

## Macro y micropropagación de peperina de las lomas (*Hedeoma multiflorum* Benth)

Peralta, P.<sup>1</sup>; Guariniello, J.<sup>1</sup>; Bach, H.<sup>2</sup>; Escandón, A.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), Instituto de Genética “Ewald A. Favret”.

Correo electrónico: peralta.patricia@inta.gov.ar <sup>2</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRN), Instituto de Investigación de Recursos Biológicos.

### Introducción

La extracción intensiva de plantas aromático-medicinales (PAMs) de sus ambientes naturales coloca a muchas especies en una situación de gran vulnerabilidad ecológica. Este es el caso de la “peperina de las lomas” (*Hedeoma multiflorum* Benth. (Lamiaceae) (Elechosa, 2009). Esta especie, además de sufrir sobre-explotación, debe hacer frente al deterioro poblacional y ambiental provocado por otras acciones antrópicas, como la expansión de la frontera agrícola-ganadera, el avance de la urbanización, el desarrollo de emprendimientos turísticos, etc. En este contexto es importante resaltar que esta especie no solo es colectada en forma no sustentable, sino que también, por sus características morfológicas como planta de pequeño porte y de tallos múltiples, es levantada indiscriminadamente durante la recolección de otras aromáticas. Por todo lo expuesto anteriormente, se consideró relevante ajustar su propagación en función de disponer de materiales para generar una colección que sirva tanto para una reintroducción como para comenzar un proceso de domesticación.

“Peperina de las lomas” es una especie nativa de Argentina, Uruguay y Brasil. En nuestro país fue reportada en Buenos Aires, Mendoza, Catamarca, Entre Ríos (Fester, 1961), Córdoba, La Pampa, Río Negro, Santiago del Estero y San Luis (Irving, 1980). También se la ha descrito en tres áreas protegidas: Parque Nacional Quebrada del Condorito, (Córdoba); Parque Nacional Lihue Calel (La Pampa) y en El Palmar, (Entre Ríos). ([https://www.sib.gov.ar/ficha/PLANTAE\\*Hedeoma\\*multiflora](https://www.sib.gov.ar/ficha/PLANTAE*Hedeoma*multiflora)). La planta es xerófita, perenne y muy aromática. Habita en lomas secas, pedregosas y en ambientes serranos hasta los 1000 m s. n. m. (Elechosa, 2009) formando matas pequeñas de 10 cm de altura aproximadamente. Posee hojas de entre 5 a 6 mm de largo y flores numerosas dispuestas en las axilas con pedicelos de 2 a 4 mm, generalmente de color azulado. Los tallos y hojas tienen pelos glandulares que producen el aceite esencial que caracteriza a la especie (Irving, 1980).

Los principales usos de esta especie son para la elaboración de yerba mate compuesta, de amargos y aperitivos, también las herboristerías y los laboratorios de productos medicinales naturales. En la medicina popular se la utiliza en forma de infusión para afecciones estomacales como la gastritis. Además, el alto contenido de fenoles y flavonoides de sus hojas le confiere a la infusión actividad antioxidante por lo que es utilizada para tratar úlceras y hemorroides. También es utilizada en aroma y fitoterapia. Es importante destacar que, a pesar de sus variadas aplicaciones medicinales, *H. multiflorum* no se encuentra registrada en la Farmacopea Argentina ([http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/fna\\_pdfs.asp](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/fna_pdfs.asp)).

Según indica la bibliografía consultada se han logrado progresos en la etapa *in vitro* de la propagación de *H. multiflorum* (Peralta *et al.*, 2017; Diaz Gabutti *et al.*, 2016; Brunetti *et al.*, 2007 y Koroch *et al.*, 1997), sin embargo todavía es necesario ajustar las fases finales de aclimatación y transferencia a campo.

En este reporte se muestran los avances realizados en las etapas de micropropagación y de aclimatación de *H. multiflorum* y su transferencia y comportamiento a campo como un primer paso para su domesticación.

## Objetivo general

El objetivo del trabajo realizado fue ajustar la multiplicación *in vivo* e *in vitro* de *Hedeoma multiflorum* para su transferencia a campo, domesticación y el posterior desarrollo de germoplasma mediante la complementación con otras biotécnicas.

## Objetivos específicos

- Ajuste de un protocolo de propagación *in vivo*.
- Ajuste de los diferentes pasos que hacen a un protocolo de rutina para la micropropagación de *H. multiflorum*, esto es:
- Introducción y establecimiento del cultivo bajo condiciones *in vitro*.
- Multiplicación.
- Enraizamiento y aclimatación.

## Materiales y métodos

### Propagación de estacas *in vivo*

Con la finalidad de obtener material para los ensayos de cultivo *in vitro* se conformó un stock de plantas madres mediante la multiplicación agámica. Para ello, a partir de un individuo (denominado como "hm5") en ciclo vegetativo, se cosecharon tallos subapicales y cortaron esquejes binodales de aproximadamente 2,5 cm de largo. El enraizamiento fue inducido aplicando en forma basal ácido indol-3-butírico (IBA) 3000 ppm en polvo. Se distribuyeron 5 esquejes por maceta de 10 cm de diámetro (20 esquejes en total) con sustrato comercial de enraizamiento Tabaco de Grow Mix® humedecido. Luego las macetas se cubrieron con bolsas de nylon transparentes a manera de cámara húmeda y los esquejes se cultivaron bajo condiciones de invernáculo estándar. Con el objeto de disminuir la humedad en forma paulatina, cada 48 horas se realizaron perforaciones en las bolsas hasta no observar condensación en su interior. Transcurridos 15 días los esquejes enraizados fueron transferidos a macetas individuales que contenían sustrato específico de trasplante Grow Mix® y cultivados en las mismas condiciones de invernáculo estándar.

### Micropropagación *in vitro*

#### Desinfección

Los clones utilizados como plantas madres fueron mantenidos bajo condiciones de invernáculo y pretratados con una solución antifúngica de Carbendazim 0,5 g/l (Mamboretá®) en forma semanal.

Para la introducción *in vitro*, segmentos binodales fueron cosechados y desinfectados en forma superficial mediante inmersión y agitación suave en una solución de hipoclorito de sodio (1,2 %) por 15 minutos. Luego, bajo condiciones de flujo laminar, los explantos fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril. Se realizaron dos repeticiones con un n=20 c/u.

### Introducción y establecimiento

Para la introducción *in vitro* de los explantos se ensayaron dos diluciones de medio de cultivo semisólido, para evaluar la supervivencia y longitud de los brotes. El medio basal Murashige y Skoog (1962) completo (MS 1X) y el mismo medio con sus macro- y micronutrientes diluidos a la mitad (MS 0,5X). Ambos suple-

mentados con 20 g/l de sacarosa y 7 g/l de agar. El pH se ajustó a 5,8 con KOH. Se introdujeron 20 segmentos binodales en tubos de 110x25 mm, con 10 ml de medio. Los explantos provenientes de clones de "hm5" se cultivaron a  $25 \pm 2$  °C de temperatura y 16 h de fotoperíodo, durante 45 días (repiques cada 15 días). Se realizaron dos repeticiones para cada tratamiento.

## **Multiplicación**

Segmentos binodales obtenidos de plantas previamente introducidas en MS 1X fueron subcultivados al mismo medio base, pero suplementado con diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP): 0,0; 2,2; 4,4; 8,8; 17,7 y 22,2  $\mu$ M. Se cultivaron 10 explantos por tratamiento con dos repeticiones siguiendo un diseño experimental completamente aleatorizado.

## **Enraizamiento**

Con el objetivo de estudiar el efecto de la suplementación con ácido indol-3-butírico (IBA) sobre el enraizamiento *in vitro* de *H. multiflorum*, veinte brotes de 1,5 cm de longitud, provenientes de cada uno de los diferentes tratamientos con BAP, fueron transferidos a un medio MS (1X) con y sin el agregado de 2,4  $\mu$ M IBA, bajo las mismas condiciones de cultivo mencionadas previamente.

## **Aclimatación**

Los explantos enraizados se retiraron de los tubos y las raíces se lavaron con abundante agua para descartar restos de agar adherido. Luego se sumergieron en una solución con fungicida durante 10 segundos y se dejaron escurrir sobre papel absorbente. Posteriormente, las plántulas fueron transferidas a un sustrato mezcla de Grow Mix®: perlita (1:1) en multimacetas cubiertas con nylon transparente bajo condiciones de invernáculo estándar.

## **Transferencia a campo**

El 15/11/2017 se llevaron a campo 48 plantas *ex vitro* de 90 días, provenientes de los tratamientos con y sin IBA (24 plantas por tratamiento), a una parcela en el campo experimental del Instituto de Recursos Biológicos (CIRN, CNIA, INTA) (34° 37' 24.105" S, 58° 40' 10.364" W, 31 m s. n. m.). La implantación se realizó a una distancia de 25 cm entre plantas dentro del surco (8 plantas) y 50 cm entre surco, intercalando los tratamientos (surcos). Se aplicó riego manual cada 48 h o según requerimientos y se procedió con el desmalezado también en forma manual.

## **Análisis de resultados**

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente por ANOVA y comparación de medias a través del test de Tukey al 5 % de significancia.

## **Resultados y discusión**

En la multiplicación de estacas *in vivo* de "hm5" se obtuvo un 80 % de eficiencia en el enraizamiento de los esquejes y un 70 % de supervivencia a 30 días de iniciado el proceso. Este material sirvió como fuente de explantos para los posteriores ensayos de micropropagación.

El protocolo de desinfección de los segmentos binodales resultó ser adecuado y no se observó contaminación endógena. El 100 % de los explantos sobrevivió al procedimiento y pudo establecerse bajo condiciones *in vitro*.

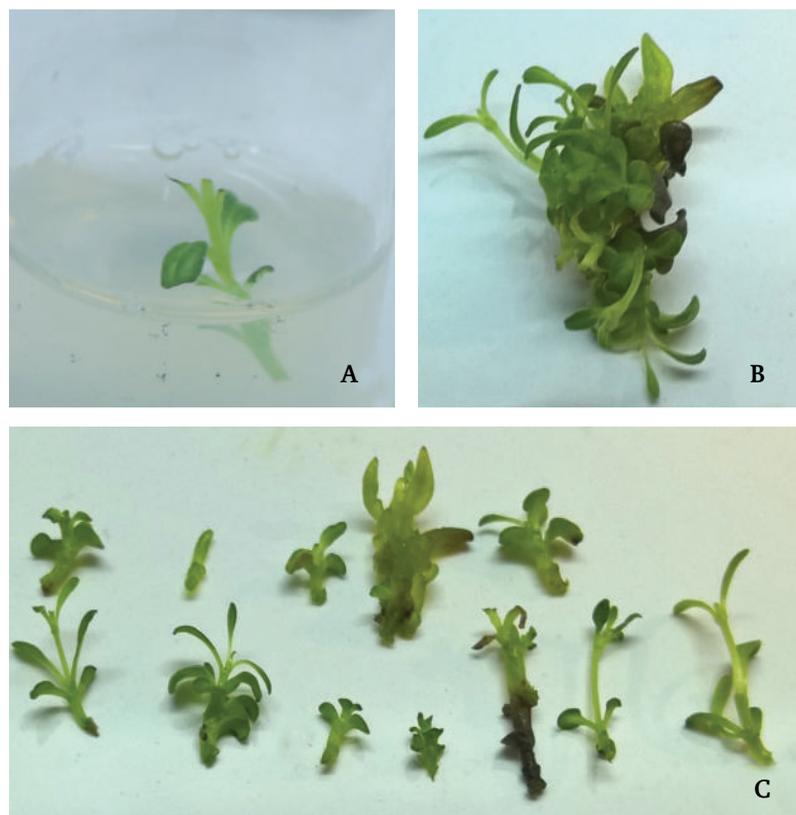
En la introducción *in vitro* de *H. multiflorum* no se observaron diferencias significativas en la longitud de los brotes entre los medios probados. Sin embargo, los brotes desarrollados en MS completo presentaron un mejor aspecto que los cultivados en MS 0,5X. Por lo tanto, se optó este medio (MS 1X) para continuar con los ensayos.

Los tratamientos con BAP en todas las concentraciones produjeron multibrotaciones a partir de callos de color verde y aspecto nodular. En la Tabla 1 se reportan las tasas de multiplicación (brotes/explanto) en las diferentes concentraciones de BAP probadas luego de 45 días de cultivo. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos excepto con respecto al control, por lo que se tomó el tratamiento de menor concentración de citocinina (2,2  $\mu\text{M}$ ) para continuar con los ensayos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Número de brotes/explanto obtenido en las diferentes concentraciones de BAP aplicadas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ). En negrita se resalta el tratamiento seleccionado para la multiplicación *in vitro*.

BAP ( $\mu\text{M}$ )	Tasa de multiplicación (N.º de brotes/explanto)
0	2,25 $\pm$ (0,14) a
<b>2,2</b>	<b>7,05 <math>\pm</math> (1,14) b</b>
4,4	6,45 $\pm$ (1,06) b
8,8	7,80 $\pm$ (1,48) b
17,7	8,60 $\pm$ (0,95) b
22,2	8,20 $\pm$ (1,17) b

En la Figura 1 se observa la evolución del cultivo *in vitro* de *H. multiflorum* suplementado con 2,2  $\mu\text{M}$  BAP. Figura 1A, explanto inicial; en la Figura 1B se destaca un conjunto de brotes originados *de novo* a partir de una misma porción de callo; y en la Figura 1C se observan los brotes originados a partir del explanto; este ejemplo representa el promedio de la tasa de multiplicación obtenida (entre 6 a 9 brotes/explanto).



**Figura 1.** Secuencia de cultivo de tejido: A) explanto inicial binodal. B) Callo con multibrotación a los 45 días de cultivo en MS suplementado con 2,2  $\mu\text{M}$  BAP. C) Brotes aislados luego de 60 días de iniciado el cultivo.

La eficiencia de enraizamiento fue del 100 % en ambos tratamientos probados. La Tabla 2 compara los promedios de las longitudes y del número de raíces desarrolladas en cada brote, según los tratamientos con y sin IBA, en los diferentes tratamientos con BAP.

Con relación a la longitud, la Tabla 2 muestra claramente que sobre el medio base probado (MS 1X) la concentración de IBA ensayada no favoreció al desarrollo de las raíces adventicias inducidas. En efecto, son notorias las diferencias que se observan en la longitud de las raíces con y sin el agregado de IBA, independientemente del tratamiento de BAP de origen. Asimismo, se observa, como tendencia, un efecto similar (acortamiento de la longitud de las raíces) a medida que se incrementa la concentración de BAP del ensayo de origen de los brotes, lo que podría atribuirse a efectos residuales de la citocinina en el brote.

Con respecto a la cantidad de raíces por brote, en la Tabla 2 se observa que se desarrolló una mayor cantidad en los individuos no pretratados con BAP.

**Tabla 2.** Número y longitud promedio de las raíces adventicias desarrolladas en brotes provenientes de los tratamientos con BAP transferidos al mismo medio base (MS 1X) con y sin suplementación de 2,4  $\mu$ M IBA. En negrita se indican las mejores respuestas. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según Tukey ( $p > 0,05$ ).  $n=50$ .

BAP ( $\mu$ M)	Longitud de la raíz (mm)		Número de la raíces	
	Sin IBA	Con IBA	Sin IBA	Con IBA
<b>0</b>	63,20 $\pm$ (2,83) a	17,63 $\pm$ (2,52) ab	7,00 $\pm$ (0,54) a	10,00 $\pm$ (0,94) a
<b>2,2</b>	62,30 $\pm$ (3,38) a	18,44 $\pm$ (3,44) ab	6,78 $\pm$ (0,36) a	6,33 $\pm$ (0,75) bc
<b>4,4</b>	52,86 $\pm$ (7,76) ab	28,10 $\pm$ (3,37) b	6,90 $\pm$ (0,82) a	8,40 $\pm$ (0,45) b
<b>8,8</b>	49,63 $\pm$ (8,21) ab	9,15 $\pm$ (2,21) a	4,50 $\pm$ (0,73) a	4,20 $\pm$ (0,65) c
<b>17,7</b>	29,76 $\pm$ (5,17) b	19,87 $\pm$ (3,70) ab	6,70 $\pm$ (0,96) a	5,00 $\pm$ (0,63) c
<b>22,2</b>	32,62 $\pm$ (5,98) b	9,58 $\pm$ (1,55) ab	5,40 $\pm$ (0,48) a	5,30 $\pm$ (0,54) c

En la Figura 2 se observan las diferencias morfológicas de las raíces inducidas en brotes de *H. multiflorum* cultivados en un medio con o sin el agregado de 2,4  $\mu$ M de IBA, previo a la aclimatación. Las raíces provenientes del tratamiento sin IBA son significativamente más largas, de menor diámetro y de una tonalidad más clara respecto de las raíces desarrolladas en los tratamientos conteniendo la auxina. En el efecto del IBA sobre la longitud de las raíces, estos resultados coinciden con los reportados para *Ugni molinae* por Rodríguez Beraud *et al.* (2015) y para *Nothofagus glauca* por Uribe *et al.* (2012).



**Figura 2.** Longitud y número de raíces inducidas en tratamientos con y sin 2,4  $\mu$ M IBA.

En la Figura 3 se observan plántulas aclimatadas bajo condiciones de invernáculo. La mezcla de Grow Mix®:perlita (1:1) ensayada previamente (datos no mostrados) resultó adecuada como sustrato de enraizamiento para esta especie. El 100 % de las plántulas se aclimataron satisfactoriamente. Este resultado confirma la funcionalidad de las raíces adventicias desarrolladas, tanto en presencia como en ausencia de IBA.



Figura 3. Plantines de 60 días aclimatados bajo condiciones de invernáculo.



Figura 4. Plantas *ex vitro* en la parcela experimental (IRB). A. Vista general de la parcela. B. Vista ampliada de un surco. C. Planta en período vegetativo a 30 días de la implantación. D. Planta en período de floración a 60 días de la implantación.

Todas las plantas se adaptaron al ambiente y registraron un aumento del diámetro de la mata durante el período vegetativo. Por el contrario, la altura de la mata disminuyó en el tiempo ya que los tallos presentaron un hábito de crecimiento decumbente. Al momento de la cosecha las plantas presentaban una altura entre 17 y 18 cm. No se observaron diferencias en el crecimiento entre los tratamientos. A 2 meses de la implantación (plantas de 5 meses) todos los individuos entraron en floración en forma uniforme y luego semillaron.

En abril de 2018 se cosechó un total de 2 g de semillas ( $P1000 = 0,23 \pm 0,01$  g). Al momento de escribir el presente reporte se estaban realizando los análisis de poder germinativo (PG).

## Conclusiones

- Se completaron satisfactoriamente tanto el ciclo de propagación *in vivo* (por multiplicación agámica) como *in vitro* (introducción, establecimiento, multibrotación, aclimatación) de *H. multiflorum*.
- La organogénesis observada fue de naturaleza indirecta, a través de un callo, por lo que el protocolo de propagación aplicado podría llegar a ser fuente de variabilidad.
- Se debería incrementar la tasa de multiplicación.
- Se logró la implantación a campo de las plantas *ex vitro*.
- A pesar de las diferencias observadas *in vitro*, la concentración de IBA evaluada no modificó el crecimiento de las plantas a campo.
- Se dio un paso relevante en el ajuste de un protocolo para la preservación, eventual domesticación y mejoramiento de esta especie.

## Perspectivas

A partir del trabajo realizado se abre un interesante panorama para la domesticación, el cultivo y para desarrollo del germoplasma de *H. multiflorum*, tanto desde la mejora clásica como con la aplicación de herramientas biotecnológicas.

Se espera concluir las mediciones a campo, completar su estudio en relación con el suelo en que se encuentra la planta, y determinar el mejor momento de cosecha, en función de la composición de aceites esenciales requeridos.

Sería interesante en un futuro, identificar y seleccionar plantas útiles para la industria de sabores, perfumería y con gran potencial en la industria farmacéutica. En este contexto, es importante destacar que debido a su contenido de compuestos fenólicos, *H. multiflorum* es una importante fuente de productos antioxidantes.

## Bibliografía

- ALONSO, S.; GUMA, I.; NUCIARI, M.; VAN OLPHEN, A. 2009. Flora de un área de la Sierra La Barrosa (Balcarce) y fenología de especies con potencial ornamental. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, XLI (2), 23-44.
- BRUNETTI, P.C.; ORTIZ, L.; PALACIO, L.; LLORET, C.; GOLENIOWSKI, M. 2007. Micropropagación de "Tomillo de las Sierras" *Hedeoma multiflorum* Benth. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas*, 6 (6), 391-392.
- DÍAZ GABUTTI, M.S.; LEPORATI, J.; TERENCE ROMERO, C.; PONCE ARIAS, A.; VERDES, P. 2016. Establecimiento *In vitro* de *Hedeoma multiflorum* Benth. *Dominguezia*, 32(2), 61.
- ELECHOSA, M.A. 2009. Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de la Argentina. Proyecto Específico PNHFA4164. Ediciones INTA. Buenos Aires.
- FESTER, G.A.; MARTINUZZI, E.A.; RETAMAR, J.A.; RICCIARDI, A.I. 1961. Aceites esenciales de la República Argentina. Academia Nacional de Ciencias, Córdoba.
- IRVING, R. 1980. The systematics of hedeoma (LABIATAE). *SIDA, Contributions to Botany*, 8(3), 218-295.
- KOROCH, A.R.; JULIANI, H.R.Jr.; JULIANI, H.R.; TRIPPI, V.S. 1997. Micropropagation and acclimatization of *Hedeoma multiflorum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48, 213-217.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- PERALTA, P.; GUARINIELLO, J.; AGUIRRE, G.M.; IANNICELLI, J.; ESCANDÓN, A.S. 2017. Propagación *in vitro* de peperina de las lomas (*Hedeoma multiflorum* Benth). Una nativa en riesgo de extinción. (Disponible: <http://www.redbioargentina.org.ar/simposio-2017-bahia-blanca/> verificado: diciembre de 2018).
- RODRÍGUEZ BERAUD, M.; CARRILLO LÓPEZ, R.; CHACÓN FUENTES, M.; HORMAZÁBAL VÁSQUEZ, N.; TAMPE PÉREZ, J.; TIGHE NEIRA, R. 2015. Enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de microtallos de *Ugni molinae* Turcz., una especie nativa de Chile. *Gayana Bot.* 72(1): 14-20.
- URIBE, M.; ULLOA, J.; DELAVEAU, C.; SÁEZ, K.; MUÑOZ, F.; CARTES, P. 2012. Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana Bot.* 69(1): 105-112.