



**ESTRATEGIAS DE PROPAGACIÓN DE  
*Prosopis alpataco* Phil. DE LA PATAGONIA NORTE**

**MARIANELEN CEDRES GAZO**

Director: Patricia Boeri  
Co- director: Sandra Sharry

Universidad Nacional de Río Negro,  
Sede Atlántica

2016

**Título:** Estrategias de propagación de *Prosopis alpataco* Phil. de la Patagonia norte

**Datos del Alumno:** Marianelén Cedrés Gazo, Licenciatura en Ciencias del Ambiente. Sede Atlántica, Universidad Nacional de Río Negro (UNRN).

**Datos del Director:** Boeri Patricia, Departamento de Ciencias Exactas, Naturales y de Ingeniería. Licenciatura en Ciencias del Ambiente. Sede Atlántica, Universidad Nacional de Río Negro (UNRN)

**Datos del Co-director:** Sharry Sandra, Centro Experimental de Propagación Vegetativa (CEProVe), CIC- PBA. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) - Licenciatura en Ciencias del Ambiente. Sede Atlántica, Universidad Nacional de Río Negro (UNRN).

**Año:** 2016

## ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>5</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>6</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>7</b>
<b>Objetivo general .....</b>	<b>11</b>
<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>12</b>
<b>Metodología .....</b>	<b>12</b>
<b>Area de recolección .....</b>	<b>12</b>
<b>Cosecha de las frutos.....</b>	<b>13</b>
<b>Procesamiento, manejo y almacenamiento de las semillas .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Optimización de los protocolos de germinación .....</b>	<b>13</b>
1.1. Ajuste de la temperatura de germinación .....	13
1.2. Dormancia .....	14
1.3. Evaluación de la germinación bajo diferentes condiciones ambientales...	15
1.3.1. Respuesta al estrés hídrico.....	15
1.3.2. Respuesta <i>in vitro</i> al estrés salino.....	16
<b>2. Propagación vegetativa a partir de estacas.....</b>	<b>16</b>
2.1. Micropropagación .....	16
2.2. Macropropagación .....	16
2.2.1. Estacas de material adulto...	16
2.2.2. Estaquillas de material juvenil.....	17
<b>Análisis de los resultados .....</b>	<b>17</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>17</b>
1. Optimización de los protocolos de germinación .....	17
1.1. Ajuste de la temperatura de germinación .....	17
1.2. Dormancia .....	19
1.3. Evaluación de la germinación bajo condiciones de estrés abiótico...	20
1.3.1. Respuesta al estrés hídrico.....	20

1.3.2. Respuesta <i>in vitro</i> al estrés salino .....	22
2. Propagación vegetativa a partir de estacas.....	25
2.1. Micropropagación.....	25
2.2. Macropropagación.....	26
2.2.1. Estacas de material adulto... ..	26
2.2.2. Estaquillas de material juvenil .....	26
Discusión y conclusiones .....	27
Bibliografía.....	31

## RESUMEN

En los ecosistemas áridos, el restablecimiento de las condiciones naturales ante disturbios severos es muy lento debido a su baja resiliencia, y limita así la germinación de las semillas, punto de partida de cualquier regeneración. Por esta causa es fundamental conocer la biodiversidad, generar técnicas de conservación y manejo sustentable. La biotecnología es la herramienta de innovación tecnológica actual que se presenta como alternativa para forestar ambientes degradados. Las técnicas de propagación *in vitro* para el género *Prosopis* prestan gran importancia en casos de recuperación de ambientes salinos. A partir de la elección de plantas resistentes a la salinidad, se pueden producir por micropropagación, gran cantidad de nuevos individuos con esta misma característica. *Prosopis alpataco* es una especie nativa de la zona árida Argentina representativa del Monte, considerada como especie multipropósito y adaptada a ambientes salinos. El objetivo general de este trabajo fue optimizar las técnicas de propagación sexual y asexual de *Prosopis alpataco* en condiciones ambientales tradicionales y bajo diferentes condiciones de laboratorio *in vitro*. Los resultados demuestran que las condiciones óptimas de germinación se obtienen cuando las semillas son escarificadas en forma mecánica (remoción del borde seminal) o química (inmersión en ácido sulfúrico durante 30 minutos) y finalmente incubadas en oscuridad a 30 °C. Los ensayos de resistencia al estrés hídrico y salino indicaron que hasta un potencial osmótico de -1 MPa y de -1,2 MPa, producidos con la adición de PEG6000 y de NaCl respectivamente, las plántulas de *P. alpataco* pueden tener un óptimo crecimiento. Los resultados del microestaquillado *in vitro* a partir de material juvenil, manifestó que con la adición de 3 mg/l de la hormona ANA se puede obtener un 37 % de enraizamiento. En los ensayos de macropropagación no se obtuvieron resultados positivos ya que no hubo enraizamiento de estacas de material adulto ni de estaquillas de material juvenil. Se concluye que *Prosopis alpataco* es una especie de gran plasticidad, útil para la reforestación de áreas degradadas y para la obtención de otros bienes y servicios.

**PALABRAS CLAVE:** *Prosopis*, propagación, Patagonia, estrés abiótico, *in vitro*.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO NEGRO por darme la oportunidad de estudiar y ser una profesional.

A mi directora de tesis, Patricia Boeri por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y motivación ha logrado que pueda terminar mis estudios con éxito.

Agradecer a mi co- directora Sandra Sharry, por la orientación, opiniones y sugerencias brindadas siempre tan oportunamente para la realización de este trabajo.

A Daniel Barrio, por el apoyo brindado y por permitirme desarrollar este y otros trabajos en el laboratorio que dirige en la universidad.

A Juan Carlos Baffoni, por la ayuda servida y por colaborar con mi investigación.

También me gustaría agradecer a mis profesores durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado a mi formación.

A mis compañeras de estudio. Sabrina Picone, Melisa Szmulewicz, Georgina Tomas, Mariana Van den heuvel y Natalí Cambuzzi, porque al final de este camino, me han dejado lindas experiencias compartidas y su amistad.

A mis amigos y amigas, por estar siempre y sostenerme en todo momento.

A mi novio, Mariano, por ayudarme a superar momentos difíciles y por su paciencia y apoyo incondicional.

A mis abuelos, tíos y primos que me apoyan día tras día. A la memoria de mis amados abuelos y tíos que siguen siendo parte presente de mi vida: Olga, Coco, Viviana y Oscar.

A mis hermanos Mariangel y José María, gracias a su apoyo durante los años más difíciles y más felices de mi vida he llegado a realizar mis más grandes metas y ustedes han estado ahí para ayudarme y apoyarme.

Finalmente agradezco a mis papas, Néstor y María Inés, a quienes nunca podré devolverles todo el amor brindado, sus sacrificios y desvelos, son un gran ejemplo para mí vida. Por esto y más.... Gracias.

## INTRODUCCION

En la Patagonia Norte, los tipos fisonómicos- florísticos de relevancia son estepas arbustivas altas de *Larrea* sp (jarilla) y *Prosopis* sp (algarrobos), y estepas arbustivas medias en donde las jarillas se combinan con otras especies como *Chuquiraga erinacea* (chilladora) y *Condalia microphylla* (piquillín) (Anchorena, 1978; Bran, 1992). Toda la región constituye un ecosistema de baja productividad sumamente frágil ya que presenta condiciones que limitan naturalmente el crecimiento de las plantas, como bajas temperaturas, elevada amplitud térmica, fuertes vientos y un marcado déficit hídrico durante la mayor parte del año (Rundel *et al.*, 2007). Sin embargo, la presencia de ciclos húmedos que alternan entre largos períodos de sequía ha permitido el avance de la frontera agropecuaria en estas regiones consideradas marginales. Este contexto se ve agravado con la tala sistemática de especies leñosas, incendios recurrentes y sobrepastoreo que ocasiona un deterioro productivo, económico y ambiental significativo (Enrique, 2010). El grado de deterioro relacionado con la pérdida de biodiversidad en Patagonia resulta difícil de cuantificar, por esto es fundamental conocer la biodiversidad para luego generar técnicas de conservación y manejo sustentable, y ser ésta una manera de sentar soberanía sobre nuestros recursos genéticos (Boeri *et al.*, 2013). Para ello el recurso fundamental son las especies nativas, adaptadas a las situaciones de estrés propias de estos sistemas ecológicos. Diversos autores han considerado utilizar especies multipropósito como *Prosopis* sp para reforestar zonas áridas y semiáridas degradadas (Goyal y Arya, 1984; Fagg y Stewart, 1994; Jordan, 1996; Felker, 2000). Las especies de *Prosopis* sp han demostrado que modifican las condiciones ambientales bajo su dosel, concentran agua, nutrientes y brindan protección contra las altas temperaturas y la irradiación. Debido a estas características, los algarrobos pueden además facilitar el establecimiento de otras especies, aumentar la biodiversidad total del sistema y disminuir la posibilidad de erosión (Pol *et al.*, 2005).

### ***Descripción de la especie***

Ubicación taxonómica de la especie:

**Reino:** Plantae Subreino: Embryophyta (Cormophyta Endl.)

**División:** Anthophyta Clase: Eudicotyledonae

**Subclase:** Rosidae

**Orden:** Fabales

**Familia:** Fabaceae Lindl 1836

**Subclase:** Rosidae

**Orden:** Fabales

**Familia:** Fabaceae Lindl 1836 Subfamilia: Mimosoideae (R. Br.) DC. 1825

**Tribu:** Mimoseae Bronn

**Género:** *Prosopis* L. 1767

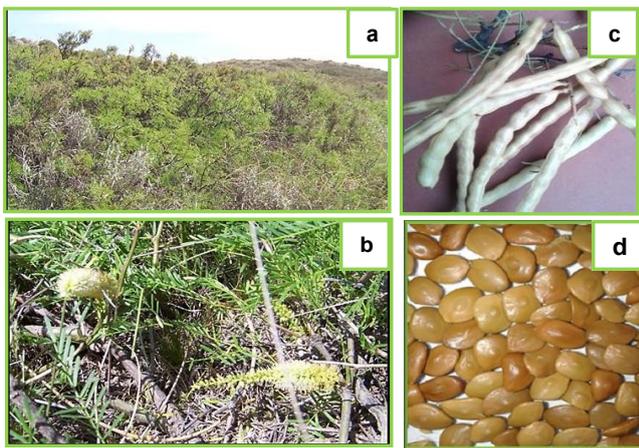
### El género *Prosopis*

El género *Prosopis* consta de 45 especies. En América se distribuye en las regiones semiáridas y áridas desde el sudoeste de Estados Unidos a lo largo de la cordillera de los Andes hasta Chile central y Argentina. *Prosopis alpataco* fue descrita por Philippi en 1962. Es una especie nativa conocida vulgarmente como “alpataco”, “algarrobo”, “algarrobo guanaco” (Forcone y González, 2014), “lámara”, “lámara” o “tako” (Roig, 1987; Palacios y Brizuela, 2005). En Argentina esta especie constituye un elemento típico de la Provincia del Monte, por lo que se distribuye en las provincias de San Juan, Mendoza, San Luis, Neuquén, La Pampa, Río Negro y Chubut (Burkart, 1976). También puede ingresar biogeográficamente a la Provincia Pampeana y del Espinal (Cabrera, 1971) (Figura 1).



**Figura 1.** Distribución geográfica de *Prosopis alpataco* Phil (Burkart, 1976 en Vega Riveros, 2011).

Bukart (1940) describe a esta especie como un arbusto de hojas caducas, de 1,50- 3,00 m de altura, con raíz pivotante leñosa, profunda y gruesa; ramas subterráneas formando un rizoma ramificado de más o menos 1 m de diámetro, sin raíces adventicias, que origina las ramas aéreas semejantes entre sí (Figura 2 a). Espinas medianas. Hojas uniyugas, pecíolo (incluido raquis) de largo variable (0,7- 5 cm). Foliolos opuestos en 9 a 18 pares por pinna, lineales, obtusos o subagudos, de base poco asimétrica, de 0,5- 1,7 cm de longitud. Presenta flores pequeñas, formando racimos espiciformes amarillentos y densos de 6- 14 cm de longitud (Figura 2 b). El fruto es levemente arqueado, comprimido, acuminado, de epicarpio amarillo pajizo uniforme; suturas paralelas, mide alrededor de 14- 17 cm de longitud, de pulpa poco abundante (Figura 2 c); endocarpio de artejos indehiscentes, cuadrados, subleñosos. Las semillas son castañas, comprimidas y aovadas de 7 mm de largo (Burkart, 1976) (Figura 2 d).



**Figura 2.** Morfología de *Prosopis alpataco* en el monte rionegrino: a) individuos adultos b) Inflorescencias c) Legumbres d) Semillas. Fuente: Lic. Patricia Boeri- Viedma, 2012.

Habita en suelos salinos y alcalinos y es una especie freatófita (Palacios y Brizuela, 2005). Se distribuye preferentemente en zonas de extrema aridez, con precipitaciones estivales y de carácter torrencial que varían entre 80- 200 mm anuales y temperaturas medias de 15 °C- 17 °C (Villagra, 1998).

Es importante destacar que por su gran variabilidad genética las especies de *Prosopis* muestran diversas respuestas frente al contenido de sales en el suelo. Si bien está descrita como tolerante a salinidad (Felker, 1981), cuando se pretende forestar áreas de suelos salinos resulta conveniente realizar una selección previa que minimice la

pérdida de plantas (Killan *et al.*, 2002). Así, la búsqueda de técnicas de propagación que permitan desarrollar protocolos para la producción de plantas resulta beneficiosa.

El conocimiento disponible sobre la producción, el manejo y estudio de las semillas nativas es escaso, y por esta razón, la búsqueda de metodologías para el análisis en estas áreas de semillas forestales es un desafío para la investigación científica (Kobori, 2013). Las semillas subsisten en estos ambientes por la dureza de la cubierta seminal (Popinigis, 1985), que impide la absorción de agua e impone una restricción mecánica en el crecimiento del embrión (Kobori, 2013), lo cual permite la regulación temporal y espacial de la germinación (Barton, 1965; Villagra, 1995). Para superar estos estados de dormición, es posible recurrir a distintos pretratamientos germinativos (Cohn y Butera, 1983) según la clase de dormición que se trate (Hepher y Roberts, 1985). Entre los métodos utilizados para romper la dormición y optimizar la germinación, se encuentra la escarificación mecánica por abrasión del tegumento, y la escarificación química mediante el uso de ácidos fuertes que simulan los efectos que ejerce el paso de las semillas por el tracto digestivo de los animales (Didoné y Distel, 1996).

La reproducción asexual o vegetativa también puede ser una alternativa a la propagación de plantas, donde toda la generación proviene de una planta madre y a su progenie se la denomina clones (Loyola, 2006 en Tabango, 2011).

La propagación vegetativa comprende esencialmente dos alternativas:

a) macropropagación, que abarca un conjunto de procedimientos simples conocidos desde tiempos inmemoriales, b) micropropagación, que comprende procedimientos tecnológicos más avanzados basados en la tecnología de cultivos de tejidos vegetales (CTV).

En la mayoría de las especies forestales el método tradicional más utilizado es la propagación a través de estacas.

La macropropagación en diferentes especies de *Prosopis* ha generado resultados muy variables, existen especies con tasas de enraizamiento superiores al 80 % (*P. juliflora* y *P. glandulosa*) y menores del 10 % como en *P. cineraria* y *P. tamarugo* (De Souza, 1993; Harris, 1992).

La micropropagación en especies leñosas ha adquirido gran interés en los últimos años (Ballester *et al.*, 2009; Jain y Häggman, 2007; Giri *et al.*, 2004). Es un término que se usa para representar un proceso de cultivo de tejidos vegetales. Brevemente, consiste en cultivar asépticamente una pequeña parte aislada de la planta donante (explante) en un medio nutritivo a fin de obtener plantas completas. La regeneración de plantas está fundada en la teoría de que todas las células vegetales son capaces de formar plantas completas, es decir que presentan totipotencialidad (Hartmann y Kester, 2000). Los

diferentes explantes bajo condiciones de cultivos de tejido vegetales pueden dar lugar a una masa de células no organizadas (callo) o bien generar una respuesta morfogénica por la cual se forman órganos (organogénesis) o embriones (embriogénesis somática) (López, 1996). Según el tipo de explante pueden continuar las siguientes vías: organogénesis directa u organogénesis indirecta (Guillén *et al.*, 2015). La primera ocurre sin que exista un proceso de dediferenciación celular (callo) mientras que en la organogénesis indirecta, el explante forma una masa indiferenciada de células, y a partir de ésta se generan partes vegetativas diferenciadas como brotes o raíces según la hormona utilizada (Tabango, 2011).

Las técnicas de propagación *in vitro* para el género *Prosopis* sp revisten gran importancia para la recuperación de ambientes salinos. A partir de la elección de plantas resistentes a la salinidad del medio, se puede obtener gran cantidad de nuevos individuos con esta misma característica.

*Prosopis alpataco* es una especie nativa representativa del monte árido Argentino. La especie necesita humedad para establecerse y se independiza de las precipitaciones una vez que sus raíces alcanzan la napa freática (Villagra y Cavagnaro, 2006).

Los principales usos citados para *Prosopis alpataco* son: forraje, comestible, leña, medicinal, melífero, y potenciales para reforestar (Sapoznikow *et al.*, 2002; Vega Riveros *et al.*, 2011; Roig, 1993; Soria *et al.*, 2007; Ladio y Lozada, 2009), pese a ello ésta es una de las especies menos conocida y estudiada respecto a otras del mismo género (Vega Riveros *et al.*, 2011).

El conocimiento de la biología de las especies nativas del Monte Patagónico y el uso de técnicas de propagación tradicional e *in vitro* es una alternativa para mantener la biodiversidad, la formación del suelo y el control de la erosión. Por ello, resulta imperioso generar conocimiento de especies representativas del monte xerofítico rionegrino como *P. alpataco* y desarrollar estrategias de propagación que contribuyan a afrontar la problemática ambiental de la región.

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este trabajo fué optimizar las técnicas de propagación sexual y asexual de *Prosopis alpataco* bajo diferentes condiciones ambientales.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Optimizar la germinación de *Prosopis alpataco* para superar la dormición física impuesta por el tegumento.
- Evaluar la capacidad de germinación y crecimiento de *Prosopis alpataco* en diferentes condiciones ambientales.
- Evaluar las condiciones necesarias para inducir la propagación por estaquillado de *Prosopis alpataco*.

## METODOLOGIA

### Área de recolección

Para la obtención de semillas de *P. alpataco* se seleccionaron cuatro sitios de muestreo ubicados en el Departamento Adolfo Alsina y San Antonio Oeste (Figura 3).

El área de recolección se caracteriza por tener un clima semiárido- subhúmedo a seco, con precipitaciones de 200 mm a 350 mm al año. Predominan los suelos areno-limosos, moderadamente alcalinos y de escasa cantidad de materia orgánica (Aridisoles) (Bran *et al.*, 2000). Estas condiciones sólo permiten el desarrollo sobre suelos esqueléticos, de una vegetación achaparrada y dispersa. Los vientos dominantes son del oeste (Schillizzi *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Recorrida realizada en la recolección de frutos de *Prosopis alpataco* y sitios de muestreo georreferenciados.

Coordenadas geográficas: sitio 1: 41°00'03,99"S 63°15'02,81"O; sitio 2: 41°09'11,72"S 63°13'57,75"O; sitio 3: 41°01'07,25"S 63°48'11,11"O y sitio 4: 40°42'51,62"S 63°34'06,54"O.

### **Cosecha de los frutos**

Para la recolección de frutos se identificaron plantas madres semilleras maduras, de buen porte, aspecto vigoroso y óptimo estado sanitario (Martínez y Schinelli, 2009). Si bien el período de fructificación de esta especie ocurre entre los meses de diciembre y febrero, la cosecha se realizó en el mes de abril debido a que las chauchas permanecen por meses sujetas a las ramas (Palacios y Brizuela, 2005).

### **Procesamiento, manejo y almacenamiento de las semillas**

Los frutos fueron colocados sobre cartón a temperatura ambiente durante 3 a 5 días, a fin de disminuir el contenido de humedad de la semilla y prolongar su viabilidad en el tiempo. Las semillas fueron extraídas manualmente de su fruto por medio de una pinza de tipo alicate y seleccionadas a través de signos visuales. Las semillas dañadas afectadas por insectos o patógenos fueron eliminadas y aquellas seleccionadas como sanas se almacenaron en oscuridad a temperatura controlada (0 °C- 5 °C).

#### **1. Optimización de protocolos de germinación**

Las semillas se desinfectaron con etanol al 70 % v/v por 10 minutos, seguidos de una inmersión en hipoclorito de sodio (48 g Cloro activo/l) al 20 % v/v durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada esteril y se dispusieron en placas de Petri (100x 15 mm, vidrio borosilicato) con diferentes soportes incubándose en oscuridad en la cámara de germinación a distintas temperaturas para cada ensayo y tratamiento.

El criterio de germinación considerado fue la aparición de una radícula de por lo menos 0,5 mm de largo (Bewley, 1997).

##### **1.1. Ajuste de la temperatura de germinación**

Para observar el comportamiento de las semillas respecto a la temperatura, estas se dispusieron sobre papel de filtro humedecido con agua destilada a temperaturas de 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C y 45 °C, rango reportado como óptimo para la especie (Villagra, 1995).

El número de semillas germinadas se registró en días durante una semana. Los parámetros evaluados fueron:

*Capacidad Germinativa (CG)*: Porcentaje de germinación total al finalizar el ensayo (Pece, 2010).

*Energía Germinativa (EG)*: Porcentaje de Germinación acumulada diaria cuando la tasa de germinación fue la más alta (González *et al.*, 2009).

*Tiempo Medio de Germinación (TMG)*: Número promedio de días utilizados en la germinación. Mide la velocidad y la dispersión del proceso (Ranal y García, 2006).

$$TMG = \frac{(X_1 \cdot d_1) + (X_2 \cdot d_2) + \dots + (X_{12} \cdot d_{12})}{X_{12}}$$

Donde X1, X2, X12 son semillas en el día d1, d2, d12, y d1, d2, d12 son los días de incubación.

*Índice de Velocidad de Germinación (IVG)*: El índice de velocidad de germinación propuesto por Maguire (1962), expresado como número de semillas germinadas por día. Su fórmula de cálculo es:

$$IVG = G_1 + G_2 + \dots + G_i + \dots + G_n = \sum_{i=1}^n \frac{G_i}{N_i}$$

Donde N<sub>i</sub> son los días necesarios para la germinación y G<sub>i</sub> el número de semillas germinadas en el día i.

*Germinación diaria acumulada (GDM)*: relación del porcentaje de germinación total de la prueba (CG) y el tiempo (en días) que tarda para alcanzar ese valor.

El ensayo fue aleatorio y constó de tres repeticiones de 25 semillas por tratamiento e incluyó el control de cada uno de ellos.

## 1.2. Dormancia

Se ensayaron diferentes tratamientos pregerminativos tendientes a incrementar el porcentaje de germinación y disminuir el tiempo medio de germinación de esta especie. Para ello se evaluaron los métodos de:

a) *Escarificación química*: Tratamiento que consistió en colocar las semillas en un vaso precipitado con ácido sulfúrico concentrado (97 %) durante un determinado tiempo; luego se realizaron varios lavados con agua destilada hasta eliminar el rastro de ácido, y se las colocó en placas de Petri con papel de filtro humedecido. Finalmente se las incubó en estufa a 30 °C. Los tiempos de inmersión realizados fueron: 0 min (K), 2 min (T1), 5 min (T2), 10 min (T3), 20 min (T4), 30 min (T5), 40 min (T6), 50 min (T7), 60 minutos (T8).

b) *Escarificación mecánica*: En este ensayo se realizaron dos tratamientos, uno que consistió en realizar una pequeña incisión en la zona de emergencia de radícula (T9: PCS (prueba de corte simple)) y otro en el que se realizó un corte con una pinza tipo alicate sobre los bordes de toda la cubierta seminal (T10: PCT (prueba de corte total)). Luego se las desinfectó y se las colocó en placas de Petri con papel de filtro humedecido. Se incubaron en la estufa a 30 °C.

Los parámetros evaluados fueron los mismos que se realizaron en el ensayo de ajuste de temperatura anteriormente descrito (1.1). El ensayo constó de tres repeticiones de 25 semillas elegidas al azar para cada tratamiento y se incluyó el control en cada uno de ellos.

### 1.1. Evaluación de la germinación bajo diferentes condiciones ambientales

Estos ensayos constaron de tres repeticiones de 10 semillas seleccionadas al azar para cada tratamiento, incluidos los controles. En la Tabla 1 se muestran las equivalencias de unidades para los diferentes tratamientos realizados.

**Tabla 1.** Potenciales hídricos, concentraciones de NaCl y de PEG evaluados durante la germinación y el crecimiento de *P. alpataco*.

$\Psi_0$ (MPa)	NaCl (mmol/L)	PEG (%p/v)
0	0	0
-0,4	100	12
-0,8	200	18
-1,2	300	22
-1,5	400	26
-1,9	500	-
-2,2	600	-
-3	800	-
-3,5	1000	-

Concentraciones calculadas según Sosa *et al.* (2005) y parcialmente modificada por el autor.

#### 1.1.1. Respuesta al estrés hídrico

Para inducir el estrés hídrico, las semillas se pusieron en placas de Petri con papel de filtro humedecido con diferentes concentraciones de Polietilenglicol 6000 (PEG), compuesto osmótico que mantiene el medio a determinado potencial hídrico ( $\Psi$ ) y que provoca estrés hídrico. Se ensayaron los siguientes potenciales (0 MPa; -0,5 MPa; -1 MPa; -1,5 MPa de PEG6000), de acuerdo a la metodología propuesta por Michel y Kaufmann (1973) y modificada por Michel (1983). Las semillas fueron incubadas en estufa de cultivo. Al finalizar el ensayo se calculó la capacidad germinativa (CG) y el tiempo medio de germinación (TMG). Se evaluaron además, los siguientes caracteres

morfológicos: altura (cm), longitud del sistema radical (cm) y el peso fresco (g) de las plántulas (Fateme Ahmadloo *et al.*, 2011).

### **1.1.2. Respuesta *in vitro* al estrés salino**

Este ensayo se realizó bajo condiciones de esterilidad. Los medios nutritivos utilizados para producir estrés salino consistieron en agarosa (6,00 % p/v), sacarosa (30 % p/v) y una solución de cloruro de sodio (NaCl) a diferentes concentraciones (0 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 300 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM, 1000 mM). El pH fue ajustado a 5,8- 6 y luego todo el material fue colocado en autoclave por 30 minutos a 120 °C de temperatura y a 1 atmósfera de presión. Las semillas se incubaron en placas de Petri con el medio adecuado, y se mantuvieron bajo condiciones de oscuridad a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Luego de 5 días de ensayo se evaluaron los mismos parámetros descriptos en el punto anterior (1.1.1.).

## **2. Propagación vegetativa a partir de estacas**

### **2.1. Micropropagación**

Se colocaron en frascos de 250 ml, 50 ml del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) diluido a la mitad de su concentración y adicionado con agar (6,00 % p/v), sacarosa (30 % p/v) y ANA (ácido naftalenacético), una auxina sintética que interviene en el proceso de rizogénesis a diferentes concentraciones (0 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l, 3 mg/l). En estos se colocaron por tratamiento 12 microestacas binodales provenientes de plántulas generadas en condiciones *in vitro* de 15 cm aproximadamente. El ensayo se realizó en esterilidad, se siguió el mismo procedimiento que en el punto anterior (1.1.2.). Luego de 30 días de ensayo se evaluó: porcentaje de enraizamiento (%), número de raíces por estaca, longitud de raíz (cm), número de explantes que produjeron brotes y el número de callos (Verdes, 2007).

### **2.2. Macropropagación**

Los parámetros analizados en estos ensayos fueron: porcentaje de enraizamiento, número de brotes y número de raíces enraizadas por estaca.

#### **2.2.1. Estacas de material adulto**

Se utilizaron 25 estacas leñosas de 20 cm de longitud, obtenidas a partir de material adulto y seleccionadas al azar en los distintos sitios de muestreo, y se las colocó en

cubículos de 4x 4x 10 cm con una mezcla de sustrato de tierra local y perlita (1:1). Se aplicó en una sola dosis de ANA (ácido naftalenacético) en polvo (Fertifox, 5 cm<sup>3</sup>/l) durante 40 días y se las regó cada 7 días con agua corriente. Se las mantuvo cubiertas con bolsas de polietileno transparente y con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, a una temperatura de 25± 2 °C.

### **2.2.2. Estaquillas de material juvenil**

Se utilizaron 12 estaquillas binodales de plántulas de 15 cm de largo obtenidas en condiciones *in vitro*, se las colocó en frascos estériles de 250 ml con una mezcla de sustratos de vermiculita y perlita (1:1) no estéril. Se les aplicó en una sola dosis, una solución de ANA a distintas concentraciones (0 mg/l; 1,5 mg/l; 3 mg/l). El ensayo duró 30 días y se las regó cada 4 días con agua corriente.

### **Análisis de los resultados**

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado. En cada variable-respuesta se realizó un análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa Infostat-Statistical Software 2014 para detectar si existían diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Los datos también fueron sometidos a la Prueba de Tukey para comparar las medias con un nivel de significancia del 5 %. Para el ensayo de ajuste de temperatura (1.1.) y para el ensayo de dormancia (1.2.) los datos de capacidad germinativa (CG) y tiempo medio de germinación (TMG) se transformaron con  $\text{Arcseno}\sqrt{x}$  para establecer homogeneidad de las varianzas (Ranal y García de Santana, 2006).

## **RESULTADOS**

### **1. Optimización de los protocolos de germinación**

#### **1.1. Ajuste de la temperatura de germinación**

En la Tabla 2 se muestran los resultados del efecto de la temperatura sobre la germinación de semillas de *P. alpataco*.

**Tabla 2.** Efecto de la temperatura sobre la germinación de semillas de *P. alpataco*.

TRATAMIENTO	CG (%)	EG (%)	TMG (días)	IVG
<b>T1: 25°C</b>	100,00a	45,30b	1,77c	27,08a
<b>T2: 30°C</b>	100,00a	100,00a	1,00a	45,83d
<b>T3: 35°C</b>	98,64a	58,67b	1,40bc	35,22b
<b>T4: 40°C</b>	88,00a	80,00b	1,09ab	38,89c
<b>T5: 45°C</b>	88,00a	69,30b	1,21ab	36,67bc
<b>p-valor</b>	0,097	0,008	0,0005	0,0001
<i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (<math>p &gt; 0,05</math>)</i>				

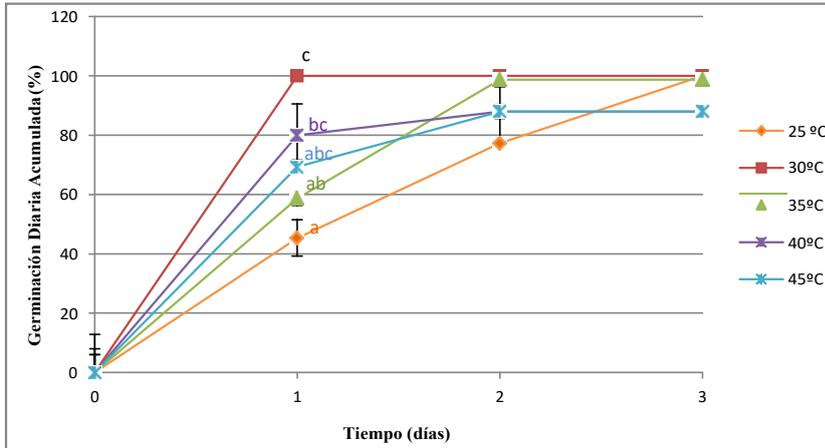
Referencias: capacidad germinativa (CG), energía germinativa (EG), tiempo medio germinativo (TMG), índice de velocidad de germinación (IVG).

Se pudo visualizar que a mayor temperatura, la capacidad germinativa (CG) disminuyó (12 %). Si bien a 25 y 30 °C germinaron la totalidad de semillas de *P. alpataco* el análisis estadístico no se presentó diferencias significativas respecto a los demás tratamientos realizados. En cuanto a la energía germinativa (EG), la influencia que posee la temperatura sobre la germinación de las semillas fue variable. Las semillas germinadas a 30 °C arrojaron diferencias altamente significativas respecto de los demás tratamientos. El menor valor de tiempo medio de germinación (TMG) se obtuvo a los 30°C (1 día), y el mayor valor a 25°C (1,77 días), aún cuando las dos temperaturas obtuvieron el 100% de germinación.

Al comparar los tratamientos donde se logró un 100 % de CG, se vió que a 30 °C se obtuvo el menor valor de TMG (1 día) mientras que a 25 °C el TMG fue el mayor obtenido (1,77 días). Respecto al índice de velocidad de germinación (IVG) el mayor valor se obtuvo a los 30 °C (45,83) encontrándose diferencias altamente significativas respecto de los demás tratamientos.

La temperatura óptima para la germinación de *Prosopis alpataco* fue de 30 °C.

Como se desprende de la figura 4 la variación de la germinación diaria media acumulada (GDM) en cada temperatura presentó diferencias altamente significativas durante el primer día de ensayo. El valor de germinación mas bajo se registró en la menor temperatura ensayada (25 °C) y sólo las semillas incubadas a 30 °C presentaron el 100 % de germinación en el primer día de ensayo.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Figura 4.** Germinación diaria media acumulada (GDM) de semillas de *P. alpataco* durante 3 días de ensayo. Referencias: T1=25 °C; T2=30 °C; T3=35 °C; T4=40 °C; T5=45 °C

### 1.1.Dormancia

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos químicos y mecánicos aplicados a las semillas de *P. alpataco*. En todos los parámetros evaluados al realizar el análisis estadístico, se registró diferencias altamente significativas entre los tratamientos ( $p < 0,0001$ ).

**Tabla 3.** Influencia de los tratamientos pregerminativos sobre la germinación de semillas de *P. alpataco*.

TRATAMIENTO	CG (%)	EG (%)	TMG (días)	GDM (%)
T1: 2 min	32,00b	32,00a	1,98c	16,00ab
T2: 5 min	100,00c	100,00b	1,99c	50,00bc
T3: 10 min	100,00c	97,00b	1,26ab	62,50cd
T4: 20 min	100,00c	100,00b	1,32ab	75,00cde
T5: 30 min	100,00c	100,00b	1,00a	100,00e
T6: 40 min	100,00c	98,00b	1,02a	98,00e
T7: 50 min	100,00c	97,00b	1,03a	97,00e
T8: 60 min	100,00c	99,00 b	1,01a	99,00e
T9: PCS	100,00c	80,00b	1,46b	50,00bc
T10: PCT	100,00c	99,00b	1,01a	99,00e
K=0	16,00a	16,00a	2,00c	8,00a
p-valor	0,0001			
Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )				

Referencias: capacidad germinativa (CG), emergencia germinativa (EG), tiempo medio de germinación (TMG), Germinación diaria media acumulada (GDM).

Las semillas no escarificadas tuvieron una capacidad germinativa (CG) no superior al 16% aún cuando el tratamiento se extendió por el término de dos semanas. La CG fue similar entre tratamientos y diferente al del control, excepto a los 5 min de inmersión donde el análisis de varianzas arrojó diferencias significativas.

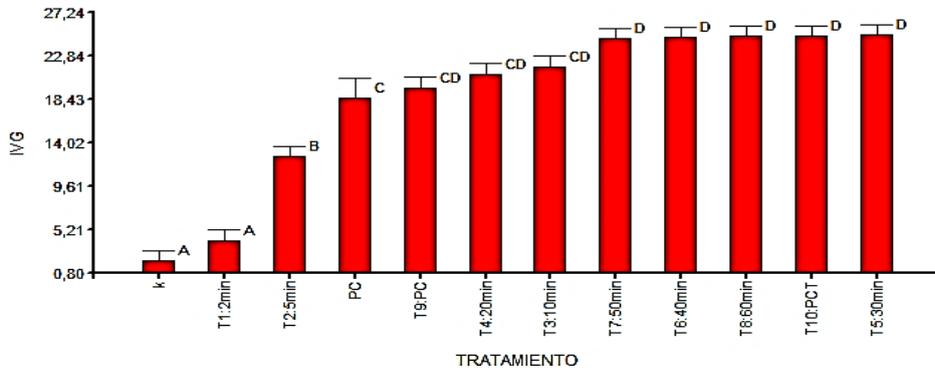
Los tratamientos de 2 y 5 minutos presentaron el mayor tiempo medio de germinación (TMG), con valores similares a los obtenidos en el control.

En los tratamientos de 40, 50 y 60 minutos la exposición de las semillas a ácido sulfúrico produjo el ablandamiento del tegumento seminal y de las gomas presentes entre la goma y el embrión. Las semillas quedaron entonces rodeadas de tegumento parcialmente desprendido y con parte de los cotiledones expuestos. Sin embargo, el tegumento blando, no permitió la protrusión de la radícula que permaneció atrapada en él (Figura 5).



**Figura 5.** Semillas de *P. alpataco* germinadas mediante el tratamiento de inmersión en ácido sulfúrico por 40 (T6), 50 (T7) y 60 (T8) minutos.

Del análisis del índice de velocidad de germinación (IVG), índice que expresa la velocidad en número de semillas germinadas por día, el mayor valor obtenido corresponde a los tratamientos de 30, 40, 50, 60 minutos y PCT.



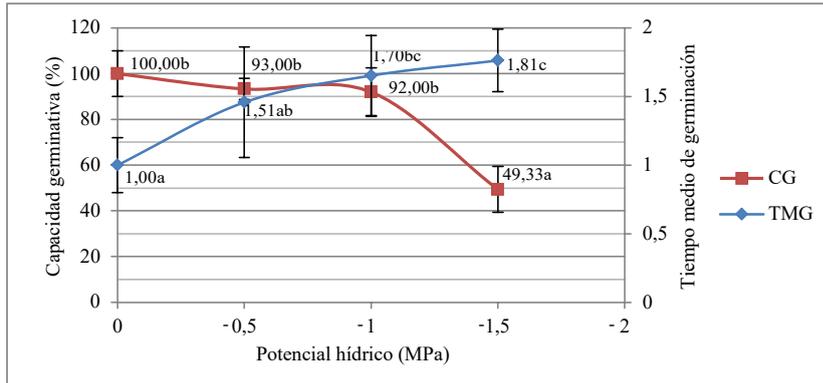
Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Figura 5.** Índice de velocidad de germinación (IVG) en distintos tratamientos pregerminativos de semillas de *P. alpataco*.

### 1.3. Evaluación de la germinación bajo condiciones de estrés abiótico

#### 1.3.1. Respuesta al estrés hídrico

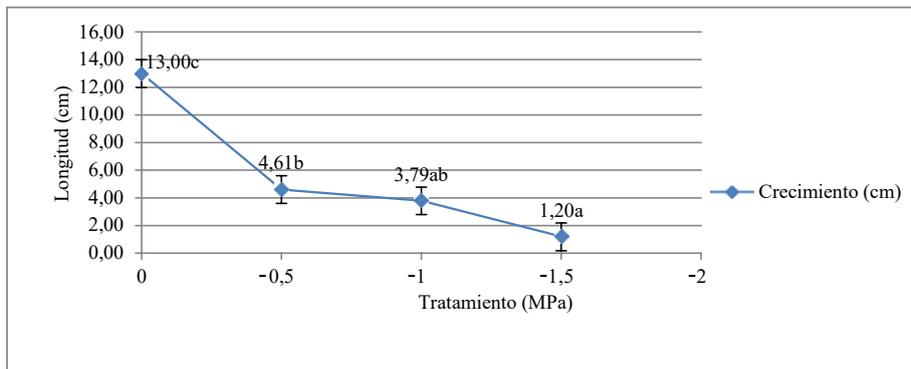
El análisis estadístico indicó que la capacidad germinativa (CG) y el tiempo medio de germinación (TMG) de las semillas de *P. alpataco* fue afectado significativamente ( $p < 0,0006$ ) por los tratamientos. Como se desprende de la figura 6, a medida que disminuye el potencial hídrico, disminuye la CG y aumenta el TMG.



Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

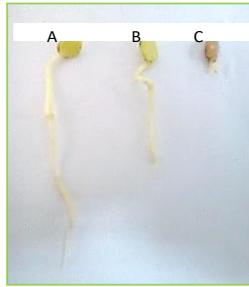
**Figura 6.** Capacidad germinativa (CG) y tiempo medio de germinación (TMG) de semillas de *P. alpataco* bajo diferentes potenciales hídricos durante 5 días de ensayo.

**Efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento:** Con respecto al crecimiento de las plántulas, se observó diferencias altamente significativas entre los tratamientos ( $p < 0,0001$ ). Al disminuir el potencial hídrico disminuyó su crecimiento, y si se excluye al control (T0) la mayor longitud se obtuvo a los -0,5 MPa (4,61 cm) (Figuras 7 y 8).



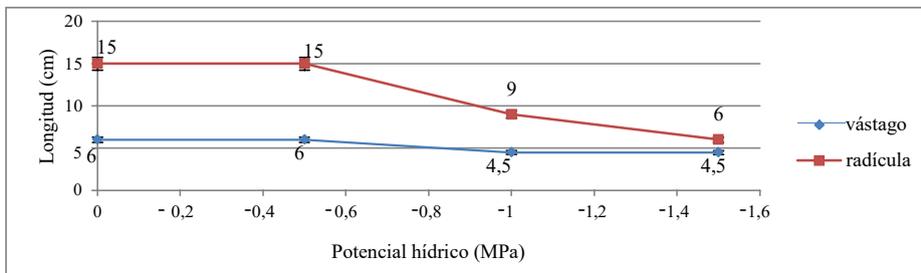
Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Figura 7.** Crecimiento de las plántulas de *P. alpataco* bajo diferentes potenciales hídricos durante 5 días de ensayo.



**Figura 8.** Plántulas de *P. alpataco* obtenidas bajo condiciones de estrés hídrico: A= -0,50 MPa; B= -1,00 MPa; C= -1,50 MPa.

En cuanto a la longitud del vástago y de la raíz en los cinco días de ensayo, se redujo en ambos casos, a medida que disminuyó el potencial hídrico (Figura 9).



**Figura 9.** Resultado del crecimiento del vástago y de la radícula de plántulas de *P. alpataco* a partir de simular distintos potenciales hídricos: T0= 0; T1= -0,5 MPa; T2= -1,0 MPa; T3= -1,5 MPa.

**Efecto del estrés hídrico sobre el peso:** Con respecto al peso fresco de las plántulas obtenidas bajo estrés hídrico, se encontró diferencias altamente significativas entre los tratamientos. El peso de las plántulas de *P. alpataco* disminuyó junto con el potencial hídrico. Si se excluye al tratamiento control, el mayor peso se obtuvo a los -0,5 MPa de potencial hídrico (0,13 g) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Efectos de tratamientos con estrés hídrico sobre el peso de las semillas de *P. alpataco* germinadas a los 5 días de ensayo.

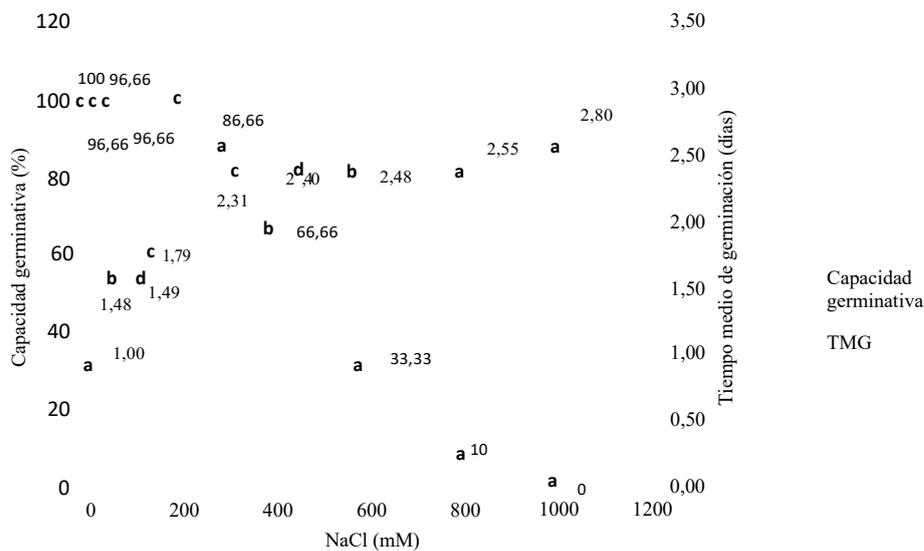
Tratamiento	Peso (g)	p-valor
T0= 0 MPa	0,23c	0,0001
T1= -0,5 MPa	0,13b	
T2= -1 MPa	0,11ab	
T3= -1,5 MPa	0,09a	
<i>Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (p&gt;0,05)</i>		

### 1.3.2. Respuesta *in vitro* al estrés salino

Respecto a la capacidad germinativa (CG) de *P. alpataco* bajo condiciones de estrés salino, se observó que en las menores concentraciones ensayadas (50 mM, 100 mM y

150 mM NaCl) la CG fue del 96,70 % y el 100 %. A partir de los 300 mM (-1,2 MPa) de concentración se observó una disminución del 17 %, y ésta continuó hasta no registrar eventos germinativos en 1000 mM (-3,4 MPa) de NaCl. En cuanto al tiempo medio de germinación (TMG) se observó diferencias altamente significativas ( $p < 0,0001$ ) entre el control y los demás tratamientos. En el control se obtuvo un 100 % de germinación en el día 1, mientras que a 800 mM (-3 MPa) la primera semilla germinada se observó al segundo día.

En la siguiente figura se muestra la relación inversa que hay entre la CG y el TMG a medida que aumenta la concentración de NaCl. El incremento de la concentración salina produjo una disminución de la CG y un aumento del TMG. Este cambio se advirtió a partir de los 300 mM de solución de NaCl (Figura 10).



Referencias: capacidad germinativa (CG), tiempo medio de germinación (TMG). Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

**Figura 10.** Relación de la capacidad germinativa (%) y el tiempo medio de germinación (días) de semillas de *P. alpataco* colocadas en diferentes concentraciones de solución de NaCl (0; 50; 100; 150; 300; 400; 600; 800; 1000 mM) o sus respectivos potenciales osmóticos (0; -0,2; -0,4; -0,6; -1,2; -1,5; -2,2; -3,0; -3,4 MPa).

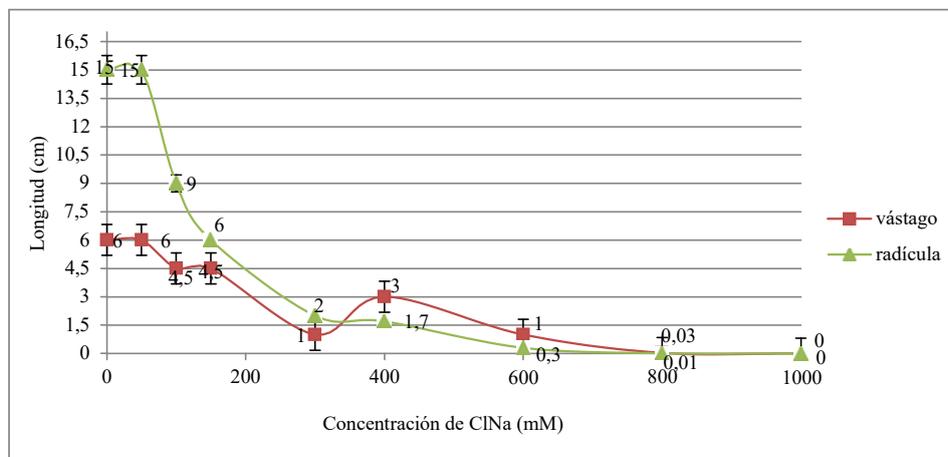
**Efecto del estrés salino sobre el crecimiento:** En la Tabla 6 se observó que el crecimiento de las plántulas (longitud del vástago + longitud de la radícula) disminuyó a medida que la concentración de NaCl fue mayor, encontrándose diferencias altamente significativas entre tratamientos.

**Tabla 6.** Efecto del estrés salino sobre la longitud de las plántulas de *P. alpataco*.

Concentración NaCl (mM)	Crecimiento (cm)	p-valor
T1= 0	12,16b	0,0001
T2= 50	11,67b	
T3= 100	11,46b	
T4= 150	6,31ab	
T5= 300	3,63a	
T6= 400	3,47ab	
T7= 600	1,18a	
T8= 800	0,10a	
T9= 1000	0,10a	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ )

En la Figura 11 se observó que el tratamiento control la longitud media de la radícula duplicó a la longitud media del vástago, manteniéndose esto hasta los 150 mM, donde la raíz y el vástago adquirieron longitudes similares. A partir de los 400 mM de concentración salina se observó un incremento de la longitud del vástago superior a la longitud de la radícula, manteniéndose esto hasta los 800 mM de concentración de NaCl donde no hay diferencias entre la longitud de la radícula y del vástago (Figura 12).



**Figura 11.** Resultado del crecimiento del vástago y de la radícula de plántulas de *P. alpataco* a partir de concentraciones de solución con NaCl: 0, 50, 100, 150, 300, 400, 600, 800, 1000 mM o sus respectivos potenciales osmóticos (0; -0,2; -0,4; -0,6; -1,2; -1,5; -2,2; -3,0; -3,4 MPa).



**Figura 12.** Efecto en el crecimiento de plántulas de *P. alpataco* en las diferentes concentraciones de NaCl:

**Fig. 1:** A= 0 mM (0 MPa); B= 50 mM (-0,2 MPa); C= 100 mM (-0,4 MPa); D= 150 mM (-0,6 MPa).  
**Fig. 2:** A= 0 mM; B= 300 mM (-1,2 MPa); C= 400 mM (-1,5 MPa); D= 600 mM (-2,2 MPa); E= 800 mM (-3,0 MPa). Fuente: Propia. Viedma, 2013.

**Efecto del estrés salino sobre el peso de plántulas:** El peso fresco de las plántulas de *P. alpataco* osciló entre 0,11 g (800 mM NaCl) y 0,25 g en el control (0 mM NaCl). En la Tabla 7 se presenta la disminución del peso de las plántulas conforme aumenta la concentración salina.

**Tabla 7.** Peso en gramos de las plántulas de *P. alpataco* luego de haberlas expuesto por 7 días a diferentes concentraciones de solución de NaCl: 0, 50, 100, 150, 300, 400, 600, 800, 1000 mM o sus respectivos potenciales osmóticos: 0; -0,2; -0,4; -0,6; -1,2; -1,5; -2,2; -3,0; -3,4 MPa.

Concentración NaCl (mM)	Peso fresco (g)	p-valor
0	0,29d	0,0001
50	0,23cd	
100	0,21bcd	
150	0,20bcd	
300	0,17abcd	
400	0,14abc	
600	0,13abc	
800	0,07ab	
1000	0,09 <sup>a</sup>	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )		

## 2. Propagación vegetativa a partir de estacas

### 2.1. Micropropagación

La Tabla 8 presenta la respuesta morfogénica de los explantos colocados en diferentes concentraciones de la hormona ANA (0; 1; 1,5; 3 mg/l) después de 30 días de cultivo *in vitro*. Se observó que a mayor concentración de ANA, mayor porcentaje de explantes

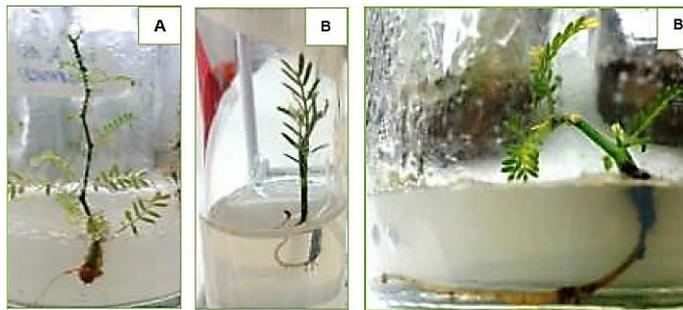
enraizados. No se observó diferencias significativas entre los tratamientos realizados ( $p>0,05$ ). En el tratamiento control (0 mg/l ANA) se obtuvo la mayor longitud de raíz, la mayor cantidad de brotes y de callos, mientras que en 3 mg/l de ANA se obtuvo la menor longitud de raíz, menor cantidad de brotes y de callos.

**Tabla 8.** Efecto del ANA sobre la organogénesis directa e indirecta de secciones nodales de *P. alpataco* cultivadas en condiciones *in vitro*.

Tratamiento (MPa)	Enraizamiento (%)	Nº raíces	Long raíces (cm)	% brotes	% callos
T0: 0	4,60	1,00	2,80	83,33	10
T1: -1	16,67	1,00	1,80	58,33	16,66
T2: -1,5	16,67	1,00	1,50	3,33	38,83
T3: -3	37,04	1,67	1,07	8,75	47,91

Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones por tratamiento con N= 12 explantes

La Figura 13 muestra estacas enraizadas obtenidas por organogénesis indirecta y estacas obtenidas por organogénesis directa.



**Figura 13.** Explantes de *P. alpataco* enraizados: A) organogénesis indirecta; B) organogénesis directa.  
Fuente: Propia y Lic. Patricia Boeri, Viedma 2014.

## 2.2 Macropropagación

### 2.2.1. Estacas de material adulto

Las estacas colocadas en sustrato (2.2.2) para el enraizamiento con ANA, no formaron raíces durante los 2 meses del ensayo. Las estacas no sobrevivieron, y presentaron contaminación fúngica secundaria (Figura 14).



**Figura 14.** Estacas de ejemplares adultos de *P. alpataco*. Fuente: Propia, Viedma 2014.

### 2.2.2 Estaquillas de material juvenil

Las microestacas colocadas en vermiculita no formaron raíces (Figura 15). Luego de un mes de iniciado el ensayo se observó un 95 % de contaminación fúngica en el sustrato.



**Figura 15.** Microestacas *in vivo* de *P. alpataco*: a) en vermiculita; b) segmentos de las plántulas utilizados para la inducción de rizogénesis. Fuente: Propia, Viedma 2014.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El conocimiento adecuado del proceso de germinación y los factores influyentes, resulta fundamental para la regeneración de plantas bajo condiciones naturales, especialmente cuando se trata de reforestar áreas degradadas o marginales.

La temperatura óptima de una especie es aquella en la que las semillas alcanzan el porcentaje de germinación más alto, en el menor tiempo (Mayer y Poljakoff- Mayber, 1982). Con este criterio, la temperatura óptima para la germinación de *P. alpataco* fue de 30 °C, a diferencia de lo reportado por Villagra (1995), quien determinó 35 °C como la temperatura óptima de germinación para esta especie. Se sabe que existe una relación entre la temperatura de germinación de especies del género *Prosopis* y su distribución geográfica (Villagra *et al.*, 2010). Las especies del norte del país muestran temperaturas mínimas de germinación más altas que las especies del sur como *P. alpataco*. Conocer la temperatura óptima de germinación de *P. alpataco* de diferente procedencia otorga una ventaja a la hora de elegir los individuos adecuados y aumentar la eficiencia en programas de reforestación o repoblación de áreas degradadas.

El efecto de la temperatura incide de manera especial en la regulación de la cantidad y ritmo de absorción de agua en la semilla durante la germinación. Si bien todas las semillas de *P. alpataco* germinaron en las temperaturas probadas, cuando las temperaturas fueron superiores a 40 °C, el tegumento de la semilla se ablandó y favoreció la aparición de contaminación secundaria.

En cuanto a la ruptura de la dormancia, las altas tasas de germinación obtenidas con los tratamientos de escarificación química y mecánica coinciden con los resultados mencionados para otras especies del género (Pelaez *et al.*, 1992, Ortega Baes *et al.*, 2002). En este trabajo, en coincidencia con Catalán y Balzarini (1992), el método más eficiente fue la escarificación mecánica, aunque esta posee la desventaja de que insume mucho tiempo. Por ello, para la producción masiva de plantas, la escarificación con ácido sulfúrico resultó ser la técnica mas adecuada.

De nuestros resultados surge que las semillas de *P. alpataco* pueden germinar en forma rápida y homogénea luego de la escarificación con ácido sulfúrico por 30 minutos o manualmente, con un corte alrededor del tegumento seminal.

Las plantas resistentes a estrés tienen un conjunto de rasgos morfo-fisiológicos que les permiten sobrevivir en condiciones adversas, pero reduce el potencial de crecimiento en presencia de éste (Chapin III *et al.*, 1993; Grime, 1977; Orians y Solbrig, 1977). En este trabajo de investigación, el estrés impuesto a las semillas, afectó tanto la germinación como al crecimiento y el peso de las plántulas obtenidas. Estos resultados fueron observados también en otras especies del género *Prosopis* (Villagra y Cavagnaro, 1997; Gonzalez, 2007; Sosa *et al.*, 2005). Los porcentajes de germinación registrados en nuestro trabajo, disminuyeron frente al estrés causado tanto por la solución de NaCl como por la solución de PEG. Sin embargo, en -1,5 MPa de potencial osmótico se observó una mayor inhibición en la germinación de las semillas incubadas con NaCl, que la observada con PEG. Estas diferencias podrían deberse al efecto específico de los iones sobre la germinación. Resultados similares fueron reportados para *P. strombulifera* por Sosa *et al.* (2005).

Gonzalez (2007) evaluó el estrés hídrico y salino en *Prosopis ruscifolia* con las mismas soluciones y rangos similares a los utilizados en nuestro trabajo (0; -0,4; -0,8; -1,2; -1,5; -1,9; -2,2 MPa). Nuestros resultados indican que *P. alpataco* presenta mayor tolerancia al estrés salino que *P. ruscifolia*, ya que germinó incluso en los menores potenciales osmóticos probados. En el caso del estrés hídrico, nuestros resultados revelaron que a

-0,4; -1,2 y -1,5 MPa de potencial, *P.alpataco* obtuvo valores superiores a los reportados por este autor (93,00 %; 92,00 %; 49,33 %). Para el caso del estrés salino, también se observaron en -0,4; -1,2; -1,5 y -2,2 MPa valores superiores de germinación en *P.alpataco* respecto de los resultados hayados por Gonzalez (96,66 %; 86,66 %; 66,66 %; 33,33 %). Los primeros síntomas causados a *P. ruscifolia* por estrés salino se manifestaron en un potencial de a -1,5 MPa, en cambio en nuestro trabajo, estos síntomas comenzaron a manifestarse a partir de los -1,2 MPa. Además, *P. alpataco* pudo germinar en soluciones con potenciales de -3,0 MPa de NaCl, mientras que los rangos de tolerancia observados en otras especies del género son entre -1,5 y -1,9 MPa (Passera, 2000).

El polietilenglicol es una sustancia considerada inerte, por lo que su efecto sobre la germinación esta relacionado con el bajo potencial de agua de la solución. Las soluciones salinas en cambio, pueden producir algún otro efecto, además del efecto osmótico (Killian *et al.*, 2002). En concordancia con estos resultados, Sosa *et al.* (2005) observaron en *P. strombulifera* una mayor inhibición en las semillas incubadas con NaCl que la observada en PEG.

Frecuentemente la tolerancia a la salinidad se asocia con la tolerancia al estrés hídrico; en nuestro caso, la especie se comportó como halófito, ya que la germinación fue mayor cuando se trabajó con NaCl que con PEG. Esto demuestra que *P. alpataco* es más tolerante al estrés salino que al estrés hídrico, resultados que coinciden con Villagra y Cavagnaro (2006) para esta misma especie.

El crecimiento en longitud y el peso de las plántulas bajo estrés fueron afectados negativamente por la presencia de NaCl y de PEG durante la incubación. Se observó una disminución tanto de la longitud como del peso fresco, en los dos ensayos realizados. De la comparación de la longitud del vástago y de la raíz, surgió que en el estrés hídrico la raíz siempre superó al vástago en los tres potenciales probados (-0,5; -1; -1,5 MPa). Sin embargo en el estrés salino, se observó que el vástago prevaleció sobre la raíz a partir de los 300 mM (-1,2 MPa). Estos resultados no concuerdan con lo expuesto por Gonzalez (2007) para *P. ruscifolia*, quien observó que la relación entre la longitud de la raíz y la longitud del tallo se incrementó en todos los casos.

El peso fresco de las plántulas fue menor a medida que disminuyó el potencial osmótico producido por NaCl o por PEG.

Los resultados obtenidos en este trabajo reafirma la idea propuesta por Villagra *et al.* (2010). Estos autores indicaron que las especies de *Prosopis* pueden conventirse en

componentes dominantes en ambientes áridos de la Argentina, debido a la adquisición de adaptaciones morfo-fisiológicas ante un medio ambiente estresante.

En este trabajo se logró ajustar un protocolo de cultivo *in vitro* para la obtención de brotes y de raíces, a partir de secciones nodales juveniles de *P. alpataco*.

Las especies de *Prosopis* han sido consideradas como recalcitrantes en el cultivo *in vitro*, es decir, incapaces de responder a las manipulaciones inherentes a estas técnicas (Harris, 1992). Sin embargo, se ha observado diferentes comportamientos de acuerdo a la especie de *Prosopis* cultivada. Si bien se ha reportado que la producción de callo morfogénico ocurre solo cuando se adicionan auxinas y citocininas al medio de cultivo (Skoog y Miller, 1957; Zhao *et al.*, 2008), la organogénesis indirecta de *P. alpataco* fue inducida sin la adición de reguladores de crecimiento. Esto mismo fue observado en otras especies de *Prosopis* (Kumar y Singh, 2009; Verdes, 2007; Nandwani y Ramawat, 1992). Si bien se obtuvieron brotes adventicios de *P. alpataco* vía organogénesis indirecta en ausencia de reguladores de crecimiento, éstos permanecieron sin elongar. Estos resultados coinciden con lo reportado para *Prosopis juliflora* (Nandwani y Ramawat, 1992).

La calidad y cantidad de raíces generadas *in vitro* influyen en la supervivencia de las plantas en condiciones *ex vitro* (Navatel, 1982). En la mayoría de los tratamientos las secciones nodales de *P. alpataco* generaron un solo eje radicular en la base del explante. De los tratamientos realizados, el mayor porcentaje de enraizamiento (37,04 %) se obtuvo cuando se adicionó ANA (3 mg/l). En otras especies del mismo género se obtuvieron resultados similares, como en *P. chilensis* y *P. tamarugo* (Jordan y Balboa, 1985).

En cuanto a la macropropagación, la respuesta a la propagación vegetativa por estacas de algarrobo ha sido muy variable. Existen especies con tasas superiores a 80 % como en *P. juliflora* (Wojtusik *et al.*, 1994) y *P. glandulosa*. Otras especies como *P. cineraria* y *P. tamarugo* arrojaron un 10 % de enraizamiento (Harris, 1992; De Souza, 1993) mientras que se reportaron tasas de entre 30 % y 80 % en *P. alba* (Klass *et al.*, 1987; Oberschelp y Marcó, 2010).

La ausencia de enraizamiento observada en las estacas de *P. alpataco*, podría asociarse con el problema de contaminación fúngica o con el período estacional donde se realizaron los cortes de las estacas (invierno). La contaminación del estaquillado ha sido poco estudiada y rara vez mencionada en la bibliografía. Los tejidos vegetales de *Prosopis* spp dispuestos en el ambiente natural son portadores de organismos

saprófitos, hongos y bacterias. Estos son de difícil eliminación y proliferan cuando están en contacto con las soluciones nutritivas (Verdes, 2007). En nuestro caso, el tipo de sustrato y el enraizante utilizado (ANA) podrían haber favorecido el desarrollo de la contaminación fúngica. Sin bien Agüero (2009) no evaluó la tasa de enraizamiento en *P. alpataco*, informó que la primavera es el momento óptimo para la obtención exitosa de estacas de ésta especie. Este período, previo al rebrote foliar y a la emergencia de los primordios florales, es el momento del año en que la rama posee la máxima concentración de hidratos de carbono de reserva.

Se puede concluir que *Prosopis alpataco* es una especie de gran plasticidad. Posee una excelente respuesta germinativa y ante la presencia de condiciones ambientales adecuadas, las semillas germinan en su totalidad. Los estudios directos de vigor (estrés salino e hídrico) realizados en este trabajo, indicaron que se trata de una especie vigorosa, ya que puede tolerar al estrés hídrico y salino. Además se halló la posibilidad de obtener plantas a través de la reproducción vegetativa de la especie.

Las técnicas logradas en esta investigación podrían ser útiles para que se puedan ser implementadas en programas de forestación o bien para obtener bienes productivos por las características sobresalientes de ésta especie multipropósito.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Agüero, P. R.** (2009). Evaluación de características estructurales y procesos fisiológicos determinantes de las posibilidades de uso dos especies arbustivas del género *Prosopis* L. en el ecotono Monte-Patagonia. Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Anchorena, J.** (1978). Regiones ecológicas de la Patagonia., *Comunicación Técnica. Rev INTA-EEA*. Bariloche. 26 (8).
- Ballester, A., A. Vidal, & Viéitez A. M.** (2009). Developmental stages during *in vitro* rooting hardwood tree from material with juvenile and mature characteristics. *Adventitious roots formation of forest trees and horticultural plants- From genes to applications*. Ed. Niemii K. y C. Escagel. Research singpost, Kerala, India. pp 277-296.
- Barton, L. V.** (1965). Dormancy in seeds imposed by the seed coat. *Enciclopedia of plant physiology*, Ed. Ruthland, Springer-Verlag. pp 727-746.
- Bewley, J. D.** (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. (9): 1055-1066.

- Boeri, P., Sharry S., & Barrio D.** (2013). Conocer la biodiversidad para conservarla y manejarla. En: Ambiente, Sociedad y Producción. *Serie Congresos y Jornadas de la Universidad Nacional de Río Negro*. pp 95- 102.
- Bran, D.** (1992). Regiones Ecológicas de la Patagonia y sus Principales Formaciones Vegetales. *Primer Curso de Planificación Integral de Campos*. Recursos Naturales. INTA EEA Bariloche. Tomo I.
- Bran, D., Ayesa, J., & López, C.** (2000). Regiones Ecológicas de Río Negro. Comunicación Técnica. p 59.
- Bukart, A.** (1940). Materiales para: una monografía del género *Prosopis* (*Leguminosae*). *Rev. Darwiniana*. 4 (1): 57-128.
- Burkart, A.** (1976). A monograph of the genus *Prosopis* (*Leguminosae* subfam. Mimosoideae). *Journal of the Arnold Arboretum*. (57): 219-249; 450-455.
- Cabrera, A. L.** (1971). Fitogeografía de la República Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. (14):1-42.
- Catalán, L. A. & Balzarini M.** (1992). Improved laboratory germination conditions for several arboreal *Prosopis* species: *P. chilensis*, *P. flexuosa*, *P. nigra*, *P. alba*, *P. caldenia* and *P. affinis*. *Seed Science and Technology*. (20): 293-29.
- Chapin III F. S., Autumn K., & Pugnaire, F.** (1993). Evolution of Suites of Traits in, Response to Environmental Stress. *The American Naturalist*, Supplement: Evolutionary Responses to Environmental Stress. (142): S78-S92.
- Cohn, M. A. & Butera, D.** (1983). Seed dormancy in red rice. *Plant Physiol*. 73: 381-384.
- De Souza, C. E.** (1993). "Propagação vegetativa de algarobeira por estaquia em casa de vegetação e em condições de telado". EMBRAPA (CEPTSA). (77): 1-10.
- Didoné, N. G. & Distel, R. A.** (1996). Efecto del pasaje de las semillas por el tracto digestivo sobre la pérdida de dormición en los *Prosopis* del Caldenal. XXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. pp 126-127.
- Enrique, M.** (2010). La voladura de suelos y la inundación ¿son incoherentes para la naturaleza? Ed. INTA, EE. Valle Inferior. 20 (63): 5-8.
- Fagg, C.W. & Stewart, J. L.** (1994). The value of *Acacia* and *Prosopis* in arid and semia-arid environments. *Journal of Arid Environment*. (27): 3-25.
- Fatemeh, A., Tabari, M., & Behtari, B.** (2011). Effect of drought stress on the germination parameters of Cupressus Seeds. *Int. J. Forest, Soil and Erosion*. GHB's Journals, IJFSE, Shabestar, Iran. 1 (1):11-17

- Felker P.** (1981). Screening *Prosopis* species for biofuel production on Semi-arid Lands. Final Report to U.S. Doentis. Springfield, V. A.
- Felker, P.** (2000). An investment based approach to 183–188 agroforestry in arid lands. *Ann Arid Zone.* (30): 383–395.
- Forcone A. & González C.** (2014). Plantas del monte patagónico. Colección Ciencias y Tecnología Bahía Blanca. Ed. Universidad Nacional del Sur, Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew).
- Giri, C.; B. Shyamkumar & Anjaneyulu C.** (2004). Progreest in Tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Rev. Trees Struct Funct.* (18):115-135
- González, D. P.** (2007). Tolerancia al estrés salino del vinal (*Prosopis ruscifolia*): germinación, crecimiento y ajuste osmótico (Doctoral dissertation, MSC. Diego A. Meloni).
- Gonzalez, Y., Reino, J., & Machado, R.** (2009). Dormancia y tratamientos pregerminativos en las semillas de *Leucaena* spp. cosechadas en suelo ácido. *Pastos y Forrajes.* 32 (4): 1-1.
- Goyal, Y. & Arya H. C.** (1984). Tissue culture of desert trees I. Clonal multiplication of *Prosopis cineraria* by bud culture. *J. Plant Physiol.* (115): 183-189.
- Grime, J. P.** (1977). Evidence for the Existence of Three Primary Strategies in Plants and Its Relevance to Ecological and Evolutionary Theory. *The American Naturalist.* 111 (982): 1169-1194.
- Guillén, S., Martínez-Palacios, A., Martínez, H., & Martínez-Ávalos, J. G.** (2015). Organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis* (Asparagaceae), una especie amenazada del noreste de México. *Botanical Sciences.* 93(2), 221-230.
- Harris, P. J. C.** (1992). “Vegetative propagation of *Prosopis*”. In *Prosopis* Species: Aspects of their Value. *Research and Development.* R.W. Dutton (Ed.). CORD, University of Durham, Durham, UK. pp 175-191.
- Hartmann, H. & Kester D.** (2000). Propagación de plantas. Principios prácticos. Octava edición. Editorial continental, México. pp 760.
- Hepher, A. & Roberts, J. A.** (1985). The control of seed germination in *Trollius ledebouri*. A model of seed dormancy. *J. Plants* 166: 321–328.
- Jain, S. M., & Häggman, H.** (2007). Protocols for micropropagation of Woody trees and fruits. Springer, Netherland. pp 137-146.

- Jordan, M. & Balboa O.** (1985). *In vitro* regeneration of *Prosopis tamarugo* Phil. and *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz from nodal sections. *Garten bauwissenschaft*. 50: 138-142.
- Killian, S., Tapia, A. M., & Sanchez, A.** (2002). Pretratamientos Salinos en semillas de *Prosopis flexuosa* A.P.D.C. En: Producciones Científicas. Congreso Regional de Ciencia y Tecnología. 2002. pp 1- 15.
- Klass, S., J. Wright, & Felker P.** (1987). Influence of Auxins Thiamin and Fungal Drenches on the Rooting of *Prosopis alba* Clone B-2v-50 Cuttings". *J. Hort. Sci.* 62: 97-100.
- Kobori, N. N., Moura Mascarin, G., & Moure Cicero, S.** (2013). Métodos não sulfúricos para superação de dormência de sementes de mucuna-preta (*Mucuna aterrima*). Informativo. ABRATES. 23 (1): 25-26.
- Ladio, A. H. & Lozada M.** (2009). Human ecology, ethnobotany and traditional practices in rural populations inhabiting the Monte region: Resilience and ecological knowledge. *Journal of Arid Environments*. (73): 222-227.
- Bilbao, M. G. L.** (1996). Estudio de la expresión génica durante la embriogénesis somática en " *Saccharum officinarum*" y su relación con el ácido abscísico y la sequía (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
- Maguire, J. D.** (1962). Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*. 2: 176- 177.
- Martinez, A., & Schinelli, T.** (2009). Viverización de especies forestales nativas de nuestra región: Los *Nothofagus caducifolios* Parte 1: Cosecha y procesamiento de semillas. *Presencia*. 53, 36- 41.
- Mayer, A. M. & Poljakoff- Mayber, A.** (1982). *The Germination of Seeds*: Pergamon International Library of Science, Technology, Engineering and Social Studies. Elsevier.
- Michel, B. E.** (1983). Evaluation of the Water Potentials of Solutions of Polyethylene Glycol 8000 Both in the Absence and Presence of Other Solutes. *Plant Physiol.* (72): 66-70.
- Michel, B. E. & Kaufmann, M.** (1973). The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiol.* (51): 914-916.
- Murashige, T. & Skoog, F.** (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Plant Physiol.* (15): 473-497.

- Nandwani, D. & Ramawat K. G.** (1991). Callus culture and plantlets formation from nodal explants of *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. *Indian Journal of Experimental Biology*. (29): 523-527.
- Navatel, J. C.** (1982). Problemas liés á la production de porte-greffe d'arbres fruitiers par la multiplication *in vitro*. *Fruits*. 37: 331-336.
- Oberschelp, G. P. J. & Marcó M. A.** (2010). Efecto del ácido 3-indolbutírico sobre el enraizamiento adventicio y la altura de plantines clonales de *Prosopis alba* Grisebach. *Rev. Quebracho*. 18(1,2):112-119.
- Orians, G. H. & Solbrig, O. T.** (1977). A Cost-Income model of leaves and roots with special reference to arid and semiarid areas. *The American Naturalist*. (111): 677-990.
- Ortega Baes, P., de Viana, M. L., & Sührling S.** (2002). Germination in *Prosopis ferox* seeds: effects of mechanical, chemical and biological scarification. *Journal of Arid Environments*. 50 (1): 185–189.
- Palacios, R. A. & Brizuela M. M.** (2005). Fabaceae, parte 13. Subfam. II. Mimosoideae, parte 4. Tribu VI. Mimoseae, parte B. *Prosopis* L. En: Anton A.M., Zuloaga F.O., *Fanerog Fl. Argent.* pp 3-25.
- Pece, M. G., Sobrero, M. T., Acosta, M., & Rossi, F.** (2014). Tratamientos pregerminativos en *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart var. *decorticans*. *Foresta Veracruzana. Recursos Genéticos Forestales, Xalapa, México*. 16 (2): 31-36.
- Pol, R. G, Camín, S. R., & Astié, A. A.** (2005). Situación ambiental en la Ecorregión del Monte. En: Brown A *et al.* (Eds.) *Situación ambiental argentina 2005*. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires. pp 227- 233.
- Ranal, N. A. & Garcia de Santana, D.** (2006). How and why to measure the germination process? *Rev. bras. Bot. São Paulo*. 29 (1).
- Roig, F. A.** (1993). Informe Nacional para la Selección de Germoplasma en Especies del Género *Prosopis* de la República Argentina. En: *Contribuciones Mendocinas a la Quinta Reunión Regional para América Latina y el Caribe de la Red de Forestación*. pp 1-36.
- Roig, F. A.** (1987). Arboles y arbustos de *Prosopis flexuosa* y *P. alpataco*. *Parodiana*. 5(1): 49-64.
- Rundel, P. W., Villagra P. E., Dillon M. C., Roig-Juñent S., & Debandy G.** (2007). "Desert and Semi-Desert Environments", en: Veblen T., Young K.; Orme A. Eds. *The*

Physical Geography of South America. Oxford Regional Environment Series. Oxford University Press. 10:158-183.

**Sapoznikow, A., Reeves, C., Degorgue, G., Sessa G., & de la Reta, M.** (2002). Flora de la Estepa. *Fundación Patagonia Natural*. pp 20.

**Schillizzi, R., Gelos, E. M., & Spagnuolo, J.** (2004). Procesos de retracción de los acantilados patagónicos entre la desembocadura de los ríos Negro y Chubut. Argentina. *Rev. de la Asociación Argentina de Sedimentología*. 11(1): 17-26.

**Soria, N.; Salomón, M.; Rubio, C., & Fernández, R.** (2007). Herbario Digital Secano de Lavalle. Laboratorio de Desertificación y Ordenamiento Territorial.

**Sosa, L., Llanes, A., Reinoso, H., Reginato, M., & Luna, V.** (2005). Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera*. *Annals of Botany*. 96(2), 261-267.

**Tabango, A.** (2011). Micropropagación in vitro de la especie endémica: jiguérón (*Aegiphila ferruginea*), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción. Tesis de grado. Escuela politécnica del ejército. Sangolquí.

**Vega Riveros, C., Meglioli P. A., & Villagra P. E.** (2011). *Prosopis alpataco* Phil. (Fabaceae, Mimosoideae). *Kurtziana*. 36 (2): 53-64.

**Verdes P.** (2007). Micropropagación de *Prosopis caldenia* burk.: estado actual y perspectivas. *Rev. Científica Agropecuaria*. Facultad de Ciencias Agropecuarias – UNER. 11 (1): 45-51.

**Villagra, P. E.** (1995). Temperature effects on germination of *Prosopis argentina* and *P. alpataco* (Fabaceae, Mimosoideae). *Seed Science & Technology*., (23): 639-646.

**Villagra, P. E.** (1998). Comparación del comportamiento fitosociológico y ecofisiológico de *Prosopis argentina* y *P. alpataco* (Fabaceae, Mimosoideae). Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza. pp 130.

**Villagra, P. E., Vilela, A. E., Giordano, C. V., & Alvarez J. A.** (2010). Ecophysiology of *Prosopis* Species from the arid lands of Argentina: What do we know about adaptation to stressful environments?. En: K.G. Ramawat. Desert Plants. Biology and Biotechnology. *Springer- Verlag*. pp 322-354.

**Villagra, P. E. & Cavagnaro J. B.** (2006). Water stress effects on the seedling growth of *Prosopis argentina* and *Prosopis alpataco*. *Journal of Arid Environments*. (64): 390-400.