis* y de especies silvestres relacionadas adquiere importancia.

Dos estrategias básicas de conservación son empleadas para mantener la diversidad genética: la conservación *in situ* y *ex situ*. La primera de ellas permite la conservación de ecosistemas y hábitats naturales (un buen ejemplo lo constituyen los parques nacionales) y, en el caso de especies domesticadas o cultivadas, el mantenimiento del ambiente donde ellas han desarrollado sus distintas propiedades (Engelmann y Engels, 2002; Rao, 2004). Se caracteriza por requerir un considerable espacio físico, las plantas están expuestas a las inclemencias climáticas y generalmente es de alto costo debido a la necesidad de mano de obra especializada, control permanente de plagas, enfermedades y

malezas. La conservación *ex situ* en cambio, permite preservar la diversidad genética fuera de su hábitat natural. Puede ser llevada a cabo en viveros y jardines botánicos o de una manera práctica y económica a través de los bancos de semillas (Pita Villamil y Pérez Ruiz, 1997; Iriundo Alegría, 2001; Scocchi y Rey, 2004; González-Benito *et al.*, 2004).

El International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) recomienda conservar las semillas a 3-7% de humedad y bajas temperaturas (-18°C) (Pita Villamil y Pérez Ruiz, 1997). Según Roberts (1973), este procedimiento es el más recomendado para especies de semillas ortodoxas, como por ejemplo arroz, trigo, avena, tabaco, tomate y lechuga. Sin embargo, en ciertos casos este método de conservación no es aplicado, porque la especie se propaga vegetativamente (como mandioca, papa, caña de azúcar, plátanos y bananos) o bien porque sus semillas son recalcitrantes. Las semillas de numerosas especies que viven en zonas tropicales o subtropicales se incluyen en esta última categoría, como por ejemplo las semillas de coco, cacao, frutales tropicales perennes, diversas palmeras y el té. De acuerdo a Withers (1987), para este grupo de plantas en los últimos años se ha desarrollado una interesante alternativa para la conservación de germoplasma que involucra el empleo del cultivo de tejidos, por ejemplo el banco de

germoplasma de mandioca, en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y de papa, en el Centro Internacional de la Papa (CIP) (Roca *et al.*, 1991).

El mantenimiento de germoplasma mediante los métodos del cultivo *in vitro* de tejidos se logra haciendo cambios en el medio de cultivo y/o de las condiciones físicas de incubación que induzcan el crecimiento lento de las células y de los tejidos con el objetivo de realizar los subcultivos en lapsos de tiempo más prolongados. Con este método, si bien se pueden conservar asépticamente una gran variedad de explantes (meristemas, semillas, embriones somáticos, embriones cigóticos, hojas, tallos, raíces, polen, anteras o callos) en un medio de cultivo artificial definido, bajo condiciones ambientales controladas, lo ideal es utilizar meristemas porque facilitan la conservación de germoplasma libres de virus, son más estables genéticamente y representan explantes apropiados para la ulterior micropropagación del material conservado (Panis *et al.*, 1998; Scocchi y Mroginski, 2004). Esta técnica ha sido usada para mantener colecciones en crecimiento mínimo, para lo cual se requiere modificar las condiciones físicas de incubación o el medio de cultivo, como por ejemplo: reducir la temperatura, reducir las condiciones de luminosidad, adicionar al medio de cultivo inhibidores o retardantes

del crecimiento, deshidratadores de tejido o modificar la fase gaseosa del recipiente de cultivo. La modificación de uno o más de estos factores es usada para la conservación de numerosas especies, como por ejemplo para la conservación de microestacas de *Manihot esculenta* Crantz (Roca *et al.*, 1991); vástagos de *Fragaria x ananassa* y de *Rubus spp.*, microtubérculos de *Solanum spp.*, meristemas de paraíso (Scocchi y Mroginski, 2004) y vástagos de *Musa spp.*, *Saccharum spp.*, *Zingiber spp.*, *Ananas spp.*, *Coffea spp.* y *Dioscorea spp.* (Ashmore, 1997).

Estas técnicas de almacenamiento, útiles para conservar germoplasma a corto y mediano plazo, se basan en reducir el metabolismo celular y con ello disminuir el crecimiento y el número de subcultivos durante meses hasta 1 año, sin afectar la viabilidad de los cultivos (Santos, 2001). Como desventaja, el almacenamiento *in vitro* de grandes cantidades de material induce a varios problemas: necesidad de subcultivos regulares, riesgos de variación genética que incrementan con la duración del almacenamiento y riesgo en la pérdida de materiales valiosos por contaminación (Engelmann, 1991).

Para el almacenamiento a largo plazo, existe un método que se basa en la supresión del crecimiento y consiste en mantener los explantes a la temperatura ultra baja del nitrógeno líquido (-196°C), causando el cese de

la mayoría de las reacciones metabólicas celulares, proceso que se conoce como Crioconservación. El primer trabajo que informa acerca de la supervivencia de tejidos vegetales expuestos a ultra bajas temperaturas fue presentado por Sakai en 1960 (Engelmann, 1997a). A partir de los resultados satisfactorios obtenidos por el Prairie Regional Laboratory, actualmente Plant Biotechnology Institute, de Saskatoon – Canadá (Kantha *et al.*, 1980; Kantha *et al.*, 1982), se iniciaron en 1985 investigaciones colaborativas entre el CIAT y el Centro Internacional de Investigaciones Genéticas (IBPGR) para desarrollar esta técnica con el cultivo de meristemas de mandioca. A partir de estos trabajos, numerosas publicaciones dan muestra de la importancia de esta técnica, de sus usos y aplicaciones (Mroginski *et al.*, 1991; Dumet *et al.*, 1993; Sakai, 1993; Uragami, 1993; Engelmann, 1997a; Withers y Engelmann, 1998).

Las técnicas de conservación de germoplasma mediante el uso de la crioconservación, presentan ventajas en relación a las técnicas tradicionales de conservación como ser: 1) conservación a largo plazo (años); 2) bajo costo de mantenimiento; 3) fácil manipulación de las muestras y 4) independencia del suministro eléctrico.

Existen varios métodos para la crioconservación de material vegetal, pero en general todos involucran los siguientes pasos: 1) selección del

material a crioconservar, 2) deshidratación, 3) aclimatación, 4) almacenamiento, 5) descongelamiento y rehidratación y 6) test de viabilidad.

En revisiones realizadas por diversos autores (Engelmann, 1998; Scocchi y Rey, 2004) se describen técnicas que combinan el uso de crioprotectores y de soluciones de vitrificación con técnicas de deshidratación y encapsulación, las cuales básicamente pueden resumirse en las siguientes técnicas:

Encapsulación-Deshidratación: utiliza la metodología aplicada a las semillas artificiales, en la cual un explante es recubierto por una matriz de alginato de sodio y polimerizado en una solución de cloruro de calcio formando un gel alrededor del explante de alginato de calcio. Una vez llevada a cabo la encapsulación, se realizan pre-tratamientos generalmente con sacarosa (0.3-1.5M) (Fabre y Dereuddre, 1990), que actúa como crioprotector del explante. La deshidratación puede llevarse a cabo sometiendo las cápsulas de alginato (conteniendo a los explantes) a una corriente de aire en el flujo laminar o exponiéndolas en cámaras con sílica gel. Las cápsulas así deshidratadas pueden ser llevadas directamente a inmersión en nitrógeno líquido o a descenso programado de temperatura.

Esta técnica ha sido aplicada con éxito para la conservación de ápices de *Pyrus spp.*, *Malus spp.*, *Saccharum spp.* y *Solanum tuberosum* (Engelmann, 1997b) y de ápices caulinares de *Citrus spp.* (González-Arno *et al.*, 1998).

Vitrificación: involucra el pre-tratamiento de las muestras con soluciones de vitrificación (Sakai *et al.*, 1990; Ashmore, 1997), que luego pueden ser sumergidas directamente en nitrógeno líquido o llevadas a un descenso programado de temperatura. Numerosas publicaciones dan muestra del éxito de esta técnica para la crioconservación de germoplasma como por ejemplo en la conservación de células nucleares de *Citrus sinensis* (Sakai *et al.*, 1991), meristemas de 15 genotipos de *Manihot esculenta* Crantz (Escobar *et al.*, 1997).

Encapsulación-Vitrificación: es una combinación de las técnicas de encapsulación-deshidratación y vitrificación. Las muestras son encapsuladas en alginato de calcio y sometidas a vitrificación durante el enfriamiento. Comparada con la técnica de encapsulación-deshidratación, en general, se consigue un 30% más de supervivencia (Ashmore, 1997), ésto puede explicarse debido a que las cápsulas de alginato reducen la toxicidad de las soluciones de vitrificación.

Desecación: proceso que requiere la deshidratación del material vegetal, sometiéndolo a una corriente de aire en un flujo laminar o en cámaras con sílica gel; posteriormente de lo cual se realiza un enfriado rápido, sumergiendo el material directamente en nitrógeno líquido. La desecación del explante es importante para el éxito de la crioconservación, al respecto, Engelmann (1997b) señala su importancia, principalmente en semillas recalcitrantes y para especies de propagación vegetativa.

Precultivo: involucra la incorporación de crioprotectores (durante distintos tiempos que dependen del explante) antes del enfriamiento; como por ejemplo la adición de altas dosis de sacarosa para la crioconservación de meristemas de *Musa spp.* (Panis *et al.*, 1996); la utilización de polietilenglicol (PEG) y Dimetilsulfóxido (DMSO) en embriones cigóticos de *Triticum aestivum* y *Phaseolus vulgaris* L. (Ashmore, 1997).

Precultivo-Desecación: es una combinación de dos técnicas descritas anteriormente. Las muestras son tratadas con crioprotectores, parcialmente desecadas y luego sometidas a enfriamiento rápido o lento. Generalmente, en el precultivo se emplean azúcares (sacarosa, glucosa) y con un tiempo de duración variable desde horas, como en el caso de la

conservación de embriones maduros de *Cocos nucifera*, en el cual el pre-cultivo tuvo una duración de 11-20 h (Assy-Bah y Engelmann, 1992), hasta 7 días como fue aplicado con éxito en embriones somáticos de *Elaeis guineensis* (Dumet *et al.*, 1993).

Microgota Congelada: Este procedimiento es una adaptación de la técnica clásica desarrollada por Kartha *et al.* (1982), con meristemas de mandioca y ha sido aplicada con éxito en ápices de *Solanum tuberosum* (Schäfer *et al.*, 1996). La misma consiste en pretratar (2-3 h) con DMSO en medio líquido y formar una microgota (2.5 µl) la cual se suspende sobre papel de aluminio y se la lleva a inmersión directa en nitrógeno líquido. Esta práctica ha sido satisfactoriamente aplicada en 150 variedades de *Solanum tuberosum* con un porcentaje de supervivencia del 40% (Schäfer *et al.*, 1996).

El té es una especie con semillas “recalcitrantes” (Chaudhury *et al.*, 1990; Chandel *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 1996). Su respuesta a la desecación es muy variable y depende del lote de semillas. Algunos datos sugieren que cuando las semillas son almacenadas húmedas a 0°C, luego de 10 meses, se obtiene una viabilidad del 50-70%, mientras que a 5-7°C, durante 9 meses, el 28% de las semillas germinan (Sebastiampillai y Anandappa, 1979).

La utilización de técnicas del cultivo de tejidos para conservar germoplasma de té se limitan al encapsulamiento de embriones somáticos y posterior conservación a bajas temperaturas con resultados que sólo permiten el almacenamiento por algunos meses. Resultados similares se obtuvieron con yemas encapsuladas (Mondal *et al.*, 2004). Por otra parte se han hecho algunos intentos de crioconservar semillas y ejes embrionarios (Chaudhury *et al.*, 1990; Chaudhury *et al.*, 1991; Kuranuki y Yoshida, 1991; Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005) con resultados variables que hacen que las técnicas no hayan sido explotadas (Mondal *et al.*, 2004).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General:

Desarrollar sistemas *in vitro* que permitan la conservación y crioconservación de germoplasma de té (*Camellia sinensis*).

1.3.2 Objetivos Particulares:

- 1) Ajuste de la técnica de propagación *in vitro* para los clones seleccionados en Argentina.

- 2) Desarrollar sistemas *in vitro* que permitan la conservación de germoplasma de té mediante el cultivo de meristemas y de yemas laterales a bajas temperaturas (4°C).
- 3) Desarrollar sistemas *in vitro* que permitan la inducción de la embriogénesis somática y la conservación de embriones somáticos mediante el empleo de bajas temperaturas (4°C).
- 4) Desarrollar sistemas *in vitro* que permitan la crioconsecvación de semillas, ejes embrionarios, meristemas, yemas y embriones somáticos a -196°C.

1.4 HIPÓTESIS

Es posible la conservación *in vitro* de germoplasma de té a bajas (4°C) y ultra bajas temperaturas (-196°C).

CAPÍTULO 2

2. DESINFECCIÓN DE EXPLANTES

2.1. INTRODUCCIÓN

El té es normalmente propagado por estacas uninodales. Este método de propagación se vuelve limitante cuando se requiere un gran número de plantas y el stock de madres es bajo (Phukan y Mitra, 1990; Tahardi *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007). Otra desventaja es que requiere un largo período de tiempo y espacio para la producción de plantines (Kato, 1989). Por ésto, la técnica de micropropagación aparece como una alternativa ideal para evitar los problemas relacionados a la propagación convencional (Mondal *et al.*, 2004; Islam *et al.*, 2005). Por otra parte, los protocolos de micropropagación deben ser establecidos previamente para encarar cualquier trabajo de conservación *in vitro*.

En la micropropagación de una especie, el primer paso es la fase preparativa, la cual incluye la selección de las plantas donadoras, su pretratamiento y crecimiento en ambientes controlados e higiénicos. Fue concebida con el objetivo de reducir los problemas de contaminación y

tiene una marcada influencia en la calidad de las plantas obtenidas (Jiménez González, 1998; Alvarado Capó, 1998; Erig y Schuch, 2003).

En especies leñosas, como el té, uno de los factores limitantes en la producción de plantas por micropropagación es la presencia de contaminación bacteriana endógena (Akula y Dodd, 1998; Alvarado Capó, 1998; Niedz, 1998; Erig y Schuch, 2003; Mondal, 2003; Akula y Akula, 2005). Los explantes de té son obtenidos de plantas que crecen en el campo y que están contaminados por numerosos organismos epifíticos y endofíticos, causando graves pérdidas en cada etapa de la micropropagación (Mondal *et al.*, 2004). Diferentes estrategias han sido empleadas para evitar estos problemas en té.

El presente trabajo describe las prácticas realizadas para disminuir la contaminación bacteriana endógena en el cultivo *in vitro* de té.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal

Se trabajó con 10 cultivares de té (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) de la colección que forma parte del Programa de Mejoramiento de la EEA Cerro Azul – INTA. En la Tabla 1 se describen algunas características.

Tabla 1. Características de los cultivares de té (inscritos por INTA en el Registro Nacional de Cultivares – INASE).

Cultivar	Agrotipo	Rendimiento (kg ha⁻¹)	Observaciones
CH 14 INTA	Híbrido chino	11.200 ± 4.700	Rendidor, crecimiento uniforme
CH 112 INTA	Híbrido chino	10.350 ± 4.050	Rendidor con calidad, brotación temprana y vigorosa
CH 318 INTA	Chino	9.850 ± 4.550	Alta calidad, infusión con aroma típico (Darjeeling)
CH 410 INTA	Híbrido chino	12.300 ± 4.650	Rendidor, de calidad media
CH 732 INTA	Híbrido chino	10.550 ± 4.800	Rendidor con calidad, amplia mesa de cosecha y brotación vigorosa
CH 1019 INTA	Híbrido chino	9.900 ± 4.200	Estándar, de calidad media
SG 1891 INTA	Híbrido chino	12.600 ± 3.000	Rendidor con calidad
SG 3191 INTA	Híbrido chino	11.200 ± 4.700	Rendidor
SG 3791 INTA	Híbrido chino	14.800 ± 4.700	Rendidor
SG 7291 INTA	Híbrido chino	12.000 ± 4.700	Rendidor con calidad

Se cosecharon ramas estaqueras para la producción de las plantas madre que crecieron bajo invernáculo en condiciones semicontroladas.

Las otras plantas dadoras de explantes crecieron en condiciones de campo.

De las mismas se aislaron segmentos uninodales para aplicar los distintos métodos de desinfección y su posterior establecimiento *in vitro*.

2.2.2. Protocolos de desinfección

Los métodos de desinfección involucraron los siguientes pasos:

1) Aislamiento de los segmentos uninodales (1,0 cm de longitud, conteniendo una yema axilar) a partir de ramas cosechadas de las plantas madre.

2) Exposición de los explantes a los distintos tratamientos de desinfección:

a. Ensayo 1: Evaluación y comparación entre la metodología de desinfección de segmentos uninodales descrita por (Akula y Akula, 2005) y diferentes tiempos de exposición al etanol al 70% (1 y 3 min) e hipoclorito de sodio al 1.5% (10, 20, 30 y 40 min) (Tabla 2).

b. Ensayo 2: En otro ensayo se evaluaron combinaciones de fungicidas y bactericidas (Captan, carbendazim, agrimicina y kasugamicina, en agitador magnético) (Toro Mujica,

2003) y posterior tratamiento con etanol 70% (1 min) e hipoclorito de sodio 1.5% (30 min) (Tabla 3).

- c. Ensayo 3: Uso de biocida de amplio espectro (PPMTM – Plant Preservative Mixture, de Plant Cell Technology, Inc.) en agitación con agua o con medio de cultivo líquido de Murashige y Skoog (1962) o incorporado en el medio de cultivo (MS) solidificado con 0.7% de agar (Sigma A-1296, St. Louis, Mo) (Tabla 4).

Tabla 2. Ensayo 1: Tratamientos de desinfección aplicados a segmentos uninodales de té (cultivar CH 14 INTA)

* Método aplicado por Akula y Akula (2005)

Tratamiento	Descripción
T1*	agua (1 h) + benomil (1,2 gL ⁻¹ ; 1 h) + etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (20 min)
T2	Etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (10 min)
T3	Etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (20 min)
T4	Etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (30 min)
T5	Etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (40 min)
T6	Etanol 70% (3 min) + NaClO 1,5% (10 min)
T7	Etanol 70% (3 min) + NaClO 1,5% (20 min)
T8	Etanol 70% (3 min) + NaClO 1,5% (30 min)
T9	Etanol 70% (3 min) + NaClO 1,5% (40 min)

Tabla 3. Ensayo 2: Tratamientos de desinfección aplicados a segmentos uninodales de té (cultivar CH 14 INTA). Los mejores tratamientos se repitieron en los 10 cultivares de té

Tratamiento	Descripción
T1	Etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (40 min)
T2	Captan ($2,0 \text{ gL}^{-1}$) + carbendazim ($1,0 \text{ cm}^3\text{L}^{-1}$) + agrimicina ($0,6 \text{ gL}^{-1}$) (25 min en agitador magnético) + etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (40 min)
T3	Captan ($2,0 \text{ gL}^{-1}$) + carbendazim ($1,0 \text{ cm}^3\text{L}^{-1}$) (25 min en agitador magnético) + etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (40 min)
T4	Captan ($2,0 \text{ gL}^{-1}$) + carbendazim ($1,0 \text{ cm}^3\text{L}^{-1}$) + kasugamicina ($3,0 \text{ cm}^3\text{L}^{-1}$) (25 min en agitador magnético) + etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (40 min)
T5	Agrimicina ($0,6 \text{ gL}^{-1}$) + kasugamicina ($3,0 \text{ cm}^3\text{L}^{-1}$) (25 min en agitador magnético) + etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (40 min)

Tabla 4. Ensayo 3: Tratamientos de desinfección aplicados a segmentos uninodales de té (cultivar CH 14 INTA).

Las dosis de PPMTM utilizadas son las propuestas por Plant Cell Technology, Inc.

Tratamiento	Descripción
T1	Etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (40 min)
T2	Etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (40 min) y cultivo en $\frac{1}{2}$ MS con PPM (0,2% v/v)
T3	$\frac{1}{2}$ MS + PPM (5%) en agitación (4 h) y cultivo en $\frac{1}{2}$ MS con PPM (0,2% v/v)
T4	Agua destilada estéril en agitación (2 h), $\frac{1}{2}$ MS + PPM (5% v/v) en agitación (15 min) y cultivo en $\frac{1}{2}$ MS con PPM (0,2% v/v)

En los ensayos 1 y 2, una vez finalizados los tratamientos, los explantes recibieron 3 lavados sucesivos con agua destilada estéril. En todos los casos, el medio de cultivo consistió en las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) a un cuarto de la concentración (1/4 MS), con 3% de sacarosa. El medio fue solidificado con 0,7% de agar (Sigma A-1296, St. Louis, Mo). El pH fue ajustado a 5.8 con hidróxido de potasio (KOH) o ácido clorhídrico (HCl), antes del agregado de agar. Los tubos fueron obturados con papel de aluminio y esterilizados a 0,101 MPa (121°C) durante 15 min. Los segmentos uninodales fueron cultivados en tubos de vidrio (25 mm x 120 mm; 40 ml de capacidad) conteniendo 10 ml de medio de cultivo. Los tubos conteniendo los explantes fueron cubiertos con dos capas de Resinite® e incubados en un cuarto climatizado a 25 ± 2°C bajo un fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad con una irradiación de 116 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ provista por lámparas fluorescentes frías.

2.2.3. Diseño experimental y análisis de los resultados

Se cultivaron 10 explantes por tratamiento. Cada experimento fue repetido por lo menos 3 veces. Después de 30 días de cultivo se registraron los porcentajes de contaminación y de sobrevivencia. Se muestran los resultados promedios con el error estándar (\pm SE).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados presentados en los tres ensayos se refieren a la contaminación bacteriana, puesto que todos fueron eficientes en la eliminación de contaminación superficial fúngica.

La metodología propuesta por Akula y Akula (2005), para la iniciación del cultivo de té desde explantes nodales, consiste en la cosecha de brotes y su mantenimiento en agua para evitar la oxidación de los tejidos y el tratamiento con fungicida para reducir la contaminación. Este tratamiento fue evaluado y comparado con un simple proceso de cosecha de brotes, los cuales fueron tratados con etanol 70% e hipoclorito de sodio 1.5%, durante distintos períodos de tiempo.

Los resultados, en términos de porcentaje de contaminación, mostraron que ninguno de los tratamientos aplicados fue efectivo para la desinfección total de los explantes. Los valores de contaminación fueron superiores al 80%, sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Figs. 11, 16 a y b).

La exposición de los segmentos uninodales a etanol 70% durante 3 minutos, provocó la muerte del 100% de los explantes cultivados.

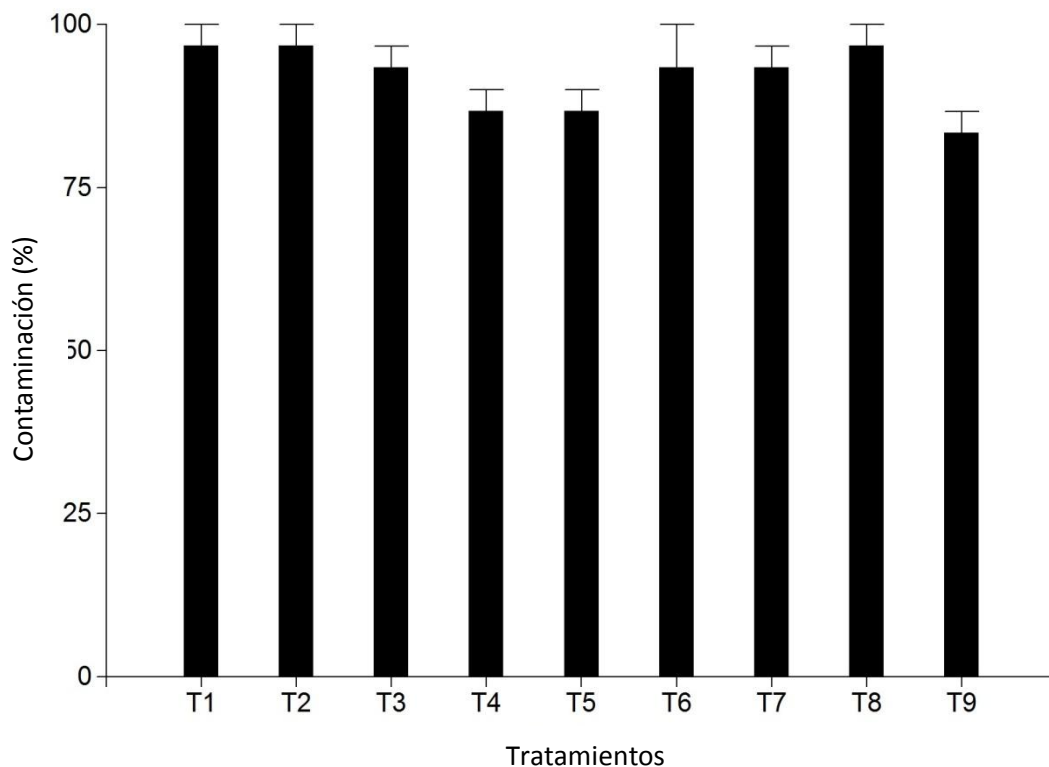


Figura 11. Tratamientos para la desinfección de segmentos uninodales de té (cultivar CH 14 INTA). Tratamiento de Akula y Akula (2005) y aplicación de etanol al 70% con dos tiempos de exposición (1 y 3 min) e NaClO al 1,5% con 4 tiempos de exposición (10, 20, 30 y 40 min). (La barra vertical representa \pm el error estándar). Ver tratamientos en Tabla 2.2

A raíz de los resultados obtenidos, se decidió la evaluación de la metodología de desinfección de explantes utilizada por Toro Mujica (2003) en la micropropagación de vid, basada en la combinación de fungicidas y antibióticos y posterior tratamiento con etanol (70%) e NaClO (1,5%). Las combinaciones de fungicidas y antibióticos evaluadas no superaron al

testigo (T1) con el cual se obtuvo, en promedio, el 50% de explantes libres de contaminación bacteriana (Figs. 12, 16 c y d).

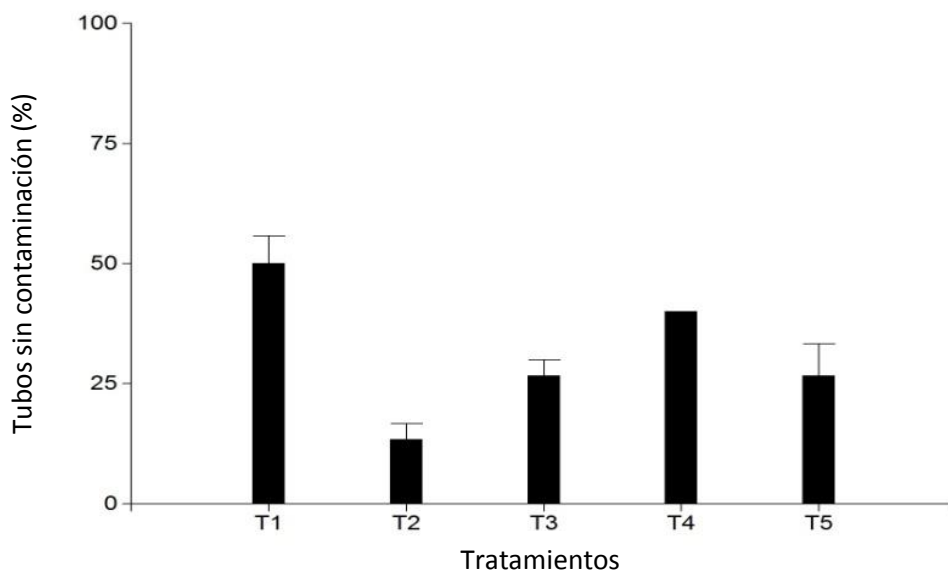


Figura 12. Desinfección de segmentos uninodales de té (cultivar CH 14 INTA). Uso de fungicidas (sistémicos y de contacto) y antibióticos previo al tratamiento con etanol 70% (1 min) e NaClO 1,5% (40 min). (La barra vertical representa \pm el error estándar). Ver tratamientos en Tabla 2.3

Los dos mejores tratamientos (T1 y T4) fueron aplicados en segmentos uninodales de los 10 cultivares de té, para determinar si existía alguna respuesta diferencial entre los materiales. Para la mayoría de los cultivares, se observó la misma respuesta que en el ensayo anterior. El tratamiento control (etanol al 70%, durante 1 min, e NaClO al 1,5% durante 40 min) superó al tratamiento 4 (Captan + carbendazim + kasugamicina (25 min en agitador magnético) + etanol 70% durante 1 min + NaClO 1,5% por 40 min). Los clones SG 1891 INTA y SG 3191 INTA

presentaron valores de desinfección cercanos al 90%, principalmente cuando se aplicó el tratamiento control (T1). En tanto, para otros clones (CH 112 INTA y CH 1019 INTA) no se lograron obtener explantes libres de contaminación (Fig. 13).

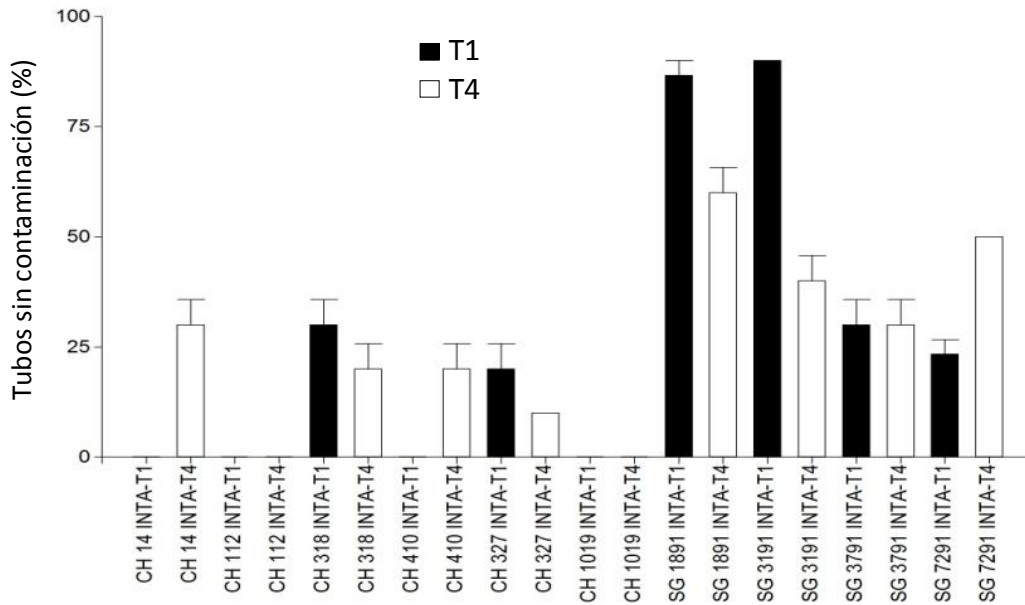


Figura 13. Desinfección de segmentos uninodales de té (10 cultivares). Tratamientos T1 (etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (40 min)) y T4 (Captan + carbendazim + kasugamicina + etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (40 min)). (La barra vertical representa \pm el error estándar).

La ventaja de haber encontrado resultados que descarten el tratamiento con antibióticos radica en los problemas de fitotoxicidad y resistencia que pueden presentarse con su uso (Niedz, 1998).

A diferencia de los antibióticos, los biocidas tienen una actividad de amplio espectro contra bacterias, hongos y otros patógenos (Niedz, 1998).

Teniendo en cuenta que no se pudo obtener un porcentaje importante de explantes desinfectados, para la mayoría de los cultivares, se decidió evaluar el Plant Preservative MixtureTM (PPMTM), un biocida de amplio espectro utilizado en el cultivo de tejidos (Niedz, 1998; Guri *et al.*, 2000; Jiménez *et al.*, 2006).

Según Niedz (1998), generalmente los biocidas causan daño físico o químico a las células pero PPMTM no causa fitotoxicidad cuando se lo utiliza en dosis entre 0,5 y 1,0 mgL⁻¹. En el presente trabajo, si bien se logró aumentar el porcentaje de explantes sin contaminación con el uso del PPMTM, el mismo afectó la supervivencia de los segmentos uninodales, quizás debido a un efecto tóxico en las dosis evaluadas (Fig. 14).

Los tratamientos T2 (etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (40 min) y cultivo en ½ MS con 0,2% de PPM) y T4 (agua destilada estéril en agitación (2 h), ½ MS + PPM (5%) en agitación (15 min) y cultivo en ½ MS con 0,2% de PPM) son los que mayores valores de desinfección mostraron (97 y 100%, respectivamente). A pesar de ello, los segmentos presentaron zonas con necrosis que posteriormente se tradujo en muerte de explantes. Según Guri *et al.* (2000), los explantes oxidados no deberían descartarse puesto que el 50% de ellos se recupera luego de 4-6 semanas.

En esta experiencia, el 100% de los explantes oxidados nunca se recuperaron. Por este motivo, el tratamiento T4 fue descartado.

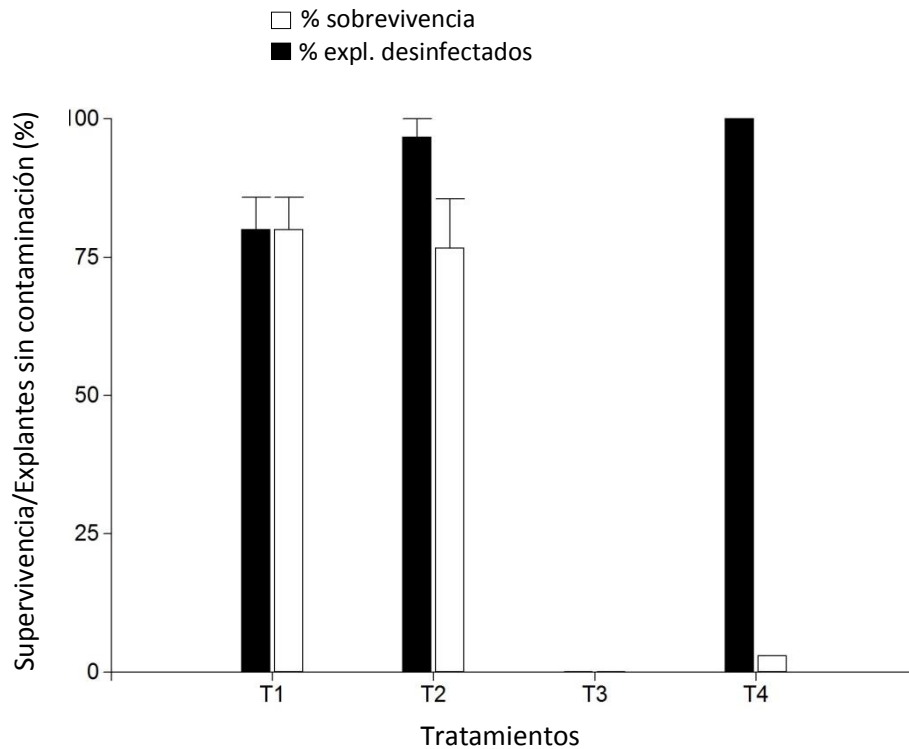


Figura 14. Efecto del tratamiento T1 (etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (40 min)) y tratamientos con PPM en el explante y en el medio de cultivo, en la desinfección y supervivencia de segmentos uninodales de té (cultivar CH 14 INTA). (La barra vertical representa \pm el error estándar). Ver tratamientos en Tabla 2.4

Teniendo en cuenta el % de desinfección, supervivencia y calidad de los explantes, una vez más el tratamiento con etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (40 min) fue el que mejores resultados obtuvo (79% de desinfección y 80% de explantes vivos) (Fig. 14).

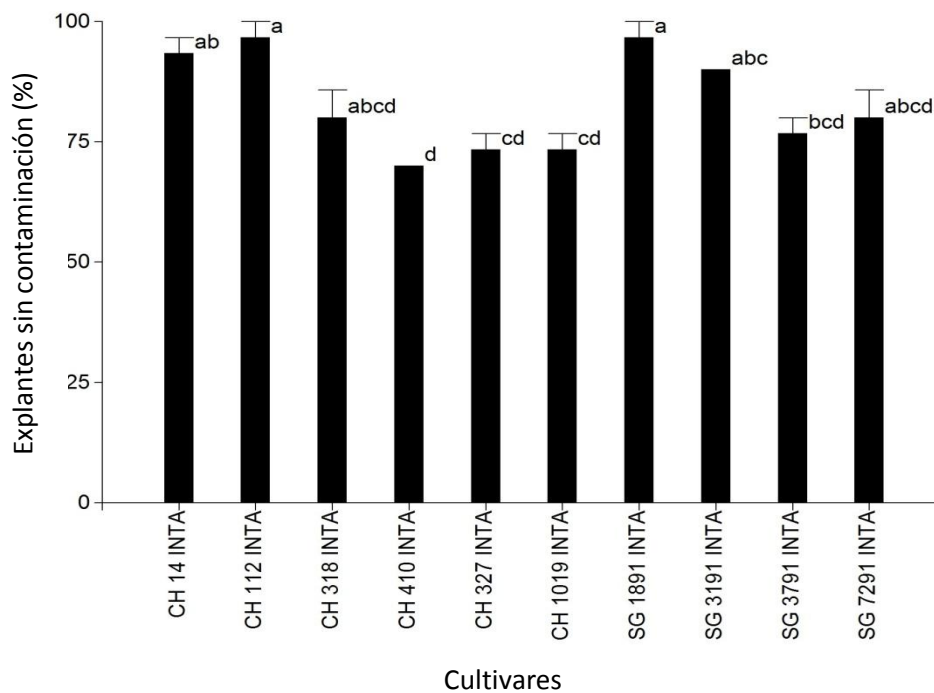


Figura 15. Desinfección de segmentos uninodales de 10 cultivares de té obtenidos de plantas madre mantenidas con riego por goteo y control químico. Tratamiento con etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (20 min). (La barra vertical representa \pm el error estándar).

La mayoría de las plantas madre necesitan ser mantenidas libre de enfermedades y plagas por medio de un estricto control químico y biológico. Las bacterias y hongos presentes en los tejidos aéreos deberían ser reducidos evitando mojar las plantas en el invernáculo y usando explantes provenientes de las partes más jóvenes (Leifert *et al.*, 1994; Jiménez González, 1998). Por ello, se instaló un sistema de riego por goteo que reemplazó el riego por aspersión existente, para evitar mojar la parte aérea de las plantas. Esta modificación en el manejo de las plantas madre no sólo produjo una disminución en la contaminación sino que además

permitió utilizar la metodología de desinfección más sencilla (etanol + NaClO) y disminuir el tiempo de exposición de los explantes al NaClO a 20 minutos (Figs. 15 y 17).

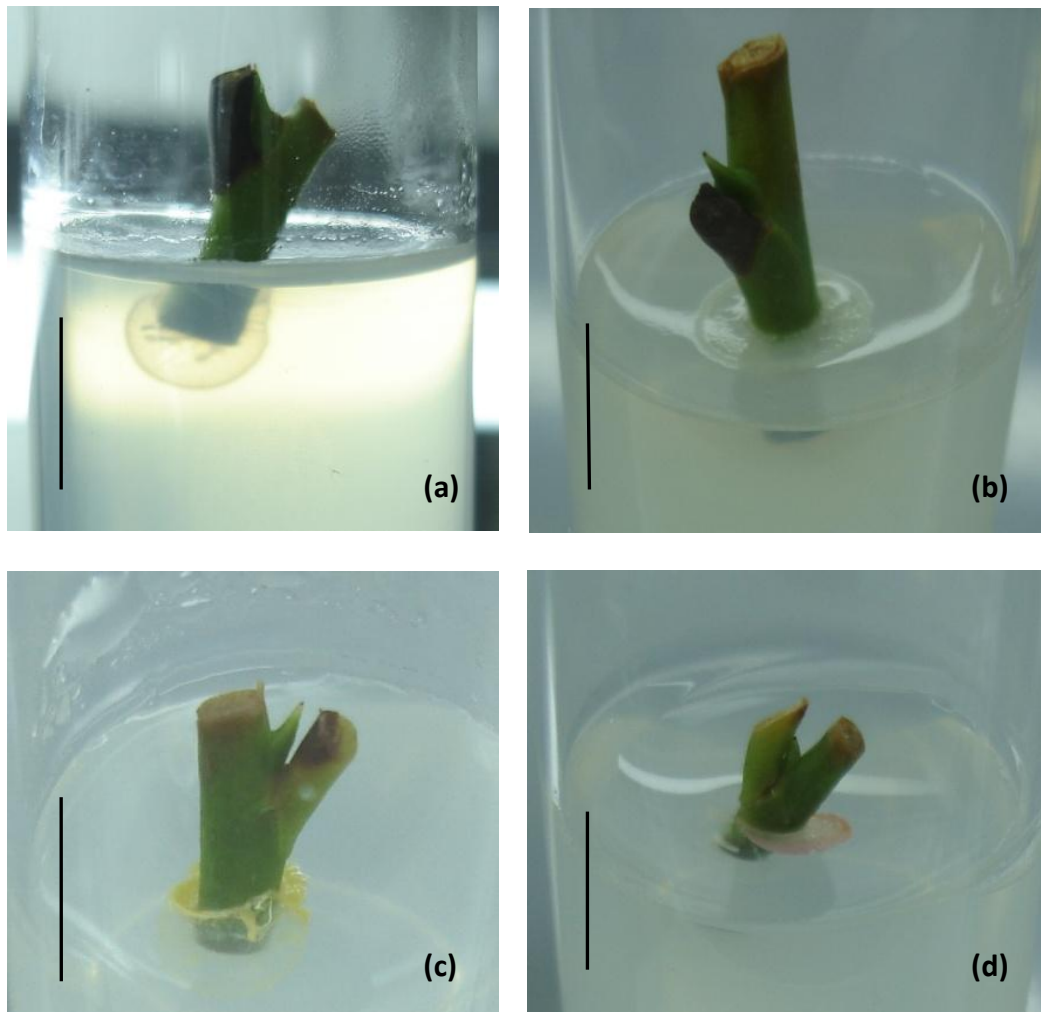


Figura 16. Contaminación bacteriana endógena encontrada en segmentos uninodales de té sometidos a los distintos métodos de desinfección: **a y b)** tratamiento con alcohol 70% (1 min) e hipoclorito de sodio 1,5% (30 min); **c y d)** Tratamiento con Captan ($2,0 \text{ gL}^{-1}$) + carbendazim ($1,0 \text{ cm}^3\text{L}^{-1}$) + kasugamicina ($3,0 \text{ cm}^3\text{L}^{-1}$) (25 min en agitador magnético) + etanol 70% (1 min) + NaClO 1,5% (40 min). (La barra vertical indica 1,0 cm).

Si bien existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los cultivares evaluados, la mayoría presenta valores de desinfección aceptables para una especie leñosa (superior al 70%) (Fig. 15).

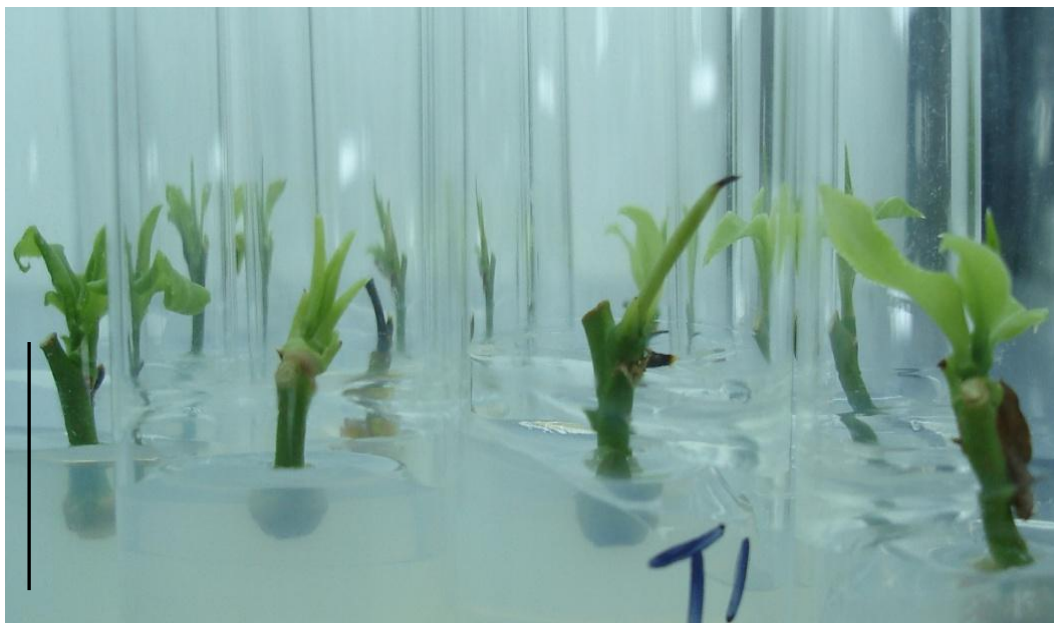


Figura 17. Explantes uninodales de té en establecimiento. Desinfección con etanol 70% (1 min) e hipoclorito de sodio al 1,5% (20 min). (La barra vertical indica 1,0 cm).

2.4. CONCLUSIONES

Los resultados informados sugieren que la desinfección de segmentos uninodales de los 10 cultivares de té (*Camellia sinensis*) puede ser lograda exitosamente a través de un método simple y rápido con etanol 70% durante 1 minuto e hipoclorito de sodio al 1,5% durante 20 minutos.

Un factor muy importante es la calidad de las plantas madres, las cuales deben ser manejadas mediante un estricto control nutricional y

químico preventivo, evitando el mojado de la parte aérea de las plantas para disminuir la contaminación bacteriana.

Basándose en los resultados encontrados en el presente trabajo, se concluye que es posible la desinfección eficiente de segmentos uninodales de té, haciendo posible una etapa importante del cultivo *in vitro*, como es el establecimiento.

CAPÍTULO 3

3. REGENERACIÓN DE PLANTAS A PARTIR DE SEGMENTOS UNINODALES, YEMAS AXILARES Y MERISTEMAS

3.1. INTRODUCCIÓN

Aunque la propagación vegetativa convencional de té es fácil de realizar, sólo es posible obtener una planta por estaca y lleva aproximadamente entre 10 y 12 meses para que esté en condiciones de llevarla a campo (Borchetia *et al.*, 2009). La técnica de micropropagación permite obtener un gran número de plantas en un tiempo relativamente corto (Bhaskaran y Prabhudesai, 1989; Phukan y Mitra, 1990; Prakash *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2007). Además, las técnicas basadas en el cultivo *in vitro* resultan imprescindibles para la conservación *ex situ* y el intercambio de germoplasma de las especies que se propagan vegetativamente o que tienen semillas recalcitrantes (Ashmore, 1997; Mondal *et al.*, 2002a). Para las técnicas de conservación *in vitro* es necesario desarrollar previamente los protocolos de propagación que permitan la introducción de los materiales disponibles y la posterior regeneración de los mismos luego de la conservación.

Varios trabajos informan sobre la regeneración *in vitro* de plantas de té mediante el cultivo de diferentes explantes (Kato, 1989; Nakamura, 1991; Mondal, 2003; Mondal *et al.*, 2004). Sin embargo el éxito de los cultivos depende del tipo y edad de los explantes y es altamente dependiente del genotipo (Das *et al.*, 1996; Mondal *et al.*, 2004).

Con este trabajo se dan a conocer procedimientos que permiten la regeneración *in vitro* de té, mediante el cultivo de meristemas caulinares, yemas axilares y segmentos uninodales de clones de interés para Argentina.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal

Se trabajó con 10 cultivares de té (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) de la colección que forma parte del Programa de Mejoramiento de la EEA Cerro Azul – INTA (Tabla 1).

Como explantes (Fig. 18 a) se utilizaron segmentos uninodales aislados de ramas cosechadas de las plantas madre que crecieron bajo invernáculo en condiciones semi-controladas, con un estricto manejo sanitario y nutricional.

En otro ensayo, se trabajó con los clones CH 14 INTA y CH 318 INTA, utilizando 3 tipos de explantes: 1) segmentos uninodales con una longitud entre 0,5 y 1,0 cm (Fig. 18 a); 2) meristemas de 0,5 mm de longitud, con el domo y por lo menos un primordio foliar (Fig. 18 b) y 3) yemas axilares (Fig. 18 c). Al igual que en el caso anterior, los explantes fueron extraídos de plantas madre mantenidas en invernáculo.

3.2.2. Cultivo de explantes

El procedimiento de cultivo involucró los siguientes pasos:

1) Desinfección de los brotes por inmersión en etanol 70% durante 1 minuto seguida de una solución de NaClO 1,5% durante 20 minutos y 3 enjuagues sucesivos con abundante agua destilada estéril.

2) Los segmentos uninodales desinfectados fueron cultivados en tubos de vidrio (25 mm x 120 mm; 40 ml de capacidad) conteniendo 10 ml de medio de cultivo. El medio consistió en las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), reducido a la mitad ($\frac{1}{2}$ MS) con 3% de sacarosa y 0,7% de agar Sigma (A-1296). La suplementación se realizó con $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de 6-bencilaminopurina (BAP), $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de ácido naftalen-acético (ANA) y $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de ácido giberélico (AG_3). Otro medio de cultivo utilizado estuvo

compuesto por ½ MS suplementado con 0,1 mgL⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), 1,0 mgL⁻¹ de BAP y 5,0 mgL⁻¹ de AG₃, con igual concentración de sacarosa y agar que el medio anterior.

En otro experimento se ensayó el efecto de diferentes concentraciones y combinaciones de BAP (0 y 1,0 mgL⁻¹), cinetina (CIN) (0 y 1,0 mgL⁻¹) y AG₃ (0; 1,0 y 5,0 mgL⁻¹) sobre la regeneración de vástagos a partir de meristemas, yemas axilares y segmentos uninodales (Tabla 5).

Tabla 5. Combinaciones de reguladores de crecimiento suplementados al medio ½ MS para la regeneración de vástagos a partir de segmentos uninodales, yemas axilares y meristemas de *Camellia sinensis*.

Tratamiento	Combinación de reguladores de crecimiento (mgL ⁻¹)		
	BAP	CIN	AG ₃
T1 (control)	0	0	0
T2	1	0	0
T3	1	0	1
T4	1	0	5
T5	0	1	0
T6	0	1	1
T7	0	1	5

3) En todos los casos, el pH del medio fue ajustado a 5,8 con KOH o HCl, antes del agregado del agar. Los tubos fueron obturados con papel aluminio y esterilizados en autoclave a 0,101 MPa por 15 minutos.

4) Los tubos conteniendo los explantes fueron cubiertos con dos capas de Resinite® e incubados en un cuarto climatizado a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo un fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad con una irradiación de $116 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ provista por lámparas fluorescentes frías.

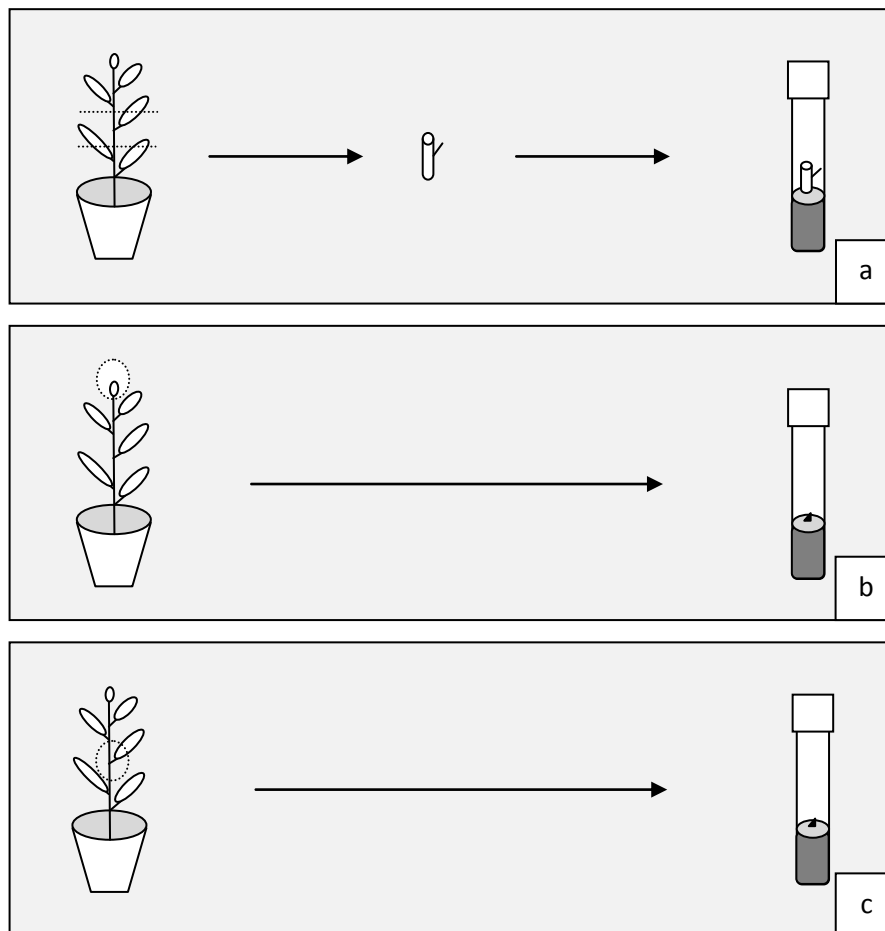


Figura 18. Aislamiento y cultivo de explantes de *Camellia sinensis*: a) segmentos uninodales; b) meristemas y c) yemas axilares.

3.2.3. Diseño experimental y análisis de los resultados

Se cultivaron 10 explantes por tratamiento. Cada experimento fue repetido por lo menos 3 veces. Después de 60 días de cultivo se registró el

porcentaje promedio de explantes que produjeron vástagos (contabilizando como vástagos a los que tenían, como mínimo, 0,5 cm de longitud y por lo menos una hoja desplegada). Las tablas y figuras muestran los resultados promedios con el error estándar (\pm SE). Los datos se analizaron mediante el análisis de la variancia (ANOVA) y las comparaciones de las medias fueron hechas usando el test de Tukey.

3.2.4. Enraizamiento de los vástagos regenerados

Los vástagos regenerados *in vitro* fueron enraizados mediante su cultivo en $\frac{1}{4}$ MS suplementado con 3% de sacarosa y $6,0 \text{ mgL}^{-1}$ de ácido indolbutírico (AIB). Las plantas obtenidas fueron transferidas a pequeñas macetas, conteniendo turba, mantenidas en una atmósfera nebulizada durante 2 o 3 semanas con el objeto de aclimatizarlas.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Cultivo de segmentos uninodales de té

Una de las citocininas más ampliamente usadas para inducir la formación de brotes es el BAP (6-bencilaminopurina) (Ghanati e Ishka, 2009). En el presente trabajo, la misma se evaluó a una concentración de

2,0 mgL⁻¹ (medio utilizado por Prakash *et al.*, 1999). Esta dosis resultó ser muy alta, provocando efectos de toxicidad evidenciados por la presencia de tamaño reducido de las brotaciones (brotaciones en “roseta”) e hiperhidricidad (Fig. 19 a y b). Esta respuesta se encontró en la mayoría de los cultivares evaluados.

Las dosis normalmente empleadas son elevadas (Dehua *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1999; Borchetia *et al.*, 2009). Gaspar *et al.* (1995) mencionan que los tejidos suelen presentar hiperhidricidad como una respuesta adaptativa, al ser sometidos a situaciones de stress, como es el uso de citocininas (principalmente BAP) en altas concentraciones.

Síntomas similares fueron encontrados en té (Sandal *et al.*, 2001) utilizando medio líquido y en otras especies como yerba mate (Zaniolo y Zanette, 1999) y palo santo (Pinto *et al.*, 1994). Según estos autores, el uso de dosis excesivas o un tiempo prolongado de exposición al BAP produce muchas brotaciones y de tamaño reducido.

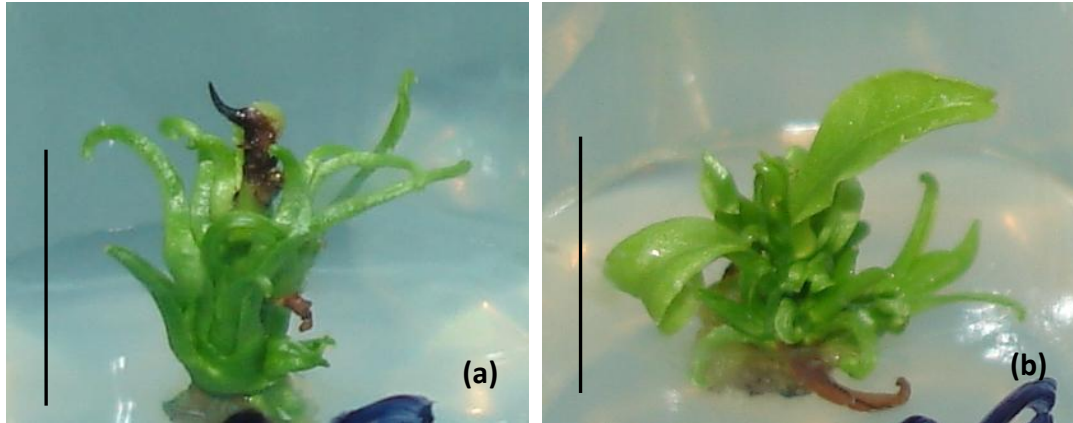


Figura 19. Efecto del uso de 6-bencilaminopurina (BAP) en altas concentraciones: a) hiperhidricidad y b) brotaciones en roseta. (Las barras verticales indican 1,0 cm).

En cuanto a la tasa de multiplicación, evaluada a través del número de brotes/explante, se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los distintos cultivares evaluados (Fig. 20).

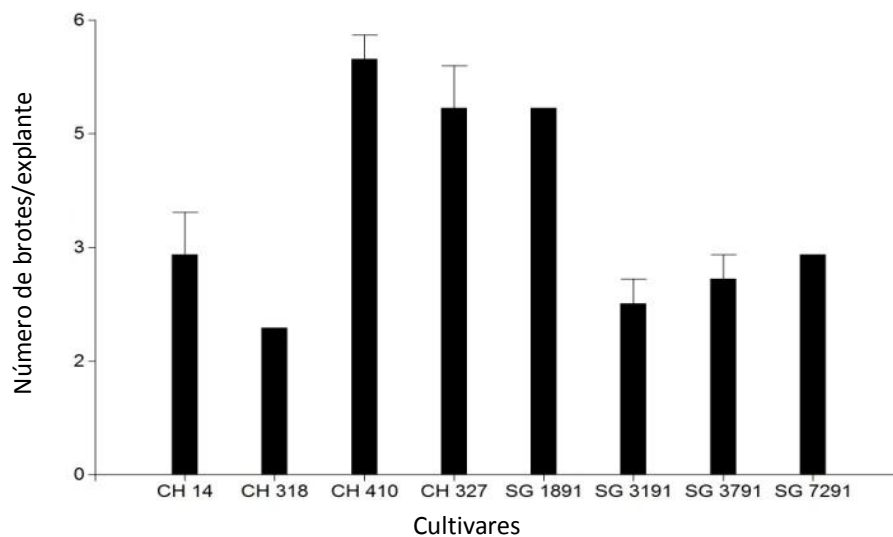


Figura 20. Tasa de multiplicación (número de brotes/explante) de segmentos uninodales cultivados en el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS y suplementado con BAP ($2,0 \text{ mgL}^{-1}$), AIA ($0,2 \text{ mgL}^{-1}$) y AG₃ ($0,2 \text{ mgL}^{-1}$), en 8 cultivares de té. (La barra vertical representa \pm el error estándar).

Con el objetivo de obtener brotes de mejor calidad y disminuir los efectos de toxicidad del BAP, se redujo a la mitad la concentración de la citocinina, combinándolo con otros reguladores de crecimiento como ácido indolbutírico (AIB, 0.1 mgL^{-1}) y ácido giberélico (AG_3 , 5.0 mgL^{-1}) (Nakamura, 1991). Con este medio de cultivo se mejoró la calidad de los brotes, reduciendo la incidencia de brotaciones en roseta y la aparición de hiperhidricidad. A pesar de ello, se observó una disminución de la tasa de multiplicación en los sucesivos subcultivos. Este comportamiento se registró en la mayoría de los cultivares evaluados (Fig. 21).

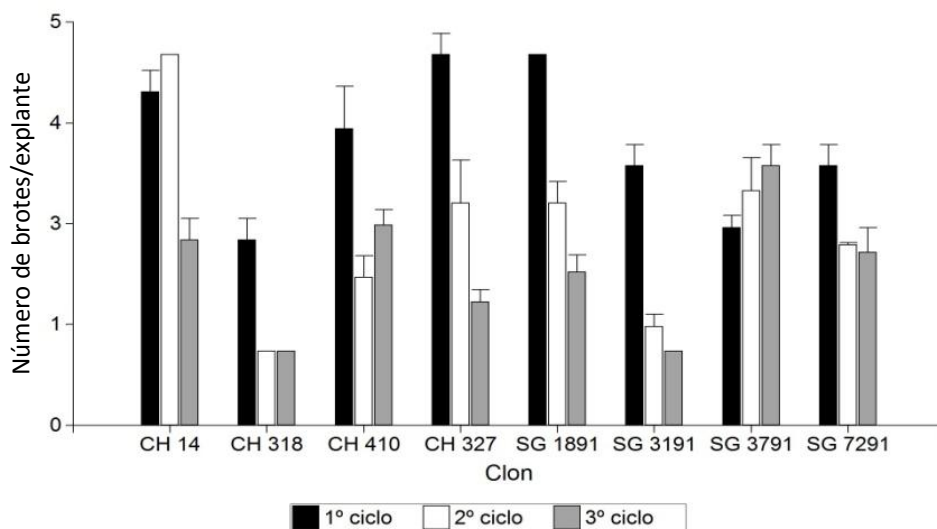


Figura 21. Tasa de multiplicación (número de brotes/explante) a partir de segmentos uninodales cultivados en el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS, suplementado con BAP ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$), AIB ($0,1 \text{ mgL}^{-1}$) y AG_3 ($5,0 \text{ mgL}^{-1}$), durante 3 ciclos de multiplicación en 8 cultivares de té. (La barra vertical representa \pm el error estándar).

Al evaluar las combinaciones de reguladores de crecimiento (Tabla 5) a los 60 días de cultivo, en todos los medios evaluados se logró la regeneración de vástagos a partir de los segmentos uninodales. Sin embargo, tanto el porcentaje de explantes con vástagos como el número de vástagos por explante fueron influenciados por el material genético (cultivar) y el medio de cultivo empleado (Fig. 22).

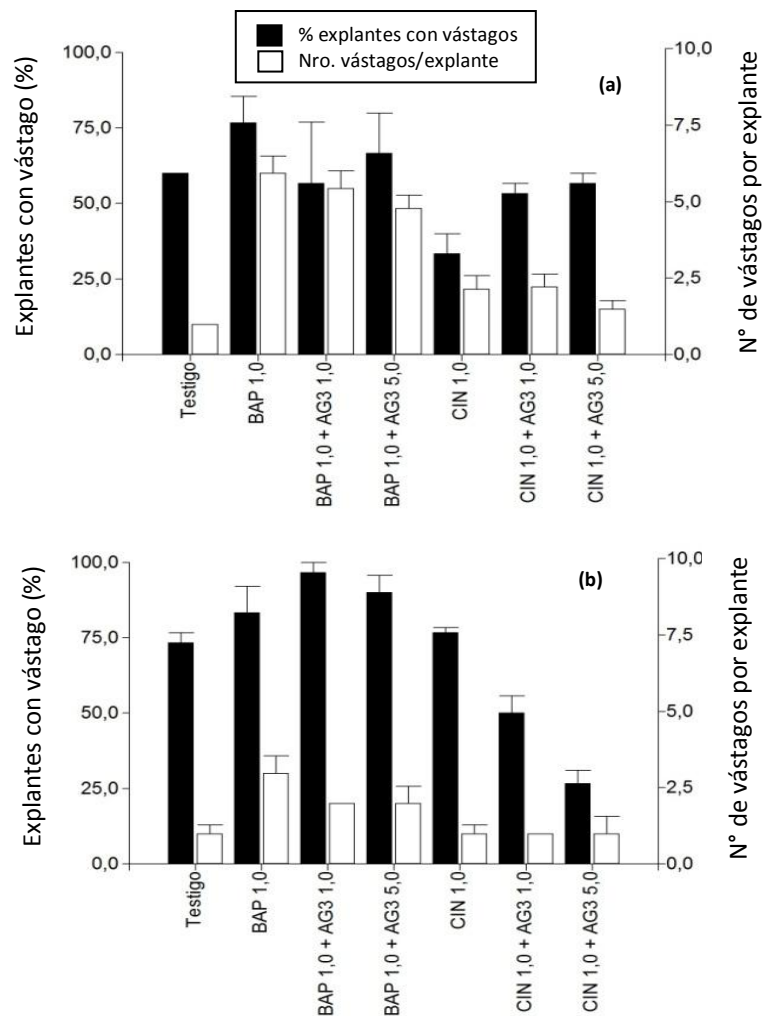


Figura 22. Efecto de siete combinaciones de reguladores de crecimiento suplementados al medio $\frac{1}{2}$ MS sobre la regeneración de vástagos a partir de segmentos uninodales en dos clones de té. a) clon CH 14 INTA y b) clon CH 318 INTA. (La barra vertical representa \pm el error estándar).

El mejor medio para el cultivo de segmentos uninodales de té fue $\frac{1}{2}$ MS suplementado con 1 mgL^{-1} de BAP, logrando que el 76,67% de los explantes en el clon CH 14 INTA y el 83,33% en el clon CH 318 INTA se regeneren con un promedio de 6 y 3 vástagos por explante, respectivamente (Figs. 22 y 23). En el mismo medio, la longitud promedio de los vástagos fue de 1,8 cm en el clon CH 14 INTA y 1,3 cm en el clon CH 318 INTA (Tabla 6).

Tabla 6. Longitud promedio de vástagos regenerados en distintos medios de cultivo, a partir de segmentos uninodales en dos clones de té. (En paréntesis \pm error estándar)

Tratamiento	Longitud de vástagos (cm)	
	CH 14 INTA	CH 318 INTA
$\frac{1}{2}$ MS	1,0 ($\pm 0,12$)	0,6 ($\pm 0,07$)
$\frac{1}{2}$ MS + $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ BAP	1,8 ($\pm 0,15$)	1,3 ($\pm 0,24$)
$\frac{1}{2}$ MS + $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ BAP + $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ AG ₃	0,9 ($\pm 0,23$)	0,8 ($\pm 0,18$)
$\frac{1}{2}$ MS + $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ BAP + $5,0 \text{ mgL}^{-1}$ AG ₃	1,2 ($\pm 0,17$)	1,1 ($\pm 0,19$)
$\frac{1}{2}$ MS + $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ CIN	1,7 ($\pm 0,40$)	0,8 ($\pm 0,28$)
$\frac{1}{2}$ MS + $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ CIN + $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ AG ₃	0,8 ($\pm 0,15$)	0,7 ($\pm 0,19$)
$\frac{1}{2}$ MS + $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ CIN + $5,0 \text{ mgL}^{-1}$ AG ₃	0,9 ($\pm 0,23$)	0,5 ($\pm 0,03$)

A diferencia de lo expuesto por (Mondal, 2007), en cuanto a que medios suplementados con BAP entre 1 y 6 mgL^{-1} resultan óptimos para la multiplicación de brotes de té, los experimentos realizados en el presente

trabajo demuestran que no es aconsejable usar dosis superiores a 1 mgL^{-1} , para obtener brotes de calidad que no comprometan los posteriores ciclos de multiplicación.

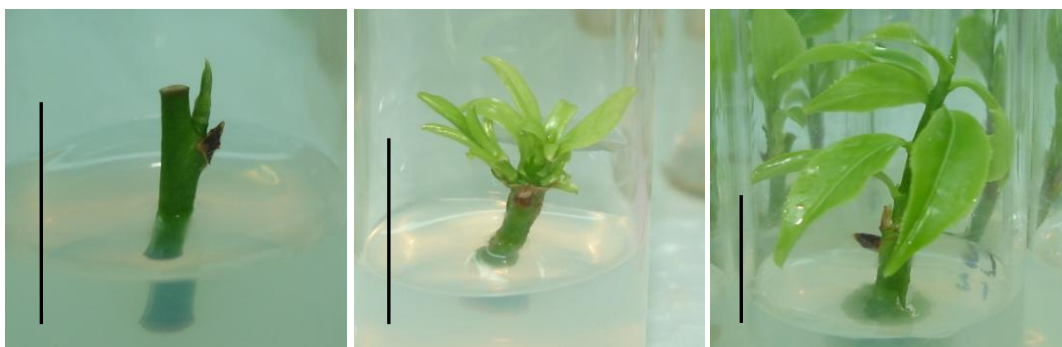


Figura 23. Crecimiento de los vástagos en el medio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS suplementado con $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP, a partir de segmentos uninodales. (Las barras verticales indican 1,0 cm).

3.3.2. Cultivo de meristemas y yemas axilares de té

Los medios de cultivo de la Tabla 5 fueron evaluados para la regeneración de té a partir de meristemas y yemas axilares. Al igual que lo ocurrido con los segmentos uninodales, todos los medios de cultivo permitieron la regeneración de vástagos a partir de los meristemas y yemas axilares. Tanto el porcentaje de explantes con vástagos como el número de vástagos por explante fueron influidos por el material genético (cultivar), el tipo de explante y el medio de cultivo empleado (Figs. 24 y 25).

En el cultivo de yemas axilares del clon CH 14 INTA, si bien no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los medios de cultivo con respecto al porcentaje de explantes capaces de formar vástagos, el medio compuesto por $\frac{1}{2}$ MS + $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP generó el mayor número de vástagos por explante (3 vástagos/explante), con una longitud promedio de 0,7 cm (Tabla 7), en el 83,33% de las yemas cultivadas (Fig. 24). El aumento en la dosis de AG_3 , si bien también estimuló el número de explantes que formaron vástagos y la longitud de éstos, disminuyó el número promedio por explante (Fig. 24; Tabla 7).

En el clon CH 318 INTA, la mejor respuesta obtenida con el cultivo de yemas axilares se obtuvo cuando al medio, además de la citocinina ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP), se le adicionó 1 mgL^{-1} de AG_3 (Fig. 26 a). En este medio, el 100% de los explantes generaron un promedio de 3 vástagos/explante (Fig. 24) con una longitud promedio de 0,8 cm (Tabla 7). Al igual que con el otro clon, la adición de AG_3 en una dosis mayor ($5,0 \text{ mgL}^{-1}$) en el medio de cultivo, produjo un efecto negativo en el número promedio de vástagos/explante (Fig. 24).

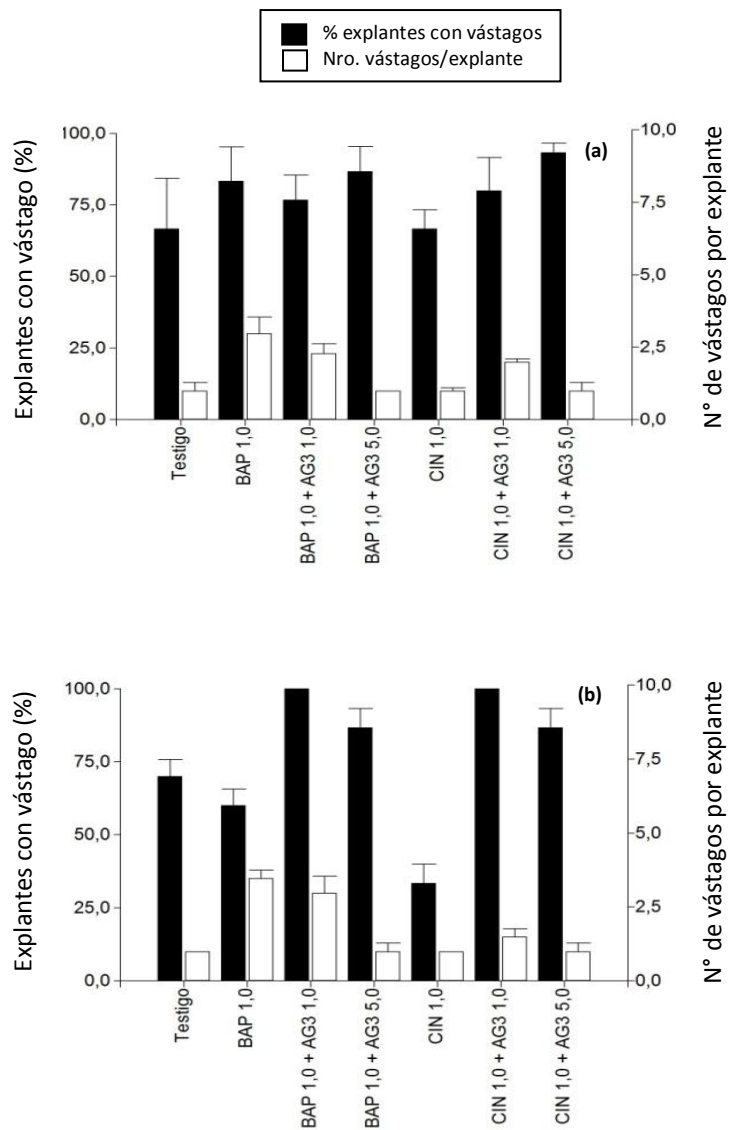


Figura 24. Efecto de siete combinaciones de reguladores de crecimiento suplementados al medio $\frac{1}{2}$ MS sobre la regeneración de vástagos a partir de yemas axilares en dos clones de té. a) clon CH 14 INTA y b) clon CH 318 INTA. (La barra vertical representa \pm el error estándar).

Tabla 7. Longitud promedio de vástagos regenerados en distintos medios de cultivo, a partir de yemas axilares en dos clones de té. (En paréntesis \pm error estándar)

Tratamiento	Longitud de vástagos (cm)	
	CH 14 INTA	CH 318 INTA
$\frac{1}{2}$ MS	0,5 ($\pm 0,03$)	0,5 ($\pm 0,03$)
$\frac{1}{2}$ MS + 1,0 mgL ⁻¹ BAP	0,7 ($\pm 0,12$)	0,8 ($\pm 0,15$)
$\frac{1}{2}$ MS + 1,0 mgL ⁻¹ BAP + 1,0 mgL ⁻¹ AG ₃	1,0 ($\pm 0,18$)	0,8 ($\pm 0,03$)
$\frac{1}{2}$ MS + 1,0 mgL ⁻¹ BAP + 5,0 mgL ⁻¹ AG ₃	1,0 ($\pm 0,07$)	0,5 ($\pm 0,03$)
$\frac{1}{2}$ MS + 1,0 mgL ⁻¹ CIN	0,5 ($\pm 0,00$)	0,4 ($\pm 0,03$)
$\frac{1}{2}$ MS + 1,0 mgL ⁻¹ CIN + 1,0 mgL ⁻¹ AG ₃	0,8 ($\pm 0,03$)	0,9 ($\pm 0,12$)
$\frac{1}{2}$ MS + 1,0 mgL ⁻¹ CIN + 5,0 mgL ⁻¹ AG ₃	0,7 ($\pm 0,12$)	0,6 ($\pm 0,09$)

Con respecto a los meristemas, con ambos clones, se lograron los mejores resultados en el medio compuesto por $\frac{1}{2}$ MS suplementado con 1,0 mgL⁻¹ de CIN y 1,0 mgL⁻¹ de AG₃ (Fig. 26 b). El clon CH 14 INTA respondió con un 83,33% de explantes con vástagos y el clon CH 318 INTA con un 73,33% (Fig. 25). La tasa de multiplicación y la longitud de los vástagos también presentaron los mayores valores en este medio, con un promedio de 3 vástagos de 1,1 cm por explante en el clon CH 14 INTA y 2 vástagos/explante en el clon CH 318 INTA con una longitud de 0,7 cm (Fig. 25; Tabla 8).

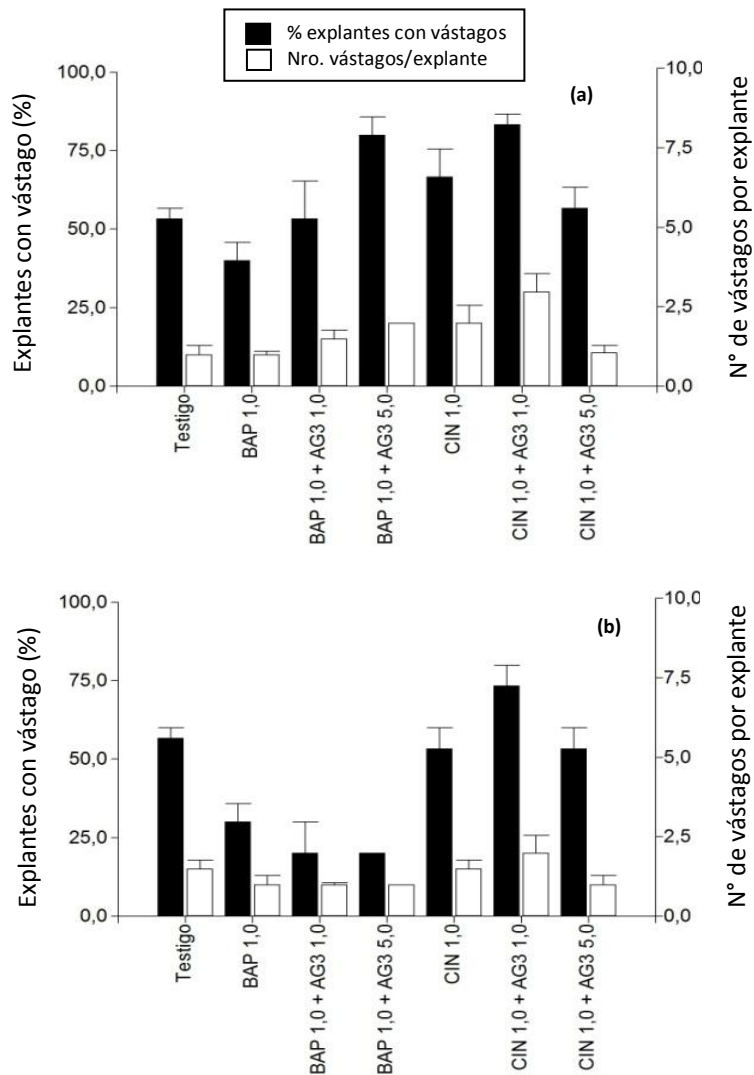


Figura 25. Efecto de siete combinaciones de reguladores de crecimiento suplementados al medio ½ MS sobre la regeneración de vástagos a partir de meristemas en dos clones de té. a) clon CH 14 INTA y b) clon CH 318 INTA. (La barra vertical representa ± el error estándar).

Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Nakamura (1991) quien informa que el AG₃ combinado con BAP estimula el crecimiento de ápices y yemas axilares de té cultivados *in vitro*. Sin embargo, los resultados de este trabajo muestran que las dosis de AG₃

que resultaron benéficas para el crecimiento de meristemas, son muy inferiores a las utilizadas por Nakamura (1991) y por Dehua *et al.* (1997).

Tabla 8. Longitud promedio de vástagos regenerados en distintos medios de cultivo, a partir de meristemas en dos clones de té. (En paréntesis \pm error estándar)

Tratamiento	Longitud de vástagos (cm)	
	CH 14 INTA	CH 318 INTA
$\frac{1}{2}$ MS	0,5 ($\pm 0,03$)	0,5 ($\pm 0,03$)
$\frac{1}{2}$ MS + 1,0 mgL ⁻¹ BAP	0,7 ($\pm 0,12$)	0,5 ($\pm 0,03$)
$\frac{1}{2}$ MS + 1,0 mgL ⁻¹ BAP + 1,0 mgL ⁻¹ AG ₃	0,6 ($\pm 0,03$)	0,7 ($\pm 0,12$)
$\frac{1}{2}$ MS + 1,0 mgL ⁻¹ BAP + 5,0 mgL ⁻¹ AG ₃	0,9 ($\pm 0,07$)	0,4 ($\pm 0,03$)
$\frac{1}{2}$ MS + 1,0 mgL ⁻¹ CIN	0,7 ($\pm 0,09$)	0,6 ($\pm 0,07$)
$\frac{1}{2}$ MS + 1,0 mgL ⁻¹ CIN + 1,0 mgL ⁻¹ AG ₃	1,1 ($\pm 0,03$)	0,7 ($\pm 0,15$)
$\frac{1}{2}$ MS + 1,0 mgL ⁻¹ CIN + 5,0 mgL ⁻¹ AG ₃	0,8 ($\pm 0,09$)	0,6 ($\pm 0,09$)

Los resultados de este trabajo muestran que, para la obtención de los máximos valores de regeneración, es necesaria la adición de por lo menos BAP, y/o CIN y/o AG₃, dependiendo del clon y del explante que se cultiva. En este sentido los resultados de este trabajo concuerdan con lo informado por algunos autores (Mondal *et al.*, 2004), aunque los protocolos que aquí se describen se caracterizan por la simplicidad de los medios de cultivo utilizados para inducir la regeneración de plantas a partir del cultivo de segmentos nodales cuando se los compara con los utilizados por varios investigadores que utilizaron además del medio MS,

extracto de levadura, leche de coco, ácido indolacético y BAP (Banerjee y Agarwal, 1990; Agarwal *et al.*, 1992). Asimismo, con la utilización de yemas axilares, los medios sugeridos en este trabajo son muy simples y difieren de los recomendados por otros autores (Tahardi y Shu, 1992). Por otra parte, este trabajo muestra por primera vez que es posible la regeneración de plantas de té a partir de meristemas caulinares.

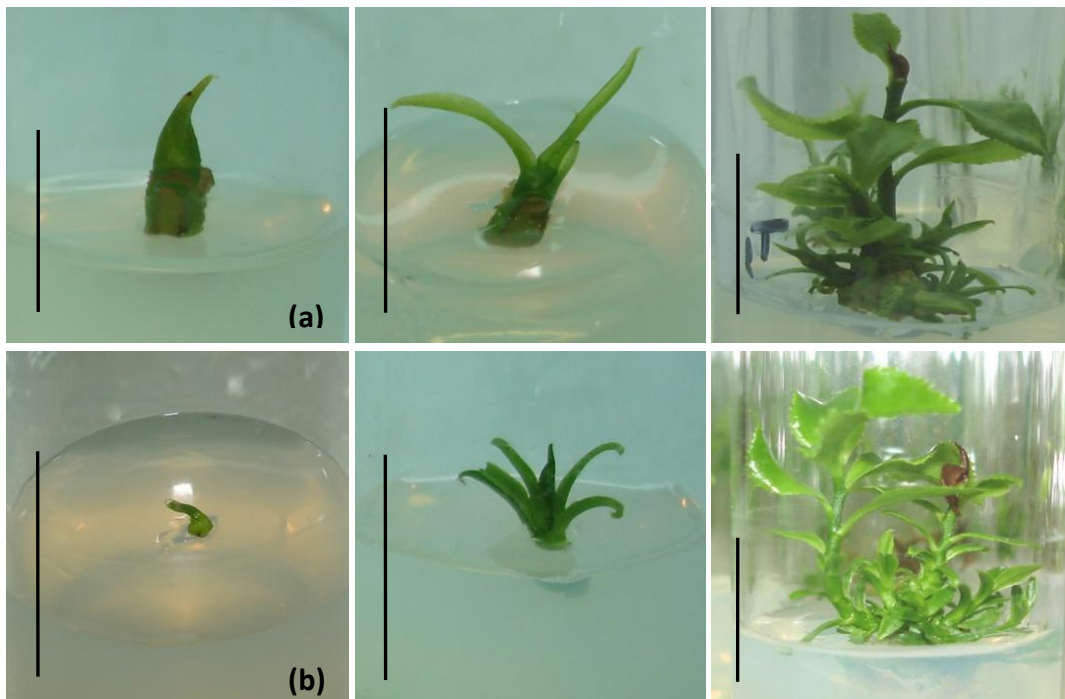


Figura 26. Crecimiento de los vástagos en un medio de cultivo a partir de los diferentes explantes en té: a) yemas axilares y b) meristemas. (Las barras verticales indican 1,0 cm).

Un punto a tener en cuenta en el cultivo *in vitro* de té es el amarronamiento del explante y ennegrecimiento del medio de cultivo. Es un problema relacionado al elevado contenido de polifenoles, característica por la cual el té es muy valorado. Estos compuestos son liberados al medio de cultivo desde el extremo de los explantes y sufren una oxidación enzimática para formar algunos compuestos tóxicos (Mondal *et al.*, 2004). Esta situación se hizo evidente cuando se cultivaron ápices, sitio de alta concentración de polifenoles (Forrest y Bendall, 1969), impidiendo el establecimiento *in vitro* de los mismos.

3.3.3. Enraizamiento de vástagos regenerados *in vitro*

Normalmente, para la inducción de enraizamiento se utilizan auxinas. Las más usadas son el ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y ácido indolacético (AIA).

En general, el enraizamiento *in vitro* de microbrotes de té se logra cultivándolos en medios con baja concentración de auxina por largos períodos de tiempo o por tratamientos “shock” con altas concentraciones de auxinas seguido por la transferencia a un medio libre de ellas (Mondal *et al.*, 2004).

Kato (1985) consiguió el enraizamiento *in vitro* de brotes de té en el medio compuesto por $\frac{1}{2}$ MS suplementado con 0,5 ó 1,0 mgL^{-1} de AIB, logrando mayor número de brotes enraizados en el medio con menor contenido de auxina. En este trabajo, prácticamente el 100% de los vástagos, regenerados a partir de segmentos uninodales, enraizaron *in vitro* en el medio similar al sugerido por Das *et al.* (1996) y por Pandidurai *et al.* (1996), consistente de $\frac{1}{4}$ MS suplementado con 3% de sacarosa y 6,0 mgL^{-1} de AIB, en un ambiente de completa oscuridad. La aclimatación permitió que entre el 80 y 90% de plantas obtenidas sobrevivieran exitosamente (Fig. 27), superando una de las fases más críticas de la micropropagación del té (Mondal *et al.*, 2004).



Figura 27. Plantas de *Camellia sinensis* provenientes del cultivo *in vitro* de segmentos uninodales.

3.4. CONCLUSIONES

En general, si bien hay regeneración en todos los medios utilizados, incluido ½ MS desprovisto de reguladores de crecimiento, para la obtención de los máximos valores de regeneración es necesario la adición de por lo menos BAP, y/o CIN y/o AG₃, dependiendo del clon y del explante que se cultiva.

Los resultados de este trabajo permiten concluir que es posible la regeneración de plantas a partir de clones adultos de té -de interés para Argentina- mediante el cultivo *in vitro* en medios muy simples de: meristemas, yemas axilares y segmentos uninodales. Esta tecnología está disponible para encarar estudios que permitan su aplicación para la conservación de germoplasma.

CAPÍTULO 4

4. REGENERACIÓN DE PLANTAS POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

4.1. INTRODUCCIÓN

Como quedó demostrado en el capítulo anterior, es posible la multiplicación *in vitro* de plantas de té por regeneración a partir de diferentes explantes. Una herramienta alternativa y más eficiente para la propagación *in vitro* es la embriogénesis somática. A diferencia de los brotes micropropagados, las plantas provenientes de embriones somáticos surgen de una o unas pocas células, sin la necesidad de la fusión de gametas. Además constan de un meristema radicular y uno apical y no tienen conexión vascular con el tejido materno (Litz y Jarret, 1991; Akula y Akula, 2005; Solís-Ramos *et al.*, 2012). Este sistema permite altas tasas de multiplicación en cortos períodos de tiempo y a un bajo costo si se considera la automatización con el uso de bioreactores (Litz y Jarret, 1991; Akula y Dodd, 1998; Giridhar *et al.*, 2004; Akula y Akula, 2005; Seran *et al.*, 2006a). Las plantas resultantes tienen buen desarrollo lo que les otorga una ventaja sobre las plantas generadas por organogénesis o por propagación convencional, particularmente en situaciones donde el stress por humedad limita el crecimiento y la producción (Akula y Dodd, 1998;

Akula y Akula, 2005). La posibilidad de encapsular los embriones para la producción de semillas artificiales y la crioconservación del tejido embriogénico, hacen que la embriogénesis somática sea el método de micropropagación más deseado. También se prefiere este método por la obtención de plantas juveniles y por presentar una menor variación somaclonal (Litz y Jarret, 1991).

Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*: directa o indirecta. La forma directa implica la formación de los embriones somáticos desde el explante. La forma indirecta implica la formación de embriones somáticos, tras pasar por una fase proliferativa (callo) (Gómez Kosky, 1998; Martínez-Ruiz *et al.*, 2004).

La embriogénesis somática, directa e indirecta, en el género *Camellia* fue descrita desde numerosos explantes (Tabla 9). Sin embargo, en la mayoría de estos trabajos, la frecuencia de conversión en plantas fue baja (10-20%) y, en algunos casos, nula.

Tabla 9. Embriogénesis somática en especies del género *Camellia* a partir de diferentes explantes.

Explantos	Especie	Referencia
láminas de cotiledón	<i>C. japonica</i>	Kato, 1986; Vieitez y Barciela, 1990
	<i>C. sinensis</i>	Kato, 1986, 1989; Paratasilpin, 1990; Wachira y Ogada, 1995; Akula <i>et al.</i> , 2000a; Suganthi <i>et al.</i> , 2012
explantes nodales	<i>C. sinensis</i>	Akula y Dodd, 1998; Akula <i>et al.</i> , 2000b; Tahardi <i>et al.</i> , 2003
hojas inmaduras	<i>C. japonica</i>	Pedroso y Pais, 1993
	<i>C. sinensis</i>	Kato, 1996; Seran <i>et al.</i> , 2006b
hojas maduras	<i>C. sinensis</i>	Ghanati e Ishka, 2009

En el presente trabajo se evaluó la capacidad embriogénica de los distintos explantes. Además se probaron medios de cultivo que permitan la germinación de los embriones somáticos obtenidos a partir de materiales seleccionados en Argentina.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal

Se trabajó con 10 cultivares de té (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) de la colección, descritos en el Capítulo 2 (Tabla 1).

4.2.2. Origen y cultivo de los explantes

Se utilizaron tres tipos de plantas dadoras de explantes:

1) Plantas adultas de 20 años de edad, creciendo a campo, a partir de las cuales se cosecharon frutos inmaduros (diciembre), frutos maduros (marzo) y botones florales (abril y junio). Para el caso de los frutos, luego de la remoción del pericarpio, las semillas se sumergieron en agua, descartando las que flotaban. La desinfección fue realizada en cabina de flujo laminar, con etanol al 70% durante 1 minuto seguido de hipoclorito de sodio al 1,5% durante 30 minutos. Finalmente, se realizaron 3 lavados sucesivos con agua destilada estéril. Con la ayuda de una pinza y un escalpelo se descartó el tegumento, quedando expuesto el embrión. Se cultivaron 3 tipos de explantes: embriones, ejes embrionales y láminas de cotiledón provenientes de embriones maduros e inmaduros (5 mm de longitud y 1 mm de espesor). Los botones florales fueron desinfectados de acuerdo al tratamiento realizado por Chantásig Vaca (2004), el cual consiste en el lavado de los botones en agua corriente, seguido de la inmersión en hipoclorito de sodio al 25% (v/v) durante 10 minutos y 3 enjuagues con agua destilada estéril. Como explantes para el cultivo *in vitro* se utilizaron bases de pétalos y anteras, que fueron aislados de los botones florales después de la desinfección. Los botones florales

fueron seccionados con la ayuda de un bisturí, separando los sépalos para extraer con mayor facilidad los pétalos y anteras. El cultivo de los explantes se realizó en tubos de vidrio de 10 ml de capacidad, conteniendo 3 ml de medio de cultivo solidificado con 0,7% de agar Sigma (A-1296). Los 39 tratamientos consistieron de ½ MS suplementado con 2,4-D, AIB ó ANA (0,1; 1 y 5 mg L⁻¹) combinado con BAP (0; 0,1; 1 y 5 mg L⁻¹) (Tabla 10).

- 2) Plantas establecidas *in vitro* provenientes del cultivo de ejes embrionales disectados a partir de semillas cosechadas de plantas madre adultas de 20 años de edad. Previa desinfección de las semillas, los ejes embrionales fueron aislados y cultivados en ½ MS, suplementado con 1 mgL⁻¹ de BAP. Luego de un período de incubación de 90 días en cámara de crecimiento a 25 ± 2°C, bajo un fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad con una irradiación de 116 μmol.m⁻².s⁻¹ provista por lámparas fluorescentes frías, las plantas regeneradas estuvieron en condiciones de ser usadas como fuente de explantes. De estas plantas, se aisló la primera hoja madura desplegada. Sin desinfección previa, se realizó el cultivo en tubos de vidrio de 10 ml de capacidad, con 3 ml de medio de cultivo solidificado con 0,7% de agar Sigma (A-1296). Los 39 tratamientos

consistieron de ½ MS suplementado con 2,4-D, AIB ó ANA (0,1; 1 y 5 mg L⁻¹) combinado con BAP (0; 0,1; 1 y 5 mg L⁻¹) (Tabla 10).

- 3) Plantas madre de 2 años de edad, mantenidas en estrictas condiciones sanitarias y nutricionales bajo invernáculo, con riego por goteo. Como explante se utilizaron hojas inmaduras (2º hoja desplegada). La desinfección fue realizada con etanol al 70% (1 min) seguido de hipoclorito de sodio al 1.5% (20 min). Los tratamientos consistieron en el cultivo de los explantes en MS con cinco dosis de 2,4-D (0; 0,5; 1; 1,5 y 2 mg L⁻¹) en un medio solidificado con 0,7% de agar Sigma (10 ml de medio en tubos de vidrio de 50 ml de capacidad) y en medio líquido en un shaker a 100 rpm (30 ml de medio en Erlenmeyers de 125 ml de capacidad). La incubación fue hecha en luz (con 16 h de fotoperíodo) y en oscuridad a 25 ± 2°C.

Tabla 10. Combinación de reguladores de crecimiento suplementados a ½ MS, utilizados para la inducción de embriogénesis somática en distintos explantes de té (*Camellia sinensis*).

Tratamiento	Reguladores de crecimiento			
	2,4-D	AIB	ANA	BAP
T1	0,1			
T2	1,0			
T3	5,0			
T4	0,1			0,1
T5	0,1			1,0
T6	0,1			5,0
T7	1,0			0,1
T8	1,0			1,0
T9	1,0			5,0
T10	5,0			0,1
T11	5,0			1,0
T12	5,0			5,0
T13		0,1		
T14		1,0		
T15		5,0		
T16		0,1		0,1
T17		0,1		1,0
T18		0,1		5,0
T19		1,0		0,1
T20		1,0		1,0
T21		1,0		5,0
T22		5,0		0,1
T23		5,0		1,0
T24		5,0		5,0
T25			0,1	
T26			1,0	
T27			5,0	
T28			0,1	0,1
T29			0,1	1,0
T30			0,1	5,0
T31			1,0	0,1
T32			1,0	1,0
T33			1,0	5,0
T34			5,0	0,1
T35			5,0	1,0
T36			5,0	5,0
T37				0,1
T38				1,0
T39				5,0

4.2.3. Germinación de embriones somáticos

Como explante se utilizaron láminas de cotiledón provenientes de semillas maduras (cosechadas en marzo). Se aplicó la metodología de desinfección de semillas empleada en el punto anterior. Se establecieron 3 etapas: 1) generación de embriones somáticos; 2) embriogénesis secundaria y 3) germinación de los embriones somáticos. Los medios de cultivo utilizados en cada etapa se describen en la Tabla 11. El cultivo de los explantes se realizó en tubos de vidrio de 10 ml de capacidad, conteniendo 3 ml de medio de cultivo solidificado con 0,7% de agar Sigma (A-1296). Para las etapas 2 y 3, el cultivo se realizó en frascos de vidrio de 100 ml de capacidad, con 30 ml de medio. Los recipientes conteniendo los explantes fueron cubiertos con dos capas de Resinite® e incubados en un cuarto climatizado a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ bajo un fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad con una irradiación de $116 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ provista por lámparas fluorescentes frías.

Tabla 11. Medios de cultivo utilizados para el proceso de embriogénesis somática a partir de láminas de cotiledón de té (clon CH 14 INTA).

Etapas	Medio de cultivo
Generación de ES	$\frac{1}{2}$ MS + 2,4-D ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) + BAP ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$)
	$\frac{1}{2}$ MS + AIB ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) + BAP ($0,1 \text{ mgL}^{-1}$)
	$\frac{1}{2}$ MS + ANA ($0,1 \text{ mgL}^{-1}$) + BAP ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$)
	$\frac{1}{2}$ MS + ANA ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) + BAP ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$)
Embriogénesis secundaria	$\frac{1}{2}$ MS + caseína hidrolizada (500 mgL^{-1})
Germinación de ES	MS + AIB ($0,005 \text{ mgL}^{-1}$) + BAP ($0,01 \text{ mgL}^{-1}$)
	MS + TDZ ($0,1 \text{ mgL}^{-1}$)
	MS + hemisulfato de adenina (100 mgL^{-1}) + ác. L-glutámico (100 mgL^{-1}) + AIB ($0,1 \text{ mgL}^{-1}$) + BAP ($0,5 \text{ mgL}^{-1}$)

4.2.4. Diseño experimental y análisis de los resultados

Se utilizaron 10 recipientes (tubos o Erlenmeyers, dependiendo de la experiencia) por tratamiento. Se cultivó 1 explante por tubo y 5 explantes por Erlenmeyer. Los tratamientos fueron repetidos por lo menos 3 veces. A los 15-60 días de cultivo, según el experimento, se registraron las respuestas morfogénicas (formación de callo, embrión o embrión + callo). En el caso de los embriones somáticos, se contabilizó el número de embriones por explante, el porcentaje de embriogénesis (número de explantes que generaron embriones/total de explantes cultivados x 100) y el porcentaje de conversión (número de embriones germinados/total de embriones x 100).

Los datos se analizaron mediante el análisis de la variancia (ANOVA) y las comparaciones de las medias fueron hechas usando el test de Tukey.

4.2.5. Estudios histológicos

Los estudios histológicos se realizaron según la técnica descrita por Gonzalez y Cristóbal (1997). Los embriones somáticos se fijaron en FAA (formalina, ácido acético y etanol 70%, en las proporciones 5:5:90). La deshidratación se realizó con deshidratante histológico (Biopur®), seguido por la inclusión en parafina (Johansen, 1940). Se realizaron cortes seriados con un micrótopo rotativo (MICROM HM350) en secciones de 8-10 µm de espesor. Los cortes se colorearon con safranina-astra blue (Luque *et al.*, 1996) y montados con bálsamo de Canadá sintético.

4.2.6. Transplante

Las plantas obtenidas a partir de la germinación de los embriones somáticos fueron lavadas con agua corriente para eliminar los restos de medio de cultivo de las raíces. Luego se repicaron en macetas con sustrato (turba) para su aclimatación y mantenidas en invernáculo.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Respuestas morfogénicas de los explantes extraídos de plantas adultas de 20 años de edad

A los 15 días de cultivo, en 26 de los 39 medios evaluados se registraron porcentajes de germinación de los ejes embrionales superiores al 85% (Tabla 12), sin formación de embriones somáticos. En general, se observa que el uso de 5,0 mg L⁻¹ de BAP afecta negativamente la germinación de los ejes embrionales. Las plantas obtenidas fueron repicadas a partir de los 60 días en bandejas con turba.

La formación de callo se observó, generalmente, en los medios con 2,4-D (Tabla 12). Además, la combinación con BAP provocó una disminución en el porcentaje de formación de callos a medida que aumentó la dosis de este regulador.

Tabla 12. Efecto de los reguladores de crecimiento, adicionados a ½ MS, en las respuestas morfogénicas de ejes embrionales de té (clon CH 14 INTA) cultivados para la inducción de embriogénesis somática. (Letras diferentes en el sentido de las columnas indican diferencias significativas para $p < 0,05$).

Regul. crecimiento (mg L ⁻¹)	Variables		
	% germinación	% expl. c/callo	% expl. sin respuesta
2,4-D 0,1	86,6 ^{abc}	13,3 ^{de}	0,0 ^e
2,4-D 1,0	86,6 ^{abc}	93,3 ^a	0,0 ^e
2,4-D 5,0	50,0 ^{bcd}	96,6 ^a	0,0 ^e
2,4-D 0,1 + BAP 0,1	86,6 ^{abc}	90,0 ^{ab}	0,0 ^e
2,4-D 0,1 + BAP 1,0	90,0 ^{ab}	36,6 ^{cd}	0,0 ^e
2,4-D 0,1 + BAP 5,0	23,3 ^{de}	10,0 ^{de}	66,6 ^{abc}
2,4-D 1,0 + BAP 0,1	93,3 ^{ab}	93,3 ^a	0,0 ^e
2,4-D 1,0 + BAP 1,0	90,0 ^{ab}	80,0 ^{ab}	0,0 ^e
2,4-D 1,0 + BAP 5,0	30,0 ^{de}	6,6 ^{de}	63,3 ^{abc}
2,4-D 5,0 + BAP 0,1	60,0 ^{abcd}	76,6 ^{ab}	0,0 ^e
2,4-D 5,0 + BAP 1,0	20,0 ^{de}	60,0 ^{bc}	16,6 ^{de}
2,4-D 5,0 + BAP 5,0	6,6 ^e	3,3 ^e	90,0 ^a
AIB 0,1	93,3 ^{ab}	0,0 ^e	0,0 ^e
AIB 1,0	90,0 ^{ab}	26,6 ^{de}	0,0 ^e
AIB 5,0	93,3 ^{ab}	0,0 ^e	6,6 ^{de}
AIB 0,1 + BAP 0,1	90,0 ^{ab}	0,0 ^e	3,3 ^e
AIB 0,1 + BAP 1,0	90,0 ^{ab}	0,0 ^e	10,0 ^{de}
AIB 0,1 + BAP 5,0	20,0 ^{de}	0,0 ^e	80,0 ^{ab}
AIB 1,0 + BAP 0,1	93,3 ^{ab}	0,0 ^e	6,6 ^{de}
AIB 1,0 + BAP 1,0	93,3 ^{ab}	0,0 ^e	6,6 ^{de}
AIB 1,0 + BAP 5,0	20,0 ^{de}	0,0 ^e	80,0 ^{ab}
AIB 5,0 + BAP 0,1	90,0 ^{ab}	0,0 ^e	10,0 ^{de}
AIB 5,0 + BAP 1,0	90,0 ^{ab}	0,0 ^e	10,0 ^{de}
AIB 5,0 + BAP 5,0	43,3 ^{cde}	0,0 ^e	56,6 ^{bc}
ANA 0,1	100,0 ^a	0,0 ^e	0,0 ^e
ANA 1,0	100,0 ^a	10,0 ^{de}	0,0 ^e
ANA 5,0	100,0 ^a	0,0 ^e	0,0 ^e
ANA 0,1 + BAP 0,1	100,0 ^a	0,0 ^e	0,0 ^e
ANA 0,1 + BAP 1,0	100,0 ^a	0,0 ^e	0,0 ^e
ANA 0,1 + BAP 5,0	50,0 ^{bcd}	0,0 ^e	50,0 ^{bc}
ANA 1,0 + BAP 0,1	100,0 ^a	0,0 ^e	0,0 ^e
ANA 1,0 + BAP 1,0	100,0 ^a	0,0 ^e	0,0 ^e
ANA 1,0 + BAP 5,0	63,3 ^{abcd}	0,0 ^e	36,6 ^{cd}
ANA 5,0 + BAP 0,1	93,3 ^{ab}	0,0 ^e	6,6 ^{de}
ANA 5,0 + BAP 1,0	100,0 ^a	0,0 ^e	0,0 ^e
ANA 5,0 + BAP 5,0	43,3 ^{cde}	0,0 ^e	56,6 ^{bc}
BAP 0,1	100,0 ^a	0,0 ^e	0,0 ^e
BAP 1,0	100,0 ^a	0,0 ^e	0,0 ^e
BAP 5,0	30,0 ^{de}	0,0 ^e	70,0 ^{ab}

Los embriones cigóticos germinaron dando lugar a plantas enteras a partir de los 120 días de cultivo. Tampoco se generaron embriones somáticos a partir de este explante.

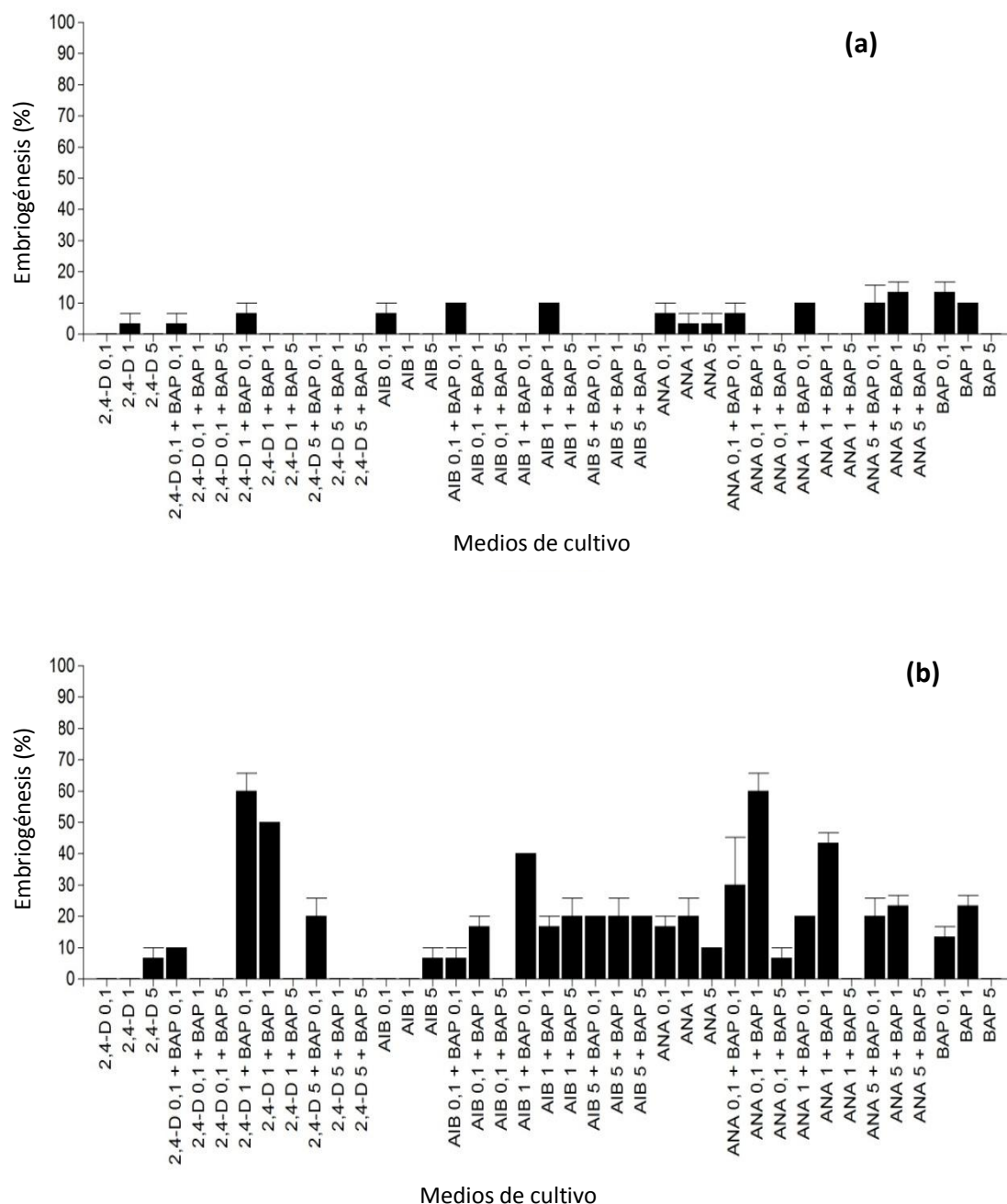


Figura 28. Embriogénesis (%) en láminas de cotiledón de té (clon CH 14 INTA), obtenidas a partir de semillas: (a) inmaduras y (b) maduras. (La barra vertical representa \pm el error estándar).

Las láminas de cotiledón, provenientes de embriones maduros e inmaduros, comenzaron a hincharse a partir de los 15 días de cultivo y luego se tornaron de color verde. Entre los 30 y 50 días comenzaron a aparecer los embriones somáticos. Las láminas de cotiledón provenientes de embriones cigóticos inmaduros generaron embriones somáticos en 15 de los 39 medios de cultivo evaluados. La utilización de tejidos de mayor grado de madurez hizo que en 26 de los 39 medios se produjera un mayor porcentaje de embriogénesis y un mayor número promedio de embriones/explante (Figs. 28 y 29).

En las láminas de cotiledón extraídas de semillas inmaduras (frutos cosechados en diciembre), el porcentaje de embriogénesis osciló entre valores de 3,3 a 13,3% (Fig. 28 a), mientras que en el material proveniente de semillas maduras (frutos cosechados en marzo), dicha variable alcanzó valores promedio entre 10 y 60%. En 13 de los 39 medios evaluados no se obtuvieron embriones somáticos a partir de láminas de cotiledón provenientes de semillas maduras (Fig. 28 b). Similar respuesta fue obtenida con el número promedio de ES/explante (Fig. 29 a y b). La utilización de semillas con mayor grado de madurez indujo a un aumento en el número promedio de ES/explante, los cuales se formaron en mayor cantidad de medios, comparado con el material más inmaduro. Mientras

que se obtuvo como máximo 30 ES/explante provenientes de semillas inmaduras, con la utilización de semillas cosechadas en marzo se logró hasta un máximo de 60 ES/explante (Fig. 29 a y b).

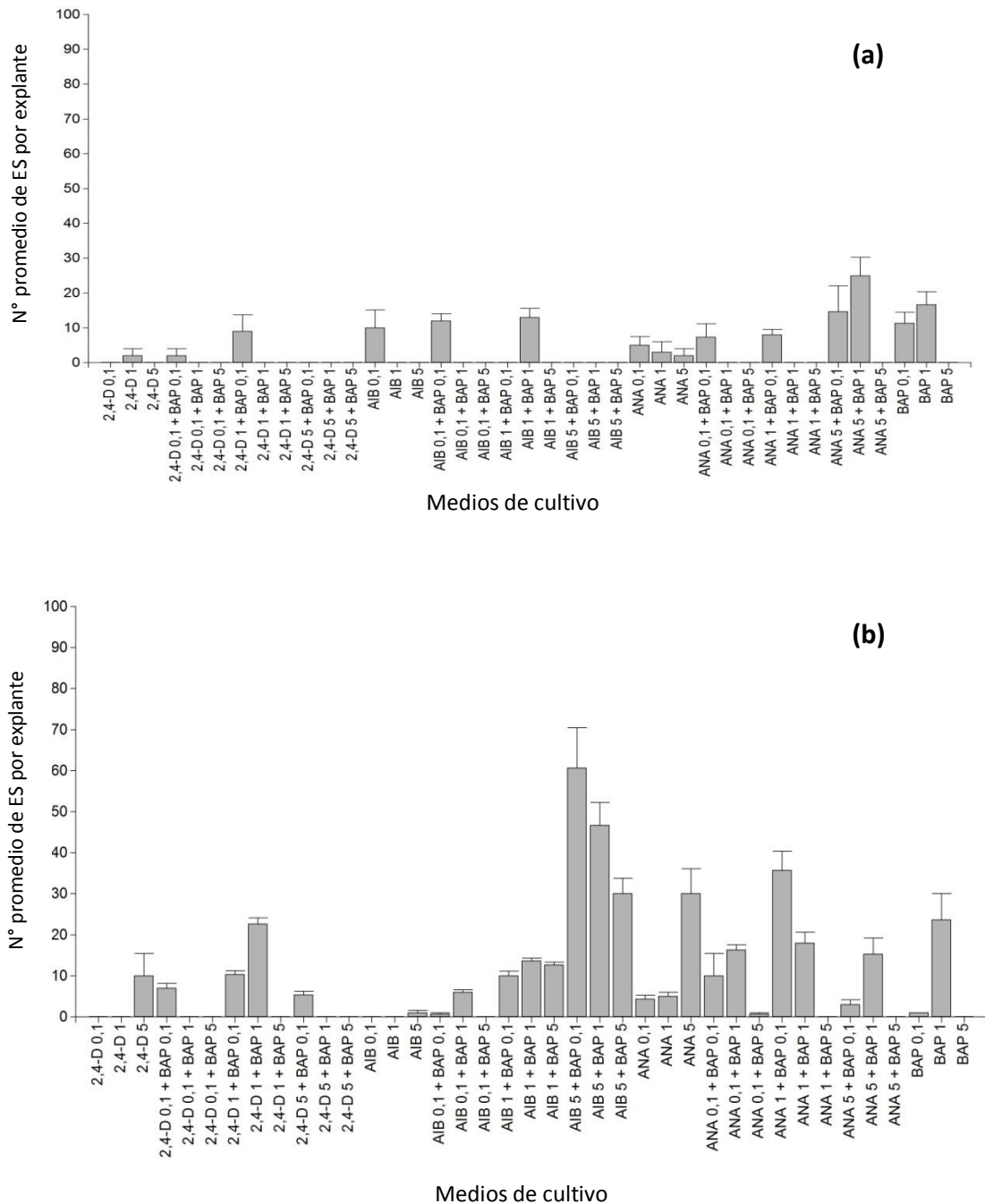


Figura 29. Número promedio de embriones somáticos/explante en láminas de cotiledón de té (clon CH 14 INTA), obtenidas a partir de semillas: (a) inmaduras y (b) maduras. (La barra vertical representa \pm el error estándar).

Algunos embriones somáticos se originaron directamente desde el explante y otros lo hicieron a partir de un callo, el cual se formaba siempre en la zona de corte y era de aspecto globoso, compacto y de color amarillento (Fig. 30 a y b).

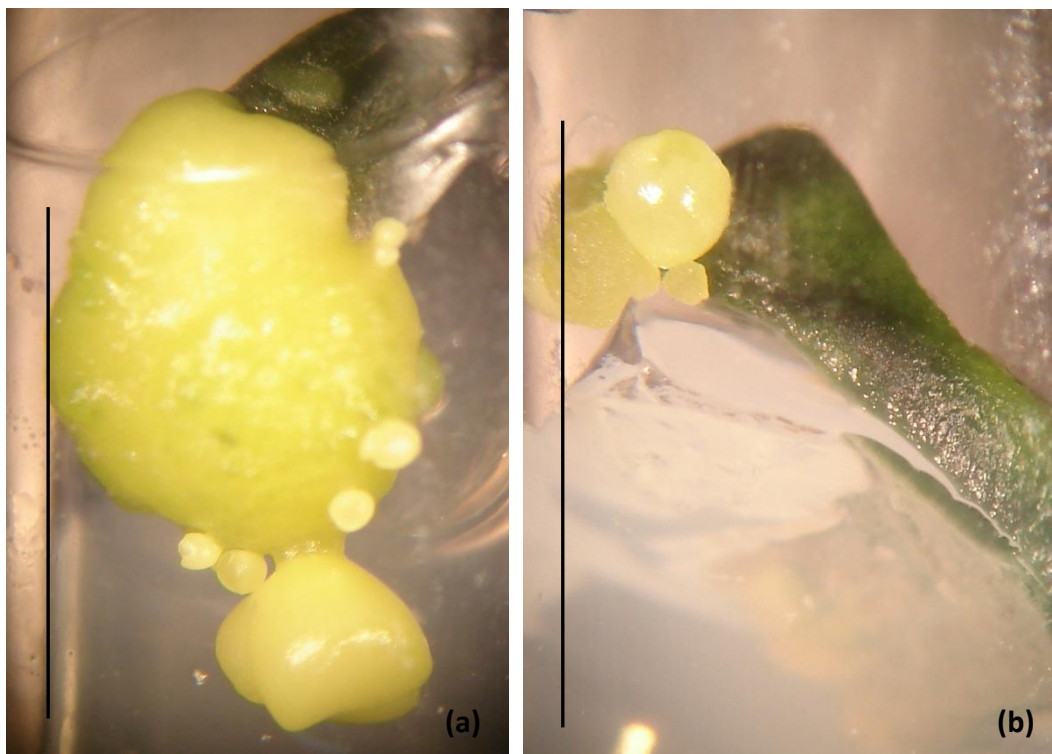


Figura 30. Embriones somáticos generados en láminas de cotiledón: (a) a partir de un callo globoso y amarillento, o (b) directamente a partir del explante. (Las barras verticales indican 1,0 cm).

Los medios de cultivo que no generaron embriones somáticos produjeron un callo de color blanco y aspecto cristalino que, a veces, presentaba formaciones cristalinas y alargadas llevando a suponer su

aptitud embriogénica. Observaciones posteriores permitieron determinar que eran estructuras proembriogénicas que no prosperaron en embriones somáticos. Características similares fueron encontradas por Chantásig Vaca (2004) en la inducción de embriogénesis somática en cacao.

En cuanto a la influencia de los reguladores de crecimiento, varios autores consideran que las auxinas, y en algunos casos junto con las citocininas, son los compuestos químicos más importantes para el desarrollo de embriones somáticos (Litz y Jarret, 1991; Martínez-Ruiz *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2007). En este trabajo se observó que las auxinas (2,4-D, AIB o ANA), en cualquiera de las dosis evaluadas, fueron beneficiosas para el proceso de embriogénesis somática cuando se combinaron con las menores dosis de BAP (0,1 y 1,0 mg L⁻¹). Tanto para el porcentaje de embriogénesis como para número de ES/explante, cuando el medio de cultivo fue suplementado con una auxina, los mejores valores se consiguieron en la mayor dosis utilizada (5,0 mg L⁻¹) (Figs. 28 b y 29 b).

Con respecto al efecto de la citocinina, los mejores resultados en porcentaje de embriogénesis y número de ES/explante se obtuvieron con las menores dosis de BAP (0,1 y 1,0 mg L⁻¹). La dosis de 5,0 mg L⁻¹ inhibió la formación de ES o su valor fue muy bajo, ya sea sólo o en combinación con las auxinas (Figs. 28 b y 29 b).

Con el cultivo de pétalos y anteras no se logró obtener embriones somáticos. En su lugar, sólo hubo formación de callos verdosos, de aspecto cristalino, y formados no solamente en la zona de corte sino en la superficie del explante (Fig. 31).

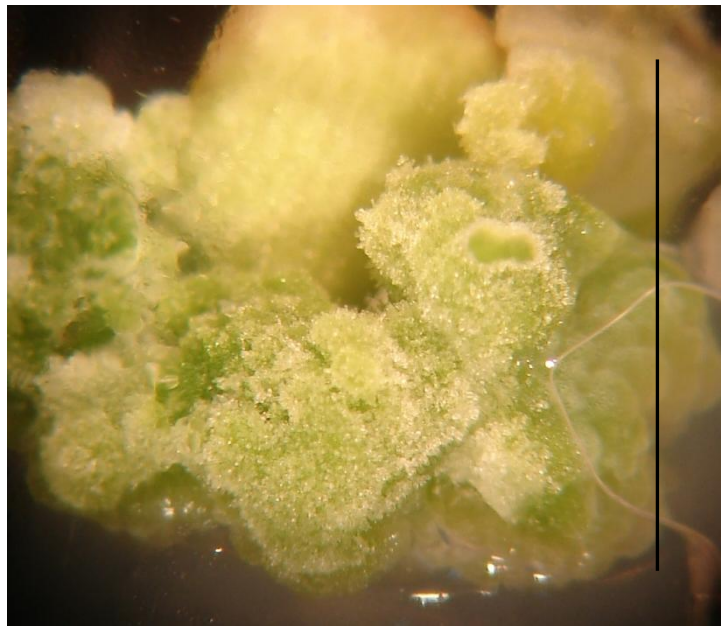


Figura 31. Aspecto de callos obtenidos a partir del cultivo de pétalos de té en $\frac{1}{2}$ MS con distintas combinaciones de auxinas (2,4-D, AIB ó ANA) y citocinina (BAP). (La barra vertical indica 1,0 cm).

4.3.2. Respuestas morfogénicas de los explantes obtenidos de plantas establecidas *in vitro*

El cultivo de hojas provenientes de plantas establecidas *in vitro*, generó, en la mayoría de los medios de cultivo, la formación de callos no embriogénicos. La presencia de callos se vio favorecida por la combinación

de una auxina con la citocinina BAP, registrándose valores muy bajos con la utilización de una auxina sola (Fig. 32).

Los callos se formaron siempre en el borde y en la base (zona de inserción con el pecíolo) de las hojas. No hubo formación de embriones somáticos.

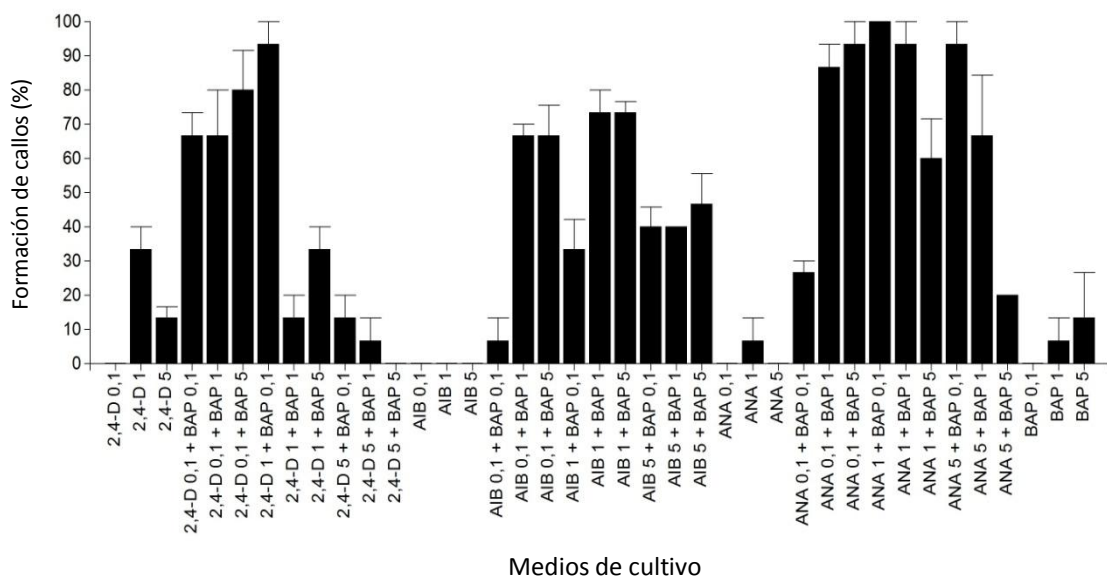


Figura 32. Formación de callos a partir del cultivo de hojas maduras provenientes de plantas establecidas *in vitro*, en ½ MS con distintas combinaciones de auxinas (ANA, AIB y 2,4-D) y citocinina (BAP). (La barra vertical representa ± el error estándar).

4.3.3. Respuestas morfogénicas de los explantes obtenidos de plantas de

2 años de edad

El cultivo en oscuridad incentivó la formación de callo en los explantes (hojas inmaduras), tanto en el medio semi-sólido como en el

líquido (Tablas 13 y 14). Dicha respuesta comenzó a manifestarse a partir de los 30 días de cultivo en el medio líquido y a los 15 días en el medio semi-sólido. Tanto en luz como en oscuridad, la formación de callos fue mayor cuando se utilizó medio semi-sólido para el cultivo de los explantes (Tablas 13 y 14).

Tabla 13. Efecto del ambiente (luz y oscuridad) en la formación de callos a partir del cultivo de hojas inmaduras en medio líquido, suplementado con distintas dosis de 2,4-D. (En paréntesis \pm error estándar).

Dosis (mg L ⁻¹) de 2,4-D adicionados al MS	% expl. c/callos	
	luz	oscuridad
0,0	0,00	0,00 \pm 0,0
0,5	0,00	20,00 \pm 0,0
1,0	0,00	26,67 \pm 6,67
1,5	0,00	26,67 \pm 6,67
2,0	0,00	53,33 \pm 13,33

Tabla 14. Efecto del ambiente (luz y oscuridad) en la formación de callos a partir del cultivo de hojas inmaduras en medio semi-sólido, suplementado con distintas dosis de 2,4-D. (En paréntesis \pm error estándar).

Dosis (mg L ⁻¹) de 2,4-D adicionados al MS	% expl. c/callos	
	luz	oscuridad
0,0	0,00 \pm 0,0	13,33 \pm 6,67
0,5	16,67 \pm 3,33	83,33 \pm 3,33
1,0	36,67 \pm 3,33	93,33 \pm 6,67
1,5	36,67 \pm 3,33	96,67 \pm 3,33
2,0	46,67 \pm 3,33	100,00 \pm 0,0

Los explantes cultivados en medio semi-sólido e incubados en oscuridad, formaron raíces originadas a partir de los callos. Esta respuesta

fue observada a partir de los 45 días en los medios de cultivo suplementados con auxina (Fig. 33).

Siempre la formación de callos y raíces, fue mayor con las dosis más altas de 2,4-D. No fue posible la formación de embriones somáticos a partir del cultivo de hojas inmaduras.

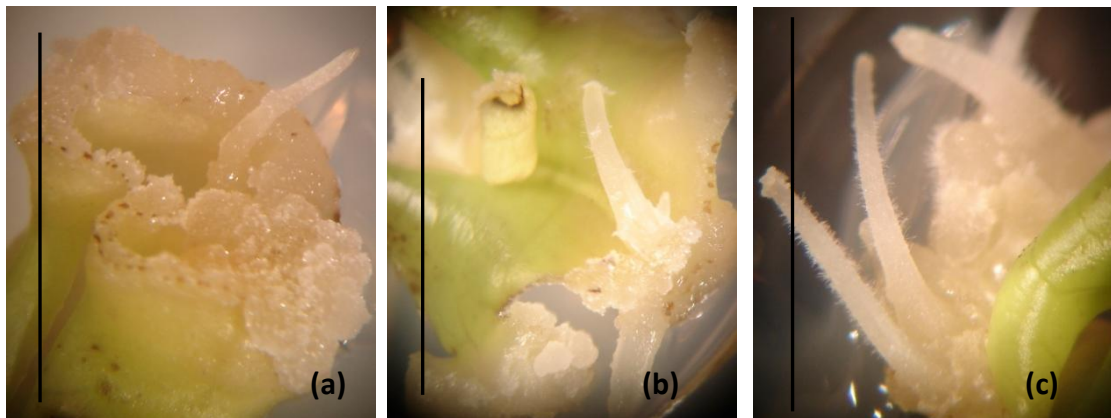


Figura 33. Respuestas morfogénicas encontradas en el cultivo de hojas inmaduras cultivadas en medio MS semi-sólido, suplementados con distintas concentraciones de 2,4-D: (a) 0 mgL^{-1} ; (b) $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ y (c) $2,0 \text{ mgL}^{-1}$, en oscuridad. (Las barras verticales indican $1,0 \text{ cm}$).

Según Litz y Jarret (1991), todos los tejidos vegetales tienen capacidad para formar callos *in vitro*; sin embargo, relativamente pocos explantes tienen la habilidad para producir callos embriogénicos. En las plantas leñosas, la selección de un explante embriogénico se vuelve muy restringida (Litz y Jarret, 1991; Bonneau *et al.*, 1994).

En el presente trabajo, de todos los explantes evaluados, la lámina de cotiledón fue el único que generó embriones somáticos. Estos resultados concuerdan con lo informado por Kato (1986) y Mondal *et al.* (2001b).

4.3.4. Germinación de embriones somáticos

La aplicación exitosa de un protocolo de embriogénesis somática depende de la habilidad de los embriones somáticos para convertirse en plantas (Chengalrayan *et al.*, 1997; Tahardi *et al.*, 2003; Joshi *et al.*, 2008).

Según Tahardi *et al.* (2003), el tratamiento con ABA exógeno podría mitigar el problema de falta de sustancias de reserva durante la maduración de embriones somáticos, considerado la mayor causa de su pobre y anormal germinación.

La composición del medio de cultivo utilizado en la etapa de generación de embriones somáticos tuvo gran influencia en la germinación de los mismos. Si bien, en todos los medios de cultivo se generaron embriones somáticos a partir de láminas de cotiledón, no todos fueron capaces de germinar para dar lugar a la formación de la planta entera.

En los medios suplementados con una auxina y una citocinina, los embriones somáticos emitieron una raíz pero nunca se logró desarrollar la parte aérea. En su lugar, se formó una estructura hueca semejante a una copa (Fig. 34).

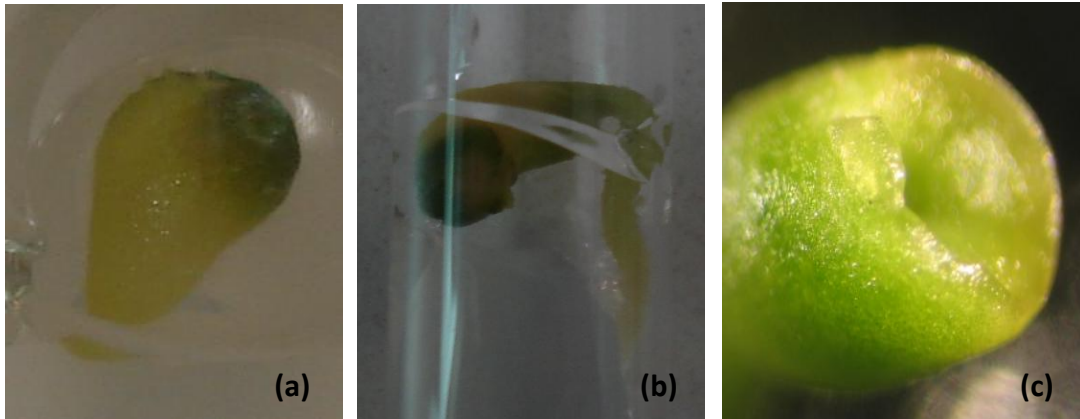


Figura 34. Emisión de la raíz en embriones somáticos de té, generados a partir de láminas de cotiledón maduro (a y b). Estructura hueca con ausencia de desarrollo de la parte aérea (c).

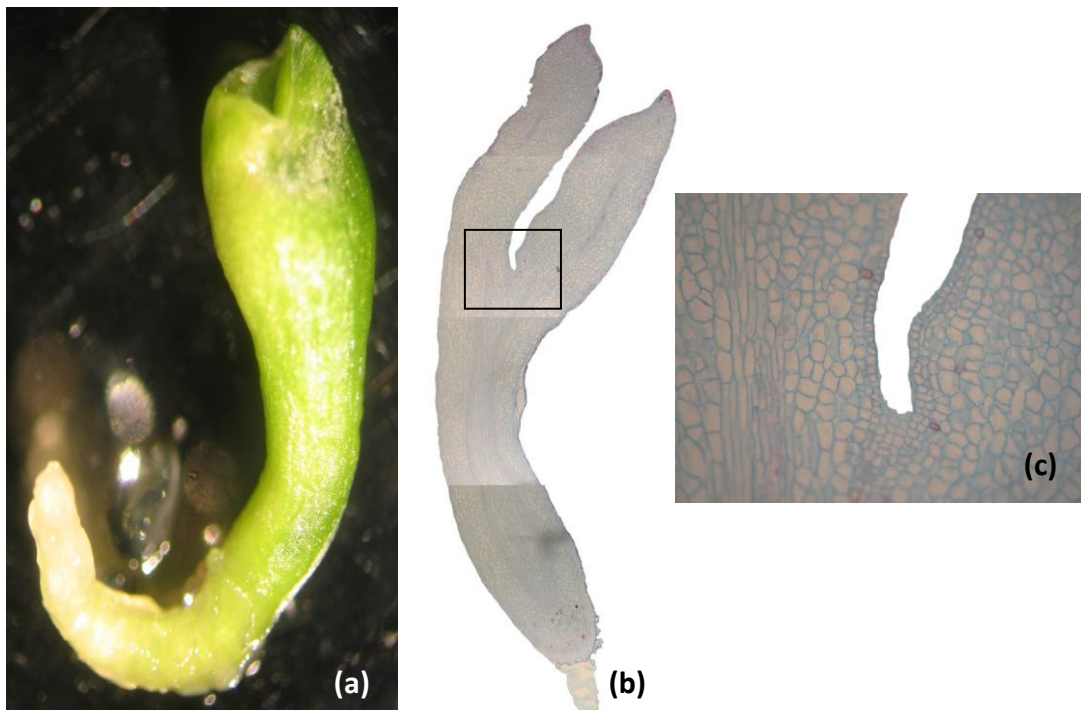


Figura 35. Corte histológico de embriones somáticos. (a) embrión somático a partir del cual se realizaron los cortes histológicos; (b) corte histológico de embrión somático generado en $\frac{1}{2}$ MS suplementado con auxina y citocinina; y (c) detalle del embrión somático con ausencia de meristema apical.

Los cortes histológicos realizados en los embriones somáticos obtenidos permitieron verificar la ausencia de meristema apical (Fig. 35), confirmando la causa de la falta de desarrollo de la parte aérea.

Por el contrario, los embriones somáticos generados en el medio de cultivo MS suplementado además con hemisulfato de adenina y ácido L-glutámico, germinaron dando origen a plantas completas (Fig. 36). Esta respuesta podría deberse al aporte de nitrógeno orgánico que realizan estos compuestos (Litz y Jarret, 1991; Suganthi *et al.*, 2012) y, específicamente, a la intervención del hemisulfato de adenina en la formación de yemas organogénicas (van Staden *et al.*, 2008; Gatica Arias *et al.*, 2010; Wongtiem *et al.*, 2011; García *et al.*, 2012).

Según Mondal *et al.* (2001a) la germinación de los embriones somáticos secundarios en té fue lograda sólo cuando el sulfato de potasio fue removido del medio de cultivo. Un año más tarde, Mondal *et al.* (2002b), encontraron que la suplementación con nutrientes precursores y formas rápidamente disponibles de carbohidratos, junto con ácido trans-cinámico mejoran significativamente la germinación de los embriones somáticos.

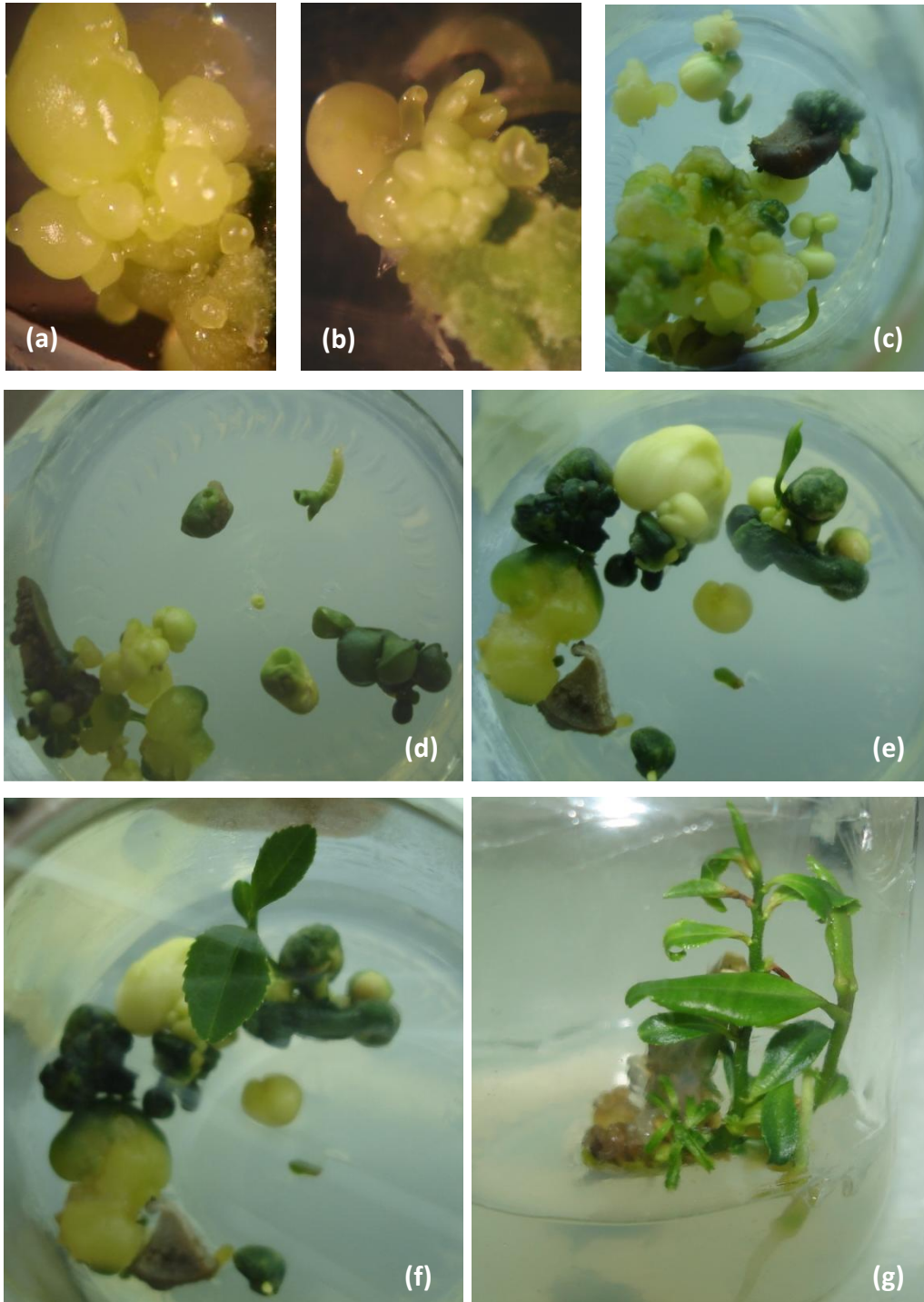


Figura 36. Embriones somáticos de té, obtenidos a partir de láminas de cotiledón, en distintos estados de desarrollo: **(a)** globular; **(b)** corazón; **(c)** torpedo; **(d)** cotiledonar; **(e)** emergencia de la primera hoja y **(f)** y **(g)** planta completa.

Cuando se evaluó el comportamiento de los 10 clones en cuanto a la capacidad de conversión de los embriones somáticos generados a partir de láminas de cotiledón, se encontró que en la mayoría de los clones la conversión fue posible. Solamente en dos de los clones evaluados (CH 327 INTA y SG 3191 INTA) no se logró obtener plantas enteras (Fig. 37). Según Litz y Jarret (1991), la respuesta embriogénica depende del genotipo. Algunos cultivares se pueden regenerar fácilmente en un medio específico, mientras que otros cultivares no responden en el mismo medio.

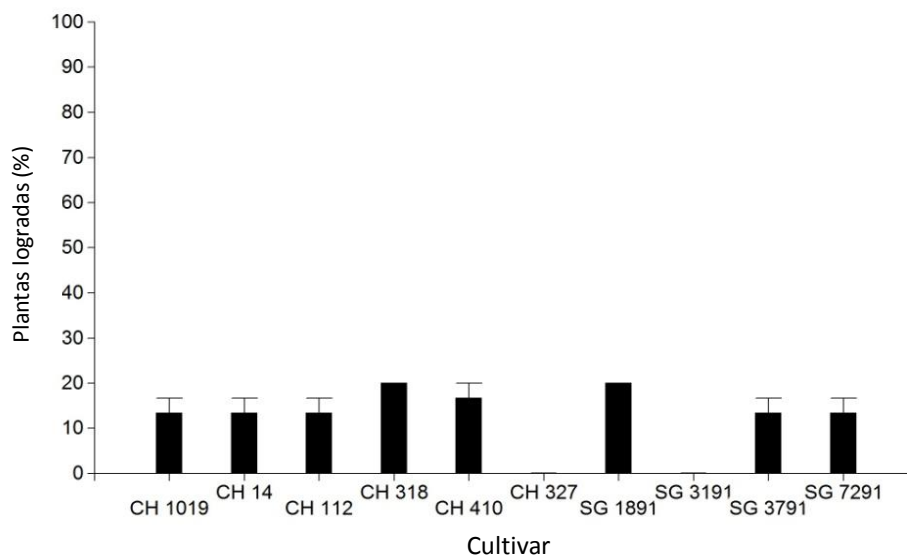


Figura 37. Obtención de plantas enteras a partir de embriones somáticos generados en el medio MS suplementado con hemisulfato de adenina (100 mgL^{-1}), ác. L-glutámico (100 mgL^{-1}), AIB ($0,1 \text{ mgL}^{-1}$) y BAP ($0,5 \text{ mgL}^{-1}$). (La barra vertical representa \pm el error estándar).

En los cultivares que regeneraron plantas, el porcentaje de conversión fue bajo (10-20%) (Fig. 37). Resultados similares fueron

obtenidos por Paratasilpin (1990) y Akula y Akula (2005) en té. El bajo porcentaje de plantas obtenidas es una de las principales limitaciones de los sistemas embriogénicos en muchas especies (Chengalrayan *et al.*, 1994; Akula *et al.*, 2000b; Michelangeli de Clavijo *et al.*, 2002; Silva Pupo *et al.*, 2005; Rivero-Bautista *et al.*, 2008).

Una característica observada en muchos sistemas embriogénicos es la asincronía en los estadios de los embriones somáticos (Bonneau *et al.*, 1994; Chengalrayan *et al.*, 1994; García-Águila *et al.*, 2010). Como se observa en la Figura 36, en un mismo recipiente de cultivo se encontró más de un estadio: globular y corazón (Fig. 36 b), globular, corazón y torpedo (Fig. 36 c).

La causa de esta asincronía aún no está definida. Según Rivero-Bautista *et al.* (2008), la embriogénesis secundaria es uno de los factores que conducirían a la asincronía durante la embriogénesis somática. Cabasson *et al.* (1997) mencionan que en *Citrus*, la ocurrencia de embriogénesis secundaria en medios de cultivo convencionales (semi-sólidos) es responsable de la asincronía, la cual puede ser mejorada con la utilización del sistema de inmersión temporal. De manera similar Etienne *et al.* (1997) en *Hevea brasiliensis*, Akula *et al.* (2000b) en té y Silva Pupo *et al.* (2005) en cacao, consideran que el uso de inmersión

temporal mejoró la sincronización de los sistemas embriogénicos. Otros autores mencionan la posibilidad de emplear ácido abscísico (ABA) dado su efecto en la inhibición precoz de los embriones somáticos, lo que permitiría la obtención de poblaciones más uniformes (González *et al.*, 2000). Por otro lado, según García-Águila *et al.* (2010), la selección adecuada de la densidad de inoculación contribuiría a la reducción del efecto negativo de la asincronía.

4.4. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permiten concluir que es posible la regeneración *in vitro* de plantas de té (*Camellia sinensis*) a partir de la embriogénesis somática.

La mayoría de los clones evaluados generaron embriones somáticos, los cuales fueron capaces de germinar y brindar plantas.

La lámina de cotiledón fue el único explante que demostró tener capacidad embriogénica y los mejores resultados se consiguieron utilizando semillas en estado maduro.

Si bien la formación de embriones somáticos se produjo en medios con distintas dosis de auxinas y bajas dosis de BAP, para que se produzca la germinación de los mismos, es necesaria la presencia en el medio de

cultivo de hemisulfato de adenina y ácido L-glutámico, como fuente de nitrógeno orgánico.

Los resultados sugieren además que existe una influencia del genotipo en la regeneración *in vitro* de plantas de té a partir de la embriogénesis somática.

La baja frecuencia de conversión en plantas conduce a la búsqueda de una profundización en el estudio del proceso embriogénico que permita una regeneración más eficiente.

CAPÍTULO 5

5. CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE GERMOPLASMA – CONSERVACIÓN A CORTO/MEDIANO PLAZO

5.1. INTRODUCCIÓN

La seguridad de las colecciones requiere su conservación por varias técnicas. Las especies propagadas vegetativamente, que en algunos casos no producen semillas, son usualmente conservadas a campo (Engelmann y Engels, 2002; Engelmann, 2011; Kaviani, 2011). Las técnicas de cultivo de tejidos, que constituyen una herramienta para la conservación de germoplasma (Ashmore, 1997; Withers y Engelmann, 1998; González-Benito *et al.*, 2004; Rao, 2004), podrían ser utilizadas como complemento para evitar la pérdida de fuentes genéticas (Lambardi y De Carlo, 2003).

Sin embargo, el mantenimiento de grandes colecciones en sistemas de cultivo *in vitro* convencional requiere de subcultivos sucesivos a intervalos de tiempo regulares, exponiendo al material a riesgos de contaminación y variación somaclonal (Engelmann, 1991). Una manera de disminuir estos problemas es a través de la conservación a corto o mediano plazo, que logra espaciar los tiempos de los subcultivos.

El almacenamiento de germoplasma en condiciones *in vitro* y a bajas temperaturas es una alternativa para la preservación de una variedad de especies vegetales (Engelmann, 1991; Ashmore, 1997; Ballester *et al.*, 1997; González-Benito *et al.*, 2004; Kaviani, 2011). En la mayoría de los casos, la baja temperatura en combinación con baja intensidad de luz o completa oscuridad, es usada para limitar el crecimiento (Reed, 1991, 1992; Hassan y Bekheet, 2008; Kaviani, 2011). Las mayores ventajas de esta técnica son los requerimientos reducidos en labor y espacio, la eliminación de problemas relacionados a patógenos y la reducción de la erosión genética si las condiciones de almacenamiento son logradas (Engelmann, 1991).

También es posible limitar el crecimiento por alteración del medio de cultivo, principalmente por reducción del contenido de azúcar o concentración de los elementos minerales, aplicación de ácido abscísico y reducción del nivel de oxígeno (Engelmann, 1991; Ashmore, 1997; Withers y Engelmann, 1998; Malaurie *et al.*, 1998; Engelmann y Engels, 2002; González-Benito *et al.*, 2004).

La técnica de conservación bajo condiciones de crecimiento mínimo ha sido desarrollada para varias especies (Tabla 15). Hasta el momento, no existen antecedentes de conservación *in vitro* a corto/mediano plazo en

té. En el presente trabajo, las dos metodologías analizadas tuvieron como objetivo evaluar la aptitud del té para esta alternativa de conservación.

Tabla 15. Conservación a corto plazo en distintas especies.

<i>Especie</i>	<i>Referencia</i>
mandioca	Roca <i>et al.</i> , 1991
<i>Castanea sativa</i> x <i>C. chestnut</i> , <i>Quercus</i> spp.	Janeiro <i>et al.</i> , 1995
<i>Dioscorea</i> spp.	Malaurie <i>et al.</i> , 1998
<i>Asparagus officinalis</i>	Bekheet, 2000
frutilla	Hassan y Bekheet, 2008

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Material vegetal

Se trabajó con el cultivar de té CH 14 INTA descrito en el capítulo 2 (Tabla 1), perteneciente al banco de germoplasma de la Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul.

5.2.2. Origen y cultivo de los explantes

Se utilizaron como explantes segmentos uninodales (con una longitud entre 0,5 y 1,0 cm), yemas axilares y meristemas caulinares (0,5 mm de longitud), aislados de ramas cosechadas de las plantas madre del clon CH 14 INTA, que crecieron bajo invernáculo en condiciones semi-controladas, con un estricto manejo sanitario y nutricional.

La desinfección de los brotes se realizó por inmersión en etanol 70% durante 1 min seguida de una solución de NaClO 1,5% durante 20 min y 3 enjuagues sucesivos con abundante agua destilada estéril.

Los explantes desinfectados fueron cultivados en tubos de vidrio (25 mm x 120 mm; 40 ml de capacidad) conteniendo 10 ml de medio de cultivo solidificado con 0,7% de agar Sigma (A-1296). Para la conservación a baja temperatura, el medio consistió en las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), reducido a la mitad ($\frac{1}{2}$ MS) con 3% de sacarosa y 0,7% de agar Sigma (A-1296). La suplementación se realizó con $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de 6-bencilaminopurina (BAP).

Para la conservación en medios sub-óptimos, los segmentos nodales fueron cultivados en 4 medios de cultivo consistentes de MS reducido a la mitad ($\frac{1}{2}$ MS) ó a un cuarto ($\frac{1}{4}$ MS), con 3% de sacarosa y 0,7% de agar Sigma (A-1296). Estos medios estuvieron desprovistos de reguladores de crecimiento o fueron suplementados con 0,01 mg/L de BAP (Tabla 16).

5.2.3. Técnicas de conservación

Se evaluaron dos técnicas de conservación a corto/mediano plazo, la conservación a baja temperatura y la utilización de medios sub-óptimos.

El cultivo a baja temperatura se realizó en heladera, a 4°C, durante distintos períodos de tiempo (0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días). Luego de cada tratamiento, los tubos fueron transferidos a un cuarto climatizado a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo un fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad con una irradiación de $116 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ provista por lámparas fluorescentes frías. Finalmente, luego de 30 días en estas condiciones se registraron las siguientes variables: porcentaje de supervivencia, porcentaje de formación de vástagos y longitud de vástagos.

El cultivo en medios sub-óptimos fue realizado en un cuarto climatizado a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, en oscuridad durante 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días (Tabla 16). Al cabo de cada período se registró el porcentaje de supervivencia, porcentaje de formación de vástagos y longitud de vástagos.

Tabla 16. Medios y condiciones de cultivo utilizados en la conservación a corto plazo de segmentos uninodales de té, del clon CH 14 INTA, mediante la utilización de medios subóptimos.

Medios de cultivo	Cultivo en oscuridad (días)
½ MS + BAP 0,01 mg/L	0
½ MS + BAP 0,01 mg/L	30
½ MS + BAP 0,01 mg/L	60
½ MS + BAP 0,01 mg/L	90
½ MS + BAP 0,01 mg/L	120
½ MS + BAP 0,01 mg/L	150
½ MS + BAP 0,01 mg/L	180
¼ MS + BAP 0,01 mg/L	0
¼ MS + BAP 0,01 mg/L	30
¼ MS + BAP 0,01 mg/L	60
¼ MS + BAP 0,01 mg/L	90
¼ MS + BAP 0,01 mg/L	120
¼ MS + BAP 0,01 mg/L	150
¼ MS + BAP 0,01 mg/L	180
½ MS	0
½ MS	30
½ MS	60
½ MS	90
½ MS	120
½ MS	150
½ MS	180
¼ MS	0
¼ MS	30
¼ MS	60
¼ MS	90
¼ MS	120
¼ MS	150
¼ MS	180

5.2.4. Diseño experimental y análisis de los resultados

Los experimentos fueron conducidos con un diseño de bloques completos al azar. Cada tratamiento fue repetido 3 veces, con 10 réplicas por repetición y 1 explante/tubo. Las figuras muestran los resultados promedios con el error estándar (\pm SE). Los datos se analizaron mediante

el análisis de la variancia (ANOVA) y las comparaciones de las medias fueron hechas usando el test de Tukey.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Conservación a baja temperatura

Existen referencias de la utilización de bajas temperaturas para la conservación *in vitro* en numerosas especies: *Solanum* spp. (Westcott, 1981), cereza silvestre, castaño y roble (Janeiro *et al.*, 1995), *Asparagus officinalis* (Bekheet, 2000), *Pyrus* sp. (Ahmed *et al.*, 2010).

En el presente trabajo, con la conservación a baja temperatura (4°C) se obtuvieron los mejores resultados, en términos de supervivencia y formación de vástagos, cuando se utilizaron segmentos uninodales y yemas axilares como explantes. En cambio, con el uso de meristemas los valores de estos parámetros fueron significativamente más bajos. Los segmentos uninodales de té mostraron una elevada supervivencia (entre 97 y 73%) hasta los 5 meses de conservación a bajas temperaturas, momento a partir del cual disminuye drásticamente, llegando a los 180 días a valores aproximados al 10%. Un comportamiento similar se observó con el uso de yemas axilares como explante (Tabla 17).

Tabla 17. Supervivencia promedio (%) de segmentos uninodales, meristemas y yemas axilares de té conservados a baja temperatura (4°C), durante diferentes períodos de tiempo. (Letras distintas en sentido de las columnas indican diferencias significativas para $p < 0,05$).

Tratamiento	Segmentos uninodales	Meristemas	Yemas axilares
Testigo (sin conservación a 4°C)	100,0 ^a	50,0 ^a	100,0 ^a
30 días a 4°C	93,3 ^a	6,7 ^b	93,3 ^a
60 días a 4°C	96,7 ^a	6,7 ^b	93,3 ^a
90 días a 4°C	90,0 ^a	0,0 ^b	73,3 ^a
120 días a 4°C	86,7 ^a	0,0 ^b	66,7 ^a
150 días a 4°C	73,3 ^a	0,0 ^b	66,7 ^a
180 días a 4°C	10,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b

Si bien no existen diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de supervivencia hasta los 150 días, se observa una disminución progresiva a medida que el período de almacenamiento aumenta. Resultados similares fueron encontrados por Ahmed *et al.* (2010) en la conservación de germoplasma de *Pyrus*.

En el presente trabajo, un mayor tiempo de exposición provocó el amarronamiento y posterior muerte de los explantes. Según Janeiro *et al.* (1995), la necrosis de los explantes es común cuando se realiza el almacenamiento a baja temperatura, pero aparentemente los explantes necróticos podrían sobrevivir un ciclo de sub-cultivo en cámara de crecimiento bajo condiciones normales, donde algunos cultivos marrones pueden proliferar, especialmente desde yemas laterales que permanecen inmersas en el agar.

Janeiro *et al.* (1995), trabajando con castaño, encontraron que el porcentaje de supervivencia disminuyó dramáticamente a 42 y 29% después de 6 y 12 meses de conservación a baja temperatura ($2 \pm 1^\circ\text{C}$).

Respecto a la variable formación de vástagos, se observó en general el mismo comportamiento en los tres explantes utilizados. Los valores más altos correspondieron al testigo y a períodos de conservación más cortos. A medida que aumentó el tiempo de conservación a baja temperatura, disminuyó la formación de vástagos. Los segmentos uninodales presentaron los mayores porcentajes de formación de vástagos, seguidos por las yemas axilares, siendo los meristemas los explantes con menor capacidad de regenerar, luego de la conservación a baja temperatura (Tabla 18).

Tabla 18. Formación de vástagos promedio (%) de segmentos uninodales, meristemas y yemas axilares de té conservados a baja temperatura (4°C), durante diferentes períodos de tiempo. (Letras distintas en sentido de las columnas indican diferencias significativas para $p < 0,05$).

Tratamiento	Segmentos uninodales	Meristemas	Yemas axilares
Testigo (sin conservación a 4°C)	100,0 ^a	36,7 ^a	50,0 ^a
30 días a 4°C	73,3 ^{ab}	6,7 ^b	46,7 ^{ab}
60 días a 4°C	76,7 ^{ab}	6,7 ^b	40,0 ^{abc}
90 días a 4°C	76,7 ^{ab}	0,0 ^b	26,7 ^{abcd}
120 días a 4°C	70,0 ^b	0,0 ^b	13,3 ^{bcd}
150 días a 4°C	56,7 ^b	0,0 ^b	6,7 ^{cd}
180 días a 4°C	6,7 ^c	0,0 ^b	0,0 ^d

Para la variable longitud de vástagos, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los distintos tratamientos. Sólo se observó una mayor longitud de vástagos cuando se utilizaron segmentos uninodales como explante (Tabla 19). En general, los vástagos no presentaron necrosis ni amarronamiento (Fig. 38).

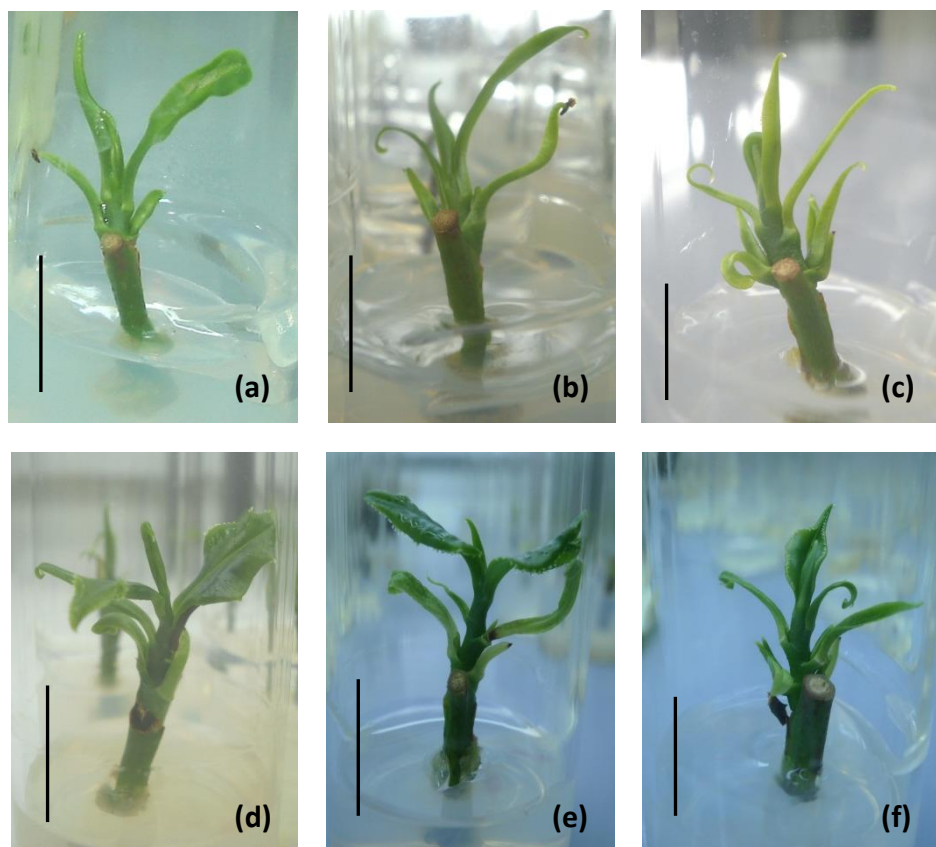


Figura 38. Vástagos formados en segmentos uninodales de té, conservados a baja temperatura (4°C), durante diferentes períodos de tiempo: a) 30 días, b) 60 días, c) 90 días, d) 120 días, e) 150 días y f) 180 días. (Las barras verticales indican 1,0 cm).

Tabla 19. Longitud promedio de vástagos formados a partir de segmentos uninodales, meristemas y yemas axilares de té, conservados a baja temperatura (4°C), durante diferentes períodos de tiempo. (Letras distintas en sentido de las columnas indican diferencias significativas para $p < 0,05$).

Tratamiento	Segmentos uninodales	Meristemas	Yemas axilares
Testigo (sin conservación a 4°C)	1,17 ^a	0,50 ^a	0,70 ^a
30 días a 4°C	1,03 ^a	0,17 ^{ab}	0,53 ^{ab}
60 días a 4°C	1,03 ^a	0,17 ^{ab}	0,60 ^{ab}
90 días a 4°C	1,17 ^a	0,0 ^b	0,53 ^{ab}
120 días a 4°C	1,23 ^a	0,0 ^b	0,43 ^{ab}
150 días a 4°C	0,77 ^a	0,0 ^b	0,17 ^{ab}
180 días a 4°C	0,73 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b

5.3.2. Conservación en medios sub-óptimos

El uso de bajas concentraciones de elementos minerales o de sacarosa en el medio de cultivo, es usado con éxito en el mantenimiento de colecciones *in vitro* de algunas especies, tales como *Dioscorea* spp. (Maurie *et al.*, 1998) y lirio (Bonnier y Van Tuyl, 1997).

En el presente trabajo, el uso de medios sub-óptimos con restricción de luz para la conservación de segmentos uninodales de té, tuvo una respuesta similar, en términos de supervivencia, que la baja temperatura. La modificación en la concentración de las sales del medio de cultivo y/o el regulador de crecimiento permitió una supervivencia relativamente alta (60-90%) hasta los 120 días. En general, hasta los 120 días no se registraron diferencias significativas entre los distintos medios de cultivo.

Estas diferencias se registraron recién cuando el período de conservación se extendió a 150-180 días (Fig. 39).

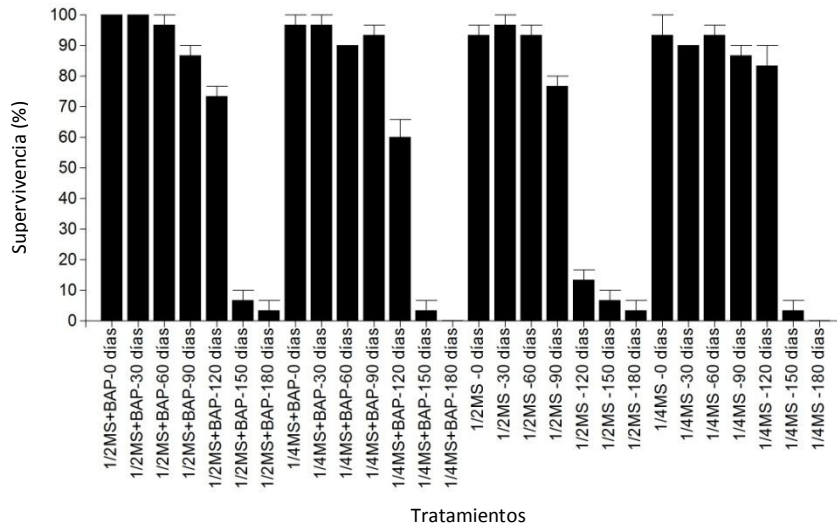


Figura 39. Supervivencia promedio (%) de segmentos uninodales de té, conservados en medios sub-óptimos, durante diferentes períodos de tiempo en oscuridad. (La barra vertical representa \pm el error estándar).

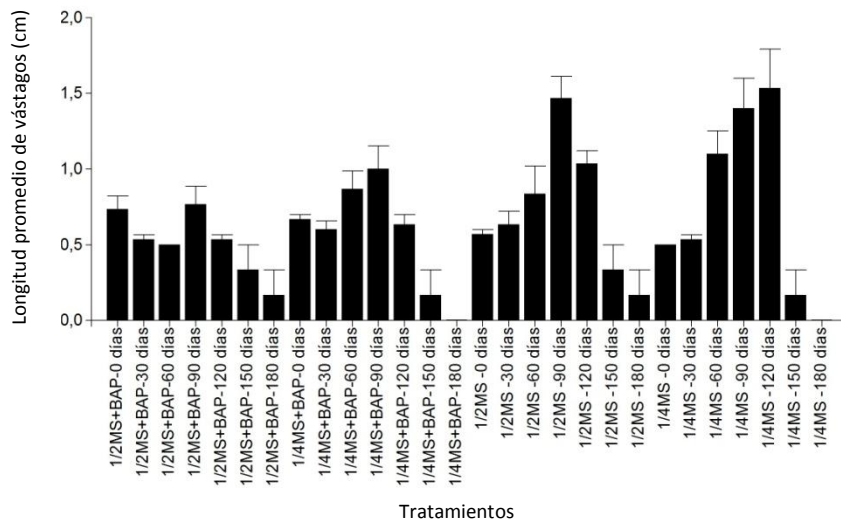


Figura 40. Longitud promedio de vástagos generados a partir de segmentos uninodales de té, conservados en medios sub-óptimos, durante diferentes períodos de tiempo en oscuridad. (La barra vertical representa \pm el error estándar).

La oscuridad produjo la aparición de clorosis que se hizo más evidente a medida que aumentó la duración del período de conservación. Esta sintomatología fue observada principalmente en el medio constituido por ½ MS sin BAP. Problemas de clorosis fueron también observados por Janeiro *et al.* (1995) en la conservación de cereza silvestre a baja temperatura y por Corredoira *et al.* (2011) en *Camellia* sp. y otras especies.

El mayor tiempo de exposición a la oscuridad provocó además el crecimiento de los vástagos (mayor longitud de entrenudos) generados a partir de los explantes. La mayor longitud de vástagos se registró en los medios de cultivo que carecían de BAP (Fig. 40).

5.4. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permiten concluir que es posible la conservación de germoplasma de té, a corto/mediano plazo.

La conservación de cultivares de té a corto plazo, mediante la reducción de temperatura, es posible hasta 150 días con porcentajes de supervivencia relativamente altos. Los segmentos uninodales y yemas axilares fueron los explantes con mejores respuestas.

En el caso de la utilización de medios sub-óptimos, se podría conservar germoplasma de té hasta 120 días, sin que la capacidad de regeneración se vea afectada.

CAPÍTULO 6

6. CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE GERMOPLASMA – CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO

6.1. INTRODUCCIÓN

Para la conservación a largo plazo de especies con semillas recalcitrantes o que se propagan vegetativamente, una de las pocas técnicas *in vitro* existentes hasta el momento es el empleo de la crioconservación (Engelmann, 1991, 1992; Engelmann y Takagi, 2000; Berjak y Pammenter, 2004). La misma consiste en la utilización del nitrógeno líquido el cual produce un cese de la mayoría de los procesos metabólicos celulares, deteniendo el crecimiento y permitiendo el almacenamiento por tiempo indeterminado sin alteración o modificación (Chaudhury y Malik, 2004).

Cuando se trata de conservar la mayor diversidad genética posible de una población, las semillas constituyen normalmente el material de propagación preferido (Iriondo Alegría, 2001).

Para la conservación a largo plazo de semillas recalcitrantes el método más promisorio es la crioconservación. Los ejes embrionarios son más adecuados que las semillas enteras debido a su pequeño tamaño y a

que toleran contenidos de humedad más bajos (Kraak, 1993; Kuranuki y Yoshida, 1996; Berjak y Pammenter, 2003; Normah y Makeen, 2008). Además, son capaces de generar una planta completa a partir de los tejidos meristemáticos que contiene (Chandel *et al.*, 1995). Esta forma de conservación es importante ya que, como explica Withers (1991), permite conservar mayor variabilidad genética y no solamente algunos genotipos.

Cuando se necesita crioconservar materiales con características definidas, es necesario desarrollar una metodología que permita utilizar partes vegetativas.

Existen numerosas técnicas que permiten la conservación de meristemas, ápices y yemas axilares pero lo ideal es encontrar la más sencilla y práctica.

La vitrificación consiste en el tratamiento de los explantes con una solución concentrada de vitrificación por períodos variables de tiempo, seguido por una inmersión directa en nitrógeno líquido. Esta técnica sigue siendo una de las más usadas y esto puede ser atribuido a su facilidad, alta reproducibilidad y al hecho que puede ser aplicada exitosamente en un amplio rango de tejidos y especies vegetales (Panis y Lambardi, 2005).

Por todo lo expuesto, el objetivo de este trabajo es encontrar metodologías de conservación *in vitro*, que sirvan de complemento a las

tradicionales *ex situ* de manera de asegurar el mantenimiento y disponibilidad de materiales de interés.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1. Material vegetal

Se trabajó con 4 cultivares de té (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) de la colección, descritos en el Capítulo 2 (CH 14 INTA, CH 112 INTA, CH 1019 INTA y SG 7291 INTA).

6.2.2. Origen y cultivo de los explantes

En el caso de la técnica de deshidratación se utilizaron semillas enteras, embriones (eje embrional + cotiledones) y ejes embrionales y, en el caso de la técnica de vitrificación se utilizaron segmentos uninodales y meristemas caulinares.

Para la técnica de deshidratación, los frutos fueron cosechados de plantas madres creciendo a campo. Después de la remoción del pericarpio, las semillas fueron desinfectadas, en la cabina de flujo laminar, con alcohol al 70% (durante 1 min) e hipoclorito de sodio al 1.5% (durante

30 min), y 3 enjuagues sucesivos con agua destilada estéril. Con la ayuda de una pinza y un bisturí, se aislaron 3 explantes: ejes embrionales (EE), ejes embrionales con una porción de cotiledón (EEC) y embrión (eje embrional con los dos cotiledones).

Luego de la conservación en nitrógeno líquido, los explantes fueron transferidos a un medio de recuperación compuesto por las sales del MS, 0.5 mgL^{-1} de BAP, 0.01 mgL^{-1} de IBA y 1.0 gL^{-1} de carbón activado.

Para la técnica de vitrificación se utilizaron plantas madre creciendo en condiciones *in vitro*, en $\frac{1}{2}$ MS sin reguladores de crecimiento, mantenidas en heladera a 4-5°C, en oscuridad. Una vez aislados los explantes (segmentos uninodales o meristemas caulinares), fueron pre-cultivados en un medio de similar composición pero con distintas concentraciones de sacarosa y por distintos períodos de tiempo: 1) sin pre-cultivo, 2) 0.2M de sacarosa durante 2 días ó 3) 0.2M de sacarosa (2 días) + 0.4M de sacarosa (3 días) + 0.7M de sacarosa (4 días). Finalmente, luego de la conservación en nitrógeno líquido, los explantes fueron transferidos a un medio de recuperación compuesto por $\frac{1}{2}$ MS + 0.01 mgL^{-1} IBA + 1.0 mgL^{-1} BAP + 1.0 mgL^{-1} GA₃ (Fig. 41).

6.2.3. Técnicas de conservación

Se utilizaron dos técnicas de crioconservación según el tipo de explante. Para semillas enteras, embriones y ejes embrionales con y sin cotiledón, se utilizó el método de deshidratación con corriente de aire estéril. Para segmentos uninodales y meristemas caulinares, se aplicó el método de vitrificación (Fig. 41).

Paralelamente al ensayo de deshidratación, se utilizaron 90 semillas, por explante y por clon, para la construcción de las curvas de deshidratación. Para ello, se aislaron los respectivos explantes, pesándolos inmediatamente para obtener su peso fresco (PF). Luego fueron llevados a estufa a $103 \pm 1^\circ\text{C}$ y sus pesos fueron registrados periódicamente hasta peso constante (peso seco – PS). El contenido de humedad se calculó con la siguiente fórmula (International Seed Testing Association – ISTA, 1993):

$$\%H_{PF} = \frac{PF-PS}{PF} * 100$$

Para la deshidratación, los explantes fueron colocados en cajas de Petri expuestos a la corriente de aire estéril de un flujo laminar. Los

tiempos de exposición a la corriente de aire conformaron los tratamientos y fueron distintos de acuerdo al tamaño del explante (Tablas 20 y 21).

Los EE y los EEC deshidratados fueron colocados en crioviales de 2 ml de capacidad y llevados a nitrógeno líquido por 24 horas, en tanto que para los embriones y semillas enteras se utilizaron tubos tipo Falcón de 50 ml de capacidad.

La descongelación se realizó a baño María a 37°C por tiempos variables, definidos según el tamaño del explante (Tablas 20 y 21).

Tabla 20. Proceso de crioconservación por la metodología de deshidratación de ejes embrionales (EE) y ejes embrionales con porción de cotiledón (EEC), en 4 clones de té.

1)	Sin deshidratación	—————→				Cultivo en medio de recuperación	
2)	Sin deshidratación	→	-196°C	→	Baño María 37° (2 minutos)	→	Cultivo en medio de recuperación
3)	1h deshidratación	→	-196°C	→	Baño María 37° (2 minutos)	→	Cultivo en medio de recuperación
4)	2h deshidratación	→	-196°C	→	Baño María 37° (2 minutos)	→	Cultivo en medio de recuperación
5)	3h deshidratación	→	-196°C	→	Baño María 37° (2 minutos)	→	Cultivo en medio de recuperación
6)	4h deshidratación	→	-196°C	→	Baño María 37° (2 minutos)	→	Cultivo en medio de recuperación
7)	5h deshidratación	→	-196°C	→	Baño María 37° (2 minutos)	→	Cultivo en medio de recuperación

Finalmente, los embriones y ejes embrionales fueron cultivados en medio de recuperación (MS + 0.5 mgL⁻¹ BAP + 0.01 mgL⁻¹ IBA + 1.0 gL⁻¹ de carbón activado) e incubados en una cámara de crecimiento a 25 ± 2°C, bajo un fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad, con una intensidad de

116 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, provista por lámparas fluorescentes frías. Las semillas se sembraron en cámara húmeda, con turba como sustrato (Tabla 21).

Tabla 21. Proceso de crioconservación por la metodología de deshidratación de embriones (eje embrional con los dos cotiledones) y semillas enteras, en 4 clones de té.

1)	Sin deshidratación	→				Cultivo en medio recuperación/siembra		
2)	Sin deshidratación	→	-196°C	→	Embrión	Baño María 37°C (15 minutos)	→	Cultivo en medio de recuperación
					Semilla	Baño María 37°C (25 minutos)	→	Siembra en turba
3)	12h deshidratación	→	-196°C	→	Embrión	Baño María 37°C (15 minutos)	→	Cultivo en medio de recuperación
					Semilla	Baño María 37°C (25 minutos)	→	Siembra en turba
4)	24h deshidratación	→	-196°C	→	Embrión	Baño María 37°C (15 minutos)	→	Cultivo en medio de recuperación
					Semilla	Baño María 37° (25 minutos)	→	Siembra en turba
5)	48h deshidratación	→	-196°C	→	Embrión	Baño María 37°C (15 minutos)	→	Cultivo en medio de recuperación
					Semilla	Baño María 37°C (25 minutos)	→	Siembra en turba

La variable porcentaje de contaminación fue registrada a los 30 días, mientras que el porcentaje de plantas logradas se evaluó a los 90 días de su cultivo en el medio de recuperación. En las semillas, se evaluó el porcentaje de germinación, definido por la emergencia de la radícula, y el porcentaje de plantas logradas.

Las plantas obtenidas fueron transferidas a pequeños vasos conteniendo turba, mantenidas en una atmósfera con alta humedad relativa durante 2 ó 3 semanas, hasta completar su rustificación.

El método de vitrificación (Fig. 41) consistió en realizar previamente una rustificación a baja temperatura de las plantas dadoras de explantes cultivadas *in vitro*, las cuales fueron colocadas en heladera (4-5°C), en oscuridad durante distintos períodos de tiempo (0, 2, 4 y 8 semanas). Luego se aislaron los explantes (segmentos uninodales y meristemas) y se los pre-cultivó a 4 °C, en ½ MS con distintas concentraciones de sacarosa según el tratamiento. Los explantes fueron colocados en crioviales con 1 ml de la solución de vitrificación PVS2 a 0°C, durante distintos tiempos de exposición (0, 30, 60 y 90 minutos). Con una pipeta Pasteur se retiró la solución PVS2, se la reemplazó con 0.5 ml de PVS2 nuevo y se llevaron los explantes directamente a nitrógeno líquido. Transcurrida 1 hora, se descongeló en un baño María a 30°C durante 1 minuto. Se extrajo el PVS2 del criovial y fue reemplazado 2 veces por ½ MS con 1.2M de sacarosa dejando los explantes durante 10 minutos antes de su cultivo (Fig. 41).

Los explantes fueron cultivados en discos de papel filtro ubicados sobre el medio de recuperación. Luego de 24 horas los explantes fueron recultivados en el mismo medio pero sin papel filtro. A partir de este momento se realizaron observaciones semanales para registrar porcentajes de supervivencia, contaminación y regeneración de brotes.

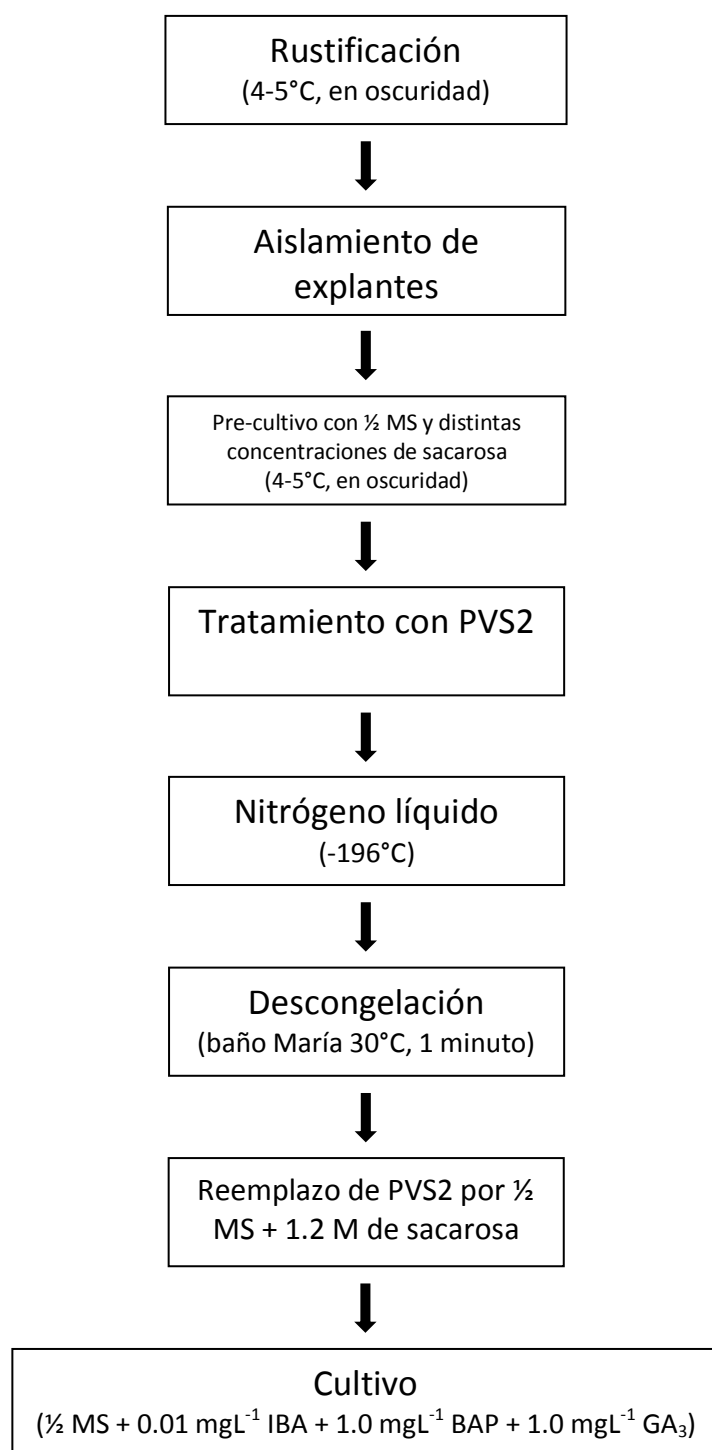


Figura 41. Proceso de crioconservación por la metodología de vitrificación de segmentos uninodales y meristemas caulinares de té.

6.2.4. Diseño experimental y análisis de los resultados

Los experimentos fueron conducidos con un diseño de bloques completos al azar. Cada tratamiento fue repetido 3 veces, con 10 réplicas por repetición y 1 explante/tubo. Los datos se analizaron mediante el análisis de la variancia (ANOVA) y las comparaciones de las medias fueron hechas usando el test de Tukey.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. Conservación de semillas, embriones y ejes embrionales por el método de deshidratación

La deshidratación es uno de los factores que afecta la sensibilidad del material vegetal crioconservado. La mayoría de las células vegetales tienen gran cantidad de agua y deberían ser deshidratadas para evitar la formación de cristales de hielo cuando son sometidas a temperaturas ultra-bajas (González-Benito *et al.*, 2004; Shibli *et al.*, 2006). Sin embargo, la deshidratación extrema también produce daños en la membrana celular, debido a la alta concentración de solutos internos y a la desnaturalización de las proteínas (González-Benito *et al.*, 2004). Por ello es necesario identificar los límites superior e inferior del contenido de humedad que permitan la viabilidad de los tejidos.

Las curvas de deshidratación en la Figura 42 a y b muestran los contenidos de humedad en base al peso fresco (% H_{PF}) de los distintos explantes: eje embrional (EE), eje embrional con trozo de cotiledón (EEC), embrión (eje embrional + cotiledones) y semilla entera.

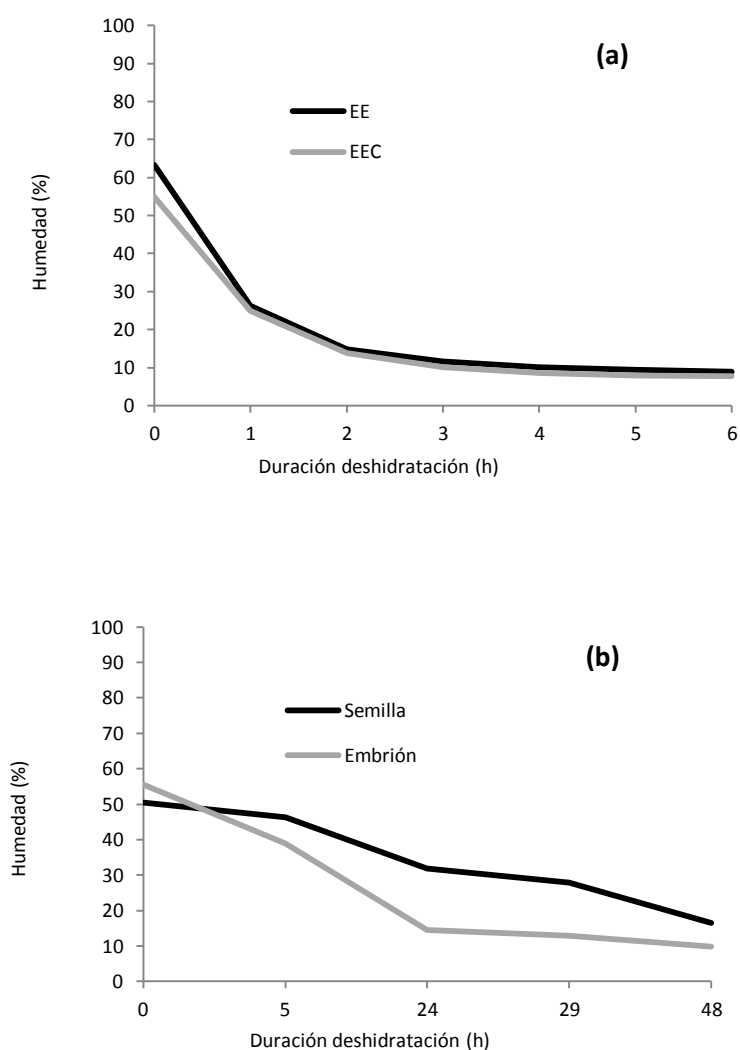


Figura 42. Curvas de deshidratación de explantes: **(a)** ejes embrionales (EE) y ejes embrionales con trozo de cotiledón (EEC); **(b)** embrión (eje embrional + ambos cotiledones) y semilla entera, expuestos a corriente de aire estéril durante distintos períodos de tiempo.

La duración del proceso de deshidratación varía de acuerdo al tamaño del explante y a su contenido inicial de agua. Según Engelmann (1992), la duración óptima de la deshidratación está generalmente comprendida entre 2 y 4 horas, dependiendo de las especies. El contenido de agua es drásticamente reducido de un nivel inicial promedio de 50-60% hasta un 10-16%. Un período más prolongado conduce rápidamente a una pérdida de viabilidad causada por deshidratación. En el presente trabajo (Figura 42 a y b), se observa que los cuatro explantes evaluados se inician con valores de humedad de entre 50 y 60%. Una disminución progresiva del contenido de agua se registró en semillas y embriones, mientras que en EE y EEC fue más abrupta. El pequeño tamaño de los EE y EEC permitió en pocas horas (3-4h) alcanzar el porcentaje de humedad óptimo.

Para el caso de embriones y semillas, se requirió un tiempo más prolongado para la deshidratación (48 horas), llegando a contenidos de humedad promedio de 10% en embriones y 16% en semillas enteras (Figura 42 b). Estos valores resultan adecuados para impedir la muerte de los explantes por deshidratación excesiva, según lo expuesto por Engelmann (1992).

Una vez determinados los valores de deshidratación, se procedió a evaluar la técnica de crioconservación propiamente dicha (Figs. 43 y 44).



Figura 43. Técnica de crioconservación por deshidratación de ejes embrionales y ejes embrionales con cotiledón: a) deshidratación, b) recipientes para conservación en nitrógeno líquido, c) inmersión en nitrógeno líquido, d) descongelación por baño María y e) cultivo en medio de recuperación.

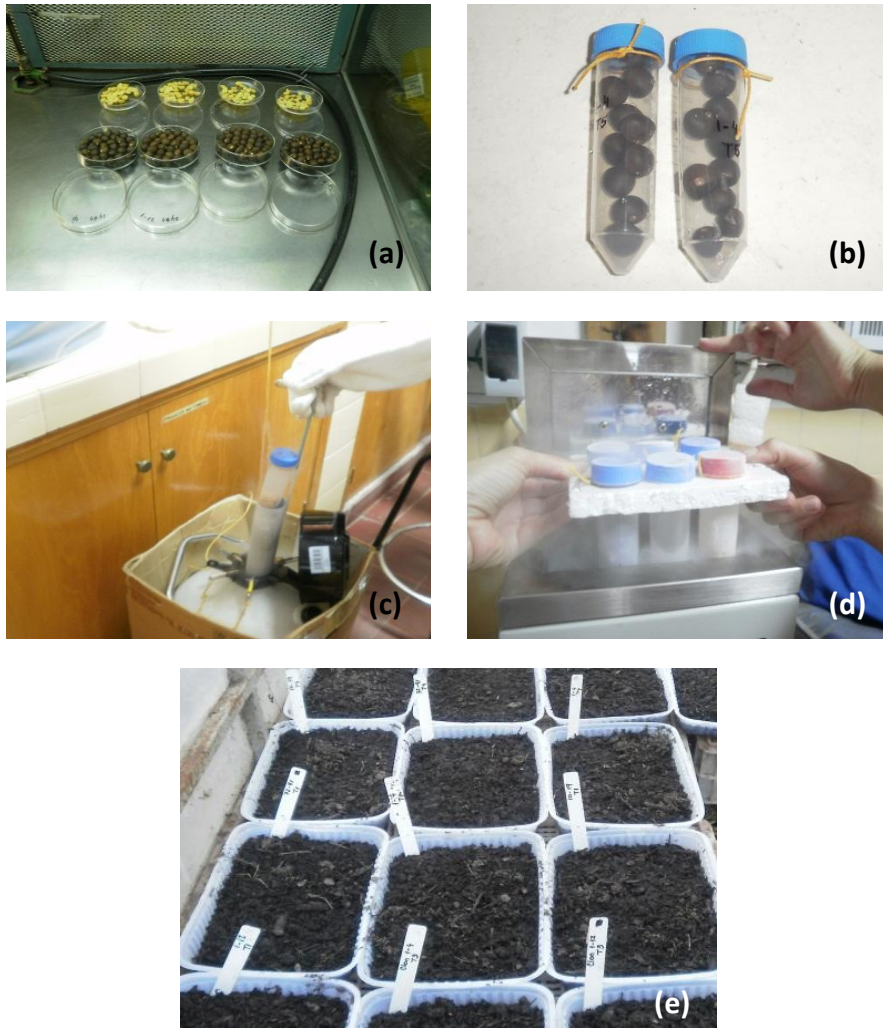


Figura 44. Técnica de crioconservación por deshidratación de semillas: a) deshidratación, b) tubos tipo Falcón para conservación en nitrógeno líquido, c) inmersión en nitrógeno líquido, d) descongelación por baño María y e) siembra.

Luego de 30 días la contaminación registrada fue muy baja, con valores que no superaron el 2.3%, independientemente de los explantes y clones utilizados.

Al cabo de 90 días se obtuvieron plantas enteras a partir de todos los clones evaluados, cuando se crioconservaron EE y EEC (Tabla 22; Figs. 45 y 46 c).

Tabla 22. Efecto del tiempo de deshidratación (horas) sobre la regeneración de plantas enteras, a partir de EE y EEC de 4 clones conservados a -196°C. (Letras diferentes en el sentido de las columnas indican diferencias significativas para $p < 0,05$).

Tiempo deshidratación (horas)	Clon			
	CH 14 INTA	CH 112 INTA	CH 1019 INTA	SG 7291 INTA
Sin deshidratación, sin N ₂	11,67 ^a	55,00 ^a	21,67 ^a	58,33 ^a
Sin deshidratación, con N ₂	0,00 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b
1h deshidratación, con N ₂	3,33 ^a	8,33 ^b	1,67 ^b	0,00 ^b
2h deshidratación, con N ₂	3,33 ^a	20,00 ^b	1,67 ^b	1,67 ^b
3h deshidratación, con N ₂	11,67 ^a	70,00 ^a	1,67 ^b	1,67 ^b
4h deshidratación, con N ₂	6,67 ^a	71,67 ^a	0,00 ^b	6,67 ^b
5h deshidratación, con N ₂	5,00 ^a	56,67 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b

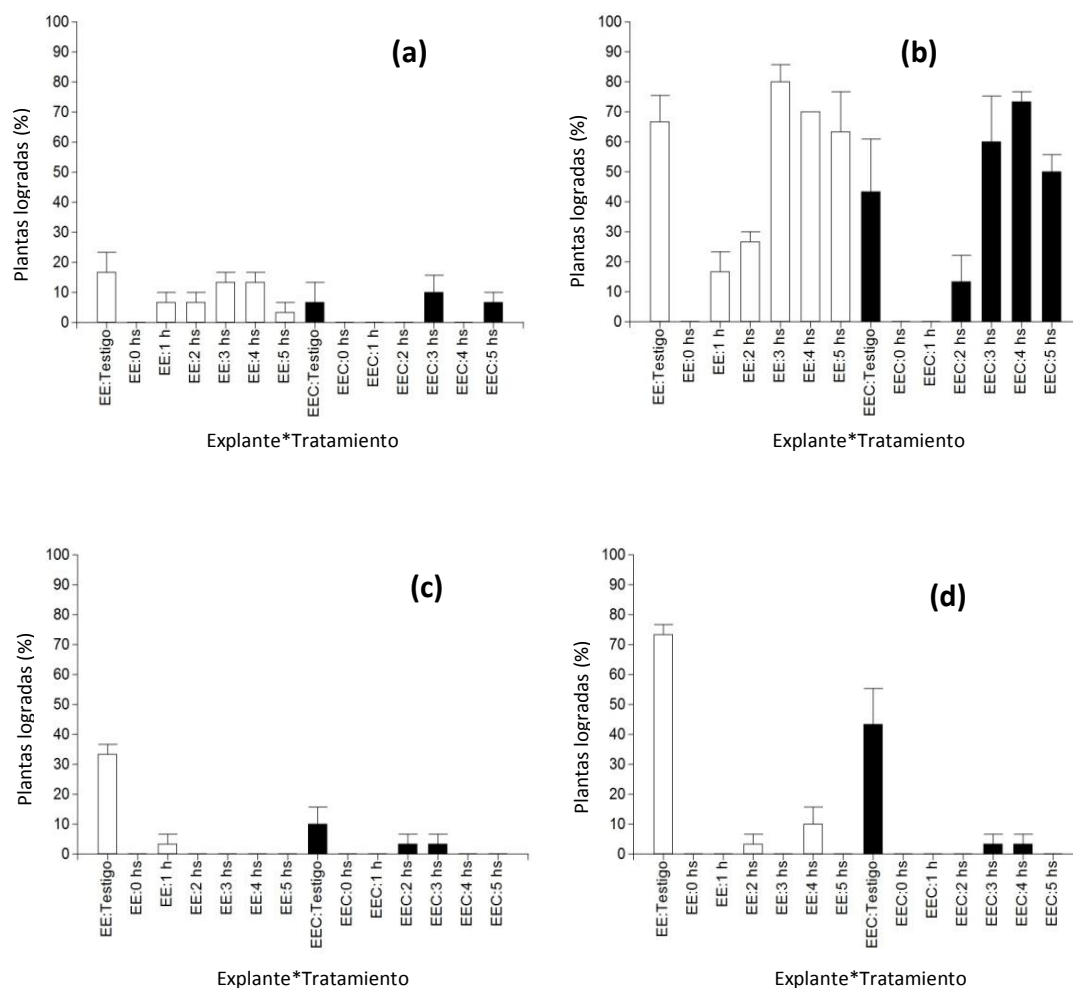


Figura 45. Plantas logradas (%) a partir de ejes embrionales-EE (□) y ejes embrionales con cotiledón-EEC (■) sometidos a distintos tiempos de deshidratación (horas), y posterior introducción en nitrógeno líquido, en cuatro clones de té: **(a)** CH 14 INTA, **(b)** CH 112 INTA, **(c)** CH 1019 INTA y **(d)** SG 7291 INTA.

El clon CH 112 INTA fue el que mejor comportamiento tuvo frente a la crioconservación, obteniendo en promedio un 71,67% de plantas regeneradas a partir de EE y EEC (Fig. 46 c y d). Este valor fue hallado en el pre-tratamiento de deshidratación de 4 horas, no encontrando diferencias

estadísticamente significativas con los pre-tratamientos de 3 y 5 horas ni con el testigo (no conservado a -196°C) (Tabla 22).

Independientemente de los tiempos de deshidratación, los clones CH 14 INTA y CH 112 INTA registraron diferencias estadísticamente significativas a favor de EE, en la regeneración de plantas enteras luego de la crioconservación (Tabla 23; Fig. 46 c). Diferentes resultados fueron encontrados por Kim *et al.* (2002), quienes obtuvieron mayor porcentaje de formación de plantas a partir de EEC, sin diferencias en el porcentaje de supervivencia entre ambos explantes (EE y EEC).

Tabla 23. Efecto del explante sometido a deshidratación y posterior conservación a -196°C sobre la regeneración de plantas enteras, en 4 clones. (Letras diferentes en el sentido de las columnas indican diferencias significativas para $p < 0,05$).

Explante	Clon			
	CH 14 INTA	CH 112 INTA	CH 1019 INTA	SG 7291 INTA
EE	8,57 ^a	46,19 ^a	5,24 ^a	12,38 ^a
EEC	3,33 ^b	34,29 ^b	2,38 ^a	7,14 ^a

En la Figura 45 se observa que, para la mayoría de los clones evaluados, el pretratamiento de deshidratación durante 3 horas, y posterior conservación a -196°C, logró los mayores porcentajes de plantas enteras. Esta respuesta se observó en ambos explantes, ejes embrionales (EE) y ejes embrionales con cotiledón (EEC).

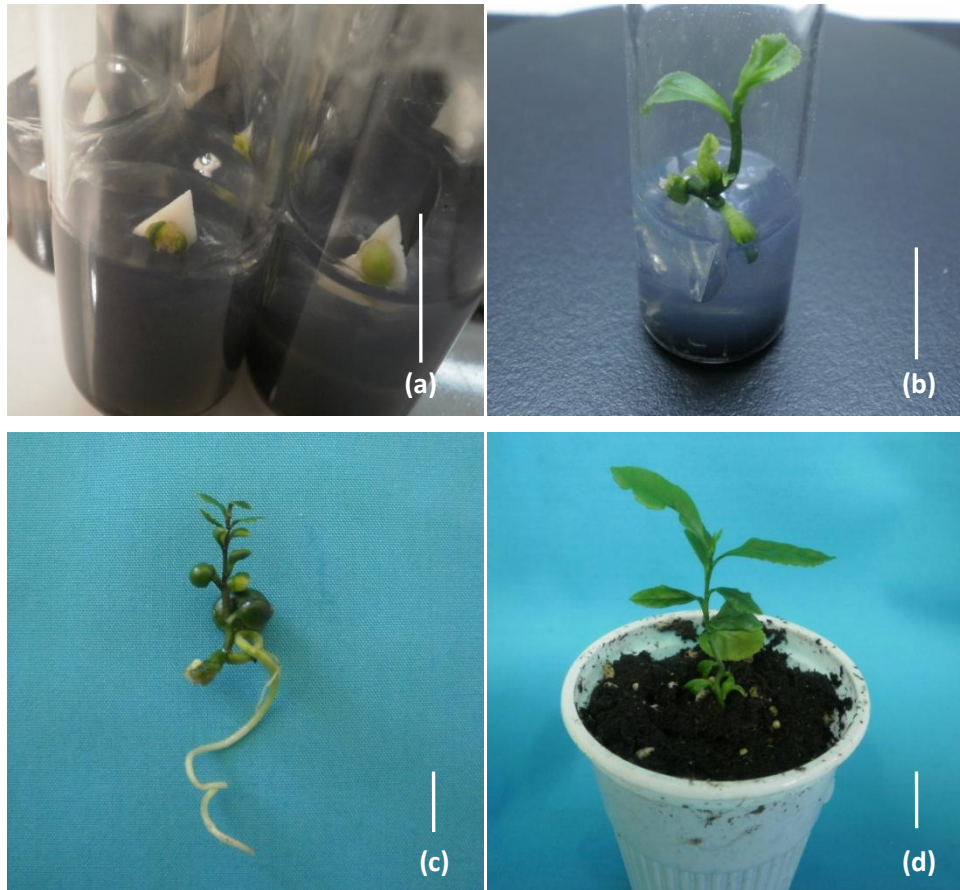


Figura 46. Desarrollo de plantas a partir de explantes crioconservados: **(a)** EEC con 2 semanas de cultivo en medio de recuperación; **(b)** EE con 1 mes de cultivo en medio de recuperación; **(c)** planta obtenida a partir de EE al momento del repique a los 3 meses; **(d)** planta obtenida a partir de EEC, luego de 1 mes de repicada en turba (las barras verticales equivalen a 1 cm).

La técnica de deshidratación es una de las más aplicadas para la crioconservación de embriones y ejes embrionales (Engelmann, 1997b). Es simple y no requiere de sustancias químicas (crioprotectores) ni equipamientos costosos (Chaudhury y Malik, 2004).

Analizando la supervivencia de los embriones sometidos a distintos tiempos de deshidratación y posterior conservación a -196°C , se

observaron porcentajes muy bajos en los 4 clones evaluados. El testigo presentó en todos los casos el 100% de supervivencia (Fig. 47).

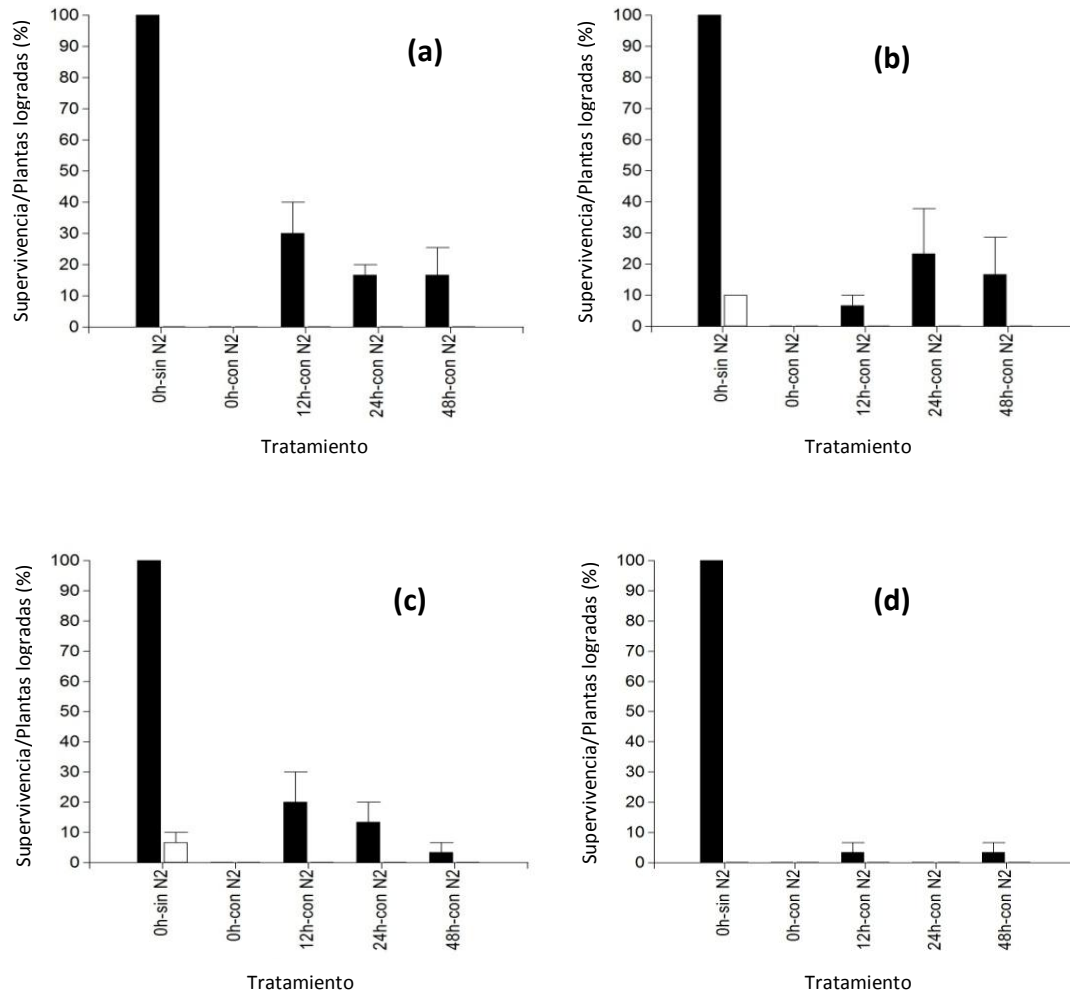


Figura 47. Porcentaje de supervivencia (■) y plantas logradas (□) a partir de embriones sometidos a distintos tiempos de deshidratación (horas), y posterior introducción en nitrógeno líquido, en cuatro clones de té: **(a)** CH 14 INTA, **(b)** CH 112 INTA, **(c)** CH 1019 INTA y **(d)** SG 7291 INTA.

No se logró la regeneración de plantas a partir de la crioconservación de embriones, siendo muy bajo el porcentaje de plantas enteras en el testigo de dos clones: CH 112 INTA y CH 1019 INTA (Fig. 47).

En cuanto a las semillas, solamente en dos clones (CH 112 INTA y SG 7291 INTA) se logró la germinación y la obtención de plantas enteras, correspondientes al tratamiento testigo (sin deshidratación e inmersión en nitrógeno líquido) (Fig. 48). Ninguna semilla proveniente de estos clones logró sobrevivir a la acción de los pre-tratamientos de deshidratación y posterior introducción en el nitrógeno líquido (Fig. 48). Resultados similares fueron encontrados por Kuranuki y Yoshida (1996) y Kim *et al.* (2002), trabajando con clones de té japoneses.

La diferencia de respuesta obtenida entre los ejes embrionales (con y sin cotiledón) y las semillas enteras crioconservadas se podría atribuir a la velocidad de deshidratación de los tejidos. La semilla tiene un mayor período de tiempo, con un contenido de agua intermedio, en el cual ocurren procesos deletéreos (Berjak *et al.*, 1998; Liang y Sun, 2002). Además, como citan varios autores (Pammenter *et al.*, 1991; Wesley-Smith *et al.*, 1992; Dussert *et al.*, 2001; Liang y Sun, 2002), las rápidas tasas de deshidratación permiten que los tejidos de semillas de comportamiento recalcitrante toleren menores contenidos de agua. En la Figura 42 se observa que un contenido de agua del 10% en los ejes embrionales (EE y EEC), es alcanzado en 3 horas mientras que en las semillas enteras una exposición de 48 horas a la corriente de aire estéril

no fueron suficientes para alcanzar el 10% de humedad. Según Wesley-Smith *et al.* (1992), la deshidratación rápida minimiza el crecimiento del cristal de hielo y el consecuente daño durante el congelamiento.

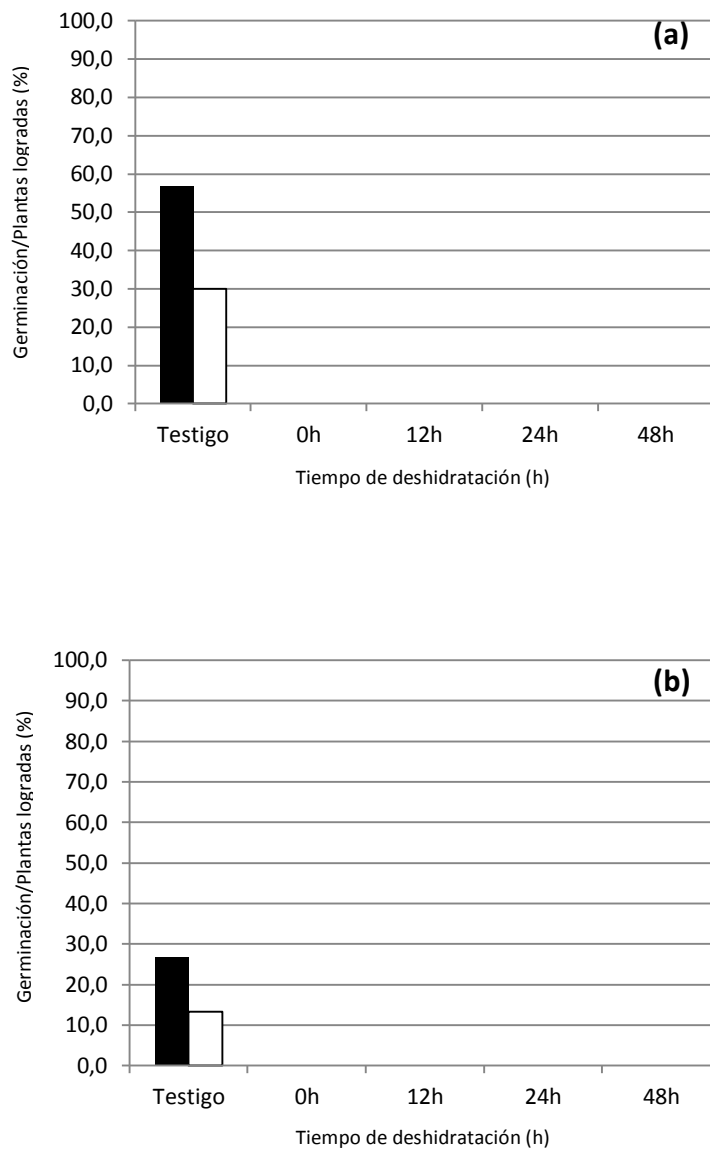


Figura 48. Porcentaje de germinación (■) y plantas logradas (□) a partir de semillas enteras sometidas a distintos tiempos de deshidratación (horas), y posterior introducción en nitrógeno líquido, en dos clones de té: **(a)** CH 112 INTA y **(b)** SG 7291 INTA.

Por lo expuesto, se observa un comportamiento recalcitrante para la semilla entera debido a su sensibilidad a la deshidratación y posterior crioconservación. En cambio, los ejes embrionales (EE) y ejes embrionales con cotiledón (EEC) de té, sometidos a deshidratación e inmersión en nitrógeno líquido, tendrían un comportamiento similar al de una especie ortodoxa. Similares resultados fueron encontrados por Kuranuki y Yoshida (1996).

6.3.2. Conservación de meristemas por el método de vitrificación

La vitrificación consiste en el tratamiento de los explantes con una solución concentrada de vitrificación por períodos variables de tiempo, seguido por una inmersión directa en nitrógeno líquido (Panis y Lambardi, 2005).

La metodología de vitrificación aplicada en segmentos uninodales produjo el 100% de mortandad, para todos los tratamientos evaluados.

La utilización de meristemas, en cambio, permitió la regeneración de vástagos. Cuando se evaluaron los 4 tiempos de exposición a las bajas temperaturas (0, 2, 4 y 8 semanas), se encontró que a mayor tiempo de exposición aumentó la supervivencia y capacidad de regeneración de

vástagos a partir de los explantes vitrificados. Como mencionan Chang y Reed (1999 y 2000), los tejidos expuestos a bajas temperaturas por períodos más largos tienen mayor capacidad de recuperación después de la criopreservación. Según Panis y Lambardi (2005), esto se debería a que la baja temperatura permitiría acumular proteínas específicas, azúcares, poliaminas y otros compuestos para proteger a los componentes celulares durante la deshidratación.

Independientemente del tiempo de pre-cultivo aplicado, se observó que una aclimatación de 4 semanas a baja temperatura (4°C) registró, con diferencias estadísticamente significativas, el mayor porcentaje de vástagos regenerados a partir de los meristemas criopreservados (Tabla 24; Figs. 49, 50, 51).

Un mayor tiempo de exposición (8 semanas) provocó una disminución de la calidad de las plantas dadoras de explantes, evidenciadas por un amarronamiento generalizado (Fig. 52 b). Resultados similares fueron encontrados por Aoshima (1997). En cambio, según Kuranuki y Sakai (1995), el porcentaje de formación de vástagos en meristemas criopreservados incrementó gradualmente con el período de almacenamiento a baja temperatura, alcanzando su máximo entre las 7 y 8 semanas.

Tabla 24. Efecto del tiempo de aclimatación sobre la regeneración de vástagos a partir de meristemas crioconservados por el método de vitrificación. (Letras diferentes en el sentido de las columnas indican diferencias significativas para $p < 0,05$).

Aclimatación	Sin precultivo	Precultivo 2 días	Precultivo completo
0 semanas	5,83 ^b	6,67 ^b	7,50 ^a
2 semanas	7,50 ^b	11,67 ^b	7,50 ^a
4 semanas	15,00 ^a	30,83 ^a	14,17 ^a
8 semanas	8,33 ^b	13,33 ^b	10,00 ^a

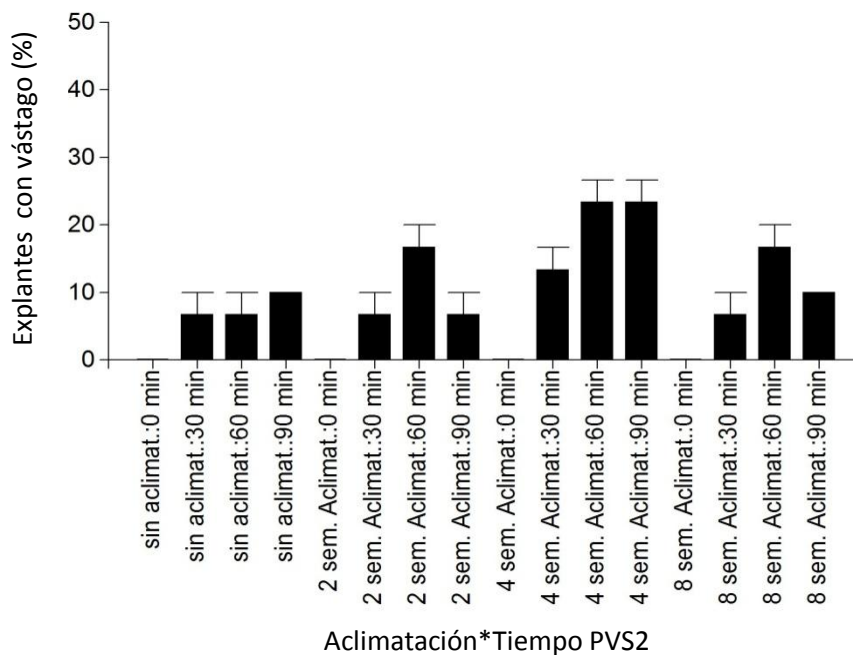


Figura 49. Porcentaje de explantes con vástagos generados a partir de meristemas crioconservados por la técnica de vitrificación, sin pre-cultivo en sacarosa, a 4°C.

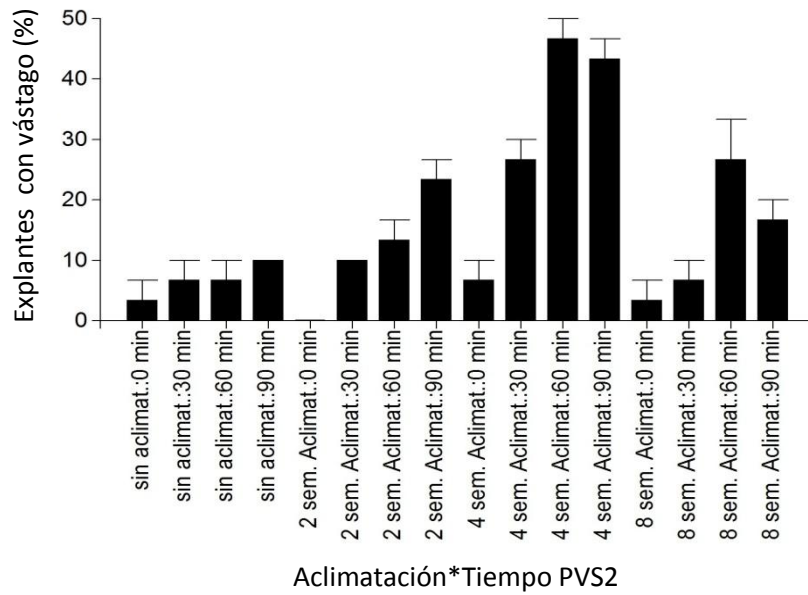


Figura 50. Porcentaje de explantes con vástagos generados a partir de meristemas crioconservados por la técnica de vitrificación, con pre-cultivo en sacarosa (2 días a 0,2 M), a 4°C.

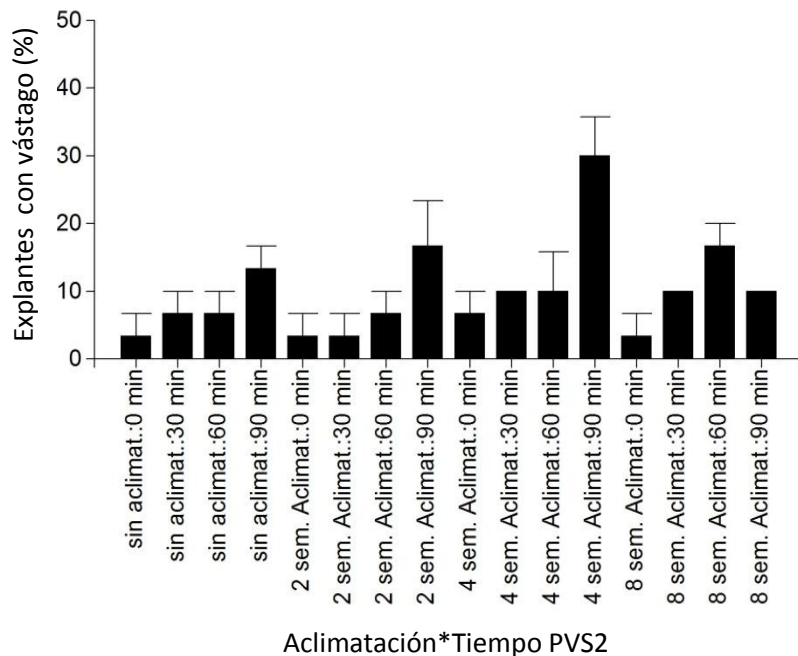


Figura 51. Porcentaje de explantes con vástagos generados a partir de meristemas crioconservados por la técnica de vitrificación, con pre-cultivo completo en sacarosa (0.2M (2 días) + 0.4M (3 días) + 0.7M (4 días), a 4°C.

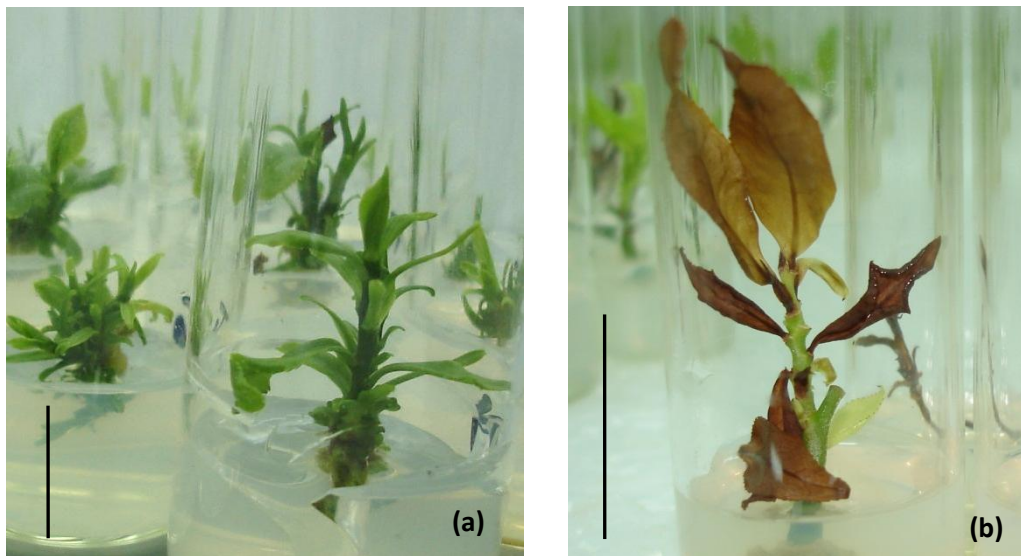


Figura 52. Plantas dadoras de explantes, para la técnica de vitrificación, expuestas a bajas temperaturas (4°C) durante: (a) 4 semanas y (b) 8 semanas (las barras verticales equivalen a 1 cm).

En cuanto al tiempo de exposición a la solución de PVS2, se observa en general que, a medida que aumenta este parámetro aumenta el porcentaje de meristemas crioconservados capaces de regenerar vástagos. Los mayores valores de regeneración de vástagos se registraron entre los 60 y 90 minutos de tratamiento con PVS2, independientemente del pre-cultivo empleado. Diferencias estadísticamente significativas solamente se registraron con el tratamiento sin PVS2 (Tabla 25).

El pre-cultivo en sacarosa es usado para incrementar la tolerancia de los meristemas a la deshidratación y posterior exposición al nitrógeno líquido (Matsumoto *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005;

Sakai y Engelmann, 2007). En especies sensibles a las altas concentraciones de sacarosa, se produce un aumento progresivo de la misma para evitar efectos deletéreos. En el presente trabajo se encontró que un pre-cultivo de 2 días con una concentración de sacarosa de 0,2 M fue suficiente para obtener el mayor porcentaje de meristemas capaces de regenerar vástagos (Tablas 24 y 25). Además, los meristemas que no fueron pre-cultivados mostraron baja tolerancia a la crioconservación (Fig. 49). Resultados similares fueron encontrados por Kuranuki y Sakai (1995) y De Carlo *et al.* (2000).

Tabla 25. Efecto del tiempo de exposición al PVS2 sobre la regeneración de vástagos a partir de meristemas crioconservados por el método de vitrificación. (Letras diferentes en el sentido de las columnas indican diferencias significativas para $p < 0,05$).

Exposición al PVS2	Sin precultivo	Precultivo 2 días	Precultivo completo
0 minutos	0,00 ^c	3,33 ^c	4,17 ^b
30 minutos	8,33 ^b	12,50 ^b	7,50 ^b
60 minutos	15,83 ^a	23,33 ^a	10,00 ^{ab}
90 minutos	12,50 ^{ab}	23,33 ^a	17,50 ^a

6.4. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permiten concluir que es posible la conservación de germoplasma de té a largo plazo.

Es posible la conservación de té mediante la técnica de deshidratación. Los ejes embrionales fueron los explantes con mejores respuestas. La respuesta obtenida con embriones y semillas, probablemente se deba a que no se lograron obtener bajos porcentajes de humedad que aseguren una mejor respuesta a la crioconservación.

La crioconservación de ejes embrionales por el método de deshidratación, además de ser un método sencillo, rápido y que no necesita de instrumental especial, permite la conservación de la mayor variabilidad genética, en un espacio reducido y a un bajo costo. Esto posibilita contar con un banco de germoplasma *in vitro* complementario al banco *ex situ* existente.

La técnica de vitrificación permitió la regeneración de germoplasma crioconservado cuando se utilizaron ápices como explante, no así cuando se utilizaron segmentos uninodales.

En la técnica de vitrificación, un período de rustificación a baja temperatura de 4 semanas permitió obtener el mayor porcentaje de regeneración. Si el período de rustificación se extiende, disminuye la calidad de las plantas madre, de las cuales se extraen los explantes. Además, se requiere un tratamiento con la solución de PVS2 no menor a 60 ó 90 minutos.

BIBLIOGRAFIA

- Agarwal, B.; Singh, U.; Banerjee, M. 1992. *In vitro* clonal propagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). Plant Cell, Tissue & Organ Culture 30:1-5.
- Ahmed, M.; Anjum, M.A.; Shah, A.H.; Hamid, A. 2010. *In vitro* preservation of *Pyrus* germplasm with minimal growth using different temperature regimes. Pakistan Journal of Botany 42:1639-1650.
- Akula, A.; Dodd, W.A. 1998. Direct somatic embryogenesis in a selected tea clone, "TRI-2025" (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) from nodal explants. Plant Cell Reports 17:804-809.
- Akula, A.; Akula, C. 2005. Protocols for somatic embryogenesis and plantlet formation from three explants in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). In: Forestry Science: Protocols for somatic embryogenesis in woody plants. (Jain, S.M.; Gupta, P.K. eds.). Springer, Netherlands. pp.181-190.
- Akula, A.; Dodd, W.A.; Bateson, M. 1997. International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species. Brisbane, Australia.
- Akula, A.; Akula, C.; Bateson, M. 2000a. Betaine a novel candidate for rapid induction of somatic embryogenesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). Plant Growth Regulation 30:241-246.
- Akula, A.; Becker, D.; Bateson, M. 2000b. High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in a selected tea clone, "TRI-2025", by temporary immersion. Plant Cell Reports 19:1140-1145.

- AL-Oud, S.S. 2003. Heavy metal contents in tea and herb leaves. Pakistan Journal of Biological Sciences 6:208-212.
- Alvarado Capó, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. (Pérez Ponce, J.N. ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba. pp.81-104.
- Aoshima, Y. 1997. Cryopreservation of multiple shoots of tea (*Camellia sinensis* L.O. Kuntze) by alginate encapsulation-dehydration. Bulletin of the Shizuoka Prefecture Tea Experiment Station 21:13-21.
- Ashmore, S.E. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), 67p.
- Assy-Bah, B.; Engelmann, F. 1992. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. CryoLetters 13:117-126.
- Bala Sheti, S. 1965. Structure and development of seed in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Proceedings of the National Institute of Science of India 31:24-33.
- Ballester, A; Janeiro, L.V.; Vieitez, A.M. 1997. Cold storage of shoot cultures and alginate encapsulation of shoot tips of *Camellia japonica* L. and *Camellia reticulata* Lindley. Scientia Horticulturae 71:67-78.
- Banerjee, M.; Agarwal, B. 1990. *In vitro* rooting of tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Indian Journal of Experimental Biology 28:936-939.

- Bekheet, S.A. 2000. *In vitro* preservation of *Asparagus officinalis*. *Biologia Plantarum* 43:179-183.
- Berjak, P.; Pammenter, N.W. 2003. Understanding and Handling Desiccation-Sensitive Seeds. In: *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Smith, R.D.; Dickie, J.B.; Linington, S.H.; Pritchard, H.W. y Probert, R.J. (eds.). Royal Botanic Gardens, Kew. pp.417-430.
- Berjak, P.; Pammenter, N.W. 2004. Biotechnological aspects of non-orthodox seeds: an African perspective. *South African Journal of Botany* 70:102-108.
- Berjak, P.; Walker, M.; Mycock, D.J.; Wesley-Smith, J.; Watt, P.; Pammenter, N.W. 1998. Cryopreservation of recalcitrant zygote embryos. In: *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Engelmann, F. y Takagi, H. (eds.). Tsukuba. 496p.
- Bhaskaran, S.; Prabhudesai, V.R. 1989. Tissue Culture of Plantation Crops. In: *Applications of Biotechnology in Forestry and Agriculture*. Vibha Dhawan (ed.). Plenum Press, London. pp.87-107.
- Bonneau, L.; Beranger-Novat, N.; Monin, J. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration in a woody species: the European Spindle Tree (*Euonymus europaeus* L.). *Plant Cell Reports* 13:165-138.
- Bonnier, F.J.M.; Van Tuyl, J.M. 1997. Long term *in vitro* storage of lily: effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49:81-87.

- Borchetia, S.; Das, S.C.; Handique, P.J.; Das, S. 2009. High multiplication frequency and genetic stability for commercialization of the three varieties of micropropagated tea plants (*Camellia* spp.). *Scientia Horticulturae* 120:544-550.
- Cabasson, C.; Alvard, D.; Dambier, D.; Ollitrault, P.; Teisson, C. 1997. Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50:33-37.
- Chanatásig Vaca, C.I. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Tesis, Magister Scientiae. Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 86p.
- Chandel, K.P.S.; Chaudhury, R.; Radhamani, J.; Malik, S.K. 1995. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jacfruit. *Annals of Botany* 76:443-450.
- Chang, Y.; Reed, B.M. 1999. Extended cold acclimation and recovery médium alteration improve regrowth of *Rubus* shoot tips following cryopreservation. *CryoLetters* 20:371-376.
- Chang, Y.; Reed, B.M. 2000. Extended alternating-temperature cold acclimatation and culture duration improve pear shoot cryopreservation. *Cryobiology* 40:311-322.
- Chaudhury, R.; Malik, S.K. 2004. Genetic conservation of plantation crops and spices using cryopreservation. *Indian Journal of Biotechnology* 3:348-358.

- Chaudhury, R.; Lakhanpaul, S.; Chandel, K.P.S. 1990. Germination and desiccation tolerance of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) seeds and feasibility of cryopreservation. Sri Lanka Journal of Tea Science 59:89-94.
- Chaudhury, R.; Radhamani, J.; Chandel, K.P.S. 1991. Preliminary observations on the cryopreservation of desiccated embryonic axes of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) seeds for genetic conservation. CryoLetters 12:31-36.
- Chen, L.; Zhou, Z.X.; Yang, Y.J. 2007. Genetic improvement and breeding of tea plant (*Camellia sinensis*) in China: from individual selection to hybridization and molecular breeding. Euphytica 154:239-248.
- Chengalrayan, K.; Sathaye, S.S.; Hazra, S. 1994. Somatic embryogenesis from mature embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Cell Reports 13:578-581.
- Chengalrayan, K.; Mhaske, V.B.; Hazra, S. 1997. High-frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos. Plant Cell Reports 16:783-786.
- Corredoira, E.; San José, M.C.; Martínez, T.; Valladares, S.; Couselo, J.L.; Janeiro, L.; Vieitez, A.M.; Ballester, A. 2011. Conservación de germoplasma en especies leñosas con técnicas de cultivo *in vitro* y almacenamiento en frío. Spanish Journal of Rural Development 2:15-24.
- Das, S.; Jha, T.B.; Jha, S. 1996. Organogenesis and regeneration from pigmented callus in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Nandadevi, an elite Darjeeling tea clone. Plant Science 121:207-212.

- De Bernardi, L.A.; Prat Kricun, S.D. 2002. Diagnóstico de la región tealera. SAGPyA e INTA. 66p.
- De Carlo, A.; Benelli, C.; Lambardi, M. 2000. Development of a shoot-tip vitrification protocol and comparison with encapsulation-based procedures for plum (*Prunus domestica* L.) cryopreservation. *CryoLetters* 21:215-222.
- Dehua, L.; Kuboi, T.; Gang, W.; Biao, X.; Hara, M. 1997. Efficient Plantlet Recovery from Cotyledon Petioles in Tea Plant (*Camellia sinensis* L.). *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Shizuoka University* 47:1-7.
- Devine, A.; Hodgson, J.M.; Dick, I.M.; Prince, R.L. 2007. Tea drinking is associated with benefits on bone density in older women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 86:1243-1247.
- Dumet, D.; Engelmann, F.; Chabrilange, N.; Duval, Y. 1993. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Reports* 12:352-355.
- Dussert, S.; Chabrilange, N.; Rocquelin, G.; Engelmann, F.; Lopez, M.; Hamon, S. 2001. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. *Physiologia Plantarum* 112:495-504.
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm – a review. *Euphytica* 57:227-243.
- Engelmann, F. 1992. Cryopreservation of embryos. In: *Reproductive Biology and Plant Breeding*. (Y. Dattée, Y.; Dumas, C.; Gallais, A., eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp.281-290.

- Engelmann, F. 1997a. *In vitro* conservation methods. In: Biotechnology and Plant Genetic Resources. Conservation and Use. (Ford-Lloyd, B.V., Newbury, H.J.; Callow, J.A., eds.), CABI, Wallingford, UK, pp.119-162.
- Engelmann, F. 1997b. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. Plant Genetic Resources Newsletter 112:9-18.
- Engelmann, F. 1998. Crioconservação del germoplasma de plantas tropicales: Progreso actual y aplicación. Book of Abstracts of the JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop. pp.8-20.
- Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 47:5-16.
- Engelmann, F.; Takagi, H. 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. JIRCAS/IPGRI. 496p.
- Engelmann, F.; Engels, J.M.M. 2002. Technologies and strategies for *ex situ* conservation. In: Managing Plant Genetic Diversity. (Engels, J.M.M.; Ramanatha Rao, V.; Brown, A.H.D.; Jackson, M.T. eds.). IPGRI. pp.89-103.
- Erig, A.C.; Schuch, M.W. 2003. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. Revista Brasileira Agrociência 9:221-227.

- Escobar, R.H.; Mafla, G.; Roca, W.M. 1997. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Reports* 16:474-478.
- Etienne, H.; Lartaud, M.; Michaux-Ferriere, N.; Carron, M.E.; Berthouly, M.; Teisson, C. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 33:81-87.
- Fabre, J.; Dereuddre, J. 1990. Encapsulation dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *CryoLetters* 11:413-426.
- Fernández Jardón, C.M.; Martínez Cobas, X.; Gutawski, R.S.; Martos, M.S.; Dekun, C.M. 2005. La cadena empresarial del Té en Misiones (Argentina). Un enfoque estratégico. ProTé. Xunta de Galicia. IUGD, UVigo, UNaM.
- Fontana, H.P.; Prat Kricun, S.D.; Belingheri, L.D. 1990. Catado de té. Informe técnico. INTA Cerro Azul (Mnes.). 24p.
- Forrest, G.I.; Bendall, D.S. 1969. The Distribution of Polyphenols in the Tea Plant (*Camellia sinensis* L.). *Biochemical Journal* 113:741-755.
- García, L.R.; Bermúdez-Caraballosa, I.; Veitía, N.; Collado, R.; Torres, D.; Romero, C. 2012. Efecto del sulfato de adenina en la regeneración y elongación de brotes de frijol común. *Bioteología Vegetal* 12:59-62.
- García-Águila, L.; Gómez-Kosky, R.; Alvarado-Capó, Y.; Sarría, Z.; Reyes, M. 2010. Efecto de la densidad de inoculación en la formación y morfología de los embriones somáticos de plátano (*Musa* spp.

- AAAB, cv. híbrido FHIA-21). Revista Colombiana de Biotecnología 12:240-247.
- Gaspar, T.; Kevers, C.; Franck, T.; Bisbis, B.; Billard, J.P.; Huault, C.; Le Dily, F.; Petit-Paly, G.; Rideau, M.; Penel, C.; Crèvecoeur, M.; Greppin, H. 1995. Paradoxical results in the analysis of hyperhydric tissues considered as being under stress: questions for a debate. Bulgarian Journal of Plant Physiology 21:80-97.
- Gatica Arias, A.M.; Muñoz Valverde, J.; Ramírez Fonseca, P.; Valdez Melara, M. 2010. *In vitro* plant regeneration system for common vean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N₆-benzylaminopurine and adenine sulphate. Electronic Journal of Biotechnology 13:1-8.
- Ghanati, F.; Ishka, M.R. 2009. Investigation of the interaction between abscisic acid (ABA) and excess benzyladenine (BA) on the formation of shoot in tissue culture of tea (*Camellia sinensis* L.). International Journal of Plant Production 3:7-14.
- Giridhar, P.; Kumar, V.; Indu, E.P.; Ravishankar, G.A.; Chandrasekar, A. 2004. Thidiazuron induced somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P ex Fr. Acta Botanica Croatica 63:25-33.
- Gómez Kosky, R. 1998. Embriogénesis somática. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología (Pérez Ponce, J.N. ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. pp.57-79.
- Gonzalez, A.M.; Cristóbal, C.L. 1997. Anatomía y ontogenia de semillas de *Helicteres Ihotzkyana* (*Sterculiaceae*). Bonplandia 9:287-294.
- González, M.E.; Ramos, R.; Santana, N. 2000. Efecto del ácido abscísico (ABA) en la regulación del desarrollo de embriones somáticos de *Coffea canephora* P. var. Robusta. Cultivos Tropicales 21:33-37.

- González-Arno, M.T.; Engelmann, F.; Urra, C.; Morenza, M.; Ríos, A. 1998. Cryopreservation of *Citrus* apices using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters* 19:177-182.
- González-Benito, M.E.; Clavero-Ramírez, I.; López-Aranda, J.M. 2004. Review. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2:341-351.
- Guri, A.; Gazhali, H.; Nick, R.; Hartmann, D. 2000. Disinfection of field collected material using Plant Preservative Mixture (PPM). *World Congress on In Vitro Biology. In Vitro Cellular & Developmental Biology* 36, Parte II. San Diego, California. 158p.
- Hassan, N.A.; Bekheet, S.A. 2008. Mid-term storage and genetic stability of strawberry tissue cultures. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 4:505-511.
- Hong, T.D.; Linington, S.; Ellis, R.H. 1996. Handbook for genebanks nº 4. Seed Storage Behaviour: a Compendium. IPGRI, Rome. 656p.
- International Tea Committee. 2008. Annual Bulletin of Statistics. Ed. International Tea Committee. Sri Lanka. 171p.
- Iriondo Alegría, J.M. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetales* 16:5-24.
- Islam, G.M.R.; Iqbal, M.; Quddus, K.G.; Ali, M.Y. 2005. Present status and future needs of tea industry in Bangladesh. *Proceedings of the Pakistan Academy of Science* 42:305-314.
- ISTA, 1993. International rules for seed testing. Rules 1993. *Seed Science and Technology* 21, Supplement: 1-75.

- Janeiro, L.V.; Vieitez, A.M.; Ballester, A. 1995. Cold storage of *in vitro* cultures of wild cherry, chestnut and oak. *Annals of Forest Science* 52:287-293.
- Jiménez, V.M.; Castillo, J.; Tavares, E.; Guevara, E.; Montiel, M. 2006. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell Tissues and Organ Culture* 86:389-395.
- Jiménez González, E.A. 1998. Cultivo de ápices y meristemas. En: *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. J.N. Pérez Ponce (ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba. pp.45-56.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw Hill Book Co. New York. 511p.
- Joshi, M.; Sujatha, K.; Hazra, S. 2008. Effect of TDZ and 2,4-D on peanut somatic embryogenesis and *in vitro* bud development. *Plant Cell Tissues and Organ Culture* 94:85-90.
- Kartha, K.K.; Leung, N.L.; Pahl, K. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 105:481-484.
- Kartha, K.K.; Leung, N.L.; Mroginski, L.A. 1982. *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 107:133-140.
- Kato, M. 1985. Regeneration of Plantlets from Tea Stem Callus. *Japanese Journal of Breeding* 35:317-322.

- Kato, M. 1986. Micropropagation through cotyledon culture in *Camellia japonica* L. and *C. sinensis* L. Japanese Journal of Breeding 36:31-38.
- Kato, M. 1989. *Camellia sinensis* L. (tea): *in vitro* regeneration. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 7. Medicinal and Aromatic Plants II (Bajaj Y.P.S. ed.). Springer, Berlín Heidelberg, New York, pp.82-98.
- Kato, M. 1996. Somatic embryogenesis from immature leaves of *in vitro* grown tea shoots. Plant Cell Reports 15:920-923.
- Kaviani, B. 2011. Review article. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. Australian Journal of Crop Science 5:778-800.
- Kim, H.H.; Cha, Y.S.; Baek, H.J.; Cho, E.G.; Chae, Y.A.; Engelmann, F. 2002. Cryopreservation of tea (*Camellia sinensis* L.) seeds and embryonic axes. CryoLetters 23:209-216.
- Kim, H.H.; Yoon, J.W.; Park, S.U.; Kim, J.H.; Cho, E.G.; Engelmann, F. 2005. Assessment of desiccation sensitivity of tea embryos for cryopreservation. CryoLetters 26:269-276.
- Kraak, H.L. 1993. Physiological aspects of storage of recalcitrant seeds. In: Tree seeds problems, with special reference to Africa. (Somé, L.M.; Kam, M. eds.). Backhuys Publishers. pp.239-253.
- Kuranuki, Y.; Yoshida, S. 1991. Cryopreservation of tea seeds and excised embryonic axes in liquid nitrogen. In Proceedings of the International Symposium on Tea Science, The Organizing Committee of ISTS, Shizuoka, Japan. pp.419-420.

- Kuranuki, Y.; Sakai, A. 1995. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of tea (*Camellia sinensis*) by vitrification. *CryoLetters* 16:345-352.
- Kuranuki, Y.; Yoshida, S. 1996. Different responses of embryonic axes and cotyledons from tea seeds to desiccation and cryoexposure. *Breeding Science* 46:149-154.
- Lambardi, M.; De Carlo, A. 2003. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. (Jain, S.M.; Ishii, K. eds.). Kluwer Academic Publishers. pp.815-840.
- Leifert, C.; Morris, C.E.; Waites, W.M. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reasons for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13:139-183.
- León, J. 2000. Té, *Camellia sinensis* (*Thea sinensis*). En: *Botánica de los Cultivos Tropicales*. IICA. 3ra. Edición revisada y aumentada. San José, Costa Rica. pp.92-95.
- Liang, Y.; Sun, W.Q. 2002. Rate of dehydration and cumulative desiccation stress interacted to modulate desiccation tolerance of recalcitrant cocoa and ginkgo embryonic tissues. *Plant Physiology* 128:1323-1331.
- Litz, R.E.; Jarret, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (eds.), Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. Pp.143-172.

- Luna, I.; Ochoterena, H. 2004. Phylogenetic relationships of the genera of Theaceae based on morphology. *Cladistics* 20:223-270.
- Luque, R.; Sousa, H.C.; Kraus, J.E. 1996. Métodos de coloração de Roeser (1972) - modificado - e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alcião 8 GS ou 8 GX. *Acta Botanica Brasilica* 10:199-212.
- Malaurie, B.; Trouslot, M.F; Berthaud, J.; Bousalem, M.; Pinel, A.; Dubern, J. 1998. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. *Electronic Journal of Biotechnology* 1:103-117.
- Martínez-Ruiz, R.; Azpiroz-Rivero, H.S.; Rodríguez de la O, J.L.; Cetina-Alcalá, V.M.; Gutiérrez-Espinosa, M.A. 2004. Embriogénesis somática de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden y *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 10:83-92.
- Matsumoto, T.; Takahashi, C.; Sakai, A.; Nako, Y. 1998. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of hybrid statice by three different procedures. *Scientia Horticulturae* 76:105-114.
- Michelangeli de Clavijo, C.C.; Artioli, P.I.; Medina, A.M. 2002. Embriogénesis somática en onoto. *Agronomía Tropical* 52:523-541.
- Mondal, T.K. 2002. Camellia biotechnology: A bibliographic search. *Internacional Journal of Tea Science* 1:28-37.
- Mondal, T.K. 2003. Micropropagation of tea (*Camellia sinensis* L.). In: *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Jain, S.M.; Ishii, K.

- (eds.), Forestry Science. Kluwer Academic Publishers. pp.671-720.
- Mondal, T.K. 2004. Biotechnological improvements of tea. ISB News Report August. pp.5-8.
- Mondal, T.K. 2007. Tea. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol.60. Transgenic Crops V (Pua, E.C.; Davey, M.R. eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp.519-535.
- Mondal, T.K.; Bhattacharya, A.; Ahuja, P.S. 2001a. Induction of synchronous secondary somatic embryogenesis in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Journal of Plant Physiology 158:945-951.
- Mondal, T.K.; Bhattacharya, A.; Sharma, M.; Ahuja, P.S. 2001b. Induction of *in vivo* somatic embryos from tea (*Camellia sinensis*) cotyledons. Current Science 81:297-300.
- Mondal, T.K.; Bhattacharya, A.; Sood, A.; Ahuja, P.S. 2002a. Propagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by shoot proliferation of alginate-encapsulated axillary buds stored at 4°C. Current Science 83:941-944.
- Mondal, T.K.; Bhattacharya, A.; Sood, A.; Ahuja, P.S. 2002b. Factors affecting germination and conversion frequency of somatic embryos of Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). Journal of Plant Physiology 159:1317-1321.
- Mondal, T.K.; Bhattacharya, A.; Laxmikumaran, M.; Ahuja, P.S. 2004. Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76:195-254.
- Mroginski, L.A.; Roca, W.M.; Kartha, K.K. 1991. Crioconservación del germoplasma. En: Cultivo de tejidos en la agricultura.

- Fundamentos y aplicaciones. (Roca, W.; Mroginski, L.A. eds.). CIAT. pp.716-730.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Mutinelli, A. 1964. Plantas estimulantes y aromáticas. En: Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Volúmen II: El cultivo de las plantas útiles. (Parodi, L.R. ed.). Editorial Acme. pp.1125-1129.
- Nakamura, Y. 1991. *In vitro* Propagation Techniques of Tea Plants. *JARQ* 25:185-194.
- Niedz, R.P. 1998. Using Isothiazolone Biocides to Control Microbial and Fungal Contaminants in Plant Tissue Cultures. *HortTechnology* 8:598-601.
- Normah, M.N.; Makeen, A.M. 2008. Cryopreservation of excised embryos and embryonic axes. In: *Plant Cryopreservation – A practical Guide* (Reed, B.M. ed.) 10: 211-240.
- Pammenter, N.W.; Vertucci, C.W.; Berjak, P. 1991. Homeohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability characteristics in *Landolphia kirkii*. *Plant Physiology* 96:1093-1098.
- Pandidurai, V.; Murali, K.S.; Manivel, L.; Rajkumar, R. 1996. Factors affecting *in vitro* shoot multiplication and root regeneration in tea. *Journal of Plant Crops* 24:603-609.
- Panis, B.; Lambardi, M. 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). En: *The Role of Biotechnology for the Characterisation and Conservation of Crop, Forestry,*

- Animal and Fishery Genetic Resources. (Ruane, J.; Sonnino, A. eds.). FAO. pp.43-54.
- Panis, B.; Totté, N.; Van Nimmen, K.; Withers, L.A.; Swennen, R. 1996. Cryopreservation of proliferating meristems of banana (*Musa* spp.). *Plant Science* 121:95-106.
- Panis, B.; Schoofs, H.; Thinh, N.T.; Swennen, R. 1998. Crioconservación de los cultivos de meristemas proliferantes de banana. Book of abstracts of the JIRCAS/IPGRI. Joint International Workshop: Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm, Tsukuba, Japón. pp.238-244.
- Paratasilpin, T. 1990. Comparative studies on somatic embryogenesis in *Camellia sinensis* var. *sinensis* and *C. sinensis* var. *assamica* (Mast.) Pierre. *Journal of the Science Society of Thailand* 16:33-41.
- Parra, P. 2006. Té (*Camellia sinensis* L.). Cadenas alimentarias. *Alimentos Argentinos* Nº 34. pp.18-27.
- Pedroso, M.C.; Pais, M.S. 1993. Direct embryo formation in leaves of *Camellia japonica* L. *Plant Cell Reports* 12:639-643.
- Pereira, A.R.; Pereira de Carvalho, S.; Pasqual, M.; Carvalho Santos, F. 2007. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaiá cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. *Ciência e agrotecnologia* 31:332-336.
- Phukan, M.K.; Mitra, G.C. 1990. Nutrient requirements for growth and multiplication of tea plants *in vitro*. *Bangladesh Journal of Botany* 19:65-71.
- Pinto, J.E.B.P.; Arelló, E.F.; Pinto, C.A.B.P.; Barbosa, M.H.P. 1994. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina

- na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 29: 867-873.
- Pita Villamil, J.M.; Pérez Ruiz, C. 1997. Crioconservación de semillas. En: Agricultura: Revista agropecuaria, Año nº 66, Nº 775, pp.123-125.
- Prakash, O; Sood, A.; Sharma, M.; Ahuja, P.S. 1999. Grafting micropropagated tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) shoots on tea seedlings – a new approach to tea propagation. Plant Cell Reports 18:883-888.
- Prat Kricun, S.D. 1990. Selección clonal en té (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) en la República Argentina. En: Catado de té. Informe técnico: INTA Cerro Azul (Mnes.). Fontana, H.P.; Prat Kricun, S.D.; Belingheri, L.D. 24p.
- Prat Kricun, S.D. 2007. Té negro. Guía de aplicación de buenas prácticas agrícolas y de manufactura. Centro Regional Misiones. Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul. 48p.
- Prat Kricun, S.D.; Píccolo, G. 1983. La plantación de té. Circular N° 22. INTA-EEA Cerro Azul. 15p.
- Rao, N.K. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology 3:136-145.
- Reed, B.M. 1991. Application of gas-permeable bags for *in vitro* cold storage of strawberry germplasm. Plant Cell Reports 10:431-434.
- Reed, B.M. 1992. Cold storage of strawberries *in vitro*: a comparison of three storage systems. Fruit Varieties Journal 46:98-102.
- Rivero-Bautista, N.; Agramonte-Peñalver, D.; Barbón-Rodríguez, R.; Camacho-Chiu, W.; Collado-López, R.; Jiménez-Terry, F.; Pérez-

- Peralta, M.; Gutiérrez-Martínez, O. 2008. Embriogénesis somática en (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad "Lambada". Ra Ximhai 4:135-149.
- Roberts, E.H. 1973. Predicting longevity in storage. Seed Science Technology 1:499-514.
- Roca, W.; Arias, D.I.; Chávez, R. 1991. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. (Roca, W.; Mroginski, L.A. eds.). CIAT, Cali. pp.697-713.
- Sakai, A. 1993. Cryogenic strategies for survival of plant cultured cells and meristems cooled to -196°C. JICA GRP. REF. 6:5-26.
- Sakai, A.; Engelmann, F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. CryoLetters 28:151-172.
- Sakai, A.; Kobayashi, S.; Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cell of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports 9:30-33.
- Sakai, A.; Kobayashi, S.; Oiyama, I. 1991. Cryopreservation of nucellar cell of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by simple freezing method. Plant Science 74:243-248.
- Sandal, I.; Bhattacharya, A.; Ahuja, P.S. 2001. An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 65:75-80.
- Santos, I.R.I. 2001. Criopreservação de germoplasma vegetal. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento Nº 20. pp.60-65.
- Sataka, L.C. 1984. Argentina y el mercado mundial de té. Universidad Nacional de Misiones y Banco de la Provincia de Misiones. 219 p.

- Schäfer, A.; Müller, E.; Mix Wagner, G. 1996. Cryopreservation: an alternative for the long-term storage of old potato varieties. *Potato Research* 39:507-513.
- Scocchi, A.M.; Mroginski, L.A. 2004. *In vitro* conservation of apical meristem-tip of *Melia azedarach* (L.) (Meliaceae) under slow-growth conditions. *Phyton. International Journal of Experimental Botany*. pp.137-143.
- Scocchi, A.; Rey, H. 2004. Conservación de germoplasma *in vitro*. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. (Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L. eds.). INTA. pp.179-185.
- Sebastiampillai, A.R.; Anandappa, T.I. 1979. The influence of moisture and temperatura of the germinability and longevity of tea (*Camellia sinensis* L.) seeds. *Tea Quaterly* 48:8-20.
- Seran, T.H.; Hirimburegama, K.; Gunasekare, M.T.K. 2006a. Direct somatic embryogenesis from explants obtained from *in vitro* germinated embryonic axes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Journal of Horticultural Science & Biotechnnology* 81:883-890.
- Seran, T.H.; Hirimburegama, K.; Gunasekare, M.T.K. 2006b. Somatic Embryogenesis from Embryogenic Leaf Callus of Tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). Eighteenth Annual Congress of the PGIA. pp.37.
- Sharma, V.S. 2012. Tea (*Camellia* sp.) germplasm status in India. *International Journal of Tea Science* 8:3-8.
- Sharma, M.; Sood, A.; Nagar, P.K.; Prakash, O.; Ahuja, P.S. 1999. Direct rooting and hardening of tea microshoots in the field. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58:111-118.

- Shibli, R.A.; Shatnawi, M.A.; Subaih, W.S.; Ajlouni, M.M. 2006. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review. *World Journal of Agricultural Sciences* 2:372-382.
- Silva Pupo, J.J.; Montes Cruz, S.; Acosta Pompa, L.; Arias, E.; García, A. 2005. Embriogénesis somática: una alternativa para la propagación, mejoramiento y conservación de germoplasma en cacao. *Cuadernos de Biodiversidad* 16:9-12.
- Singh, M.; Dhiman, B.; Sharma, C. 2011. Characterization of a highly repetitive DNA sequence in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze genome. *Journal of Biotech Research* 3:78-83.
- Solís-Ramos, L.Y.; Andrade-Torres, A.; Sáenz Carbonell, L.A.; Oropeza Salín, C.M.; Castaño de la Serna, E. 2012. Somatic Embryogenesis in Recalcitrant Plants. In: *Embryogenesis* (Ken-ichi Sato, ed.). InTech. pp.597-618.
- Suganthi, M.; Arvinth, S.; Raj Kumar, R. 2012. Impact of Osmotica and Absciscic Acid on Direct Somatic Embryogenesis in Tea. *International Journal of Plant Research* 2:22-27.
- Tahardi, J.S.; Shu, W. 1992. Commercialization of clonal micropropagation of superior tea genotypes using tissue culture technology. USAID/CDR Network Meeting on Tea Crop Biotech. Costa Rica.
- Tahardi, J.S.; Riyadi, I.; Dodd, W.A. 2003. Enhancement of somatic embryo development and plantlet recovery in *Camellia sinensis* by temporary liquid immersion. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 8:1-7.
- Toro Mujica, B. 2003. Protocolo de micropropagación para el cv. Carménère (*Vitis vinífera* L.) con la finalidad de su utilización en

- un programa de certificación de plantas libres de virus. Tesis, Magíster en Ciencias Vegetales. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 40p.
- Turner, S.R.; Senaratna, T.; Bunn, E.; Tan, B.; Dixon, K.W.; Touchell, D.H. 2001. Cryopreservation of shoot tips from six endangered australian species using a modified vitrification protocol. *Annals of Botany* 87:371-378.
- Uragami, A. 1993. Cryopreservation of cultured cells and organs of vegetables. *JICA. GRP. REF.* 6:111-135.
- van Staden, J.; Zazimalova, E.; George, E.F. 2008. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In: *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* (George, E.F.; Hall, M.A.; De Klerk, G.J. eds.). Springer. pp.205-226.
- Vieitez, A.M.; Barciela, J. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryonic tissues of *Camellia japonica* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21:267-274.
- Wachira, F.; Ogada, J. 1995. *In vitro* regeneration of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze by somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 14:463-466.
- Wang, Q.; Laamanen, J.; Uosukainen, M.; Valkonen, J.P.T. 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Reports* 24:280-288.
- Wesley-Smith, J.; Vertucci, C.W.; Berjak, P.; Pammenter, N.W.; Crane, J. 1992. Cryopreservation of desiccation-sensitive axes of *Camellia sinensis* in relation to dehydration, freezing rate and the thermal

- properties of tissue water. *Journal of Plant Physiology* 140:596-604.
- Westcott, R.J. 1981. Tissue culture storage of potato germplasm. 1. Minimal growth storage. *Potato Research* 24:331-342.
- Wiseman, S.A.; Balentine, D.A.; Frei, B. 1997. Antioxidants in tea. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37:705-718.
- Withers, L.A. 1987. *In vitro* methods for germplasm collecting in the field. *FAO/IBPGR Plant Genetic Research Newsletter* 69:2-6.
- Withers, L.A. 1991. In-vitro conservation. *Biological Journal of the Linnean Society* 43:31-42.
- Withers, L.A.; Engelmann, F. 1998. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: *Biotechnology in Agriculture*. (Altman, A. ed.). Marcel Dekker, Inc. 4:57-88.
- Wongtiem, P.; Courtois, D.; Florin, B.; Juchaux, M.; Peltier, D.; Broun, P.; Ducos, J.P. 2011. Effects of cytokinins on secondary somatic embryogenesis of selected clone Rayong 9 of *Manihot esculenta* Crantz for ethanol production. *African Journal of Biotechnology* 10:1600-1608.
- Zanino, L. 1993. La actividad tealera en la Provincia de Misiones. Consejo Federal de Inversiones. Buenos Aires. 179p.
- Zaniolo, S.R.; Zanette, F. 1999. Obtenção de brotações múltiplas de erva-mate através de micropropagação. *Agrárias Curitiba* 18:17-22.