

Micropropagación de variedades ornamentales nacionales del género Nierembergia

*Tecnología de micropropagación para la
obtención de plantines con calidad y sanidad controlada
de variedades ornamentales nacionales de propagación agámica*

Universidad CAECE
Trabajo final para optar al grado de Licenciada en Ciencias Biológicas
Año: 2024

Alumna: Marcela N. Mori
Director: MSc. Mariana Pérez de la Torre
Co-Director: Dra. María Silvina Soto
Tutor: Dr. Diego Sauka

Lugar de Trabajo: Instituto de Floricultura – CIRN - CNIA – INTA

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a mi Directora MSc. Mariana Pérez de la Torre, por su paciencia, tiempo, comprensión, por guiarme y darme la oportunidad de realizar esta Tesis.

A la Dra. Leticia Tombion quien ha sabido guiarme con sus comentarios y sugerencias.

A mis compañeros del Instituto de Floricultura, su Directora Dra. Maria Silvina Soto, quienes me han brindado siempre el apoyo, aportando desinteresadamente materiales para esta tesis.

Al MSc. Ing. Agr. Daniel Morisigue, la Ing. Agr. Adriana Kato, con quienes me inicie en este mundo de la investigación en el área de la Floricultura y en el trabajo en el Laboratorio de Cultivo *in vitro*.

A mi familia, amigas y amigos, siempre presentes en toda esta etapa y dándome fuerzas para seguir adelante.

A todas las personas que me acompañaron durante mi carrera, compañeros, profesores, autoridades de la Universidad, sinceramente agradecida por cada momento compartido, por cada aprendizaje recibido.

Índice de Contenidos

<i>INTRODUCCIÓN</i>	8
La Floricultura en Argentina	8
Cultivo de Tejidos Vegetales	11
Micropropagación	12
Etapas de la Micropropagación	13
Cultivo de Meristemas	14
Nierembergia.....	17
<i>OBJETIVOS</i>	20
Objetivo general:.....	20
Objetivos específicos:	20
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	21
Protocolo de micropropagación a partir de cultivo de meristemas	21
<i>Material vegetal</i>	21
<i>Preparación de explantes</i>	21
<i>Tratamientos analizados</i>	21
Protocolos de cultivo <i>in vitro</i> para conservación a corto plazo.....	22
<i>Aclimatación ex vitro</i>	23
<i>RESULTADOS Y DISCUSION</i>	24
Cultivo de Meristemas	24
Conservación a Corto Plazo	27
<i>CONCLUSIONES</i>	33
<i>REFERENCIAS</i>	34
<i>ANEXOS</i>	38
Anexo 1. Composición de medio basal MS	38
<i>Macroelementos</i>	38
<i>Microelementos</i>	38
<i>Vitaminas / Orgánicos</i>	38
Anexo 2	39
Definiciones	39

Índice de Figuras

Figura 1: Desarrollo de explantos de <i>Nierembergia</i> Nieve INTA proveniente de Meristemas	25
Figura 2: Planta completa (tallo y raíz) de <i>Nierembergia</i> Nieve INTA y Cielo INTA	27
Figura 3: Propagación in vitro a 15 días de subcultivo en <i>Nierembergia</i> Nieve INTA	29
Figura 4: Propagación de explantos de <i>Nierembergia</i> Nieve INTA y Cielo INTA en Cámara de Cultivo	29
Figura 5: Plantas obtenidas de <i>Nierembergia</i> Nieve INTA y Cielo INTA en Invernáculo de Aclimatación	30
Figura 6: Plantas obtenidas de <i>Nierembergia</i> Nieve INTA y Cielo INTA en Invernáculo de Plantas Madre.....	30
Figura 7: Diferencias en el desarrollo in vitro de <i>Nierembergia</i> Nieve INTA y Cielo INTA.....	32

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Resultados obtenidos de evaluación a los 15 días de cultivo en Nieve INTA (a) y Cielo INTA (b) con todos los tratamientos utilizados.....	27
Gráfico 2: Resultados obtenidos de evaluación a los 60 días de cultivo en Nieve INTA (a) y Cielo INTA (b) con todos los tratamientos utilizados.....	28
Gráfico 3: Resultados obtenidos de evaluación a los 90 días de cultivo en Nieve INTA (a) y 100 días (b) de cultivo en Cielo INTA.....	30

Índice de Tablas

Tabla 1: Descripción de las variedades ornamentales obtenidas por el Instituto de Floricultura en función del marco legal (RNPC –Registro Nacional de Propiedad de Cultivares; RNC – Registro Nacional de Cultivares	9
Tabla 2: Composición de medios de cultivos con diferentes concentraciones hormonales.....	24
Tabla 3: Nieve INTA a 90 días de cultivo con todos los tratamientos.....	26
Tabla 4: Cielo INTA a 90 días de cultivo con todos los tratamientos.....	26
Tabla 5: Explantos de Nieve INTA a los 100 días de cultivo	28
Tabla 6: Explantos de Cielo INTA a los 110 días de cultivo.....	28
Tabla 7: Nieve INTA a 125 días de crecimiento en medio basal MS	29
Tabla 8: Cielo INTA a 135 días de crecimiento en medio basal MS	29

Abreviaturas

ANA: ácido naftalen acético

Br: Brote

CNIA: Centro Nacional de Investigación Agropecuaria

CBD: Convenio de Diversidad Biológica

g: gramos

gl⁻¹: gramos por litro

H: hoja

IF: Instituto de Floricultura

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

ISSR: Inter Simple Sequence Repeat – microsatélites anclados

JICA: Agencia de Cooperación Internacional del Japón

KIN: Kinetina

LINEVEN: Listado Nacional de Especies Vegetales Nativas

MS: medio Murashige & Skoog

mgl⁻¹: miligramos por litro

Ne: necrosado

Pl: plántula

Pr: primordio

PVP: polivinil pirrolidona

R: raíz

RNC: Registro Nacional de Cultivares

RNPC: Registro Nacional de Propiedad de Cultivares

RRGG: Recursos Genéticos

RBG: Registro Base de Germoplasma

T: tallo

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

UPOV: Unión Internacional por la protección de las obtenciones vegetales

INTRODUCCIÓN

La Floricultura en Argentina

La floricultura comercial en Argentina comienza a principios del Siglo XX. Inmigrantes japoneses y alemanes comienzan en la zona norte de Gran Buenos Aires a producir plantas en macetas. A partir de la década del '30 se extiende la producción de flores de corte y se incorporan productores de origen portugués e italiano. Hasta la década del '60 la floricultura argentina era la más desarrollada de Latinoamérica, pero la falta de políticas oficiales, la inadecuada gestión y la falta de ajuste de la producción al nuevo contexto mundial, han limitado su desarrollo (Morisigue et al., 2012).

Argentina, a pesar de tener casi un siglo de producción comercial, se encuentra escasamente diversificada, lo que atenta tanto para el crecimiento del mercado interno como para el externo. En flores de corte predominan en el mercado local poco más de 30 especies en el AMBA, cuando en el mundo hay más de 100. En el interior del país se cultivan en total 20 especies, de las cuales crisantemo y clavel son las principales. La producción de follaje de corte, flores tropicales y bulbosas en la Argentina es casi inexistente, por lo que estas especies constituyen una gran posibilidad de diversificación de la producción. Esto podría potenciar el mercado local y a mediano plazo ser una alternativa de exportación, considerando que son productos de gran demanda internacional (Morisigue et al., 2012)

En Argentina no existe mejoramiento de plantas ornamentales nativas por parte del sector privado. Históricamente, la oferta de variedades ornamentales ha sido muy reducida, especialmente en el rubro de flores y follaje de corte, y la actividad florícola ha dependido enteramente de variedades extranjeras, implicando el pago de regalías, inclusive para aquellas variedades originadas a partir de especies nativas. Asimismo, las variedades disponibles, al haber sido mejoradas genéticamente en otros países, no están adaptadas a condiciones agroecológicas locales. En 1999 comienza el primer programa de mejoramiento de plantas ornamentales en el INTA (Facciuto et al., 2011), en este contexto, y desde su creación en el año 2004, el Instituto de Floricultura (IF) ha llevado a cabo un plan de mejoramiento genético a partir de plantas nativas con potencial ornamental, a fin de ofrecer al sector productivo alternativas novedosas y adaptadas a nuestro territorio, permitiendo un uso sustentable de la flora y colaborando en evitar el uso extractivo de la biodiversidad.

Es importante destacar que todas las variedades nacionales son de propagación agámica, siendo este tipo de variedades uno de los pilares que contribuye funcionalmente al mercado interno, debiendo garantizar la comercialización de productos que cumplan con los criterios de sanidad y calidad, involucrando también la protección de las obtenciones vegetales. Este tema resulta ser complejo, fundamentalmente por la informalidad que aún presenta el sector florícola, y para su resolución se requiere un arduo trabajo conjunto entre el sector público y el privado.

Desde el Instituto de Floricultura del INTA se desarrolló el proyecto denominado "Tecnología de propagación de variedades ornamentales INTA con calidad controlada" (PICT Start Up 2015-0018), a partir del cual se desarrolló el "know how" para la producción de plantas madre de variedades ornamentales INTA de los géneros *Calibrachoa*, *Nierembergia*, *Glandularia* y *Mecardonia*. Este proyecto tiene como objetivo obtener un modelo de trazabilidad productiva desde la obtención varietal hasta su transferencia comercial, de todas las variedades ornamentales nacionales obtenidas en INTA. La presente tesis se encuadra en el proyecto mencionado para desarrollar los protocolos de micropropagación y cultivo *in vitro* para mediano y largo plazo en variedades comerciales de *Nierembergia*.

Actualmente, el Instituto cuenta con 25 variedades ornamentales registradas en el *Registro Nacional de Cultivares* (Tabla 1). De las cuales, 9 variedades están registradas en el *Registro Nacional de Propiedad Intelectual de Cultivares* (Hanna Magenta INTA, Sorpresa Rosa INTA, Victoria INTA-JICA, Guarani Amarilla INTA, Kamba clara INTA, Poty Amarilla INTA, Tatarendy Melocotón INTA, Overa Fucsia INTA y Pampa Salmon INTA). También algunos de los materiales son comercializados por empresas internacionales en el exterior, como SAKATA (Japón) y Proven Winners (Estados Unidos). Estos logros han requerido del abordaje de nuevas temáticas vinculadas a la propagación, transferencia, comercialización, y tópicos vinculados a la sanidad vegetal consolidando el área de patología vegetal principalmente asociada a enfermedades fúngicas y virosis que afectan a diferentes cultivos florícolas.

Tabla 1: descripción de las variedades ornamentales obtenidas por el Instituto de Floricultura en función del marco legal (RNPC –Registro Nacional de Propiedad de Cultivares; RNC – Registro Nacional de Cultivares; que presenta y su uso.

Nº Registro	Género	Cultivar	Inscripción RNC	País
1864	ASTROEMERIA	FIESTA DE 15 INTA	2019-10-04	ARG
13299	CALIBRACHOA	OVERA FUCSIA INTA	2013-11-21	ARG
13296	CALIBRACHOA	PAMPA SALMON INTA	2013-11-21	ARG
14220	GLANDULARIA	ALBA INTA	2012-12-19	ARG
16387	GLANDULARIA	DULCE CORAL INTA	2016-07-11	ARG
14221	GLANDULARIA	EXTREMA ROJA INTA	2012-12-19	ARG
16386	GLANDULARIA	EXTREMA VIOLETA INTA	2016-07-19	ARG
16388	GLANDULARIA	HANA MAGENTA INTA	2017-07-11	ARG
18259	GLANDULARIA	NATALI MORA INTA	2019-04-01	ARG
14222	GLANDULARIA	NATALI ROSA INTA	2012-12-19	ARG
18260	GLANDULARIA	NEVADA INTA BARILOCHE	2019-04-01	ARG
13264	MECARDONIA	GUARANI AMARILLA INTA	2012-03-21	ARG
16568	MECARDONIA	KAMBA CLARA INTA	2017-07-14	ARG
13128	MECARDONIA	POTY AMARILLA INTA	2011-10-13	ARG
20782	MECARDONIA	TATARENDI EXTREMA INTA	2022-06-14	ARG
16569	MECARDONIA	TATARENDI MELOCOTON INTA	2017-07-11	ARG
14219	NIEREMBERGIA	CIELO INTA	2013-03-18	ARG
8191	NIEREMBERGIA	ESTRELLA INTA JICA	2004-03-23	ARG
8190	NIEREMBERGIA	LUNA INTA JICA	2004-02-20	ARG
14218	NIEREMBERGIA	NIEVE INTA	2013-03-18	ARG
16389	NIEREMBERGIA	YVOTY BLANCA INTA	2017-07-11	ARG
16390	NIEREMBERGIA	YVOTY LILA INTA	2018-08-08	ARG
21780	SEEMANNIA HIBRIDA	FAROLITO DEL MONTE INTA	2022-12-26	ARG
8446	TECOMA	VICTORIA INTA JICA	2004-06-25	ARG
11040	TABEBUIA	SORPRESA ROSA INTA	2008-12-19	ARG

El IF es referente en el mejoramiento genético para la obtención de variedades ornamentales, pionero en temáticas vinculadas al uso sustentable de Recursos Genéticos (RRGG) con fines ornamentales, con reconocimiento internacional por la UPOV (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales). A nivel nacional fue la primera institución que firmó convenios internacionales en el marco de CBD (Convenio sobre la Diversidad Biológica). Con relación a la formación de recursos humanos, el IF forma parte del dictado de la Maestría en Floricultura de INTA-Universidad Nacional de Lomas de Zamora y brinda cursos de capacitación a nivel nacional e internacional con el auspicio de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA) y Cancillería Argentina en temáticas vinculadas al uso sustentable de RRGG con fines ornamentales.

En cuanto a instalaciones el IF cuenta con un laboratorio de cultivo *in vitro*, un laboratorio de sanidad y un laboratorio de análisis molecular, todos totalmente equipados y en funcionamiento.

Para el cultivo de plantas *in vitro* hay dos cámaras de cría automatizadas con control de luz y temperatura. También cuenta con un invernáculo de aclimatación para la rusticación de las plantas provenientes de cultivo *in vitro*, para el aislamiento sanitario. Un invernáculo para el cultivo de plantas madre en producción y otro invernáculo para el cultivo de materiales vegetales que requieran cuarentena, equipados con jaulas con malla anti-áfido y sistemas de riego automatizado. Es importante destacar que el IF cuenta con un total de 5.000 m² de invernáculos utilizados para ensayos productivos, planes de mejoramiento y evaluaciones de variedades en etapa comercial. Los mismos tienen en funcionamiento sistemas de riego específicos, control de temperatura con extractores e instalación de calefactores de gas natural, mesadas equipadas con sistemas térmicos para el enraizamiento y parcelas experimentales a campo para evaluaciones varietales.

Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explanto) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas, químicas y ambientales apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco e inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana. (Roca & Mroginski, 1991). Estas metodologías son extensamente utilizadas como herramientas aplicadas en diferentes áreas de la ciencia y productivas: fisiología, genética, bioquímica y ciencias relacionadas; bioconversión y producción de compuestos secundarios, conservación, mejoramiento, micropropagación, entre otras.

La aptitud para la multiplicación vegetativa es una característica importante de los vegetales.

Existen dos conceptos biológicos que sustentan estas técnicas: totipotencia celular y diferenciación-desdiferenciación. *Totipotencia celular*, propuesto por primera vez por Haberlandt en 1902, quien establece que todas las células vivas de la planta poseen el potencial de regenerar una planta entera (Thorpe & Stasolla, 2001). Los genes responsables para diferenciar una planta están contenidos en todas las células del cuerpo de la misma y muchos de ellos permanecen inactivos, pudiéndose expresar bajo condiciones adecuadas de cultivo. *Diferenciación* de las células es una especialización estructural, una adaptación a funciones definidas: conducción, fotosíntesis, acumulación de reservas, etc. Por lo contrario, la

Desdiferenciación celular de tejidos especializados, es la recuperación de las características meristemáticas a través de divisiones mitóticas sucesivas. Es decir, potencialmente una célula diferenciada, por ejemplo, de flor, hoja, raíz, etc., en condiciones adecuadas, puede desdiferenciarse para luego rediferenciar yemas y posteriormente una planta completa. Todo proceso de diferenciación está regulado por el balance entre las auxinas y citocininas (Skoog & Miller, 1975).

Micropropagación

La micropropagación de plantas es una industria de gran impacto económico, practicada en cientos de pequeños y grandes viveros y/o laboratorios comerciales, a través del mundo. En estos momentos, es considerada un área de la biotecnología vegetal y ha sido utilizada a gran escala, especialmente para la producción de ornamentales. La micropropagación de especies leñosas y plantas medicinales ha adquirido gran importancia (Bajaj, 1997)

La micropropagación se denomina de esa forma en función del tamaño de los explantos iniciales (Grattapaglia, 1999). Las plántulas micropropagadas pueden ser obtenidas de la siguiente manera:

- Multiplicación por desinhibición de yemas preexistentes: meristemas, ápices terminales y yemas axilares, con este tipo de multiplicación se logran plantas con muy baja variabilidad genética, es muy utilizado en ornamentales.
- Multiplicación por yemas adventicias: se induce la formación de yemas (neoformadas) en algún tejido de la planta que no es habitual (ej: limbo de la hoja) sin pasar por la formación de callo, lo que se denomina “organogénesis directa”, en este tipo de multiplicación, al igual que sucede en el caso anterior, la posibilidad de variación genética es baja. Muchas son las especies que poseen este potencial para la producción de yemas adventicias.
- Multiplicación a partir de callo, por medio de yemas adventicias o embriones somáticos es lo que se denomina “organogénesis y embriogénesis indirecta”, se induce la división celular con la aplicación de reguladores de crecimiento, generalmente en dosis elevada en tejidos juveniles. La posibilidad de encontrar variaciones genéticas en este tipo de multiplicación es mayor.

Etapas de la Micropropagación

El Dr. Toshio Murashigue de la Universidad de California (1974) dividió el proceso en tres etapas: establecimiento, multiplicación y enraizamiento. Posteriormente otros investigadores incorporaron la aclimatación al proceso general de la micropropagación quedando el mismo conformado en las siguiente cuatro etapas:

- Etapa I: Iniciación y establecimiento: en esta etapa es importante la elección de la planta madre, su estado sanitario y fisiológico son puntos a considerar ya que de ellos se obtendrán los explantos iniciales. Las plantas madre elegidas es conveniente ubicarlas en invernáculo y tratarlas con fungicidas para disminuir la carga microbiana. Es aconsejable combinar pulverizaciones con otro tipo de producto químico, fungicidas de contacto, fungicidas sintéticos y/o antibióticos para lograr así un amplio espectro de acción. Durante los procesos de cultivo *in vitro* se trabaja en condiciones de asepsia, para ello primero se realiza la desinfección superficial del material vegetal:

El material vegetal (esquejes, hojas, ápices, etc.) son lavados con agua corriente, desde una simple corriente de agua hasta un cepillado intenso, dependerá de la especie o de su procedencia.

El material vegetal, se los somete a la acción de algún producto químico como etanol 70%, lavandina (Hipoclorito de Sodio = NaClO), hipoclorito cálcico ((CaClO)₂) y/o bicloruro de mercurio (HgCl₂), pero siendo éste muy toxico para vegetales, animales y el hombre y de difícil lavado, se usa solo en casos de trabajar con material valioso y/o escaso.

En muchas especies, particularmente en leñosas (ej: rosa, lapacho) suelen producirse oxidaciones en los tejidos del explanto, dando compuestos muchas veces tóxicos. Para contrarrestar sus efectos se agregan al medio de cultivo antioxidantes, ej: ácido cítrico, ácido ascórbico, L-cisteina, carbón activado, PVP (polivinil pirrolidona)

Los protocolos de desinfección más utilizados combinan dos o tres de estos productos en una secuencia, con gotas de un agente tensioactivo, Tween 20 u 80. Los productos químicos, generalmente son corrosivos, es por ello aconsejable, posteriormente enjuagar cuidadosamente el material vegetal.

La disección del material vegetal se realiza en condiciones asépticas y seguidamente se siembran en el medio de cultivo adecuado.

- Etapa II: Multiplicación: en esta etapa los explantos son subcultivados en un nuevo medio de cultivo similar al de la etapa de establecimiento, suelen modificarse la relación entre los reguladores de crecimiento, beneficiando al grupo de citocininas con el propósito de

estimular la división celular e inhibir la dominancia apical, estimulando la formación de brotes. Esta etapa puede repetirse, los brotes logrados en cada subcultivo son subdivididos para ser propagados. Sin embargo, como puede existir la posibilidad de presentar variación genética no suelen exceder los 4-5 subcultivos. Es una fase de especial importancia en la multiplicación a gran escala.

- Etapa III: Enraizamiento: en esta etapa se induce la formación de raíces adventicias, los brotes desarrollados con hojas se subcultivan en un medio que generalmente se suplementa con auxinas, promover el crecimiento y favorecer la formación de raíces. Las especies herbáceas no presentan grandes dificultades para el enraizamiento, no así las leñosas. En algunas especies la respuesta es mayor si se le subcultiva en medio con auxinas durante unos pocos días (3 a 7 días) y luego nuevamente son repicados a un medio libre de hormonas (Jarvis, 1986). En la última fase de esta etapa se somete a los brotes a un aumento en la intensidad lumínica para prepararlos a la aclimatación.
- Etapa IV: Rusticación: las plántulas son retiradas de los frascos y sus raíces se lavan con agua corriente, eliminando restos de agar y sustancias nutritivas. De esta forma se evita el desarrollo de microorganismos durante la fase de aclimatación. Posteriormente, son trasplantadas en recipientes (plugs, cajas plásticas, macetas, etc.) con un sustrato liviano, estéril (perlita, turba, vermiculita, etc.) y es conveniente crear una cámara con alta humedad relativa (túnel de polietileno, fog, caja plástica, etc.) para evitar un estrés hídrico, que puede ocasionar grandes pérdidas por mortalidad de plántulas.

Las pequeñas plántulas obtenidas por cultivo *in vitro* tienen ciertas características morfológicas y fisiológicas que obligan a tomar precauciones en el traspaso a condiciones *in vivo* como, por ejemplo, delgada cutícula (Sutter & Langhans, 1979), pelos radicales escasos o ausentes (Blank, 1989), falta de funcionalidad de estomas (Blanke & Belcher, 1989).

Cultivo de Meristemas

Los meristemas son porciones de tejido que conservan la capacidad de dividirse durante toda la vida de la planta. Mantienen indefinidamente tal actividad y no solo aumentan el número de células de la planta, sino que se perpetúan a sí mismos. Los que se ubican en el extremo de los tallos y raíces principales y laterales, se denominan meristemas primarios y producen el crecimiento de la planta originando los diferentes órganos: tallos, hojas, raíces, flores, etc. (Essau, 1985).

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*.

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 claros, 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 convencionales 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 desea 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 (Tombión, L. 2023).

Nierembergia

El género *Nierembergia* pertenece a la familia *Solanaceae* Adans, subfamilia *Cestroideae* Schltl., tribu *Nicotianeae* G. Don y subtribu *Nierembergiinae* Hunz., y está constituido por 20 especies presentes en el sur de América y una en México. En la Argentina habitan 15 especies (Barboza & Romanutti, 1999), en una altitud que se extiende desde el nivel del mar hasta 3500 msm (Cocucci, 1995). Muchas de las especies en el género presentan un gran valor ornamental por el color de sus flores y el largo período de floración, la variabilidad fenotípica dentro del género, la amplia distribución geográfica, entre otras características (Shizukawa *et al.*, 1997).

Otro aspecto interesante de las especies de este género es que, aunque son perennes, presentan características de plantas de ciclo anual. Wilkins y Anderson (2006) hacen referencia a la importancia de las especies herbáceas que conjugan características de especies de ambos ciclos. El hecho de que sean perennes les otorga durabilidad en los jardines. Esto último evita tener que renovarlas todos los años y favorece el bajo costo de mantenimiento, un aspecto importante en la producción ornamental. Ambas ventajas se conjugan con características frecuentes en plantas de ciclo anual como floración temprana (menor a 16 semanas desde semillas), baja estatura, bajos requerimientos nutricionales, resistencia a enfermedades (Wilkins & Anderson, 2006). En la Argentina, el estudio del género desde el punto de vista ornamental comenzó en el año 1999, en el marco del Proyecto “Desarrollo de la Floricultura en la Argentina” (Suárez *et al.*, 2003).

El género *Nierembergia* fue uno de los géneros seleccionado para iniciar un plan de mejoramiento en el IF. En el marco de ese proyecto se realizaron numerosos viajes de recolección, con el objetivo de incorporar material con suficiente variabilidad, desde las zonas de distribución de las especies, para comenzar un plan de mejoramiento (Soto *et al.*, 2003). En el mejoramiento del género *Nierembergia* se utilizaron métodos tradicionales, basados en cruzamientos y selección. Se obtuvieron plantas con características superiores desde el punto de vista ornamental con respecto de la población original, las cuales fueron evaluadas en establecimientos productivos (Soto *et al.*, 2004). Esta evaluación permitió la obtención de variedades comerciales, que fueron registradas en el Registro Nacional de Cultivares. *N.*

linariaefolia, fue la primera especie del género con la cual comenzaron los trabajos de mejoramiento de especies ornamentales en la Argentina, siendo las dos primeras variedades comerciales registradas en nuestro país “Luna INTA-JICA” y “Estrella INTA-JICA” (Soto et al., 2005). Para contribuir y asegurar la propiedad de las variedades se realizaron trabajos de identificación de variedades por técnicas moleculares. Se pusieron a punto los protocolos para la técnica de microsatélites anclados (ISSR – Inter-Simple Sequence Repeat), método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Escandón et al., 2005; Pérez de la Torre et al., 2004). Con el objetivo de aumentar la variación existente se comenzó a utilizar la hibridación interespecífica, una de las metodologías más efectivas evaluadas en los programas de mejoramiento que se realizan en cultivos ornamentales (Van Tuyl & De Jeu, 2005). Asimismo, en el mejoramiento de cultivos extensivos, actualmente hay una utilización marcada de cruzamientos interespecíficos y/o intergenéricos entre cultivares y especies salvajes para recuperar o incorporar nuevos genes (Shivanna et al., 2005; Handa, 2003).

En el año 2013 se registran las variedades *Nierembergia* Nieve INTA y Cielo INTA.

***Nierembergia* Nieve INTA**



Esta variedad de *Nierembergia* se obtuvo del cruzamiento de un individuo selecto nativo de *Nierembergia linariaefolia* con una variedad comercial (Mont Blanc). Presenta corola blanca de gran tamaño con un pequeño centro amarillo. De aspecto globoso, dado por su porte semi-erguido y ramificaciones en los extremos. Su floración se presenta en primavera verano.

***Nierembergia* Cielo INTA**

Esta variedad de *Nierembergia* se obtuvo del cruzamiento dirigido de individuos selectos de *Nierembergia linariaefolia* originarios de las provincias de Tucumán y Córdoba. Presenta la corola de color lila con un centro amarillo de pequeño diámetro, la planta forma una mata laxa, dado por el porte semi-erguido y el largo de las ramificaciones. Su floración se presenta en primavera verano.



El presente trabajo tiene como objetivo la puesta a punto de protocolos de micropropagación y la conservación *in vitro*, involucrados en el proceso de producción de plantas madre con calidad y sanidad controlada de variedades ornamentales nacionales, obtenidas a partir de recursos genéticos nativos.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Obtención de plantas madre con sanidad y calidad controlada de variedades del género *Nierembergia*.

Objetivos específicos:

Puesta a punto del protocolo de micropropagación, a partir de meristemas de variedades comerciales de *Nierembergia*.

Puesta a punto de protocolos de conservación *in vitro* para corto plazo de variedades comerciales de *Nierembergia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Protocolo de micropropagación a partir de cultivo de meristemas

La puesta a punto del protocolo de micropropagación a partir del cultivo de meristemas se realizó en el laboratorio de cultivo *in vitro* del IF. Se evaluaron diferentes medios de cultivo con base en MS (Murashigue & Skoog, 1962) (Anexo1) adicionado con auxinas y citocininas en diferentes concentraciones.

Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron dos variedades de *Nierembergia*: Nieve INTA y Cielo INTA obtenidas de los planes de mejoramiento realizados en el Instituto con especies nativas, cultivadas en invernáculo de plantas madre con una temperatura entre 24 °C y 15 °C (máxima y mínima), en macetas de 5 L, con sustrato IF.

Preparación de explantes

Se emplearon como explanto, esquejes de 5 cm de longitud, de donde fueron extraídos los meristemas apicales de tamaño 0,2-0,5 mm de longitud mediante bisturí con la ayuda de una lupa binocular (Nikon® SMZ-10) en cámara de flujo laminar. Se realizó la desinfección superficial del material con etanol 70% durante 10 segundos, luego hipoclorito de sodio 0,5% de cloro activo en solución acuosa con gotas de Tween 80 durante 10 minutos en agitación permanente. Por último, bajo campana de flujo laminar, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril en condiciones de asepsia (Kato, et al., 2002).

Tratamientos analizados

El medio de cultivo basal MS sin reguladores de crecimiento, se utilizó como tratamiento control (N1). Los tratamientos N2 al N8 se elaboraron con el medio basal MS adicionado con Ácido naftalénacético (ANA) y/o Kinetina (KIN) en diferentes concentraciones.

Los meristemas fueron introducidos en diferentes medios de cultivo conformados por un medio base más un regulador de crecimiento, de la siguiente manera: MS -testigo-; MS + 0,01 mg l⁻¹ ácido naftalenacético (ANA); MS + 0,025 mg l⁻¹ ácido naftalenacético (ANA); MS + 0,05 mg l⁻¹ ácido naftalenacético (ANA); MS + 0,01 mg l⁻¹ kinetina (KIN); MS + 0,025 mg l⁻¹ kinetina (KIN); MS + 0,05 mg l⁻¹ kinetina (KIN); MS + 0,01 mg l⁻¹ ácido naftalenacético (ANA) + 0,01 mg l⁻¹ kinetina (KIN) (Tabla 2).

Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 30g.l^{-1} de sacarosa y solidificados con 7g.l^{-1} de agar, pH: 5,8 previo a la esterilización para obtener un pH final de 5,6 y dispensados en tubos de ensayo (de 240 x 115 mm) hasta completar 10 ml de medio.

Se introdujo un meristema por cada tubo.

Tabla 2: Composición de medios de cultivos con diferentes concentraciones hormonales.

Código	ANA (mg/l)	KIN (mg/l)
N1	0	0
N2	0,01	0
N3	0,025	0
N4	0,05	0
N5	0	0,01
N6	0	0,025
N7	0	0,05
N8	0,01	0,01

Los meristemas fueron cultivados en cámara de cultivo de 24 ± 2 °C, con una intensidad de luz de 3000 lux y un fotoperiodo de 16 horas.

El ensayo consistió en 8 tratamientos con 12 repeticiones por tratamiento de cada una de las variedades. Los parámetros evaluados fueron, presencia/ausencia de primordios foliares, presencia/ausencia de brotes, presencia/ausencia de plántula, altura de tallo, número de raíces y presencia/ausencia de tejidos necrosados.

Protocolos de cultivo *in vitro* para conservación a corto plazo

Para la conservación a corto plazo se utilizaron los explantos provenientes de la etapa de micropropagación de cultivos de meristemas.

Los explantos de Nieve INTA y Cielo INTA de los medios N1 a N8 de la etapa anterior con tallos que alcanzaron al menos 2 cm de altura y emitieron raíces, fueron subcultivados en tubos de ensayo (de 24,0 x 15,5 mm) con medio MS sin hormonas, continuando su etapa de propagación *in vitro* en cámara de cultivo con temperatura de 24 ± 2 °C y fotoperiodo de 16 hs de luz.

Se realizaron repiques de mantenimiento del material cuando la longitud del tallo del explanto superó los 10 cm de longitud (aproximadamente cada 35 días), el mismo se secciona y subcultiva en tubos de ensayo (24,5 x 15 mm) con medio MS libre de hormonas.

Aclimatación *ex vitro*

El proceso de aclimatación consiste en extraer cuidadosamente la plántula del tubo, lavando sus raíces con agua corriente de canilla para remover cualquier resto de medio de cultivo y ubicarla en maceta N° 8 (8 cm de diámetro por 8 cm de alto) con sustrato de aclimatación (Growmix®).

Las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* tienen ciertas características que obligan a tomar precauciones en el traspaso a condiciones *in vivo*, se debe cubrir cada planta con una bolsa de polietileno transparente a modo de cámara húmeda para su rusticación y ubicarlas en el invernáculo de aclimatación.

Transcurrida una semana se inicia gradualmente la apertura de la bolsa de polietileno hasta retirarla por completo.

Una vez aclimatada, las plantas son llevadas al Invernáculo de Plantas Madre.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cultivo de Meristemas

Realizada la siembra de los meristemas de las variedades Cielo INTA y Nieve INTA, pudo observarse el desarrollo de los primeros primordios foliares en la etapa inicial del cultivo a los 15 días en los tratamientos N1, N2, N3 y N4 adicionados con ANA en sus diferentes concentraciones y en el tratamiento N8 (ANA y KIN) sin necrosamientos en los tratamientos mencionados, a diferencia de los adicionados solo con KIN (N5, N6 y N7), donde se obtuvo un menor porcentaje de formación de primordios y presencia de necrosamiento (Gráfico 1 a, b)

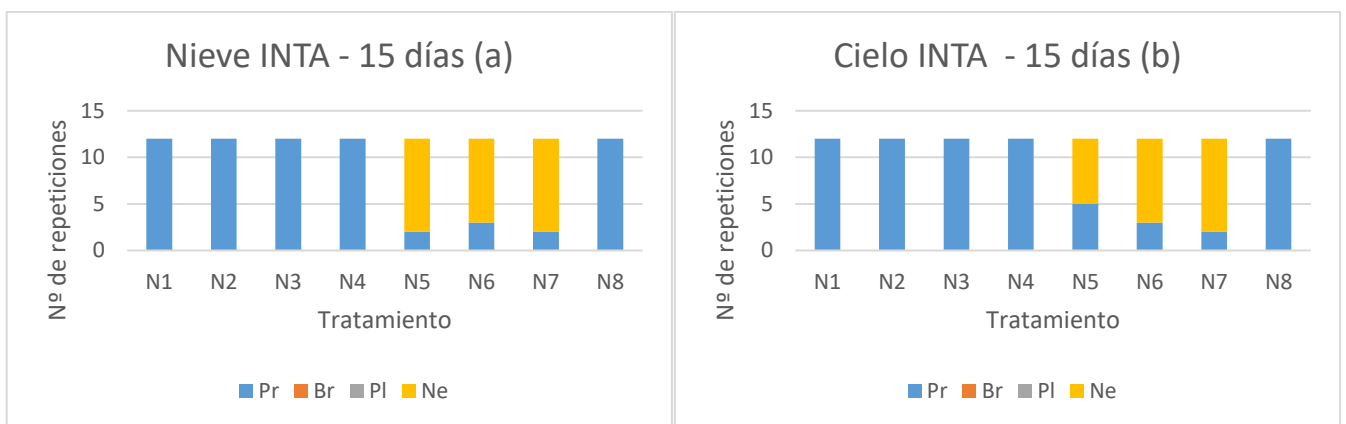


Gráfico 1: Resultados obtenidos de evaluación a los 15 días de cultivo en Nieve INTA (a) y Cielo INTA (b) con todos los tratamientos utilizados. Parámetros: Pr=Primordio; Br=Brote; Pl=Plántula; Ne=Necrosado.

N1: MS -testigo-; N2: MS + 0,01 mg. L⁻¹ (ANA); N3: MS + 0,025 mg. L⁻¹ (ANA); N4: MS + 0,05 mg. L⁻¹ (ANA); N5: MS + 0,01 mg. L⁻¹ (KIN); N6: MS + 0,025 mg. L⁻¹ (KIN); N7: MS + 0,05 mg. L⁻¹ (KIN); N8: MS + 0,01 mg. L⁻¹ (ANA) + 0,01 mg. L⁻¹ (KIN)

A los 60 días de cultivo en Nieve INTA se observó presencia de brotes con 2 hojas en N1 y presencia de brotes con 2 a 4 hojas emisión de raíces en los tratamientos N2, N3, N4 y N8; se advirtió, además, comienzo de elongación del tallo en N3 y N8. En Cielo INTA se vieron en los tratamientos N1, N2, N3 y N4 presencia de brotes con 2 a 4 hojas y elongación de tallo menor a 1 cm en los tratamientos N2, N3, N4 y N8 (Gráfico 2, Figura 1).

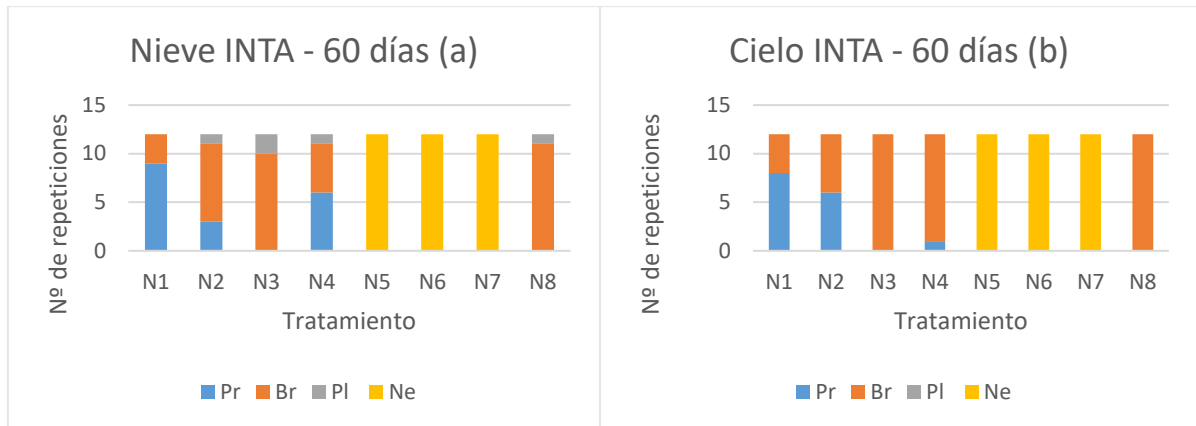


Gráfico 2: Resultados obtenidos de evaluación a los 60 días de cultivo en Nieve INTA (a) y Cielo INTA (b) con todos los tratamientos utilizados. Parámetros: Pr=Primordio; Br=Brote; Pl=Plántula; Ne=Necrosado.

N1: MS -testigo-; N2: MS + 0,01 mg. L⁻¹ (ANA); N3: MS + 0,025 mg. L⁻¹ (ANA); N4: MS + 0,05 mg. L⁻¹ (ANA); N5: MS + 0,01 mg. L⁻¹ (KIN); N6: MS + 0,025 mg. L⁻¹ (KIN); N7: MS + 0,05 mg. L⁻¹ (KIN); N8: MS + 0,01 mg. L⁻¹ (ANA) + 0,01 mg. L⁻¹ (KIN)

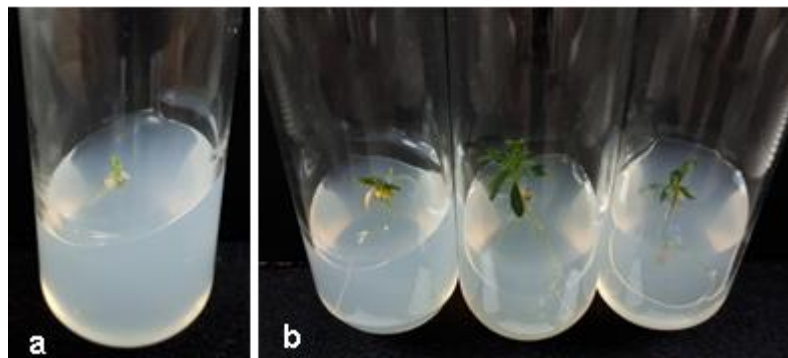


Figura 1: Desarrollo de explantos de *Nierembergia* Nieve INTA proveniente de meristemas. a) presencia de primordios foliares a los 15 días de la siembra. b) presencia de brotes a los 60 días de la siembra.

Cabe destacar un 100% de formación de brotes en los tratamientos N3 y N8 y aparición de necrosamiento total de los tratamientos adicionados con KIN (N5, N6 y N7) para ambas variedades (Gráfico 2 a, b).

A los 90 días de cultivo se observó en Nieve INTA regeneración de planta completa con superficie radicular y elongación de tallo superior a 1 cm de altura en los tratamientos N2, N3 y N8, siendo N3 el de mayor número de plantas completas en 9 de los 12 tubos del tratamiento (75%) con un promedio de 1,1 cm de elongación de tallo, 9 hojas y 1,5 raíces por plántula, seguido por el tratamiento N2 con 8 tubos (66,7%), N8 y N4 con 6 (50%) y 5 (41,6%) tubos respectivamente (Tabla 3, Gráfico 3a).

Tabla 3: Nieve INTA a 90 días de cultivo con todos los tratamientos. Tallo: promedio de longitud del tallo en cm; Hoja: promedio de número de hojas; Raíz: promedio de número de raíces. N1: MS -testigo-; N2: MS + 0,01 mg. L⁻¹ (ANA); N3: MS + 0,025 mg. L⁻¹ (ANA); N4: MS + 0,05 mg. L⁻¹ (ANA); N5: MS + 0,01 mg. L⁻¹ (KIN); N6: MS + 0,025 mg. L⁻¹ (KIN); N7: MS + 0,05 mg. L⁻¹(KIN); N8: MS + 0,01 mg. L⁻¹ (ANA) + 0,01 mg. L⁻¹ (KIN).

TRATAMIENTO/ PARÁMETRO	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8
PRIMORDIO	6	3	0	1	0	0	0	0
BROTE	6	1	3	6	0	0	0	6
PLÁNTULA	0	8	9	5	0	0	0	6
TALLO	0	1,0	1,1	0,5	0	0	0	1,0
HOJA	0,5	7,8	9	4,8	0	0	0	7
RAÍZ	0	1,7	1,5	0,4	0	0	0	0,8
NECROSADO	0	0	0	0	12	12	12	0

Para la variedad Cielo INTA, fue necesario esperar hasta los 100 días para la regeneración de planta completa en los tratamientos N2, N3, N4 y N8, donde se observa importante desarrollo de la superficie radicular y de los tallos.

En el tratamiento N3 se obtuvo el mayor número de plantas completas en un 67% de los tubos (8 de 12), con promedios de: elongación del tallo superior a 1 cm de altura (1,2 cm), 7,8 hojas y 0,7 raíces; seguido por los tratamientos N2 y N8 con 6 tubos (50%) y N4 con 3 plántulas regeneradas (25%) (Tabla 4, Grafico 3b).

Tabla 4: Cielo INTA a 90 días de cultivo con todos los tratamientos. Tallo: promedio de longitud del tallo en cm; Hoja: promedio de número de hojas; Raíz: promedio de número de raíces. N1: MS -testigo-; N2: MS + 0,01 mg. L⁻¹ (ANA); N3: MS + 0,025 mg. L⁻¹ (ANA); N4: MS + 0,05 mg. L⁻¹ (ANA); N5: MS + 0,01 mg. L⁻¹ (KIN); N6: MS + 0,025 mg. L⁻¹ (KIN); N7: MS + 0,05 mg. L⁻¹(KIN); N8: MS + 0,01 mg. L⁻¹ (ANA) + 0,01 mg. L⁻¹ (KIN).

TRATAMIENTO/ PARÁMETRO	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8
PRIMORDIO	8	5	0	1	0	0	0	0
BROTE	4	1	4	8	0	0	0	6
PLÁNTULA	0	6	8	3	0	0	0	6
TALLO	0,12	0,71	1,24	0,82	0	0	0	0,98
HOJA	1	5,33	7,83	5,17	0	0	0	6,5
RAÍZ	0	0,67	0,67	0,25	0	0	0	0,75
NECROSADO	0	0	0	0	12	12	12	0

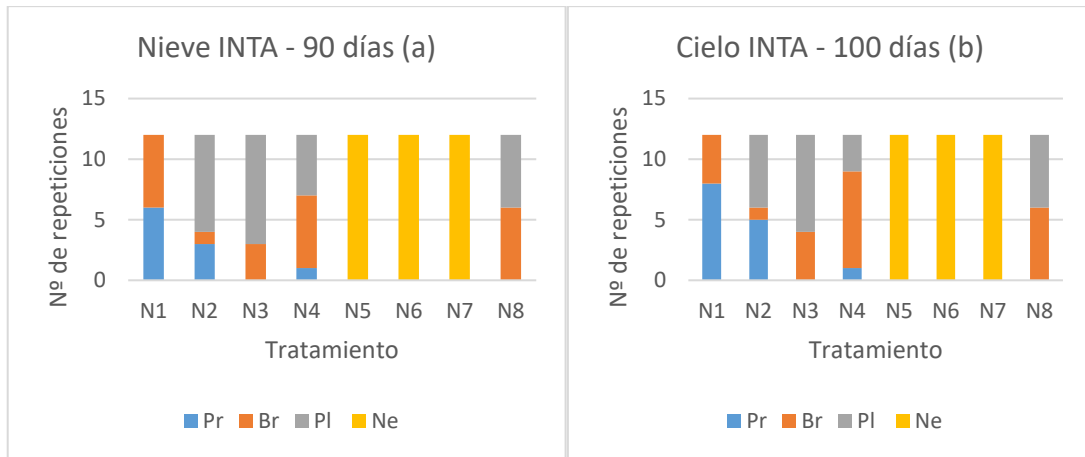


Gráfico 3: Resultados obtenidos de evaluación a los 90 días de cultivo en Nieve INTA (a) y 100 días (b) de cultivo en Cielo INTA. Parámetros: Pr=Primordio; Br=Brote; Pl=Plántula; Ne=Necrosado

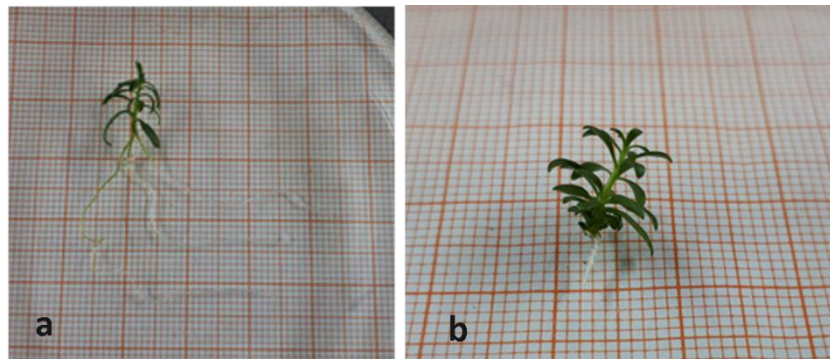


Figura 2: Planta completa (tallo y raíz) de *Nierembergia* a 90 y 100 días de desarrollo a) Nieve INTA y b) Cielo INTA.

El ensayo de cultivo de meristema se llevó a cabo en un lapso de 90 días para Nieve INTA y de 100 días para Cielo INTA. En este período de tiempo, se realizó la renovación de medio de cultivo cada 35 días, respetando las concentraciones hormonales de los 8 tratamientos, descartando las raíces -en los casos que hubiera- y manteniendo las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad.

En ningún tratamiento se observó la presencia de callos.

Conservación a Corto Plazo

De las plántulas obtenidas en todos los tratamientos del cultivo de meristemas de Nieve INTA y Cielo INTA se seleccionaron aquellas que presentaron iguales condiciones de desarrollo de tallos y raíces para ser subcultivadas en medio basal MS (Tabla 5 y 6).

Tabla 5: Explantos de Nieve INTA a los 100 días de cultivo. Tallo - long: longitud del tallo en cm; Hoja - n°: número de hojas; Raíz - n°: número de raíces.

Explanto	Tallo - long	Hoja - n°	Raíz - n°
1	2	10	2
2	2,5	12	3
3	2,5	12	3
4	2	10	2
5	2,5	12	3
6	2	10	2
7	2,5	12	3
8	2	10	2
9	2,5	12	3
10	2	10	2
11	2,5	12	3
12	2	10	2
13	2,5	12	3
14	2	10	2
15	2,5	12	3

Tabla 6: Explantos de Cielo INTA a los 110 días de cultivo. Tallo - long: longitud del tallo en cm; Hoja - n°: número de hojas; Raíz - n°: número de raíces.

Explanto	Tallo - long	Hoja - n°	Raíz - n°
1	2	10	2
2	2	10	2
3	2	10	2
4	2,5	12	3
5	2	10	2
6	2,5	12	3
7	2	10	2
8	2,5	12	3
9	2,5	12	3
10	2	10	2
11	2,5	12	3
12	2,5	12	3
13	2,5	12	3
14	2,5	12	3

El seguimiento del material se realizó cada 15 días, observándose que las plántulas no presentarían inconvenientes en su desarrollo.

Los explantos con tallos de 10 cm de longitud se los propagó seccionando cada 3 cm por esqueje -sin raíces-, logrando mantener un plantel de 24 plántulas de cada variedad (Tabla 7 y 8; Figura 3 y 4).

Para la preservación del plantel *in vitro*, se realizaron repiques sucesivos cada 35 días aproximadamente, tiempo en que las plántulas alcanzan una altura de alrededor de 10 cm, en las mismas condiciones de cultivo.

Tabla 7: Nieve INTA a 125 días de crecimiento en medio basal MS.

Explanto	Tallo - long	Hoja - n°	Raíz - n°
1	10	46	4
2	12	50	6
3	12	50	6
4	10	46	4
5	12	50	6
6	10	44	4
7	12	50	6
8	10	46	4
9	12	50	6
10	10	44	4
11	12	50	6
12	10	46	4
13	12	52	6
14	10	46	4
15	12	50	6

Tabla 8: Cielo INTA a 135 días de crecimiento en medio basal MS.

Explanto	Tallo - long	Hoja - n°	Raíz - n°
1	10,5	44	4
2	11	46	4
3	10,5	44	4
4	12	50	6
5	11	46	4
6	12	50	6
7	10,5	44	4
8	12	50	6
9	12	50	6
10	11	46	4
11	12	50	6
12	12	50	6
13	12	50	6
14	12	50	6



Figura 3: Propagación *in vitro* a 15 días de subcultivo de *Nierembergia* Nieve INTA.



Figura 4: Propagación de explantos de *Nierembergia* Nieve INTA y Cielo INTA en cámara de Cultivo a 24 ± 2 °C y fotoperiodo de 16 horas de luz

Las plantas obtenidas que continuaron a la siguiente etapa de cultivo *ex vitro*, fueron trasplantadas a macetas N°8 con sustrato de aclimatación y rusticadas en condiciones controladas de temperatura para que se aclimaten gradualmente al nuevo ambiente y al cultivo en el invernáculo de aclimatación para pasar, posteriormente, al invernáculo de Plantas Madre para su propagación (Figuras 5 y 6).



Figura 5: Material de *Nierembergia* Nieve INTA y Cielo INTA en invernáculo de aclimatación durante la etapa de rusticación.



Figura 6: Material de *Nierembergia* en Invernáculo de Plantas Madre destinados a la Producción a) Nieve INTA b) Cielo INTA.

Los resultados obtenidos del cultivo de meristemas con los diferentes tratamientos, muestran que la regeneración de plantas completas se dio en el medio N3 (MS + 0,025mg^l⁻¹ ANA) siendo éste el que produjo los mejores resultados, observándose en Nieve INTA a los 60 días de cultivo, comienzo de desarrollo de brotes y aparición de raíces, obteniendo el 75% de plantas completas a los 90 días, mientras que el 67% de regeneración de planta completa en Cielo INTA se obtuvo a los 100 días, considerándolo como el medio seleccionado para la obtención de plantas *in vitro* por cultivo de meristemas de *Nierembergia*.

Estos datos son similares a los obtenidos en *Nierembergia* Estrella INTA JICA y Luna INTA JICA, donde se logró el mayor porcentaje de regeneración de plantas con la adición de ANA al medio de cultivo MS (Soto, et al., 2005).

Es llamativo el gran porcentaje de necrosamiento de los explantos en los tratamientos N5, N6 y N7 con las diferentes concentraciones de citocininas (KIN) ya que ésta promueve la división y diferenciación celular, lo cual debería favorecer la formación de tallos. (Kato et al., 2006). Estos necrosamientos podrían ser originados por la presencia de compuestos fenólicos exacerbados por la hormona, ocasionando la oxidación del material vegetal (Azofeifa, 2009; Matos Acureiro y Sanchez, 2011).

En la etapa de corto plazo, los explantos no presentaron inconvenientes en su establecimiento en el medio basal MS permitiendo mantener el material en conservación *in vitro*, aclimatarlo y abastecer los requerimientos del plantel de plantas madre.

Dentro de las dos variedades de *Nierembergia* utilizadas en el presente trabajo, se observó una diferencia de 10 días en los tiempos de desarrollo *in vitro* hasta obtener la plántula completa para ser utilizada en la etapa de conservación a corto plazo (Figura 8). Esta diferencia puede deberse a los diferentes parentales utilizados en los cruzamientos para la obtención de las variedades de *Nierembergia* Nieve INTA y Cielo INTA (Escandón et al., 2007).

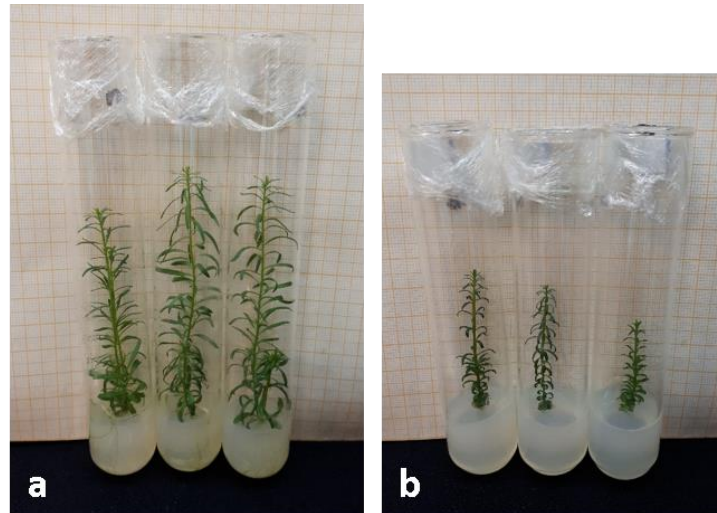


Figura 7: Diferencia en el desarrollo *in vitro* a 135 días de cultivo en *Nerembergia* a) Nieve INTA, b) Cielo INTA

CONCLUSIONES

Este estudio representa un avance significativo en el desarrollo de métodos de propagación *in vitro* para las variedades de Nierembergia, Nieve INTA y Cielo INTA. El establecimiento de un protocolo eficiente de micropropagación a través del cultivo de meristemas ha demostrado ser prometedor, especialmente con el tratamiento N3 (MS + 0,025 mg/L ANA), que ha mostrado ser óptimo para la multiplicación de brotes con un promedio de 4,5 brotes por explanto a los 30 días.

Además, hemos logrado establecer un protocolo de cultivo *in vitro* para la conservación a corto plazo de ambas variedades. Al utilizar un medio MS sin hormonas y realizar repiques cada 35 días, hemos podido mantener la calidad y la sanidad de las plantas madre en el invernadero, asegurando su disponibilidad para su propagación.

El protocolo de regeneración a partir de meristemas desarrollado para las dos variedades de Nierembergia tiene implicaciones aún más amplias. Más allá de su aplicación en la multiplicación de plantas, este protocolo tiene el potencial de ser utilizado para el saneamiento de plantas infectadas por virus, lo que es esencial para obtener plantas sanas y de alta calidad en la producción comercial de flores y plantas ornamentales.

Este estudio no solo proporciona herramientas prácticas para la producción de plantas, sino que también tiene importantes implicaciones económicas y ambientales. La capacidad de propagar masivamente las variedades Nieve INTA y Cielo INTA no solo aumentará su disponibilidad en el mercado argentino y extranjero, sino que también contribuirá a la conservación del germoplasma y a la diversidad genética de estas especies.

En última instancia, este estudio sienta las bases para futuras investigaciones en el género Nierembergia y contribuye al avance de la floricultura argentina. Al proporcionar métodos eficaces y sostenibles para la propagación de plantas, así como para la conservación del germoplasma y el saneamiento de plantas enfermas, este estudio tiene el potencial de impactar positivamente en la industria florícola nacional.

REFERENCIAS

- Alderete L M. 2010. Desarrollo de metodologías para la producción *in vitro* de especies nativas de *Glandularia* libre de virus. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/6013>
- Afanador Perez A M. 2005. Propagación *in vitro* a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L. (clavel)
- Azofeifa Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía Mesoamericana, Vol. 20, Núm. 1, pp. 153-175. Universidad de Costa Rica. <https://www.redalyc.org/pdf/437/43711514016.pdf>
- Barboza G, Romanutti A. 1999. *Solanaceae*: 1059-1114. En Eds. Zuloaga, F.O.; Morrone, O. Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II. Missouri Botanical Garden press.
- Blanke, M M., Belcher A R. 1989. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 19; 85-89
- Cocucci A A, Hunziker A T. 1995. Flora Fanerógama Argentina. Pugliese Siena S.R.L. Córdoba.
- Conci V. 2004. Obtención de plantas libres de virus. En Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. (Eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal 8(5):303-312. Ediciones INTA.
- Essau, K. 1985. Anatomía Vegetal. Ed. Omega S.A. Barcelona 777 pp.
- Escandón A, Pérez de la Torre M, Soto M S, Zelener N, Marcucci Poltri S. 2005. Identificación de clones selectos de *Nierembergia linariaefolia* mediante microsatélites anclados. RIA 34 (1): 5-17.
- Escandón A S, Zelener N, Pérez de la Torre M, Soto M S. 2007. Molecular identification of new varieties of *Nierembergia linariaefolia* (Graham), a native Argentinean ornamental plant. J Appl Genet 48(2). pp. 115-123.
- Facciuto G, Soto M S, Maldonado S. 2007. Domestication and Breeding of Ornamental Plants Native to Argentina: The Cases of *Tabebuia* and *Nierembergia* Genera. Global Science Books.

- Handa T, Kita K, Kurashige Y, Yukawa T. 2003. Molecular Phylogeny as a guide for Breeding of ornamental: The Case of Study *Menziesia* and *Dendrobium*. *Acta Horticulturae*. 621: 155-163.
- Kato A E, Escandón A, Facciuto G R. 2002. Aplicaciones del Cultivo *in vitro* en Especies Ornamentales. CETEFFHO – INTA.
- Kato A E, Mori M, Dacunto L, Acosta C y Hagiwara J C. 2006. Biotécnicas Aplicadas a *Calibrachoa variabilis*. *Agro Sur* 34(1-2): 57-58.
- Matos Acurero Á, Sánchez A. 2011. Evaluación de reguladores de crecimiento para la inducción de callo en *Aloe vera* L. *Multiciencias*, Vol. 11, N° 1 (7 - 14)
- Morisigue D E, Mata D A, Facciuto G, Bullrich L. 2012. FLORICULTURA, Pasado y Presente de la Floricultura en la Argentina. Ediciones INTA.
- Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. PI* 15: 437-497.
- Navarro Lucas L. 1979. Microinjertos de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas de agrios libres de virus. Ministerio de Agricultura. Bol. Serv. Plagas 5:127-148. Valencia. España.
- Pérez de la Torre M, Escandón A, Hagiwara J C, Miyajima I. 2004. Construcción de un perfil de identificación de nuevas variedades de *Tecoma* mediante microsatélites anclados. II Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. VI Jornada de Floricultura, Buenos Aires, Argentina
- Razdan M K. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture, 2° ed. Enfield, New Hampshire, USA. 375pp.
- Roca W M, Arias D I y Chávez R. 1991. Capítulo 31: Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Roca WM y Mroginski LA (eds). Cali, Colombia. pp 697-713.
- Roca W M., Mroginski L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Cali Colombia. 969pp.

- Shivanna K R. 2005. Barriers to hybridization. En: Shivana, K R Sawhney V K. eds. Pollen biotechnology and Crop Production and Improvement. Cambridge: Cambridge University Press.
- Shizukawa Y, Mii M. 1997. A simple and efficient plant regeneration system for leaf protoplasts of *Nierembergia repens* by inducing single shoots on the microcolonies. Plant Cell Reports 16:545-549.
- Skoog F, Miller C. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. Vitro Symp Soc Exp Biol.
- Soto S, Neumann R, Facciuto G, Hagiwara J C, Nishiyama K, Escandón A, Suárez E. 2003. Recolección de especies con valor ornamental en el Noroeste. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 38.
- Soto S, Miyajima I, Bullrich L, Mata D, Facciuto G, Serpa J C, Hagiwara J C, Morisigue D. 2004. Evaluación de cuatro clones selectos de *Nierembergia linariaefolia* desarrolladas en Argentina bajo condiciones de producción. En Acta II Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales, Buenos Aires, Argentina.
- Soto M S, Mori M N, Facciuto G R, Kato A E. 2005. Cultivo de meristemas de Estrella INTA-JICA y Luna INTA-JICA, dos variedades de *Nierembergia linearifolia*. Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y El Caribe. Montevideo. Uruguay.
- Soto M S. 2007. Estudios de las relaciones interespecíficas en el género *Nierembergia*, como herramienta del mejoramiento.
https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n4146_Soto.pdf
- Suarez E, Nishiyama K, Facciuto G, Escandón A, Soto S, Hagiwara J C, Mata D, Miyajima I, Kobayashi N. 2003. The Horticulture development Project INTA JICA. V International Symposium on New Floriculture Crops. Iguazu-Fall. Brasil.
- Sutter E and Langhans R W. 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. J. Am. Soc. Hort. Sci. 104:493-496.
- Thorpe T and Stasolla C. Chapter 12 Somatic embryogenesis. In Plant Physiology Research Group, Department of Biological Sciences, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.
- Tombión, L. 2023. El cultivo de tejidos vegetales y su empleo en plantas y cultivares ornamentales INTA. Instituto de Floricultura. CIRN-CNIA. INTA.
https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/bitstream/handle/20.500.12123/15686/INTA_CIRN_Insti

[tutodeFloricultura Tombion El cultivo de tejidos vegetales y su%20 empleo.pdf?sequence=2&isAllowed=y](#)

Van Tuyl J M, De Jeu M J. 2005. Methods for overcoming interespecific crossing Barriers. En: Shivana, k R Sawhney V K. Eds. Pollen biotecnology and Crop Production and Improvement. Cambridge: Cambridge University Press, 273- 292.

Walkey D. 1991. Applied Plant Virology. 2nd edition. Chapman and Hall, London.

Wilkins H, Anderson N O. 2006. Creation of New Floral Products. Annualization of perennials. Horticulture and commercial Significance. En: Anderson N O ed. Flowers Breeding and Genetic. Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century. Minnesota: Springer.

ANEXOS

Anexo 1. Composición de medio basal MS (Murashige & Skoog, 1962)

Componentes

Macroelementos	mg l⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microelementos	mg l⁻¹
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
Na ₂ ·EDTA	37,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
Vitaminas / Orgánicos	mg l⁻¹
Mio-Inositol	100
Ac. Nicotínico	0,5
Piridoxina HCl	0,5
Tiamina HCl	0,1
Glicina	2,0
Sacarosa	30g
pH	5,8

Anexo 2

Definiciones

Agar: producto obtenido (polisacárido) a partir de algas que se utiliza para solidificar medios nutritivos.

Agua destilada: agua producida por destilación, que no contiene compuestos orgánicos e inorgánicos.

Asepsia: conjunto de métodos destinados a preservar de gérmenes infecciosos al material biológico, el instrumental y el equipo.

Autoclave: aparato en el cual se esterilizan, por medio de vapor de presión, los medios nutritivos, instrumental de vidrio, etc.

Auxinas: grupo de hormonas vegetales naturales o sintéticas que producen elongación celular y en algunos casos, división celular, frecuentemente inducen a la aparición de raíces adventicias e inhiben el desarrollo de yemas adventicias.

Banco de Germoplasma: colección de todo el patrimonio genético de una especie, mantenido con la finalidad de preservar a su variabilidad

Biotecnología: conjunto de técnicas donde se utilizan organismos vivos o alguno de sus componentes para obtener un producto. Abarca el cultivo de tejidos vegetales, cultivo de tejidos animales, ingeniería genética, etc.

Callos: tejido no organizado formado por células diferenciadas o desdiferenciadas que se dividen en forma activa y que generalmente se originan en zonas dañadas por heridas o en cultivo de tejidos.

Citocininas: grupo de hormonas vegetales naturales o sintéticas que inducen la división celular y frecuentemente la formación de yemas adventicias. En la mayor parte de los casos inhiben la formación de raíces adventicias.

Explanto: porción aislada de una planta que puede ser un protoplasto, una célula, tejido u órgano puesto en cultivo *in vitro*.

Estéril: medio u objeto que no contiene microorganismos perceptibles o viables. Son necesarias pruebas de esterilidad para comprobación.

Flujo Laminar: cámara para inoculación que se mantiene estéril por medio de flujo turbulento y continuo de aire estéril.

Fotoperiodo: número de horas de luz de cada ciclo de 24hs, duración relativa del día y noche (luz u oscuridad).

Germoplasma: La variabilidad genética total, representada por células germinales, disponibles para una población particular de organismos

Growmix®: sustrato compuesto a base de turba, compost de corteza fina, perlita y base de fertilización.

Hormona: sustancia orgánica que se produce en la planta y que a bajas concentraciones promueve el crecimiento, lo inhibe o lo modifica cuantitativamente, generalmente en un lugar diferente de donde se origina.

In vitro: literalmente en vidrio, en tubo de ensayo, matraz, etc. Se aplica al cultivo estéril de organismos, tejidos, células y órganos en recipientes en laboratorio.

Macronutrientes (macroelementos): grupo de elementos esenciales como N, P, K, Ca y Mg necesarios en cantidades relativamente altas.

Medio básico: medio de cultivo formado por macro y micronutrientes sin reguladores de crecimiento.

Meristema: conjunto de células en división en el ápice de raíz o vástago (meristema primario), en el cambium intercalar de las yemas, hojas y flores (meristema secundario)

Micronutrientes (microelementos): grupo de elementos como el Fe, B, Zn, Mo, Mn, etc., que son importantes en cantidades relativamente pequeñas para la nutrición inorgánica de las plantas.

Micropropagación: propagación vegetativa de plantas *in vitro*

Órgano: parte de una planta que tiene función específica, ejemplo: raíz, tallo, hoja, flor, fruto, etc.

Organogénesis: formación de órganos (caulogénesis, iniciación de brotes y rizogénesis, iniciación de raíces)

Primordio: grupo de células que dan origen a un órgano

Subcultivo: transferencia del inoculo a un medio de cultivo fresco

Totipotencia: es el fenómeno por el cual las células somáticas provienen de diferentes partes de la planta, dadas las condiciones apropiadas, pueden desarrollarse en una planta completa.