

El cultivo de tejidos vegetales y su empleo en plantas y cultivares ornamentales INTA

Ing. Agr. Dra. Leticia Tombion
Instituto de Floricultura
INTA CIRN-CNIA



Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

El cultivo de tejidos vegetales y su empleo en plantas y cultivares ornamentales

INTA

Ing. Agr. Dra. Leticia Tombion
Instituto de Floricultura
INTA CIRN-CNIA



2023

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a la Ing. Agr. Dra. María Silvina Soto del Instituto de Floricultura del INTA por haber pensado este libro y por haberme alentado a llevarlo a cabo.

ÍNDICE

Prólogo	5
Capítulo I. Generalidades sobre el cultivo de tejidos vegetales	6
Conceptos principales	7
Componentes condicionantes del cultivo de tejidos	8
1) Condiciones ambientales controladas	8
2) Medios de cultivo	8
3) Instalaciones mínimas	11
Principales aplicaciones del cultivo de tejidos	14
1) Micropropagación	14
2) Saneamiento de plantas	16
3) Conservación e intercambio de germoplasma	18
4) Transformación genética de plantas	19
5) Rescate de embriones	20
6) Cultivo de óvulos, anteras, granos de polen y protoplastos	20
7) Producción de metabolitos secundarios	21
Bibliografía consultada	22
Capítulo II. Aplicaciones del cultivo de tejidos en plantas ornamentales.	
Un enfoque desde la experiencia del Instituto de Floricultura (INTA)	25
Una breve introducción	26
Micropropagación y cultivo de meristemas	27
• Circuito de trazabilidad de plantas madre del Instituto de Floricultura	27
• Otros trabajos realizados	31
Conservación de germoplasma	33
Transformación genética	34
Cultivo in vitro de semillas	36
Rescate de embriones, cultivo de óvulos y de discos de ovarios	37
Obtención de poliploides	39
Trabajos actualmente en desarrollo	40
Visión a futuro	41
Bibliografía consultada	42

PRÓLOGO

El objeto educativo de este texto se basa en conocer los principales conceptos y elementos condicionantes y las principales aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales, además de demostrar las experiencias de trabajo realizadas por el equipo de investigación del Instituto de Floricultura (INTA) durante los últimos años.

Fue necesario llevar a cabo una vasta revisión bibliográfica que ofreciera un enfoque íntegro y actualizado de la temática al momento de confeccionar este escrito. Por ello, se espera que resulte de utilidad como texto de apoyo en el área de las Ciencias Biológicas, Naturales y Agronómicas, y que constituya un documento de consulta para profesionales, estudiantes y productores interesados en estas técnicas.

A hand wearing a white latex glove is holding two glass test tubes. The test tubes are tilted and contain small, green, leafy plant tissue cultures. The background is a solid teal color. The text is overlaid on the left side of the image.

CAPÍTULO I

Generalidades sobre el cultivo
de tejidos vegetales

CONCEPTOS PRINCIPALES

El **cultivo de tejidos in vitro** es un conjunto de procedimientos biotecnológicos que permite la producción de plantas en condiciones asépticas sobre medios nutritivos artificiales apropiados y en un ambiente controlado. “**In vitro**” proviene del latín y significa “en vidrio”, lo cual se refiere a que esta técnica se lleva a cabo principalmente en recipientes de este material, tales como frascos o tubos de ensayo.

Esta metodología se puede emplear tanto en el área de la investigación como en la producción comercial. Entre sus aplicaciones de mayor importancia se destacan la propagación vegetativa o micropropagación, la obtención de plantas libres de enfermedades sistémicas, la conservación e intercambio de germoplasma, el mejoramiento genético, el rescate de embriones, la producción de metabolitos secundarios, la germinación de semillas y el cultivo de granos de polen, óvulos y protoplastos.

El fundamento del cultivo de tejidos vegetales se basa en la teoría de la **totipotencialidad** celular, la cual indica que se puede obtener una planta entera a partir de cualquier célula viva bajo condiciones controladas de cultivo. Para ello es indispensable lograr la **desdiferenciación** de la célula inicial (es decir, la transformación y pérdida de las características de especialización de una célula para dar lugar a células de tipo meristemático) y, posteriormente, la **rediferenciación** de esta célula de partida (proceso por el cual la célula cambia su morfología a una de mayor especialización). En resumen, una célula de una hoja, una raíz, un tallo o una flor puede desdiferenciarse para luego rediferenciar yemas y, finalmente, originar una planta completa en un espacio reducido y bajo condiciones ambientales controladas.

La porción de material vegetal con la que se inicia el cultivo in vitro se llama **explanto** o **explante** y es, entonces, un fragmento de una planta madre del cual se obtiene una descendencia uniforme con plantas genéticamente idénticas (clones). Estas porciones vegetativas pueden ser:

- tejidos organizados: órganos o parte de ellos (fragmentos de raíces, de hojas, de tallos, embriones, semillas, anteras, óvulos, meristemas, yemas);
- tejidos indiferenciados: callos, protoplastos y suspensiones celulares.

El empleo de cada uno de estos dependerá de los objetivos de la investigación o de la producción que se desee realizar.

COMPONENTES CONDICIONANTES DEL CULTIVO DE TEJIDOS

1. CONDICIONES AMBIENTALES CONTROLADAS

Las plantas cultivadas in vitro requieren ser incubadas en un ambiente que posea sus factores físicos tales como temperatura, luz y humedad controlados. Esto se obtiene a partir de cuartos climatizados que posean una adecuada y uniforme circulación del aire. Mantener estos factores regulados es un aspecto clave para el desarrollo exitoso del cultivo in vitro.

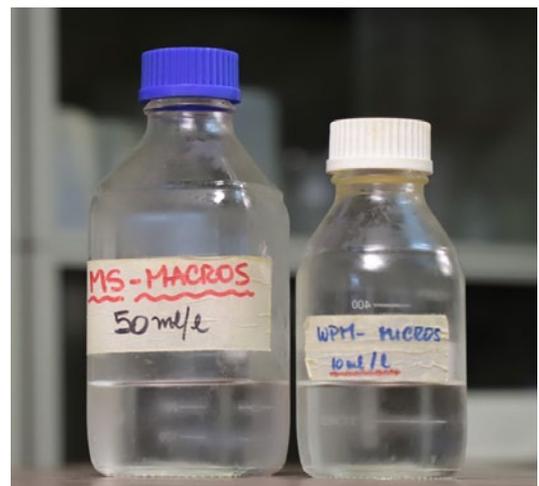
- **Temperatura:** este parámetro varía según el requerimiento de cada especie o cultivar. Por ejemplo, el cultivo de tejidos provenientes de plantas tropicales tendrá mejores resultados en una incubación a mayores temperaturas, a diferencia de aquellos que provengan de plantas de climas templados, que responderán favorablemente a temperaturas más bajas. En líneas generales, se suelen emplear rangos de temperaturas entre 24 y 28°C. Por otro lado, también se ha visto que la alternancia de temperaturas puede lograr efectos propicios para el desarrollo de las plantas en determinadas especies.
- **Luz:** si bien los requerimientos de luz de las plantas cultivadas in vitro son menores que los de las plantas in vivo, tanto la calidad como la intensidad y la duración del período luminoso son factores determinantes, ya que intervienen en la regulación del crecimiento, el desarrollo, la diferenciación y el metabolismo de las plantas. El establecimiento de estos tres factores dependerá también de los requerimientos de cada especie y cultivar, sin embargo, se suelen utilizar ciclos de luz/oscuridad de 16/8 horas y lámparas que proporcionen entre 1000 y 4000 lux de iluminación.
- **Humedad:** este parámetro, medido en términos de humedad relativa -HR-(cantidad de vapor de agua contenida en la atmósfera gaseosa), dependerá de la cobertura del recipiente empleado: si es hermético, la HR interior será del 100 %, mientras que, si existe un intercambio gaseoso con el ambiente, puede llegar a un 50 %, lo cual puede provocar la disminución del contenido de agua del medio de cultivo y la consecuente variación de la concentración de sus componentes. Por ello, es adecuado que la humedad del ambiente sea elevada (80-90 %) a modo de evitar la existencia de un gradiente de presión de vapor que culmine en la deshidratación de los tejidos.

2. MEDIOS DE CULTIVO

El medio de cultivo es definido como el sustrato capaz de aportar las sustancias esenciales requeridas para el crecimiento y el desarrollo del vegetal cultivado en condiciones in vitro. El control de su elaboración, conservación y uso asegura exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos.

En líneas generales, los medios de cultivo deben estar conformados por distintos componentes, los cuales se detallan a continuación.

- **Constituyentes inorgánicos:** estos se agrupan en macronutrientes (N, P, K, S, Ca y Mg), que son aquellos que la planta necesita en grandes cantidades; y micronutrientes (Fe, Mo, B, Zn, Cu, Co y Mn), los cuales son los elementos que los vegetales requieren en menores cantidades. Un exceso de la suplementación de estos minerales puede causar fitotoxicidad, por lo que se debe tener precaución durante la preparación del medio.
- **Constituyentes orgánicos:** dentro de estos componentes se destacan:
 - Carbohidratos: proporcionan la fuente de energía metabólica y los esqueletos carbonados necesarios para la biosíntesis de aminoácidos, proteínas y polisacáridos estructurales. Además, ayudan a mantener reducido el potencial osmótico del medio. La sacarosa es el hidrato de carbono más utilizado para la elaboración de los medios, pero también se suele emplear fructosa y glucosa, en menor medida.
 - Vitaminas: estos componentes intervienen en las reacciones enzimáticas y metabólicas de las plantas. Se ha visto que la vitamina más importante es la timina, ya que es esencial para estimular los procesos de crecimiento. También se puede emplear ácido nicotínico, piridoxina, ácido pantoténico, ácido fólico, riboflavina, ácido ascórbico y biotina, entre otros.
 - Aminoácidos: el de mayor uso es la glicina, aunque también se puede agregar metionina o arginina, en menor frecuencia.
 - Reguladores de crecimiento: estos son moléculas orgánicas que tienen una acción rápida sobre los vegetales para modular sus procesos de desarrollo y crecimiento. Se emplean a bajas concen-



→ Frascos de vidrio con macro (izquierda) y micronutrientes (derecha)

traciones (10^{-6} M; 10^{-8} M) y las respuestas que generan dependen de la especie, del órgano vegetal, de su estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de la interacción con otros reguladores de crecimiento y de las condiciones del ambiente. Los reguladores de uso más frecuente en el cultivo de tejidos son:

- ✓ Auxinas: aquellas que intervienen en la división celular, la elongación y la diferenciación radical. Las de mayor uso son el ácido indol-3-acético (AIA), el ácido indol-3-butírico (AIB), el ácido 1-naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).
- ✓ Citoquininas: estos son derivados de la adenina que promueven la división celular, además del rompimiento de la dominancia apical, el retraso de la senescencia foliar y la promoción de la maduración de los cloroplastos. En interacción con las auxinas, regulan la diferenciación in vitro. La relación elevada de citoquininas/auxinas produce tallos, mientras que una baja relación origina raíces. Las citoquininas más comunes son 6-bencil adenina (BAP), isopentil-adenina (IPA o 2i-p), kinetina (KIN) y zeatina.
- ✓ Giberelinas: son aquellas que participan en el crecimiento, la elongación y la floración de las plantas, además de intervenir en la ruptura de la dormición de las semillas. La giberelina utilizada usualmente en cultivos vegetales es el ácido giberélico (GA_3).

- **Agua:** es el componente básico de los medios de cultivo y debe ser destilada y desionizada o bidesionada, a modo de evitar variaciones en los resultados originados por los iones presentes en el agua corriente o de pozo.

- **Agentes solidificantes:** en los medios de cultivo sólidos o semisólidos se deben utilizar componentes que otorguen cierta consistencia. El más empleado es el agar, el cual es un polisacárido extraído de las algas marinas. Por su parte, los medios líquidos requieren algún soporte o sistema de agitación para asegurar la oxigenación del explanto.

- **Componentes indefinidos:** son mezclas de sustancias orgánicas o inorgánicas que se emplean en casos especiales, como por ejemplo cuando los requerimientos nutricionales son complejos o bien cuando se necesita alcanzar un rápido crecimiento. Agua de coco, carbón activado, caseína hidrolizada, extracto de levadura, amoníaco y sales de amonio son los que se utilizan con mayor frecuencia y se agregan a la preparación del medio de cultivo en cantidades que dependerán del objetivo de trabajo y de la especie vegetal.



→ Frasco de vidrio con sustancia solidificante (agar)

CONSIDERACIONES IMPORTANTES



Una vez mezclados los componentes es necesario ajustar el pH de la solución con la finalidad de lograr una adecuada gelificación del medio (en caso de medios semi-sólidos) y la correcta solubilidad de las sales minerales. Generalmente, el pH debe encontrarse entre 5,8 y 6,2, y este ajuste se puede realizar con KOH (para alcalinizar) o HCl (para acidificar) 0,1 N a 1 N.



Cuando los medios de cultivo se encuentran listos, es necesario realizar su esterilización mediante el uso de un autoclave a 121°C y 1 atm de presión. El tiempo de exposición dependerá del volumen de la preparación: 0-50 cm³/17 minutos; 50-250 cm³/20 minutos; 250-500 cm³/25 minutos; 500-1000 cm³/35 minutos.

Si bien no existe un medio de cultivo universal que se pueda utilizar para todos los propósitos y para todas las especies cultivadas en condiciones *in vitro*, el medio básico Murashige y Skoog (1962) “MS” es aquel que se utiliza mayormente y con resultados favorables para una gran variedad de plantas, ya sea solo o en combinación con otros componentes. Con respecto a la experiencia de trabajo del Instituto de Floricultura del INTA, también se han obtenido prósperos efectos en la mayoría de los cultivares ornamentales a partir de la utilización de *woody plant medium* (McCown y Lloyd, 1981) “WPM”, el cual es comúnmente empleado para el cultivo *in vitro* de plantas leñosas.



La elección del medio de cultivo adecuado dependerá de la especie vegetal, del cultivar y del propósito de trabajo (multiplicación, saneamiento del material, conservación de germoplasma, mejoramiento genético, entre otros). Por lo tanto, para hallar el medio que mejor se adapte a nuestras condiciones será necesario realizar experimentos a modo de lograr una formulación que permita obtener los resultados más sobresalientes de acuerdo con el objetivo planteado.

3. INSTALACIONES MÍNIMAS

Las metodologías *in vitro* requieren la existencia de un lugar físico compartimentado en secciones y provisto de aquellos elementos necesarios para llevar a cabo las diferentes tareas. Es de suma importancia que los laboratorios tengan a disposición agua, gas y energía eléctrica. Además, resulta indispensable que cuenten con las siguientes divisiones de trabajo:

- **Área de preparación de medios de cultivo, limpieza y esterilización de materiales:** en este compartimento del laboratorio es donde se lleva a cabo la recepción y el lavado del material vegetal, además de la preparación y esterilización de los medios de cultivo, y la limpieza de los instrumen-

tos de trabajo. Aquí se deben ubicar los equipos y el mobiliario necesarios para trabajar en condiciones apropiadas, como las mesadas, alacenas y vitrinas para almacenar reactivos, recipientes, espátulas, pinzas y elementos cortantes, entre otros. A su vez, se deben situar las balanzas, el medidor de pH, los agitadores, las heladeras para almacenar reactivos químicos, el horno, las estufas y el autoclave.



→ Vitrina de vidrio para el almacenamiento de recipientes esenciales para el trabajo en laboratorio



→ Mesada de laboratorio. Sobre ella se encuentran el agitador, la balanza, el medidor de pH y la estantería para el almacenamiento de reactivos



→ Autoclaves para la esterilización de los materiales

• **Área de trabajo en condiciones de esterilidad:** en este sector se realiza el establecimiento (introducciones de nuevos materiales, repiques, extracciones de meristemas, entre otras aplicaciones del cultivo in vitro) y la transferencia del cultivo, en condiciones de asepsia. Para ello es necesario contar con cabinas de flujo laminar, que son equipos que originan una corriente de aire estéril porque cuentan con un sistema de filtros que retienen micropartículas, tales como hongos y bacterias. Este aire es emitido sobre el operador y la mesada de trabajo. En estas cabinas también se pueden colocar lupas binoculares estereoscópicas para realizar tareas que requieran el empleo de cierto aumento, como el aislamiento de meristemas.



→ Sala de flujos laminares



→ Lupa estereoscópica binocular

- **Cuarto de cultivo:** en esta sala es donde los explantos se desarrollan durante sus diferentes etapas de crecimiento. Debe ser un lugar aislado, sin ventanas y que posea estantes para almacenar los recipientes donde se cultiven los diferentes tejidos (tubos de ensayo, frascos, placas de Petri). A su vez, debe contar con un sistema de iluminación adecuado para la morfogénesis de las plantas. A pesar de que tradicionalmente se han utilizado tubos fluorescentes, durante los últimos años se ha comenzado a implementar el uso de la tecnología LED (*light emitting diode*-diodo emisor de luz) para el cultivo de tejidos vegetales. Este tipo de iluminación se basa en emisores de estado sólido donde un bajo voltaje es suficiente para originar fotones luminosos. Además, posee una capacidad de reproducción radiante casi total, puede generar emisiones monocromáticas dentro y fuera del espectro visible, y emisiones de espectro continuo con diferentes cantidades de luz en cada frecuencia. En cuanto a la emisión de calor, la temperatura máxima que se alcanza en el interior de los cristales LED llega a 125°C, lo que hace que el calor radiante sea inexistente a diferencia de los tubos fluorescentes que pueden generar temperaturas por encima de 1000°C. Por otro lado, este cuarto debe contar con fotoperíodo, temperatura y humedad controlados, lo cual dependerá de la especie y/o el cultivar, el tipo de explanto y la etapa del cultivo. Es necesario, entonces, que el cuarto de cultivo posea un sistema de control de temperatura y un acondicionador de aire.



→ Cuarto de cultivo con luminaria LED

Otra instalación importante que se requiere para concluir el desarrollo de una planta obtenida a partir del cultivo in vitro es el **invernáculo de aclimatación**. Este debe ser un lugar preparado para lograr la adaptación gradual de las plantas cultivadas in vitro al ambiente exterior. Para ello, el invernadero debe contar con elementos y equipos reguladores de las condiciones ambientales, tales como acondicionadores de aire, lona radiante, tejido media sombra, ventanas, mallas antiáfidos, boxes para sectorizar la procedencia de los diferentes materiales vegetales y sistemas de riego especiales.



→ Interior del invernáculo de aclimatación con boxes para sectorizar la procedencia de los materiales vegetales



→ Invernáculo de aclimatación con doble puerta y tejido media sombra en el techo



→ Plantas recientemente aclimatadas en continua adaptación a las nuevas condiciones ambientales

PRINCIPALES APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS

1. MICROPROPAGACIÓN

Esta técnica es aquella que se utiliza mundialmente para la producción clonal de plantas, ya que permite obtener una gran cantidad de material vegetal durante todo el año a partir de un genotipo selecto. Dentro del proceso de la micropropagación se diferencian las siguientes etapas:

- **Fase 0. Preparación de la planta madre:** las plantas madre o “donadoras de explantos” deben ser acondicionadas previo a la extracción del material para el cultivo in vitro. Para ello, es recomendable aplicarles sustancias antifúngicas o bactericidas algunas semanas antes de la introducción en el laboratorio a modo de disminuir la contaminación. También es necesario fertilizar y regar las plantas durante ese período para lograr un crecimiento vigoroso que permita la obtención de explantos de mayor calidad.
- **Fase 1. Establecimiento del cultivo:** esta etapa consiste en la elección del explanto y su esterilización. Para aumentar las probabilidades de éxito en la micropropagación es aconsejable utilizar tejidos jóvenes o zonas de crecimiento activas, en lugar de partes adultas, leñosas o en estado de reposo, ya que se obtendrá una mejor respuesta in vitro a medida que el tejido se encuentre menos diferenciado. Una vez elegida la planta madre, se deben extraer los fragmentos a partir de los cuales se extraerán los explantos y, en condiciones de laboratorio, se debe realizar su desinfección superficial. Si bien no es factible recomendar un método de limpieza puntual para todas las especies, en líneas generales se realiza un procedimiento de varios pasos, el cual incluye el lavado del material vegetal con agua, seguido de etanol 70 % y luego un aseo con hipoclorito de sodio más gotas de tensioactivos para favorecer su penetración y actividad. Es importante tener en cuenta que los explantes provenientes de plantas cultivadas en invernáculo o en cuartos climatizados se pueden desinfectar con mayor facilidad que aquellos cultivados a campo, al igual que los tejidos jóvenes con respecto a los más adultos o leñosos.

Finalizada la desinfección superficial, es necesario realizar tres enjuagues sucesivos con agua destilada estéril en cámara de flujo laminar a modo de eliminar los restos de agentes químicos. A partir de este material esterilizado se debe realizar la disección del explante y su posterior introduc-

ción en los recipientes que contengan el medio de cultivo adecuado y estéril, también bajo flujo laminar. Dentro de un período de una semana o 15 días comenzará el proceso de regeneración de nuevos tejidos, lo que da inicio al ciclo de cultivo in vitro.

- **Fase 2. Enraizamiento-obtención de plantas completas:**

la finalidad de esta etapa es la producción del sistema radical en los brotes obtenidos durante la multiplicación. En especies herbáceas es menos complicado que en leñosas, ya que estas tienen una capacidad rizogénica limitada. A modo de promover la rizogénesis se pueden utilizar reguladores de crecimiento tales como las auxinas. Además de la formación de raíces,



→ Acondicionamiento del explante en cámara de flujo laminar

en esta fase se pretende que los brotes se elonguen para que resulte más probable su adaptación a las condiciones ambientales externas. Sin embargo, algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y logran emitir sus raíces en el mismo medio donde fueron introducidos los explantos, por lo que el proceso de multiplicación y enraizamiento ocurren en forma simultánea.

- **Fase 4. Aclimatación:** las plantas producidas in vitro son altamente sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso depende crucialmente de esta última fase. Cuando las nuevas plantas son extraídas de los recipientes de vidrio no se encuentran adaptadas para crecer en un invernáculo, ya que han crecido bajo condiciones de temperatura, humedad y radiación diferentes, además de poseer estomas que no son completamente funcionales ni cutícula desarrollada, por lo que son sumamente propensas a la desecación. Por ello, esta etapa constituye el período de adaptación a las condiciones del ambiente, rustificación y trasplante. Este pasaje de un ambiente controlado a uno no controlado debe ser realizado en forma gradual. En el momento en que los brotes lograron un sistema radical predominante deben ser transferidos a contenedores con sustratos estériles adecuados. Para ello, se debe sacar la planta del recipiente y sus raíces deben ser lavadas delicadamente para luego poder trasplantarla al contenedor, el cual debe ser colocado bajo una niebla intermitente que produzca un ambiente permanentemente húmedo. Otro modo de mantener alta la HR es mediante la cubierta del contenedor con bolsas de nylon transparentes. Luego de 15 días se pueden retirar las bolsas durante las horas de menor temperatura para cumplir con la adaptación gradual al nuevo ambiente, lo cual minimiza el estrés y aumenta la tasa de sobrevivencia. Toda esta fase se lleva a cabo en el invernáculo de aclimatación descrito en el apartado anterior (“Instalaciones mínimas”).



→ Lavado delicado de las raíces de una planta salida de un tubo de ensayo previo a su trasplante al contenedor



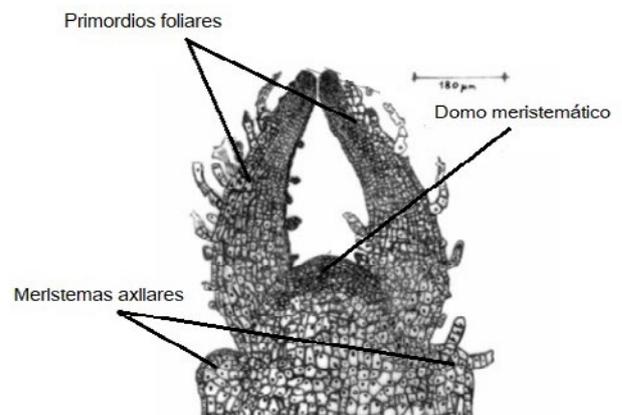
→ Plantas trasplantadas cubiertas con bolsas de nylon transparente a modo de afrontar la adaptación gradual al nuevo ambiente

2. SANEAMIENTO DE PLANTAS

La obtención de plantas libres de enfermedades sistémicas se puede lograr mediante diferentes técnicas que involucran al cultivo de tejidos vegetales:

- **Cultivo de meristemas:** los meristemas son pequeñas porciones de tejido (0,2-0,3 mm) que tienen la capacidad de dividirse y derivar en cualquier tipo de vegetal. Según su localización se pueden clasificar como apicales (aquellos que se encuentran en la punta de las raíces y de los tallos), axilares (son los meristemas de las yemas que se ubican en las axilas de las hojas), laterales (responsables del crecimiento radial, dan lugar al xilema, al floema y a los parénquimas secundario y cortical) e intercalares (son los que se ubican en la base de los tallos, cumplen una función similar a la de los laterales y son propios de las monocotiledóneas).

El cultivo de meristemas es una técnica que consiste en aislar asépticamente la región meristemática de una yema, llamada “domo”, junto con 1 ó 2 primordios foliares e implantarla en un medio de cultivo estéril que posibilite el desarrollo de una planta completa. Este domo suele ser aislado con los primordios foliares, ya que al ser una estructura sumamente pequeña (menor a 0,1 mm), resulta complicado extraerlo en forma apartada y lograr a partir de él una planta *in vitro*.



→ Corte longitudinal de un meristema apical. Las zonas de mayor oscuridad corresponden a las de mayor actividad mitótica (adaptado de Fontúrbel Rada *et al.*, 2007)

Las plantas obtenidas mediante este procedimiento son idénticas genéticamente a la planta madre de la cual se extrajo el explanto (clones).

Esta metodología puede ser empleada para la micropropagación de material deseable, la conservación de germoplasma y la obtención de plantas libres de virus. Estos microorganismos son patógenos extremadamente pequeños (18-600 nm) que afectan a los cultivos al disminuir sus rendimientos y su calidad comercial, y al aumentar la susceptibilidad de las plantas a otras afecciones. Tienen gran importancia en aquellas plantas que se multiplican en forma agámica porque si se selecciona una planta madre infectada se puede diseminar la enfermedad al resto de las generaciones de plantas con la consecuencia que ello implica.

El cultivo de meristemas defiende la idea de que en las infecciones virales la cantidad del virus dentro de la planta es variable y la mayoría de estos patógenos no alcanza a afectar el tejido meristemático. Los motivos por los cuales sucede esto aún no están totalmente aclarados, pero se sostienen las siguientes hipótesis:

- los meristemas no tienen tejido vascular formado, por lo tanto, se dificulta el avance de los virus ya que estos se movilizan por xilema y floema;
- en la región meristemática se encuentra una activa división celular que le dificulta a los virus invadir las células;
- las altas concentraciones endógenas de auxinas presentes en los ápices meristemáticos pueden inhibir la multiplicación de los virus en su interior.

Si bien se ha demostrado que esta técnica es eficiente para la eliminación de ciertos virus en determinadas especies vegetales, existen excepciones en las que no resulta efectiva, por lo que es necesario combinarla con otros tratamientos tales como termoterapia, crioterapia, quimioterapia y microinjertos de ápices caulinares. La eficiencia de la eliminación de virus mediante el cultivo de meristemas puede verse afectada debido a diferentes factores, tales como el tamaño del meristema (a mayor tamaño, menores posibilidades de éxito), la localización del meristema en la planta (los axilares tienen menos probabilidad de encontrarse libres de virus, a diferencia de los apicales) y la naturaleza del virus (ciertos virus son más invasivos y pueden infectar los primordios foliares, inutilizando la técnica).

- **Termoterapia:** esta metodología consiste en someter a las plantas u órganos infectados a tratamientos térmicos por un período variable de tiempo (entre 34 y 38°C desde una a varias semanas) a modo de destruir o disminuir la replicación de los virus sin dañar al material vegetal. Finalizado ese tiempo se debe realizar la extracción del meristema y se continúa con los pasos convencio-

nales para su desarrollo. No es una práctica que resulte efectiva para todos los cultivos, ya que depende de la especie y del hospedante vegetal. Además, la exposición a altas temperaturas por períodos prolongados puede causar daños en los tejidos vegetales.

- **Crioterapia:** es una técnica que está fundada en el sometimiento de la planta a tratamientos de baja temperatura (con nitrógeno líquido a -196°C) con la finalidad de que las células infectadas por el patógeno mueran y sobrevivan aquellas que se encuentren libres de estos microorganismos. De esta manera, tras el proceso de crioterapia el nuevo brote estará conformado por células muertas y células vivas congeladas que, al revertir las condiciones de bajas temperaturas, se desarrollarán y podrán originar una planta superviviente y libre de virus. Esta metodología es reciente, por lo que existen escasos estudios sobre el uso de la crioterapia en comparación con otras formas tradicionales de eliminación de virus.
- **Quimioterapia:** este método implica el empleo de sustancias químicas que disminuyen la concentración viral. En líneas generales, estas sustancias antivirales atenúan o suprimen los síntomas que produce la infección, pero si se suspende el tratamiento se recupera la concentración viral, por lo que hasta el momento no se ha encontrado un compuesto que sea la solución definitiva contra estas enfermedades. La ribavirina suele ser el agente químico de mayor uso y actúa bloqueando la replicación viral. Sin embargo, puede causar fitotoxicidad si se la utiliza en altas dosis. Esta práctica se suele emplear en combinación con el cultivo de meristemas, al colocar el antiviral en el medio de cultivo o bien se puede aplicar en callos de los cuales se pueden obtener plantas con menor carga viral.
- **Microinjertos de ápices caulinares:** se basa en la extracción del meristema del cultivar que se desee injertar para posteriormente introducirlo en la superficie decapitada del epicótilo de una plántula germinada de una semilla sembrada en condiciones in vitro. En la base del tallo se debe realizar un corte en forma de “T” invertida donde se coloca el meristema. Luego, cuando las plantas injertadas tienen entre 2 y 3 hojas desarrolladas se deben injertar las plantas normales de vivero. Esta metodología suele ser implementada en plantas leñosas en las que el cultivo de meristemas por sí solo no es posible.

3. CONSERVACIÓN E INTERCAMBIO DE GERMOPLASMA

El mantenimiento de la diversidad genética de las variedades tradicionales y regionales, de los cultivares mejorados y de las plantas silvestres es clave para preservar con la mayor integridad posible la variabilidad genética de las poblaciones seleccionadas. La diversidad genética provee a los agricultores y mejoradores opciones para desarrollar nuevos cultivares o híbridos, los cuales

pueden tener mejores características, mayor productividad, resistencia a patógenos y tolerancia a condiciones ambientales diversas, entre otros aspectos. Por ello, se debe realizar la conservación de germoplasma, la cual puede ser *in situ* (en sus hábitats naturales) o *ex situ* (en sitios fuera del centro de origen de la especie, los cuales proveen las condiciones adecuadas para su preservación por largo tiempo). Una forma de conservación de este último tipo es el cultivo *in vitro* de tejidos, la cual se realiza en condiciones asépticas y al resguardo de los riesgos ambientales que podrían provocar la pérdida del material. La unidad de colección puede ser la semilla botánica o explantos vegetativos, lo cual depende del hábito de crecimiento de la especie.

Esta conservación *in vitro* se puede clasificar de acuerdo con su duración en “almacenamiento por corto plazo” y en “almacenamiento por largo plazo”. En el primer caso, los explantos pueden permanecer hasta por 12 meses y se trata de manejar las condiciones de cultivo para retrasar el crecimiento y aumentar los intervalos entre los subcultivos. Para ello, se puede reducir la temperatura de los cuartos de cultivo a valores de 4°C para especies templadas y entre 10 y 15°C para especies tropicales, a modo de reducir la actividad metabólica y, por tanto, detener el crecimiento. Otra forma de lograrlo es mediante la modificación de los medios de cultivo a partir de la reducción de la concentración de los elementos minerales y de la sacarosa, del aumento del potencial osmótico del medio con el uso de manitol y de la adición de reguladores de crecimiento. De este modo, el explanto absorbe los nutrientes en forma lenta y se reduce su crecimiento. Este retraso del crecimiento también se puede alcanzar mediante la disminución del nivel de oxígeno disponible para los explantos a partir del uso de atmósferas controladas o de la reducción de la presión atmosférica de la cámara de cultivo.

En cuanto al almacenamiento por largo plazo, generalmente se emplea la criopreservación, la cual permite almacenar células, tejidos u órganos vegetales por períodos mayores a un año. Para ello, se utiliza nitrógeno líquido (-196°C) porque permite detener todos los procesos metabólicos y la división celular inmediatamente al entrar en contacto con el explanto, además de permitir que los tejidos conserven la viabilidad sin que ocurran alteraciones fisiológicas.

Por su parte, la utilización del cultivo *in vitro* posibilita el intercambio internacional de material genético, ya que pequeñas muestras pueden ser enviadas en condiciones asépticas aún a países con estrictas regulaciones fitosanitarias.

4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS

Esta es la alteración del genoma de un organismo por la introducción de uno o más genes foráneos con la finalidad de incorporar nuevos caracteres en variedades de cultivo ya existentes, a modo de

lograr plantas resistentes a patógenos, a estreses abióticos, tolerantes a herbicidas y con distinta conformación, entre otros aspectos. El organismo modificado que surge de ello se denomina transgénico o transformado.

En los métodos biológicos o de transferencia indirecta de ADN se emplean cepas de *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes* (bacterias fitopatógenas gram negativas que habitan en el suelo y causan agallas-tumores-en el hospedante) para aprovechar su capacidad natural de introducir un segmento de cadena simple de su propio ADN en las células vegetales infectadas. Mediante ingeniería genética se reemplaza la secuencia de genes patogénicos por una secuencia nueva con los genes de interés y de selección, ya sea de antibióticos o de herbicidas. De esta manera, el ADN es transferido, heredado y expresado de manera estable en las células vegetales receptoras. Luego de la transformación, el tejido vegetal es cultivado en condiciones in vitro en un medio adecuado con reguladores de crecimiento y un agente de selección para que solamente sobrevivan las células transformadas. Finalmente, se obtiene como resultado una planta completa que porta los genes de interés en sus células.

5. RESCATE DE EMBRIONES

En ciertas situaciones puede ocurrir que luego de determinados cruzamientos interespecíficos se produzca el aborto del embrión híbrido debido a varios motivos, como por ejemplo la incompatibilidad del embrión con el endosperma, reconocido como uno de los más frecuentes. Para evitar que esto suceda, resulta posible rescatar al embrión inmaduro y cultivarlo en condiciones in vitro hasta obtener una planta completa. A las técnicas de laboratorio que se utilizan para inducir el desarrollo de un embrión aislado del ovario se las conoce como rescate de embriones, las cuales posibilitan el crecimiento de una nueva planta en condiciones de asepsia y controladas durante cualquier época del año. Esta metodología se muestra provechosa para proporcionar nuevas variaciones genéticas a los programas de mejoramiento vegetal, ya que mediante su empleo se resuelven los problemas de germinación originados por el desarrollo incompleto del embrión y de la semilla al cultivarlo en un medio aséptico y rico en nutrientes. Para ello, se suelen utilizar medios de cultivo base suplementados con reguladores de crecimiento de acuerdo con la especie vegetal. Luego se espera que se desarrolle la planta en el cuarto de cultivo hasta que finalmente es trasplantada a condiciones ex vitro, cuya adaptación al nuevo ambiente también debe ser gradual (ver sección “Fase 4. Aclimatación” de micropropagación).

6. CULTIVO DE ÓVULOS, ANTERAS, GRANOS DE POLEN Y PROTOPLASTOS

El cultivo de óvulos se puede implementar para dar respuesta a la incompatibilidad que surge entre determinados cruzamientos a modo de evitar problemas de abscisión de frutos y de abortos de em-

briones o bien para la obtención de plantas haploides o para el estudio de cigotos y preembriones. Sin embargo, es un procedimiento complejo cuya probabilidad de éxito es baja, ya que la manipulación de los óvulos resulta sumamente dificultosa debido a su tamaño y fragilidad ante los daños.

Por su parte, el cultivo de anteras y granos de polen es una técnica que se basa en la aplicación de un tratamiento de estrés al polen con el objetivo de reprogramar su vía natural de desarrollo gametofítico para que finalmente de lugar a la formación de embriones y plantas haploides. Este proceso de formación de plantas haploides a partir del núcleo masculino se llama androgénesis y es extremadamente raro en la naturaleza, por lo que se ha podido conseguir a partir del cultivo in vitro. Para ello se utilizan medios de cultivo base suplementados con reguladores de crecimiento y compuestos orgánicos apropiados para lograr la embriogénesis directa o la formación de callo, lo que permitirá la posterior regeneración de plantas.

En cuanto al cultivo de protoplastos, la aplicación de esta técnica en el mejoramiento vegetal representa una opción para transferir características que se encuentran en las especies silvestres hacia las cultivadas, ya que la fusión de protoplastos facilita el flujo genético entre las especies y permite superar los obstáculos para la hibridación sexual que presentan determinados géneros. Un protoplasto es una célula desprovista de pared celular, ya que ha sido eliminada por medios mecánicos o enzimáticos. Se puede obtener de raíces y suspensiones celulares, pero se ha visto que las hojas jóvenes son los mejores materiales para obtener este tipo de células. Los protoplastos se pueden “sembrar” en medios especiales y cultivar en cámaras con baja intensidad de luz a modo de que se produzca la regeneración de la pared celular y las primeras mitosis para dar lugar a la formación de callos. La inducción de la fusión de estas células puede originarse a partir de medios químicos o por empleo de pulsos breves de corriente continua (electro-fusión).

7. PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

El cultivo de tejidos presenta aspectos y aplicaciones prácticas variadas, entre las que se destaca la producción de metabolitos secundarios de plantas. Estos son compuestos derivados del metabolismo primario de ciertas especies vegetales que pueden tener función de defensa contra herbívoros y microorganismos patógenos; fisiológica, en el caso de las pectinas que transportan sustancias tóxicas; protectora, como los flavonoides que resguardan de los rayos ultravioletas; además de ser una fuente importante de principios activos de medicamentos y otros productos químicos. La producción de estos compuestos regulada por el cultivo in vitro proporciona una oportunidad para el desarrollo de investigaciones bioquímicas relacionadas con las rutas metabólicas bajo un ambiente controlado. La mayor parte de los reportes sobre metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro se ha focalizado en la utilización de tejidos indiferenciados (callos, suspensiones celulares).

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Aguado Martínez, A. (2022). Obtención de plantas de vid libres de virus mediante el uso de la crioterapia y la termoterapia. Tesis presentada para obtener el Grado en Enología. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias. Universidad de Valladolid, España.
- Aranzales Rondón, E. (2018). "Conservación in vitro. Conceptos básicos". Taller de Operaciones y Aprendizaje Avanzado en Bancos de Germoplasma. Disponible en: <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/109643/Conservaci%C3%B3nB%C3%A1sico2018.pdf?sequence=1> Fecha de último acceso: 27/12/2022.
- Campana, B.M.R.; Ochoa M. J. (2007). *Árboles frutales, ecofisiología, cultivo y aprovechamiento*. Sozzi, G. (ed). Capítulo 5: "Propagación vegetativa o agámica de especies frutales". Buenos Aires, Argentina: Orientación Gráfica. Pp. 188-196.
- Cantabella, D.; Dolcet-Sanjuan, R.; Casanovas, M.; Solsona, C.; Torres, R.; Teixidó, N. (2020). "Inoculation of in vitro cultures with rhizosphere microorganisms improve plant development and acclimatization during immature embryo rescue in nectarine and pear breeding programs". *Scientia Horticulturae*, 272:1-9.
- Cantabella, D.; Rolando Mendoza, C.; Teixidó, N.; Vilaró, F.; Torres, R.; Dolcet-Sanjuan, R. (2022). "GreenTray® TIS bioreactor as an effective *in vitro* culture system for the micropropagation of *Prunus* spp. rootstocks and analysis of the plant-PGPMs interactions". *Scientia Horticulturae*, 291:1-10.
- Cañal, M. J.; Rodríguez, R.; Fernández, B.; Sánchez, R.; Majada, J. P. (2001). "Fisiología del cultivo in vitro". *Bioteología vegetal*, 1:3-9.
- Castillo, A. (2004). "Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo". Documentos INIA, Uruguay. Disponible en: <http://www.inia.uy/publicaciones/documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf> Fecha de último acceso: 22/12/2022.
- Chinestra, C.; Marinangelli, P. (2011). "Saneamiento y detección de virus en *Lilium*". *AgroUNS*, 8(15):23-27.
- Conci, V. (2010). *Bioteología y Mejoramiento Vegetal II*. Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; Mroginski, L.; Levitus, G. (eds). Capítulo 9 "Utilización de cultivos de tejidos para la obtención y conservación de plantas libres de enfermedades". Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA. Pp. 481-493.
- Fontúrbel Rada, F.; Achá Cordero, D.; Mondaca Gutiérrez, D. (2007). *Manual de introducción a la Botánica*. Capítulo 3: "Niveles de organización. Los meristemas y el crecimiento primario". La Paz, Bolivia: Publicaciones Integrales. 2da edición. P. 78.
- Gago Calderón, A.; Barceló Muñoz, M.; Barceló Muñoz, A. (2021). "Descripción y estandarización de la iluminación LED para su utilización en el cultivo in vitro de plantas". Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga, España. Disponible en: <https://riuma.uma.es/xmlui/bitstream/handle/10630/22829/Texto-Al-Sec-21-Caracterizaci%C3%B3n%20LED.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Fecha de último acceso: 22/12/2022.

- Gil Rivero, E.; López Medina, S.; López Zavaleta, A. (2017). "Aclimatación de plantas in vitro de *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. (Gesneriaceae) 'violeta africana' a condiciones de invernadero". *Arnaldoa*, 24(1):343–350.
- Kato, A.; Escandón, A.; Facciuto, G. (2002). *Aplicaciones del cultivo in vitro en especies ornamentales*. Centro Tecnológico de Flori-Fruti-Horticultura. Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA.
- Levitus, G.; Echenique, G.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; Mroginski, L. (2010). *Bioteología y Mejoramiento Vegetal II*. Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA.
- López-Medina, E.; Mostacero-León, J.; Gil-Rivero, A.; López-Zavaletta, A.; De La Cruz-Castillo, A. (2019). "Efecto del ácido giberélico y del ácido indolacético en la micropropagación in vitro de *Solanum tuberosum* var. Maria Reiche". *Revista de Investigación Científica REBIOL*, 39:1-9.
- McCown, B.H.; Lloyd, G. (1981). "Woody Plant Medium (WPM)—A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species". *HortScience*, 16:453-453.
- Martirena-Ramírez, A.; Veitía, N. (2013). "Factores que influyen en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris* L." *Bioteología Vegetal*, 13(2).
- Murashige, T.; F. Skoog. (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures". *Physiologia Plantarum*.15:473-497.
- Nickel, O.; Martins Fajardo, T. V. (2016). "Eliminação de vírus latentes de macieiras por quimioterapia e cultivo de meristemas in vitro". Comunicado técnico 193, EMBRAPA. Disponible en:
- <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1060518/1/ComunicadoTecnico193.pdf> Fecha de último acceso: 27/12/2022.
- Pierik, R. L. M. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Pineda Balbuena, P. (2019). "Cultivo in vitro de anteras y granos de polen de plantas de *Hemerocallis* spp.". Trabajo final presentado para acceder al Título de Grado en Biología. Universidad de La Laguna, San Cristóbal de La Laguna, Tenerife, España.
- Ramos Amaya, J. E. (2012). "Avances de la propagación in vitro de plantas leñosas". Trabajo presentado para acceder al título de especialista en Bioteología Agraria. Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Bogotá, Colombia.
- Retheesh, S.T.; Bhat, A.I. (2010). "Simultaneous elimination of *Cucumber mosaic virus* and *Cymbidium mosaic virus* infecting *Vanilla planifolia* through meristem culture". *Crop Protection*, 29(10):1214-1217.
- Rivera Rodríguez, R.; Perea Dallos, M. (2004). "Aislamiento y cultivo de protoplastos en maracuyá". *Acta Biológica Colombiana*, 9(2):35-46.
- Rodríguez Amaro, M. (2018). "Cultivo in vitro: alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales". Trabajo docente. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España. Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MIGUEL%20RODRIGUEZ%20AMARO.pdf> Fecha de último acceso: 22/12/2022.
- Ruíz-Rivas, M.; Tellez-Valerino, E.; Martínez-Núñez, M.; Vera-Hernández, P.; Martínez-Romero, E.; Rosas-Cárdenas, F. (2022). "Influencia de la luz en la generación de callos y el cultivo in vitro de plantas". *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 27:11-21.

- Ruscitti, M.; Beltrano, J.; Giménez, D. (2011). "Biotecnología vegetal, cultivo de tejidos vegetales". Curso de Fisiología vegetal. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Disponible en:
- https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/76847/mod_resource/content/1/in%20vitro.pdf
- Fecha de último acceso: 27/12/2022.
- Sánchez-Chiang, N.; Jiménez, V. (2010). "Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales". *Agronomía Mesoamericana*, 21(1):193-205.
- Sharry, S.; Adema, M.; Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad de La Plata.
- Suárez, F. E. (2011). "Micropropagación in vitro de piña (*Ananas comosus* L. Merrill) híbrido MD-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales". Tesis de pregrado. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.
- Tiznado Hernández, M.; Miranda Jiménez, A.; Ojeda Contreras, A.; Sánchez Estrada, A.; Arreola Ortíz, H.; Martínez Díaz, G. (2015). "Desarrollo de nuevas variedades de uva (*Vitis vinifera* L.) sin semilla mediante rescate de embriones". *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(5):917-928.

A person wearing a white lab coat and blue nitrile gloves is holding a clear petri dish. Inside the dish, there are several pieces of green plant tissue, likely explants, submerged in a clear liquid medium. The background is a blurred laboratory setting with a light blue tint.

CAPÍTULO II

Aplicaciones del cultivo de tejidos en plantas ornamentales. Un enfoque desde la experiencia del Instituto de Floricultura (INTA)

UNA BREVE INTRODUCCIÓN

Desde el 2002, el Instituto de Floricultura (INTA-CNIA) se dedica a la domesticación y al mejoramiento genético de plantas nativas con el objetivo de lograr cultivares ornamentales comerciales adaptados al mercado local e internacional y de conservar la flora autóctona bajo un marco legal y sustentable del uso de los recursos.

Entre los géneros de plantas nativas que se trabajan actualmente se destacan *Glandularia*, *Calibrachoa*, *Mecardonia*, *Nierembergia*, *Alstroemeria*, *Handroanthus*, *Tecoma* y *Seemannia*. En este marco, el Instituto dispone de ciertas herramientas biotecnológicas que resultan de suma importancia para complementar las técnicas de mejoramiento clásico normalmente utilizadas con la finalidad de obtener nuevos cultivares.

El cultivo de tejidos vegetales ha resultado ser una metodología clave para la propagación de estas plantas ornamentales, para la conservación del material selecto y para la obtención de clones con sanidad controlada, entre otras aplicaciones. Por ello, en el presente apartado se abordarán los principales resultados y avances sobre el cultivo de tejidos de plantas ornamentales y de los cultivares INTA llevados a cabo por el Instituto de Floricultura.

MICROPROPAGACIÓN Y CULTIVO DE MERISTEMAS

CIRCUITO DE TRAZABILIDAD DE PLANTAS MADRE DEL INSTITUTO DE FLORICULTURA

Actualmente, el Instituto cuenta con un sistema de trazabilidad para el seguimiento y la producción de plantas madre de los cultivares ornamentales obtenidos mediante el mejoramiento genético.

El material vegetal seleccionado es cultivado en condiciones *in vitro* en un medio de cultivo base (MS-WPM) a partir de esquejes y cuando las plantas alcanzan un tamaño entre 10 y 15 cm dentro de los tubos de ensayo se procede a la extracción de sus meristemas.

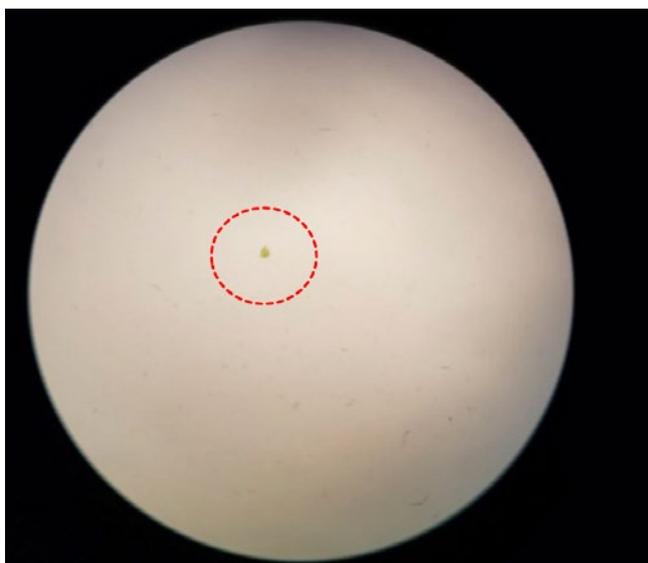
El cultivo de meristemas es un procedimiento clave dentro de este sistema, ya que permite obtener plantas idénticas genéticamente a la planta madre de la cual se extrajo el explanto con una calidad sanitaria superior, ya que permite rejuvenecer y, en determinados casos, liberar de virus aquellas plantas que se encuentren infectadas.

Los meristemas son cultivados en un medio de cultivo base más un regulador de crecimiento de acuerdo con la especie y/o el cultivar, bajo una temperatura de 24°C y un fotoperíodo de 16 h.

Particularmente, los meristemas de los cultivares de glandularia (“Alba INTA”, “Dulce coral INTA”, “Hanna magenta INTA”, “Blanca Bariloche INTA”, “Natalí rosa INTA”, “Natalí mora INTA”, “Extrema roja INTA” y “Extrema violeta INTA”), al igual que los cultivares de mecardonia (“Poty



→ Extracción de meristemas con lupa binocular estereoscópica bajo flujo laminar



→ Meristema de 0,5 mm observado mediante lupa binocular estereoscópica a 40 X

amarilla INTA”, “Guaraní amarilla INTA”, “Kambá clara INTA” y “Tatarendy melocotón INTA”), calibrachoa “Garden Rose” y los clones selectos amarillo, violeta y blanco de este género son cultivados en WPM + 0,01 mg.L⁻¹ ANA.

Por su parte, los meristemas de los cultivares de nierembergia (“Yvoty blanca INTA”, “Yvoty celeste INTA”, “Cielo INTA”, “Estrella INTA-JICA”, “Luna INTA-JICA” y “Nieve INTA”) suelen ser cultivados en MS + 0.025 mg.L⁻¹ ANA, mientras que los de calibrachoa “Pampa salmón INTA” en MS ½ + 0,01 mg.L⁻¹ BAP y los de alstroemeria “Fiesta de 15 INTA” (provenientes de rizomas) en MS + 0,2 mg.L⁻¹ ANA. Además, se han logrado óptimos resultados para la regeneración de plantas completas de calibrachoa “Overá fucsia INTA” en medios de cultivo conformados por WPM y bajas concentraciones de ANA en combinación con BAP.

En cuanto a seemannia, se han obtenido clones selectos de flores amarillas y de flores rojas que han alcanzado la regeneración de plantas completas a partir de meristemas en medios de cultivo compuestos por MS y bajas concentraciones de AIB.

La especie *Portulaca gilliesii* también se encuentra dentro de este sistema y sus meristemas son cultivados en un medio compuesto por MS + 0,01 mg.L⁻¹ ANA.

Una vez que se obtienen plantas completas (entre 30 y 40 días desde la extracción de los meristemas) se realiza la multiplicación in vitro a medios de cultivo base sin reguladores de crecimiento con el objetivo de aumentar la cantidad de material vegetal. Estos medios dependen del género taxonómico y se detallan en la tabla 1:



→ Plantas completas de mecardonia regeneradas a partir de meristemas apicales



→ Plantas completas de calibrachoa “Overá fucsia INTA” regeneradas a partir de meristemas apicales



→ Planta completa de seemannia roja regenerada a partir de meristemas apicales

Tabla 1. Medios de cultivo base empleados de acuerdo con el género taxonómico

Género	Medio de cultivo
<i>Calibrachoa, Mecardonia, Nierembergia</i>	WPM
<i>Glandularia</i>	MS-WPM
<i>Alstroemeria, Seemannia, Portulaca</i>	MS

Cuando las plantas desarrollan un sistema radical abundante (aproximadamente a los 30 días) son transferidas a la fase de aclimatación para que se adapten gradualmente al cultivo en maceta y a las condiciones ambientales de un invernáculo. Esta etapa dura entre 15 y 20 días y, cuando finaliza, las plantas son trasladadas al invernáculo de plantas madre donde son fertilizadas de acuerdo con sus requerimientos nutricionales y controladas estrictamente frente a eventuales problemas sanitarios.

Además, se realizan diversas pruebas de diagnóstico de enfermedades para corroborar que no haya presencia de virus, hongos y bacterias. Cuando no se detectan patógenos, las plantas son propagadas en forma vegetativa para aumentar el stock que será ingresado en el sector productivo para su posterior comercialización.



→ Plantas de glandularia “Extrema violeta INTA” regeneradas a partir de meristemas y multiplicadas en WPM

CIRCUITO DE TRAZABILIDAD PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS MADRE



1. Caracterización y mejoramiento

En el Instituto de Floricultura (INTA) se llevan a cabo procesos de mejora genética con la finalidad de obtener plantas con características ornamentales y agronómicas de alto impacto comercial a partir de especies nativas de la Argentina.

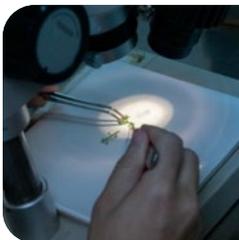
2. Introducción in vitro del material vegetal

El material vegetal seleccionado por los mejoradores es cultivado en un medio base (WPM-MS) a partir de esquejes.



3. Cultivo de meristemas

Cuando las plantas introducidas alcanzan entre 10 y 15 cm se procede a la extracción de sus meristemas, los cuales son cultivados en un medio especial de acuerdo con el genotipo bajo una temperatura de 24°C y un fotoperíodo de 16 h.



4. Multiplicación

Una vez que se obtienen plantas completas se realiza su multiplicación in vitro en un medio de cultivo base sin reguladores de crecimiento con el objetivo de aumentar la cantidad de material vegetal.



5. Aclimatación

Cuando las plantas desarrollan un sistema radical abundante son transferidas a un invernáculo bajo condiciones controladas para que se adapten gradualmente al nuevo ambiente y al cultivo en maceta.



6. Transferencia al invernáculo de plantas madre

Las plantas son fertilizadas según sus requerimientos nutricionales y controladas frente a eventuales problemas sanitarios (virus, hongos y bacterias) para luego realizar su multiplicación agámica a modo de aumentar el *stock*.



7. Transferencia al sector productivo

Una vez que se logró la multiplicación del material las plantas son enviadas a los productores florícolas para luego ingresar en el mercado local.



OTROS TRABAJOS REALIZADOS

Dentro de esta temática también se han logrado regenerar plantas completas de *Argyranthemum frutescens* (“margarita”) mediante meristemas apicales a partir de la suplementación de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ KIN + $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA al medio base MS. Si bien esta especie no forma parte del circuito de producción del Instituto, este avance sirve como aporte fundamental para el rejuvenecimiento del material de los productores florícolas de la zona.

En cuanto a especies nativas, se han regenerado plantas de a partir de meristemas de *Calibrachoa calycina*, *C. linearis* y *C. pigmaea* mediante de la adición de bajas concentraciones de KIN al medio MS.

Por otro lado, además de lograr la optimización de un protocolo de regeneración de plantas de calibrachoa “Pampa salmón INTA” a partir de meristemas apicales, se ha conseguido obtener un 74 % de plantas de este cultivar libres del virus Y de la papa (*Potato virus Y-PVY*) mediante la aplicación de esta técnica sobre plantas que se encontraban infectadas por este patógeno.

En lo que respecta a la micropropagación de materiales vegetales ornamentales, se ha logrado la multiplicación in vitro de *Verbena bonariensis*., *Senecio pterophorus*, *A. frutescens* y *Dimorphotheca* sp. a partir de esquejes en el medio base MS sin la adición de reguladores de crecimiento.

Por otra parte, se han podido propagar esquejes juveniles de tecoma “Victoria INTA” a partir del agregado de bajas concentraciones de AIB al medio WPM.

La micropropagación exitosa de clones selectos de jacarandá (*Jacaranda mimosifolia*) se pudo realizar a partir del cultivo de segmentos nodales en MS + 1 mg.L^{-1} BAP, mientras que en santa Rita (*Bougainvillea* sp.) se alcanzó mediante el cultivo de esquejes en MS + 5 mg.L^{-1} BAP + $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ GA₃. Además, se logró establecer un protocolo de propagación in vitro de *Mecardonia tenella* a partir de segmentos nodales cultivados en MS más la

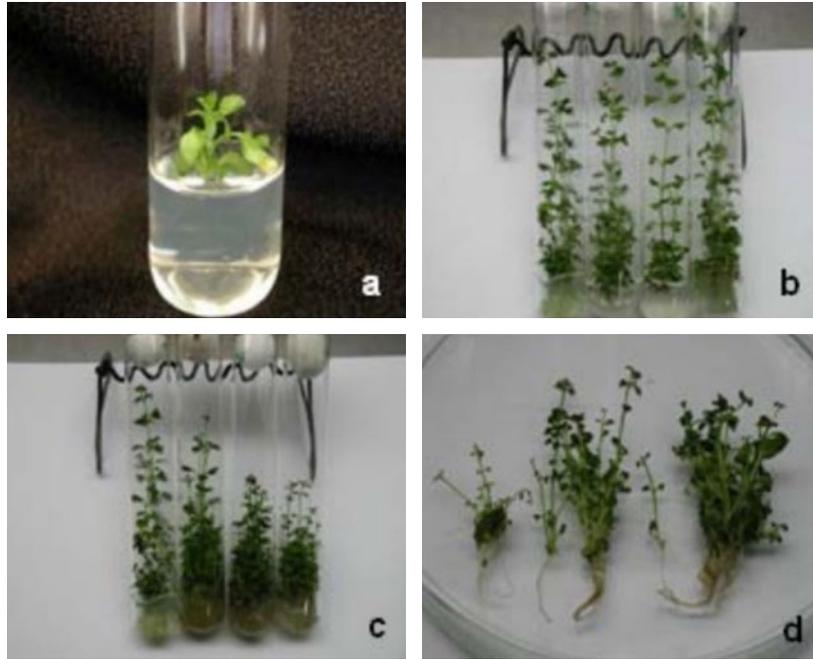


→ Planta completa de *A. frutescens* regenerada a partir del cultivo de meristemas apicales



→ Planta de *Verbena bonariensis* obtenida a partir de la micropropagación mediante esquejes

suplementación de 0,25 y 0,5 mg.L⁻¹ de BAP. También se pudo alcanzar la micropropagación de *Evolvulus glomeratus* mediante el cultivo de segmentos nodales en MS suplementado con 2,2 μM de BAP y la introducción in vitro de *Rhodophiala bifida* a partir del uso de catáfilas dobles como explantos, las cuales fueron cultivadas en medio MS.



- Progreso de la micropropagación de *Mecardonia tenella*. (a) Explante inicial. (b) Brotes en MS + ANA (0,0; 0,25; 0,5 y 1,0 mg.L⁻¹, respectivamente). (c) Brotes en MS + BAP (0,0; 0,25; 0,5 y 1,0 mg.L⁻¹). (d) Plántulas del tratamiento 0,25 mg.L⁻¹ BAP al final de la fase in vitro (Alderete *et al.*, 2006)

CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA

En especies y cultivares de propagación agámica la conservación in vitro resulta una metodología eficiente para el mantenimiento del germoplasma. Por ello, el Instituto de Floricultura ha realizado la conservación de los cultivares ornamentales de *Calibrachoa*, *Mecardonia*, *Glandularia* y *Nierembergia* con la colaboración del Instituto de Recursos Biológicos (INTA-CNIA) en un medio de cultivo compuesto por MS, tiamina (0,1 mg.L⁻¹), glicina (2 mg.L⁻¹), piridoxina (0,5 mg.L⁻¹), ácido nicotínico (0,5 mg.L⁻¹), D-sorbitol (40 g.L⁻¹), sacarosa (20 g.L⁻¹) y agar (8 g.L⁻¹), el cual usualmente para la conservación de papa. Este medio permitió generar una menor tasa de crecimiento y, por tanto, un mayor tiempo entre repiques, el cual resultó entre 7 y 12 meses. Esta conservación se llevó a cabo a partir de segmentos nodales apicales de 4 cm de altura, los cuales fueron mantenidos en cámara de cultivo a 25 ± 2°C bajo una intensidad luminosa de 3000 lux y 12 h de fotoperíodo.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Las especies de mecardonia nativas de la Argentina suelen tener hábito de crecimiento alargado, por lo que la generación de plantas de mayor compacidad ha sido un desafío dentro de las líneas de investigación del Instituto. Una estrategia de mejora molecular que contrarresta las limitaciones de la mejora clásica (incompatibilidad entre cruzamientos y esterilidad) consiste en la introducción de genes rol (aquellos responsables de producir alteraciones fenotípicas en las plantas) de *Agrobacterium rhizogenes* en las plantas que se pretenda realizar alguna modificación de sus características. En este marco, se logró la transformación de mecardonia “Guaraní amarilla INTA” a partir de una cepa *wild-type* de *A. rhizogenes*.

Estas nuevas plantas demostraron tener una arquitectura más compacta y mayor producción de flores, lo que constituyó una alternativa útil frente al uso de las técnicas de poda, además de tener un mayor atractivo visual.

Para lograr estos resultados se inocularon entrenudos de plantas mantenidas in vitro con la cepa ATCC15834 de *A. rhizogenes*, las cuales fueron cultivadas en WPM a 24°C y 16 h de luz. Una vez que se desarrollaron nuevas raíces a partir de los entrenudos inoculados, estos fueron cortados en fragmentos y posteriormente cultivados en WPM más un antibiótico (a modo de eliminar las bacterias) bajo las mismas condiciones ambientales anteriores. Cuando se desarrollaron brotes a partir de estas nuevas raíces, se transfirieron nuevamente a WPM con antibiótico y se cultivaron durante 40 días. Luego, los segmentos nodales regenerados a partir del cultivo anterior fueron extraídos y repicados en WPM sin antibiótico. Finalmente, cuando estas nuevas plantas crecieron se realizó una prueba PCR para confirmar la presencia de los genes introducidos, la cual fue positiva y comprobó la transformación de mecardonia.



→ Mecardonia “Guaraní amarilla INTA” transformada con *A. rhizogenes* (Pérez de la Torre et al., 2018)

Por otro lado, también se logró la transformación de *Calibrachoa excellens* a partir de la inoculación de sus hojas con *A. rhizogenes*. Las plantas regeneradas luego de este evento mostraron diferencias en el color de las flores y en las formas de las hojas, respecto de las plantas originales. La prueba de PCR detectó la presencia de los genes rol de la bacteria, lo que confirmó la transformación de estas plantas.

CULTIVO IN VITRO DE SEMILLAS

El cultivo in vitro constituye una herramienta de gran utilidad para la germinación y favorece el proceso de mejora al aumentar la variabilidad y la selección de individuos. Ofrece un medio rápido y confiable para la germinación de semillas que ha demostrado ser superior a otras técnicas, tales como la germinación con papel de filtro o en sustratos.

En este marco y, dada la importancia de las especies nativas de calibrachoa en los programas de mejoramiento del Instituto, se evaluó la germinación in vitro de semillas de *C. thymifolia* y *C. missionica* en los medios MS y WPM. Durante 7 días las semillas fueron incubadas en oscuridad a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y luego fueron colocadas en una cámara a la misma temperatura, pero bajo un fotoperíodo de 16 h.

Finalmente, se obtuvo que ambos medios de cultivo resultan adecuados para la germinación in vitro de estas especies y que *C. thymifolia* logra germinar una mayor cantidad de semillas en menor tiempo.

Por otro lado, también se han realizado pruebas de germinación in vitro en *Jacaranda mimosifolia*. Las semillas de esta especie requieren más de 6 meses para madurar luego de la polinización, por lo que el largo período que surge desde el cruzamiento hasta la obten-



→ Plántulas de *C. missionica* a los 15 días desde la siembra en MS (A) y WPM (B)

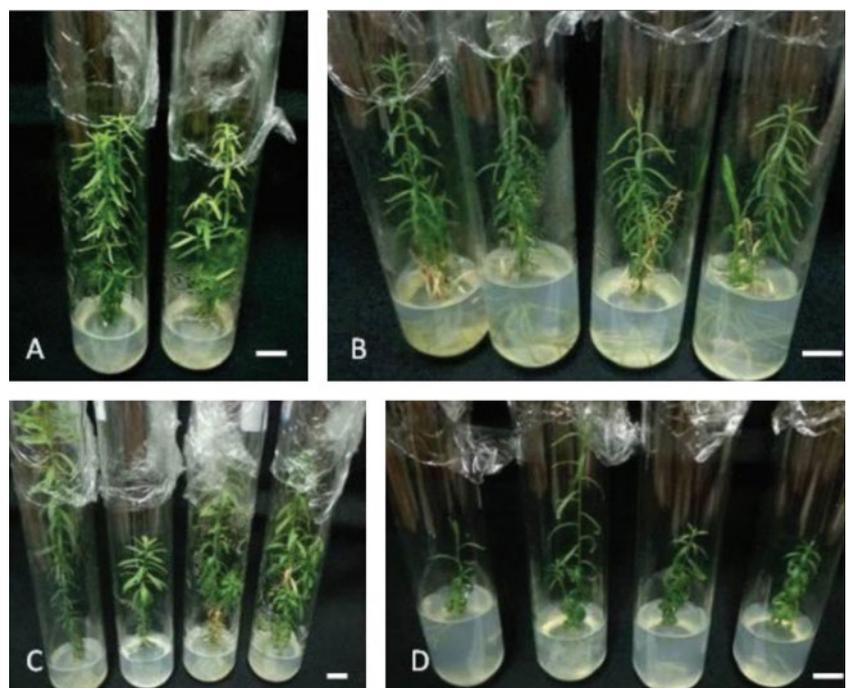
ción de plántulas constituye un obstáculo para su mejoramiento. Por este motivo, se estudió el efecto de las giberelinas sobre la germinación de estas semillas a modo de reducir los tiempos de duración de este período. Esta disminución fue alcanzada luego de la imbibición de las semillas inmaduras con 100 y 500 mg.L⁻¹ de ácido giberélico durante 24 h, las cuales fueron posteriormente sembradas en MS con 3 % de sacarosa y 0,6 % de agar, y almacenadas en una cámara a 25°C y 16 h de luz, ya que al cabo de 2 semanas de cultivo se obtuvieron porcentajes de germinación superiores al 60 %.

RESCATE DE EMBRIONES, CULTIVO DE ÓVULOS Y DE DISCOS DE OVARIOS

La hibridación interespecífica es una de las herramientas de mayor uso en el mejoramiento de plantas ornamentales debido al alto potencial que representa para obtener vigor híbrido y variación de caracteres. Sin embargo, a menudo se encuentra limitada por diferentes barreras de incompatibilidad entre especies, las cuales se pueden superar mediante el rescate de embriones. Dado que en el Instituto de Floricultura se lleva a cabo el mejoramiento genético de *Nierembergia*, se obtuvieron híbridos interespecíficos de *N. ericoides* x *N. linearifolia* a partir del rescate embrionario y el cultivo de óvulos. Para ello, los óvulos fueron aislados 7 días después del cruzamiento y cultivados en MS modificado (50 % de macroelementos, 40 g.L⁻¹ de sacarosa y 146 mg.L⁻¹ de glutamina) a 25 ± 2°C durante 24 h. Cuando los embriones emitieron radícula fueron repicados a MS con 50 % de macroelementos y 0,1 mg.L⁻¹ BAP, y almacenados en cámara a 25°C y 12 h de luz a 4000 lux para favorecer su desarrollo.

Por su parte, la hibridación interespecífica en *Alstroemeria* está limitada por barreras postcigóticas que se traducen en aborto del embrión asociado a un crecimiento retardado, falta de

celularización del endosperma y degeneración del tejido esporofítico. Por este motivo, fue necesario realizar el rescate de embriones y su posterior cultivo in vitro para la obtención de nuevos híbridos. Para ello, se realizaron cruzamientos dirigidos entre un genotipo selecto de *A. psittacina* y los cultivares comerciales “Orange Queen”, “Sacha”, “Senna”, “Virginia”, “Belvedere”, “Cartagena”, “Costa Azul”, “Fuego” e “Himalaya”,



→ Híbridos de *N. ericoides* x *N. linearifolia* obtenidos por rescate embrionario. A) *N. ericoides* x Luna INTA-JICA; B) *N. ericoides* x *N. scoparia* (control); C) *N. ericoides* x Cielo INTA; D) *N. ericoides* x Estrella INTA-JICA.

Aumento: barra = 1cm
(Milicia et al., 2018)

cuyos frutos fueron cosechados a los 7 y 14 días después de la polinización. Posteriormente, en condiciones de laboratorio, se extrajeron las placentas de los ovarios con los óvulos, los cuales fueron cultivados en MS $\frac{1}{2}$ + 40 g.L⁻¹ de sacarosa y 146 mg.L⁻¹ de glutamina, a 25 ± 2°C durante 24 h.

Los óvulos cuyos embriones emitieron radícula fueron cultivados en MS $\frac{1}{2}$ + 0,5 mg.L⁻¹ BAP a 25°C con fotoperiodo de 12 h e intensidad de 4000 lux. Cuando las plántulas obtenidas desarrollaron brotes de 1,5 cm fueron repicadas a MS $\frac{1}{2}$ + 0,2 mg.L⁻¹ AIB y conservadas bajo un régimen de iluminación y temperatura igual a la etapa anterior.

Finalmente, el número de embriones germinados y la obtención de plántulas normales varió respecto al cultivar y al tiempo al rescate. En el caso de los cruzamientos con “Belvedere”, la mayor cantidad de embriones desarrollados se produjo a los 14 días post polinización (DPP), para “Cartagena” a los 7 DPP y para “Costa Azul” no se detectaron diferencias significativas entre ambos tiempos. También se obtuvieron plántulas en los cruzamientos con “Himalaya” y “Virginia”. La eficiencia reproductiva mayor fue en “Costa Azul” siendo 6,6 y 8,4 para los rescates a 7 y 14 DPP, respectivamente.

Por otro lado, los cruzamientos interespecíficos del género *Lilium* suelen resultar incompatibles debido a barreras pre y postcigóticas. Una forma de superar la barrera postcigótica es el cultivo de discos de ovarios. En este marco, en el Instituto se llevaron a cabo distintos cruzamientos entre *Lilium x formolongi* y los híbridos asiáticos Montreaux, Grand Paradise y Corsica. Treinta días después de la polinización se realizó la cosecha de los frutos y su posterior introducción in vitro. Para ello, estos frutos fueron cortados transversalmente a modo de generar discos de 0,3 cm de espesor con aproximadamente 30 semillas inmaduras en su interior, los cuales fueron cultivados en MS + sacarosa 3 % + 0,01 mg.L⁻¹ ANA, a 25 ± 2°C y luz permanente de 3000 lux. A partir de este procedimiento se logró la germinación de casi un 6 % de las semillas provenientes del cruzamiento entre *L. x formolongi* con el cultivar Montreaux, el cual originó 281 híbridos nuevos.

OBTENCIÓN DE POLIPLÓIDES

Las especies de calibrachoa nativas de la Argentina que se encuentran involucradas dentro de los programas de mejoramiento genético del Instituto no siempre son compatibles entre sí a la hora de realizar los cruzamientos y obtener nuevos híbridos. Dado que existen evidencias de que un aumento del nivel de ploidía (número de conjuntos de cromosomas de una célula) puede romper esta incompatibilidad entre especies, se lograron obtener individuos tetraploides de *C. pygmaea* en condiciones in vitro a partir del tratamiento de segmentos nodales en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) 1 % y colchicina 0,01 % durante 48 h, los cuales fueron posteriormente cultivados en MS a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 16 h de luz.

TRABAJOS ACTUALMENTE EN DESARROLLO

El Instituto de Floricultura continúa realizando investigaciones en cuanto al saneamiento de virosis en plantas ornamentales; en la actualidad, se encuentra en proceso la liberación de plantas de calibrachoa “Overá fucsia INTA” infectadas por PVY mediante el cultivo de meristemas.

Por otro lado, también se está desarrollando la optimización de un protocolo de cultivo de meristemas de tecomá “Victoria INTA” y de nuevos clones selectos de calibrachoa que serán incorporados dentro del circuito de trazabilidad de plantas madre, y de un protocolo de multiplicación in vitro de alstroemeria “Fiesta de 15 INTA”.

A su vez, se está realizando una investigación sobre la reducción de la duración de los tiempos de multiplicación in vitro de especies nativas de orquídeas, ya que estas suelen tardar varios meses desde su introducción hasta el primer repique.

Por su parte, se dio comienzo al desarrollo de la técnica de microinjertos en plantas de lapacho (*Handroanthus impetiginosus*) a modo de introducir el cultivar “Sorpresa rosa INTA” sobre pies de lapacho rosado cultivados in vitro, en colaboración con agentes de la EEA INTA Concordia (Entre Ríos).

En cuanto a la línea de investigación de mejoramiento, se ha avanzado en la transformación genética de portulaca con *A. rhizogenes* con la finalidad de lograr mayor compactación en la arquitectura de las plantas. Además, se han comenzado a realizar estas transformaciones en calibrachoa “Overá fucsia INTA” y calibrachoa “Garden Rose”, cuyos resultados preliminares obtenidos hasta el momento resultan alentadores. También se ha logrado la transformación genética de *Petunia hybrida* con el objeto de investigar el rol de los diferentes genes candidatos que podrían regular la senescencia en este cultivo a través de la sobreexpresión, el silenciamiento génico por ARN de interferencia y la edición génica, lo cual se encuentra en proceso.

VISIÓN A FUTURO

Si bien el cultivo in vitro es una herramienta que tiene varios años de uso en la mayoría de las especies vegetales, sigue siendo clave para complementar todos los programas de mejoramiento genético llevados a cabo por el Instituto de Floricultura, el cual ha sido el principal obtentor de cultivares ornamentales logrados a partir de germoplasma nativo del país. Por este motivo, se continuará con el desarrollo de investigaciones sobre el saneamiento de plantas ornamentales comerciales y de otros cultivares INTA, además de prosperar en líneas de mejoramiento mediante el uso de la biotecnología. Estos avances permitirán mantener el propósito de desarrollar y transferir tecnologías que mejoren la productividad a partir de la sustentabilidad y la conservación del ambiente, en un marco general que contemple siempre el beneficio de los productores florícolas.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Alderete, M.; Mori, M.; Kato, A.; Escandón, A. (2006). "Establishment of an in vitro micropropagation protocol for *Mecardonia tenella*". *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3):263-266.
- Du Plessis, H.; Vassileva, R.; Kleynhans, R.; Egam B. (2020). "In vitro seed germination and seedling performance of *Hibiscus coddii* subsp. *Barnardii*". *Ornamental Horticulture*, 26(4):598-606.
- Facciuto, G.; Morisigue, D.; Soto, M. S. (2005). "Nuevas variedades de *Lilium*: método de obtención y caracterización". *Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA)*, 34(2):3-12.
- Faroni, A.; Coviella, A.; Soto, M. S. (2018). Evaluación de medios de cultivo para la conservación de los recursos genéticos de especies nativas ornamentales en el banco in vitro del IRB. *40º Congreso argentino de Horticultura*. 2-5 de octubre. Ciudad de Córdoba, Córdoba, Argentina. Libro de resúmenes, p. 486.
- Gennarelli, M. C.; Hagiwara, J. C.; Tosto, D.; Álvarez, A.; Borja, M.; Escandón, A. (2009). "Genetic transformation of *Calibrachoa excellens* via *Agrobacterium rhizogenes*: Changing morphological traits". *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84(3):305-311.
- Greppi, J. (2014). "Petunias y calibrachos nativos de la Argentina". Disponible en: https://www.economiayviveros.com.ar/enero2014/produccion_cultivo-plantas_ornamentales_y_flores_de_corte_1.html Fecha de último acceso: 28/12/2022.
- Hagiwara, J. C.; Kato, A.; Mori, M.; Miyajima, I. (2002). Obtención de poliploides en *Calibrachoa pygmaea* mediante el uso de colchicina in vitro. *1º Congreso argentino de Floricultura y plantas ornamentales*. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Kato, A.; Escandón, A.; Facciuto, G. (2002). *Aplicaciones del cultivo in vitro en especies ornamentales*. Centro Tecnológico de Flori-Fruti-Horticultura. Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA.
- Kato, A.E.; Hagiwara, J.C.; Mori, M.N.; Soto, M.S. (2005). Meristem culture for the conservation and propagation in four *Calibrachoa* species native to Argentina. *15º Congreso Brasileiro de Floricultura y Plantas Ornamentales y II Congreso Brasileiro de cultivo de tejidos de plantas*. 7-12 de agosto. Asociación Brasileira de Horticultura. Fortaleza, Brasil. Libro de resúmenes p. 644.
- Maritano, P.; Alderete, M.; Pérez de La Torre, M.; Escandón, A. (2009). "In vitro propagation and genetic stability analysis of *Evolvulus* spp. Biotechnological tools for the exploration of native germplasm with ornamental potential". *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 46:64-70.
- Maritano, P.; Kato, A.; Pérez de la Torre, M.; Marinangelli, P.; Escandón, A. (2009). Ajuste de biotécnicas para el estudio de *Rhodophiala bifida*, una bulbosa con potencial ornamental. *II Congreso Internacional-RED-BIO-Argentina*. 20-24 de abril. Rosario, Santa Fe, Argentina.

- Milicia, V.; Chiesa, A.; Coviella, M. A.; Soto, M. A. (2018). "Producción de híbridos interespecíficos entre *Nierembergia ericoides* y *Nierembergia linariaefolia* mediante la aplicación de técnicas de rescate embrionario". *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 34(3):234-242.
- Miyajima, I.; Kato, A.; Hagiwara, J. C.; Mata, D.; Facciuto, G.; Soto, S.; Escandón, A.; Mori, M.; Kobayashi, N. (2005). "Promotion of immature seed germination in *Jacaranda mimosifolia*". *HortScience*, 40(5):1485-1486.
- Pakoca, C.; Bugallo, V.; Facciuto, G. (2021). "Mejoramiento genético de *Alstroemeria* en la Argentina: obtención de híbridos a través de rescate de embriones". *Revista FAVE-Ciencias Agrarias*, 20(1):133-144.
- Pérez de La Torre, M.; Fernández, P.; Greppi, J.; Coviella, A.; Fernández, M.; Astigueta, F.; Mata, D.; Trupkin, S. (2018). "Transformation of *Mecardonia* (Plantaginaceae) with wild-type *Agrobacterium rhizogenes* efficiently improves compact growth, branching and flower related ornamental traits". *Scientia Horticulturae*, 234:300-311.
- Rodríguez, M.; Chacón, M.; Carrillo, R. (2014). "Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación in vitro de *Ugni molinae*". *Bosque*, 35(1):119-122.
- Ruíz, B. C.; Laguna, C.; Iglesias, A.; Damon, A. Marín, H. Azpíroz, R.; M. Moreno (2008). "Germinación in vitro de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae)". *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 77:203-215.
- Tombion, L.; Soto, M. S.; Mori, M.; Mira, A.; Facciuto, G. (2020). "Propagación in vitro de *Alstroemeria* var. 'Fiesta de 15 INTA' a partir del cultivo de meristemas de rizoma". *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 36(2):110-116.
- Tombion, L.; Kato, A.; Soto, M. S. (2020). "Protocolo de regeneración de *Calibrachoa* var. Pampa Salmón INTA a partir de meristemas apicales". *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 36(2):121-128.
- Tombion, L.; Coviella, M. A.; Soto, M. S. (2021). Protocolo preliminar de micropropagación de *Argyranthemum frutescens* var. "Vanilla butterfly". 41º Congreso argentino de Horticultura. 5-8 de octubre. La Plata, Buenos Aires, Argentina. Modalidad virtual.
- Tombion, L. (2022). "Estudio de *Potyvirus* y *Nigrospora oryzae* como agentes patógenos del género *Calibrachoa*". Tesis presentada para acceder al título de Doctora de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Tombion, L.; Coviella, M. A.; Pannunzio, M. J.; Soto, M. S.; Bologna, P. (2023). "Germinación in vitro de *Calibrachoa thymifolia* y *Calibrachoa missionica* nativas de la Argentina". *Revista Tecnología en Marcha*, 36(3):127-133.



Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria