

## ANEXO I

### **OBJETIVO GENERAL**

1. Optimizar y aplicar protocolos de micro y macropropagación de especies nativas de la flora bonaerense.
2. Producir material vegetal de propagación (sexual, asexual por macro y micropropagación)

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Compilar antecedentes y bibliografía.
2. Seleccionar a campo plantas madre y fuentes donantes de explantes.
3. Establecer un jardín clonal como fuente de explantes y ensayos de macropropagación.
4. Colectar semillas y evaluar su poder germinativo.
5. Introducir bajo condiciones *in vitro* diferentes tipos de explantes.
6. Inducir respuestas morfo génicas por diferentes vías (organogénesis y embriogénesis)
7. Desarrollar, adoptar o adaptar tecnologías automatizadas para el escalamiento de la producción de plantas (biorreactores)
8. Enraizar y obtener plantas completas
9. Determinar las condiciones de aclimatación y rusticación.
10. Desarrollar fichas técnicas de propagación para cada especie.
11. Capacitar y entrenar recursos humanos especializados en micropropagación de plantas para el funcionamiento de biofábricas.

### **METODOLOGÍA DE TRABAJO**

La metodología contempla varias etapas:

#### **Etapas 0.**

Puesta en marcha y ajuste del laboratorio (post ASPO)

#### **Etapas 1 (objetivos específicos 1-4)**

Consiste en la recolección georreferenciada de germoplasma a campo, que se conservará acondicionado en el LIMAD; la identificación, registro y caracterización de los individuos seleccionados como fuentes donantes de propágulos y la construcción de un jardín de propagación. Se aplicarán normas ISTA para semillas. Se utilizará la macropropagación, para generar huertos clonales que proporcionen material seleccionado.

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

Es muy importante conocer la fenología de cada una de las especies con las que se trabajará para determinar el momento más adecuado para coleccionar germoplasma, organizar calendarios y planificar actividades.

En esta etapa se propagarán las siguientes especies: *Erythrina crista-galli* (seibo), *Salix humboldtiana* (sauce criollo), *Scutia buxifolia* (coronillo), *Acacia caven* (espinillo), *Parkinsonia aculeata* (cina-cina), *Jodinia rhombifolia* (sombra de toro), *Citharexylum montevidense*, por semillas y por macropropagación de estacas.

## **Etapas 2 (objetivos específicos 5-9)**

### **Micropropagación.**

a. *Elección, acondicionamiento y desinfección del explante.* El éxito de un sistema de micropropagación está determinado por la calidad del explante a utilizar. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes (Levitus *et al.*, 2010). Los explantes serán debidamente acondicionados y desinfectados mediante inmersiones seguidas en diferentes soluciones como etanol 70% (v/v), hipoclorito de Sodio, peróxido de hidrógeno, agentes tenso activos, entre otras. Las concentraciones y tiempos de inmersión se ajustarán para cada caso.

b. *Optimización del medio de cultivo:* según los antecedentes del grupo de trabajo, los medios de Woody Plant Medium-WPM (Lloyd & McCown 1981) y Murashige & Skoog-MS (Murashige & Skoog 1961) han sido apropiados para iniciar el cultivo de tejidos de varias especies nativas leñosas. Por ello, inicialmente se utilizarán estos medios de cultivo y en caso de requerir otra formulación, se probarán otros medios comerciales como el B5 (Gamborg 1968), entre otras alternativas.

c. *Regulación hormonal exógena:* se realizarán diferentes tratamientos con diferentes reguladores de crecimiento de acuerdo a la respuesta esperada, en distintas concentraciones y combinaciones.

d. *Incubación de los cultivos:* los cultivos se incubarán de acuerdo a la información bibliográfica de cada especie o se ajustará en cuarto de cultivo bajo condiciones ambientales adecuadas (fotoperiodo/oscuridad y temperaturas) de acuerdo a la respuesta morfogénica inducida y a la etapa de desarrollo.

e. *Inducción de respuestas morfogénicas* por diferentes vías (organogénesis y embriogénesis) Inicio de la morfogénesis. En esta etapa es fundamental el medio de cultivo, que contiene las sustancias necesarias para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. Para la multiplicación se utilizan diferentes balances de reguladores de crecimiento con la finalidad de multiplicar el material.

Esta **segunda etapa** abarca, también, la introducción de técnicas automatizadas, incluyendo el uso de sistemas de inmersión temporal (Objetivo específico 7).

*Escalamiento de la multiplicación. Biorreactores.* Ajuste del protocolo de micropropagación por método convencional primero, para iniciar, posteriormente el proceso de propagación vía biorreactor de inmersión temporal. Puesta a punto de los reactores de inmersión temporal tipo SIT.

En la etapa de multiplicación del material se ajustará el protocolo para su cultivo bajo las condiciones del sistema de inmersión temporal tomando en cuenta las consideraciones indicadas por Debiasi (2011), como la densidad de siembra inicial, condiciones de cultivo (fotoperiodo, intensidad lumínica y temperatura), duración de cada etapa o ciclo del cultivo (multiplicación, elongación y enraizamiento), frecuencia y período de inmersión, intensidad y período de aireación, recambio del medio de cultivo y demás parámetros que hacen al ajuste fino de un protocolo de cultivo para cada especie en particular.

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

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

En esta etapa, se comenzará en una primera instancia con la micropropagación de *Salix humboldtiana* (sauce criollo) y *Erythrina crista-galli* (seibo) y se continuará con la propagación *in vitro* de *Acacia caven* (espinillo), *Parkinsonia aculeata* (cina-cina) y *Lonchocarpus nitidus* (bugre).

### **Etapa 3 (objetivos específicos 10-11)**

- Desarrollo de protocolos y fichas. Los resultados se volcarán en fichas de protocolos y propagación por las diferentes vías ajustadas
- Transferencia y difusión del conocimiento y tecnología obtenidos.
- Organización de jornadas técnicas



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

- Capacitación de recursos humanos, mediante pasantías, cursos y talleres de capacitación en la propagación de especies vegetales.
- Redacción de Informes.

## EQUIPAMIENTO

Desde el año 1980 se desarrollan en la FCAyF trabajos de propagación de especies forestales, aromáticas, medicinales, ornamentales, frutales y alimenticias. El ex Centro Experimental de Propagación Vegetativa (C.E.Pro.Ve.) pertenece al Laboratorio de Investigación en Maderas (LIMAD) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Fue creado en el año 1983 como resultado de un convenio con el Ministerio de la Producción - Dirección de Desarrollo Forestal de la Provincia de Buenos Aires con el 1er Programa nacional de Biotecnología y con el apoyo de la CIC y UNLP, con la finalidad de aplicar técnicas de reproducción asexual para la producción masiva de especies forestales. En el C.E.Pro.Ve. se ha trabajado con diversas especies nativas forestales, ornamentales, alimenticias, aromáticas, medicinales, fitorremediadoras y leñeras. El ex C.E.Pro.Ve. (FCAyF - UNLP) cuenta en sus instalaciones con la infraestructura necesaria para llevar a cabo las tareas programadas en esta investigación.

**Sala de esterilización:** Aquí se realizan las tareas de desinfección del material vegetal, esterilización del material de vidrio e instrumental y la preparación de los medios de cultivo.

**Equipo disponible:** Bidestilador, autoclave, estufa, microondas, lavavajillas, balanza de precisión, agitador, freezer, heladera, pH metro, instrumental menor de vidrio, instrumental menor de disección, stock de drogas (macro y micronutrientes, compuestos orgánicos reguladores de crecimiento, etc.).

**Sala de transferencia y cámara de cultivo:** En esta dependencia se manipula el material asépticamente, para ello se cuenta con una campana de flujo laminar. La cámara climatizada reúne las condiciones ambientales requeridas para el cultivo de tejidos *in vitro*.

**Invernáculo:** Equipado para desarrollar las técnicas de macropropagación, de rusticación y aclimatación de las plántulas provenientes del cultivo *in vitro* de tejidos.

## DEPENDENCIAS DE APOYO

**Sala de microscopía:** En éste lugar se realizan las técnicas histológicas y microscópicas que sirven de complemento en las diferentes investigaciones que se llevan adelante en este centro. Este módulo cuenta con equipo de microscopía, fotografía y video.

**Biblioteca:** La tarea de búsqueda bibliográfica se realizará en forma personales la consulta a bases de datos, visita a bibliotecas, pedidos a Instituciones, contacto personal y correspondencia con profesionales del área.

**Sala de computación.**

**Campo Experimental EEJH y Vivero forestal de la FCAyF.**

## PERSONAL INVOLUCRADO

Responsable

- Dra. Sandra Sharry



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Contacto: [ssharry@gmail.com](mailto:ssharry@gmail.com)

Técnicas - Personal de Apoyo

- Lic. Marina Adema
- Lic. Blanca Villarreal

Estudiantes pasantes:

- Tatiana Cinquetti
- Mariano Velázquez

### CRONOGRAMA DE TRABAJO

Actividades	AÑO 2021											
	Meses											
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Puesta en marcha y ajuste del laboratorio												
Compilación de antecedentes y bibliografía												
Selección a campo plantas madres y fuentes donantes de explantes, colecta de semillas.												
Ensayos de macropropagación												
Propagación <i>in vitro</i> de especies seleccionadas												
Escalamiento de la etapa de multiplicación de plantas. Biorreactores												
Desarrollo de protocolos y fichas técnicas de propagación para cada especie												
Capacitación y entrenamiento de recursos humanos en micropropagación de plantas (cursos, talleres)												
Redacción de informes												

## DESCRIPCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL PRESUPUESTO

Presupuesto mensual	
Rubro	Monto (en pesos)
Gastos operativos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• insumos, drogas *<sub>1</sub></li> <li>• material de invernadero *<sub>2</sub></li> <li>• material de vidrio y descartables. *<sub>3</sub></li> <li>• material de librería e informáticos</li> <li>• viajes y viáticos</li> <li>• publicación de resultados</li> </ul>	30.000
Sueldos <ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnico Profesional: Villarreal, Blanca</li> <li>• Técnico Profesional: Adema, Marina</li> </ul>	40.000 40.000
<b>TOTAL MENSUAL</b>	110.000

\*<sub>1</sub> Insumos /Drogas

- medio basal de cultivo MS, WPM, Gamborg's.
- reguladores de crecimiento BAP, ANA.
- fungicidas
- fertilizante
- agar (agente gelificante)
- hidróxido de sodio
- ácido clorhídrico
- alcohol etílico 96 x1000cc
- agua oxigenada 100Vol
- tween 20 (emulsionante no iónico)
- lavandina
- detergente limpiador neutro
- sacarosa
- azúcar común

\*<sub>2</sub> Material de invernadero.

- macetas plásticas, bandejas.
- sustrato (tierra fértil, vermiculita, perlita, etc)

\*<sub>3</sub> Material de vidrio y descartables

- rollo papel de secar
- barbijos
- guantes de látex, descartables
- algodón hidrófilo
- marcadores indelebles permanentes
- banditas elásticas
- hojas de bisturíes
- pinzas
- placas de Petri
- tubos
- bolsas plásticas (de arranque)
- vasos y bandejas plásticas, descartables

## TAREAS DESARROLLADAS EN 2021

Desde el mes de Abril hasta el mes de Julio de 2021 se han realizado las siguientes tareas:

### Avances en la puesta en marcha y ajuste del laboratorio (post ASPO).

- Limpieza y acondicionamiento del laboratorio.
- Inventario de drogas, compuestos químicos, soluciones y material de laboratorio.
- Acondicionamiento de la cámara de cultivo: reemplazo de luces, colocación de placas antihumedad.
- Relevamientos de equipos del laboratorio: mantenimiento de la campana de flujo laminar, instalación y puesta en funcionamiento de una nueva autoclave, Ph-metro, reemplazo de destilador.
- Limpieza del Invernadero.
- Pedido de presupuestos.

### Etapa 1 (objetivos específicos 1-4)

- Búsqueda bibliográfica y compilación de antecedentes de las especies seleccionadas para el convenio.
- Identificación, registro y caracterización de plantas madres como fuentes donantes de propágulos de *Erythrina crista-galli* (seibo), *Salix humboldtiana* (sauce criollo), *Acacia caven* (espinillo), *Parkinsonia aculeata* (cina-cina), *Citharexylum montevidense*, *Celtis spinosa* (tala), *Scutia buxifolia* (coronillo).
- Recolección de semillas de *Erythrina crista-galli* (seibo), *Acacia caven* (espinillo), *Parkinsonia aculeata* (cina-cina).
- Macropropagación de *Salix humboldtiana* por medio de estacas con individuos seleccionados en la zona de Punta Lara.
- Ensayos de germinación de semillas de *Erythrina crista-galli* y *Parkinsonia aculeata* recolectadas en el jardín de la memoria de la Facultad de Ciencias Agrarias y forestales, UNLP.

### Etapa 2 (objetivos específicos 5-9)

#### Micropropagación

- Preparación de soluciones madres de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas, de medios de cultivo: MURASHIGE & SKOOG (MS), WOODY PLANT MEDIUM (WPM), preparación de reguladores de crecimiento: bencil amino purina (BAP), ácido indol butírico (IBA), ácido naftalén acético (ANA).
- Preparación de medios de cultivos (MS, WPM) para iniciar la micropropagación de *Erythrina crista-galli* (seibo), *Salix humboldtiana* (sauce criollo), *Acacia caven* (espinillo) y *Parkinsonia aculeata* (cina-cina).
- Ensayos de desinfección y siembra *in vitro* de semillas de *Erythrina crista-galli* (seibo), *Acacia caven* (espinillo) y *Parkinsonia aculeata* (cina-cina).
- Microestaquillado con secciones nodales de *Salix humboldtiana* (sauce criollo).



GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES  
2021 - Año de la Salud y del Personal Sanitario

**Hoja Adicional de Firmas**  
**Anexo**

**Número:**

**Referencia:** Anexo I

---

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 7 pagina/s.