
UNIDADES ENCAPSULABLES: UNA ESTRATEGIA DE PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN *ex situ* DE PLANTAS NATIVAS

SYNSEEDS: A PROPAGATION AND *ex situ* CONSERVATION STRATEGY FOR NATIVE PLANTS

Huenelaf, Valeria¹; Dalzotto, Daniela²; Piñuel, Lucrecia³, Sharry, Sandra⁴ y Boeri, Patricia⁵

^{1, 2, 3, 4, 5}Universidad Nacional de Río Negro, Río Negro Viedma, Argentina; ^{2, 3, 4, 5}CIT-Río Negro – CONICET, Viedma, Río Negro, Argentina

valeriahuenelaf@gmail.com

Palabras clave: *Unidades Encapsulables, norpatagonia, Larrea divaricata, Acantholippia seriphioides, jarilla, tomillo del monte*

Eje temático*: 1. Gestión y conservación de recursos naturales

Modalidad*: póster

Resumen

Ante la degradación ambiental en las zonas áridas y semiáridas de la región Norpatagónica, es necesario emprender acciones que favorezcan la conservación de la biodiversidad nativa. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de regeneración de plántulas de *Nicotiana tabacum* a partir de Unidades Encapsulables (UE) y la germinación *in vitro* de dos especies nativas, *Larrea divaricata* y *Acantholippia seriphioides*, luego de ser escarificadas mecánicamente. Para las UE, se utilizaron secciones nodales como explantes en una matriz de alginato de sodio y se evaluó su capacidad de regenerar plántulas luego del almacenamiento de 45 días a 4°C. Por otro lado, se realizaron diferentes tratamientos pre-germinativos y se desarrollaron protocolos de desinfección para las semillas de las especies nativas. Los resultados mostraron que las UE germinaron en un 100% y lograron enraizar luego del almacenamiento. Se logró un 63,3% de germinaciones *L. divaricata* y un 73,3% para *A. seriphioides*.

Abstract

Due to environmental degradation in the arid and semi-arid areas of the North Patagonian region, it is necessary to undertake actions that favor the conservation of native biodiversity. The objective of this work was to evaluate the regeneration capacity of *Nicotiana tabacum* seedlings from synseeds and the *in vitro* germination of two native species, *Larrea divaricata* and *Acantholippia seriphioides*, after being mechanically scarified. For the synseeds, nodal sections were used as explants in a sodium alginate matrix and their ability to regenerate seedlings after storage for 45 days at 4 ° C was evaluated. On the other hand, different pre-germination treatments were carried out and disinfection protocols were developed for the seeds of native species. The results showed that 100% of the synseeds germinated and managed to root after storage. A 63.3% germination of *L. divaricata* and 73.3% for *A. seriphioides* were achieved.

Introducción

Argentina es uno de los países con mayor biodiversidad específica del mundo, producto de su elevado número de ecosistemas. En su extenso territorio, las plantas se han adaptado a ambientes muy variables, que van desde condiciones subtropicales y templadas, a ambientes áridos y semiáridos, como los de la Patagonia (Clausen *et al.*, 1995). A pesar de la riqueza específica del lugar, el deterioro ambiental y la desertificación han provocado que los sistemas áridos y semiáridos de la Norpatagonia presenten una elevada vulnerabilidad. Así, no solo se ve comprometida la biodiversidad regional sino también su capacidad de generar bienes y servicios. Por otra parte, la conservación de la biodiversidad de la estepa y monte de Patagonia ha recibido escasa atención, en relación con otros biomas (Chehébar *et al.*, 2013). En este contexto, resulta imprescindible implementar estrategias de conservación de la biodiversidad nativa, aspecto crucial para alcanzar mayor resiliencia y capacidad adaptativa ante el actual y futuro escenario de cambio climático global.

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una de las estrategias biotecnológicas que permite apoyar programas de conservación *ex situ* de la biodiversidad vegetal (Engelmann y Engels 2002). Por ello, en los últimos años se ha intensificado la atención en biotécnicas que permiten llevar a cabo la conservación *ex situ* de las especies, como las semillas sintéticas y unidades encapsulables (UE). Estas son semejantes a una semilla natural y puede estar formada por un

embrión somático (semilla sintética) o propágulos (unidades encapsulables), capaces de producir una planta completa. Esta tecnología ha demostrado ser una estrategia viable para la conservación a mediano y corto plazo del germoplasma vegetal y puede tener múltiples aplicaciones científicas e industriales, permitiendo el manejo y uso de los recursos naturales de forma sustentable. En los últimos años, ha habido un creciente interés por aplicar el CTV en especies nativas, sin embargo, la técnica de las UE aún no ha sido estudiada como estrategia de conservación y propagación en estas especies. En este contexto, desde el año 2019, en el laboratorio de Tecnología de Alimentos y Biotecnología de la Universidad Nacional de Río Negro se desarrollan actividades de investigación tendientes a evaluar las respuestas de algunas especies nativas al cultivo de tejidos vegetales, particularmente en lo referido a la producción de UE con el fin de establecer protocolos eficientes de propagación y conservación *ex situ*. Para ello, en primer lugar se realizó la puesta a punto de la técnica de encapsulamiento en *Nicotiana tabacum*, una especie de fácil propagación *in vitro*, para luego replicarla en dos especies nativas: el tomillo de monte (*Acantholippia seriphioides*) y la jarilla (*Larrea divaricata*). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de regeneración de plántulas de *N. tabacum* a partir de UE y la germinación *in vitro* de dos especies nativas, *L. divaricata* y *A. seriphioides*, luego de ser escarificadas mecánicamente.

Materiales y métodos

1. Establecimiento *in vitro* de las tres especies:

1.1. Pre-tratamientos germinativos

La presencia de dormancia en las semillas de *L. divaricata* ha sido sugerida anteriormente (López Dumrauf *et al.* 2018; Palacio, 2008). Por ello, antes de germinar las semillas de esta especie se llevó a cabo una escarificación mecánica que constó de remover la pared del mericarpio a través del corte con una pinza y luego raspar la semilla contra una lija para desgastar el tegumento seminal y que se permeabilice la semilla. En el caso de *A. seriphioides*, bajo lupa, se utilizaron pinzas para remover los restos de las piezas florales y remover la pared del mericarpio para aislar la semilla.

1.2. Desinfección de las semillas e introducción al CTV

Luego de los tratamientos pre-germinativos, se desinfectaron las semillas de las tres especies bajo estudio. Las semillas de *L. divaricata* fueron desinfectadas con una inmersión durante 1' en etanol 70%, luego en NaOCl 25% durante 15'. Las semillas de *A. seriphioides* fueron sumergidas durante 30" en etanol 70%, NaOCl 10% durante 10'. Las semillas de *N. tabacum* fueron sumergidas durante 1' en etanol 70%, luego en NaOCl durante 15'. Luego de las desinfecciones, todas las semillas fueron primeramente enjuagadas repetidamente con agua destilada estéril y luego colocadas en frascos de vidrio con medio de cultivo de Murashige and Skoog a la mitad de la concentración, sacarosa (3 %), agar 0,7 % y con un pH entre 5,8 y 6,2. Para *L. divaricata* y *A. seriphioides* se realizó un control que constó de semillas desinfectadas y puestas a germinar, sin haber sido sometidas a los tratamientos pre-germinativo. Los frascos fueron mantenidos con fotoperiodo luz/oscuridad 16/8 hs a 23 ± 2 °C. A los 10 días se calculó el porcentaje de germinación de las especies nativas.

2. Obtención de UE de *Nicotiana tabacum*

Para el ensayo preliminar de Unidades Encapsulables de *N. tabacum* se utilizaron secciones nodales como explantes. En condiciones de esterilidad, 9 explantes fueron cortados con un bisturí y sumergidos en alginato de sodio al 2% estéril, luego se recogieron en pequeñas gotas con una pipeta. Las mismas se sumergieron en una solución de CaCl_2 (100 mM) durante 2'. Las UE formadas fueron almacenadas en placas de Petri selladas con papel film y fueron mantenidas a 4°C durante un mes y medio en condiciones de esterilidad. Finalizada esta etapa, las UE se pusieron a germinar en medio Murashige and Skoog a la mitad de la concentración, sacarosa (3 %), agar 0,7 % y con un pH entre 5,8 y 6,2. Las placas fueron mantenidas con fotoperiodo luz/oscuridad 16/8 hs a 23 ± 2 °C. Se mantuvo un control de UE que fue puesto a germinar sin haber pasado por almacenamiento en frío.

Resultados

1. Germinaciones *in vitro*

Al finalizar los 10 días de ensayo no se observaron signos de contaminación fúngica o bacteriana con los protocolos de desinfección utilizados para las tres especies. Se obtuvieron plántulas de

ambas especies, de aspecto sano y vigoroso (figura 1). El porcentaje de germinación para *L. divaricata* fue de un 63,3%, el doble del observado en las semillas control (31,6%). En cuanto a *A. seriphioides*, a los 10 días se obtuvo un porcentaje de germinación del 73.3%, lo cual demuestra que el tratamiento pre-germinativo tiene un efecto positivo en la germinación de esta especie respecto al control, en el cual no se observaron semillas germinadas.

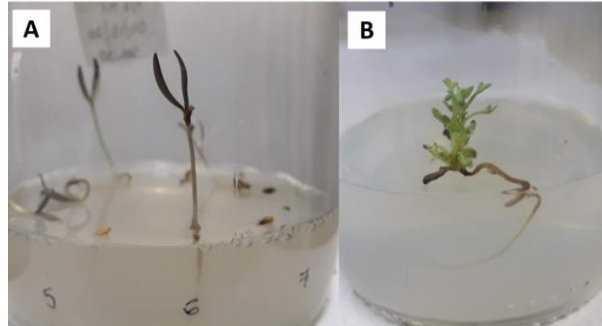


Figura 1. A) plántulas de *L. divaricata*, B) plántula de *A. seriphioides*.

2. Unidades encapsulables de *N. tabacum*

Las UE formadas a partir de nudos de *N. tabacum* tuvieron entre 0,6 y 1 cm de diámetro. No se observó contaminación fúngica o bacteriana durante todo el ensayo. El 100% de las UE formadas que fueron almacenadas en frío lograron germinar en el plazo de dos semanas (figura 2C), al igual que las UE control (figura 2B). Sin embargo, se observaron signos de deterioro en las plántulas germinadas luego del almacenamiento, respecto del control. Ello podría deberse a que el periodo de incubación fue demasiado prolongado para la especie, con lo cual se debería evaluar a futuro un almacenamiento más corto para lograr plántulas de mejor calidad. Por otro lado, se observó que las plántulas germinadas, tanto en el control como en las almacenadas en frío, desarrollaron raíces en el medio sin necesidad de ser transferidas a un medio de enraizamiento.

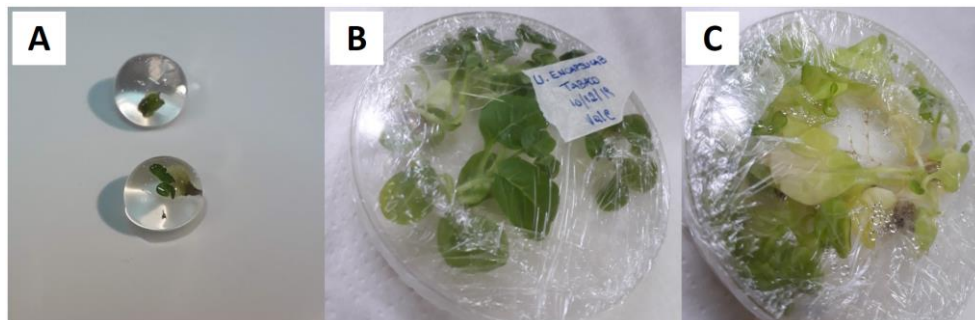


Figura 2. A) Unidades Encapsulables, B) UE control germinadas A) UE germinadas luego del almacenamiento a 4°C.

Conclusiones

Las estrategias de propagación eficientes y a gran escala que proporciona el CTV cobra importancia para las especies nativas cuya propagación sexual es lenta y está condicionada por la dormancia de sus semillas, como es el caso de *L. divaricata* y *A. seriphioides*. Los resultados del presente trabajo indican que ambas especies pueden ser multiplicadas y crecer bajo condiciones *in vitro* y que los tratamientos pre-germinativos aplicados resultaron eficientes, ya que permitieron aumentar sus porcentajes de germinación. Las UE generadas a partir de propágulos vegetativos de *N. tabacum* germinaron en medio MS, sin la presencia de aditivos en la matriz de alginato ni en el medio de cultivo. Estos resultados son fundamentales como punto de partida en el desarrollo de un protocolo para generar UE de especies nativas que puedan ser almacenadas en espacios reducidos, a bajas temperaturas y a mediano y corto plazo. Esto no solo permite un fácil almacenamiento, transporte y acceso, sino que ofrece también la posibilidad de generar estrategias de conservación a largo plazo, a través de la crioconservación de las UE por métodos de encapsulación-deshidratación y encapsulación-vitrificación. Sin embargo, resulta necesario continuar los estudios tendientes a establecer un protocolo eficiente de UE, así como también el periodo adecuado de conservación para cada caso. Por ello, se continuará trabajando

en el ajuste y optimización de esta técnica de encapsulación en las especies nativas seleccionadas. Cabe destacar que esta metodología presenta la ventaja de que, durante el almacenamiento en frío, los propágulos encapsulados no requieren ser transferidos a un medio fresco, lo que reduce el costo de mantenimiento de los cultivos. Además, a través de la generación de UE se asegura la disposición de material vegetal para su conservación ex situ y la disponibilidad de plantas para futuros programas de reforestación de ecosistemas degradados.

Bibliografía

BISIGATO, A.J., & AMP; LAPHITZ, R.M.L. 2009. "Ecohydrological effects of grazing-induced degradation in the Patagonian Monte, Argentina". *Austral Ecology*, 34(5): 545-557. Wiley Online Library.

CHEHÉBAR, C., NOVARO, A., IGLESIAS, G., WALKER, S., FUNES, M., TAMMONE, M., & DIDIER, K. 2013. "Identificación de áreas de importancia para la biodiversidad en la estepa y el monte de Patagonia". *ErreGé y Asociados imprenta*, p112.

ENGELMANN, F., & ENGELS, J.M.M. 2002. "Technologies and strategies for ex situ conservation. Managing plant genetic diversity". V. RAMANATHA RAO, A. H. D. BROWN, M. JACKSON (eds.). 89-103. Roma, CABI Publishing.

LÓPEZ DUMRAUF, I.; DALZOTTO, D.; SABANES, I.; FAILLA, M.; SHARRY, S. & BOERI P. 2018. "Efectos de la escarificación física y química en semillas de *Larrea divaricata* (Zygophyllaceae) en Patagonia argentina". *Naturalia patagónica*, (12): p161. Comodoro Rivadavia: Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

PALACIO, L., BAEZA, M. C., CANTERO, J. J., CUSIDÓ, R., & GOLENIOWSKI, M. E. 2008. "In Vitro Propagation of "Jarilla" (*Larrea divaricata* CAV.) and Secondary Metabolite Production". *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31(12), 2321–2325. J-Stage.