

APLICACIÓN DE BIOTECNOLOGÍAS PARA LA PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE “MONTE NEGRO” (*Bougainvillea spinosa* (Cav.) Heimerl.)



Autora: Micaela Espíndola
Directora: Dra. Patricia Boeri
Co-directora: Lic. Daniela Dalzotto

Licenciatura de Ciencias del Ambiente
Universidad Nacional de Río Negro
2021

*Aplicación de biotecnologías para la propagación y conservación de “monte negro”
(Bougainvillea spinosa (Cav.) Heimerl.)*

Título: Aplicación de biotecnologías para la propagación y conservación de “monte negro” (*Bougainvillea spinosa* (Cav.) Heimerl.)

Datos de la Estudiante Micaela Belén Espíndola, Licenciatura en Ciencias del Ambiente. Sede Atlántica, Universidad Nacional de Río Negro (UNRN).

Datos de la Directora: Dra. Boeri Patricia, Universidad Nacional de Río Negro, Centro de Investigación y Transferencia (CIT-UNRN-CONICET).

Datos de la Co-directora: Lic. Dalzotto Daniela, Universidad Nacional de Río Negro, Centro de Investigación y Transferencia (CIT-UNRN-CONICET).

Año: 2021

ÍNDICE

Resumen.....	4
Agradecimientos.....	6
1. Introducción.....	7
2. Objetivos.....	8
2.1 Objetivo general.....	8
2.2 Objetivos específicos.....	8
3. Hipótesis.....	8
4. Marco teórico.....	9
4.1 Contexto regional de la investigación: la degradación ambiental de la región norpatagónica y el alcance de las biotecnologías.....	9
4.2 Características de <i>Bougainvillea spinosa</i>	9
4.3 Germinación <i>in vitro</i>	10
4.4 El Cultivo de Tejidos Vegetales <i>in vitro</i> : características y su aplicación en el género <i>Bougainvillea</i>	12
4.4.1 Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	13
4.4.2 Algunas dificultades del CTV y de su aplicación en especies leñosas.....	15
4.4.2.1. La hiperhidricidad.....	15
4.4.2.2. La oxidación de los tejidos	15
4.5 Unidades encapsulables: consideraciones generales.....	16
5. Materiales y métodos.....	16
5.1 Recolección de semillas.....	16
5.2 Optimización del protocolo de desinfección.....	17

5.3 Evaluación de la germinación <i>in vitro</i>: parámetros germinativos y cinética de la imbibición.....	18
5.4 Multiplicación de <i>B. spinosa in vitro</i>: inducción a la organogénesis (caulogénesis, callogénesis y rizogénesis)	20
5.5. Unidades encapsulables.....	21
5.6 Tratamiento estadístico de los datos.....	21
6. Resultados y discusión.....	22
6.1 Optimización del protocolo de desinfección.....	22
6.2 Germinación <i>in vitro</i>.....	25
6.3 Multiplicación de <i>B. spinosa in vitro</i>: organogénesis.....	28
6.3.1 Respuesta: “inducción y proliferación de brotes”	28
6.3.2. Respuesta: “inducción de callos”	30
6.3.3. Respuesta: “inducción de raíces”	32
6.4. Unidades encapsulables.....	32
7. Conclusiones.....	36
8. Bibliografía.....	37

Resumen

La diversidad biológica es crucial para amortiguar los efectos del cambio climático y la desertificación. Sin embargo, continúa perdiéndose a tasas sin precedentes. Estas problemáticas han afectado de forma irreversible el suelo y su productividad en ambientes áridos y semiáridos como los de la Patagonia argentina, con consecuencias graves tanto en la economía regional como en la salud de la población. Las prácticas de restauración activas se convierten en una herramienta fundamental para avanzar en acciones capaces de revertir esta situación. Sin embargo, para ello se requiere contar con una gran cantidad de individuos, adaptados a las condiciones locales, lo que constituye una de las principales limitantes. Así, el Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro* (CTV) es una biotécnica capaz de producir un gran número de individuos, en tiempo y espacios reducidos. Además, a través de la técnica de unidades encapsulables, el CTV posibilita la propagación y conservación *ex situ* de los recursos fitogenéticos a mediano y largo plazo.

Bougainvillea spinosa, conocida como “monte negro”, es una especie del monte, nativa de Perú, Bolivia, Paraguay y Argentina. Si bien ésta ha sido poco estudiada y documentada, se han llevado a cabo diversas investigaciones sobre la micropagación en otras especies leñosas nativas de la región y en algunas bougainvilleas.

El objetivo general de este trabajo plantea evaluar la propagación sexual y asexual de *Bougainvillea spinosa* a través del cultivo *in vitro*, a fin de contribuir a su conservación y uso sustentable. Así, se estudió la germinación *in vitro* de las semillas de esta especie, las condiciones adecuadas para la introducción al cultivo *in vitro*, la expresión morfogénica de explantes juveniles, la multiplicación de plantas y el almacenamiento en frío de unidades encapsulables, como estrategia de conservación a mediano plazo. Se alcanzó una germinación de $98,67\% \pm 2,31$ y se logró obtener plántulas libres de contaminación, al cabo de dos semanas, con una desinfección en H_2O_2 (30%, 4 min), etanol (70%, 5 min) y OCINa (20%, 10 min). Los parámetros germinativos evaluados fueron comparables con los obtenidos por otros autores para la misma especie (EG: $61,33\% \pm 9,24$ en el primer día en ensayo; TMG: $1,79$ días $\pm 0,35$; IV: $76,80 \pm 3,53$). El medio de cultivo de Murashige-Skoog, a la mitad de su concentración y suplementado con BAP (3 mg/l) y AG_3 (0,01 mg/l) obtuvo los mejores resultados para la formación de brotes ($90\% \pm 10$ explantes con brotes y $3,47 \pm 2,56$ brotes/explante); mientras que con la adición de IBA (2,5 mg/l) y sin reguladores, también presentaron caulogénesis. Asimismo, la formación de callo fue la respuesta morfogénica más frecuente, aún en medios libres de reguladores de crecimiento. Sólo se logró un 10% de enraizamiento en medios nutritivos suplementado con IBA (5 mg/l). Por otra parte, las unidades encapsulables sobrevivieron, e incluso germinaron, luego de una y dos semanas de almacenamiento en frío (13,33% en ambos casos), sin presentar diferencias significativas con aquellas sin este almacenamiento. No obstante, al cabo de seis semanas de su germinación se evidenció más del 70% de unidades oxidadas

en todos los casos. Se deberán diseñar nuevos ensayos, tendientes a mejorar el porcentaje de enraizamiento, así como a ajustar las condiciones de germinación de las unidades encapsulables, de modo de evitar su oxidación.

En conclusión, se obtuvo por primera vez, una metodología de desinfección de las semillas y de germinación *in vitro* eficiente, que permitió establecer los primeros avances en el cultivo *in vitro* y en la aplicación de unidades encapsulables de *Bougainvillea spinosa* para el desarrollo de nuevos protocolos de propagación y conservación *ex situ* de la especie.

Palabras clave: cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (CTV), germinación, unidades encapsulables, reguladores de crecimiento (PGR), organogénesis

Agradecimientos

En esta etapa tan importante que llega a su fin quiero agradecer a la institución y a las personas que lo hicieron posible.

A la Universidad Nacional de Río Negro por brindarme la posibilidad de estudiar esta hermosa carrera, cerca de mi familia, en la provincia en la que nací, con personas tan cálidas como son mis profesores y compañeros.

A Patricia y Daniela por ser las responsables de que hoy esté viviendo este momento, que parecía inalcanzable, pero que, con su continuo acompañamiento, compromiso y entusiasmo, lo hicieron posible.

A Pedro, mi gran compañero, por estar cerca en los buenos y no tan buenos momentos, por ser parte de todo esto y hacer que cada día sea aún mejor con su compañía; y a su familia porque me dieron el abrigo que muchas veces necesité por estar lejos de casa.

Especialmente a mis padres por darme la posibilidad de realizar una carrera universitaria, por enseñarme el valor del esfuerzo y la dedicación, por ser mis ejemplos a seguir.

A mis hermanos y sobrino, Javier, Solana, Joaquín y Amadeo, por ser lo mejor en esta vida, por acompañarme siempre, entender mis tiempos y la distancia.

A mi mejor amiga y compañera, Jorgelina, que, a pesar de los desencuentros, siempre está presente.

A toda mi familia, a Silvana y Oscar por escucharme y muchas veces aconsejarme.

Y finalmente a mis abuelos, que me enseñaron y me enseñan día a día lo más importante, el valor de la vida.

A todos ellos, gracias.

1. Introducción

En los últimos años, nuestra comprensión sobre la biodiversidad, los ecosistemas y su importancia para la supervivencia y el bienestar de la humanidad, ha aumentado. La diversidad biológica constituye el sustento de la mayoría de las actividades humanas; es parte esencial de nuestras culturas e identidades y es crucial para amortiguar los efectos del cambio climático y la desertificación, especialmente en las regiones más secas del planeta. Pese a esto, continúa perdiéndose a tasas sin precedentes y con ello, la capacidad de la naturaleza para contribuir al bienestar de las personas. La degradación ambiental, el cambio climático, la sobreexplotación y el uso no sostenible de los recursos naturales, son algunos de los principales impulsores (IPBES, 2019).

La desertificación en ambientes áridos y semiáridos, provocada principalmente por la erosión eólica, ha afectado de forma irreversible al suelo y su productividad, con graves consecuencias tanto en las economías regionales como en la salud de la población. Particularmente, en la Patagonia argentina esta problemática tiene su origen en la producción ganadera intensiva y la expansión de la frontera agropecuaria. En los últimos años, esta degradación ambiental ha quedado en evidencia con la aparición de eventos extremos, como las altas temperaturas que se produjeron en el 2019 en la Patagonia, o las fuertes nevadas que afectaron el noroeste de esta región, habiéndose superado incluso, los récords anteriores (Informe del estado del ambiente, 2019). Cabe mencionar que estos ecosistemas son vulnerables y presentan una recuperación natural muy lenta después de las perturbaciones (Safriel *et al.*, 2005; Bainbridge, 2007; Reynolds *et al.*, 2007; Busso y Fernández, 2018; Pérez *et al.*, 2020). Por ello, las prácticas de restauración activas se convierten en una herramienta fundamental: proponen modelos y tecnologías que permiten avanzar en acciones capaces de revertir la degradación y desertificación (Hernández y Pérez, 2021). Sin embargo, el éxito de futuros programas de restauración en estas regiones depende en gran parte de la reintroducción de especies nativas, para lo cual se requiere disponer de grandes cantidades del material vegetal adecuado, de calidad y adaptado a las condiciones ambientales del lugar. En este sentido, el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una de las biotecnologías que permite la propagación de especies, incluso aquellas que presentan dificultades de reproducción, en tiempo y espacios reducidos. Por otra parte, permite la aplicación de técnicas como la producción de semillas sintéticas y/o unidades encapsulables para la propagación y conservación *ex situ*, a mediano y largo plazo, de recursos fitogenéticos que en muchos casos no podrían ser conservados mediante técnicas convencionales (Cano Castillo, 2013). Cabe destacar que estas biotécnicas permiten tanto la conservación de clones de determinadas especies, como de la diversidad genética presente en una región o centro de origen (Sharry, 2015), para lo cual es fundamental iniciar el cultivo de tejidos a partir de semillas colectadas de diferentes plantas madres.

Por otra parte, las técnicas de CTV presentan la posibilidad de producir metabolitos secundarios a partir de plantas cultivadas *in vitro*. Si bien éstos no cumplen una función aparente en el metabolismo primario de las mismas, tienen una participación ecológica vinculada con mecanismos de defensa contra herbívoros, virus, hongos, bacterias, sustancias alelopáticas, fitoalexinas, entre otros. Además, estos compuestos metabólicos suelen ser de importancia comercial para las industrias farmacéutica, alimentaria, de cosméticos y como fuentes de numerosas sustancias de importancia agroquímica (Karuppusamy, 2009).

En la Patagonia existen varias especies de interés para la aplicación de estas biotecnologías. Sin embargo, muchas de ellas han sido poco estudiadas, como es el caso de *Bougainvillea spinosa*, una especie leñosa característica del monte. No obstante, hay un vasto registro de otras especies del género que han sido micropropagadas, principalmente por su valor ornamental, ya que poseen flores protegidas por brácteas de colores muy llamativos. Por otro lado, también es un género de interés debido a su potencial farmacéutico/medicinal, como, por ejemplo, *Bougainvillea glabra*, especie en la que se han determinado propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas, y de reconocido uso ancestral en el tratamiento de afecciones gastrointestinales (Saleem *et al.*, 2020). En este contexto, este Trabajo Final de Carrera pretende aplicar diferentes biotécnicas en *Bougainvillea spinosa* con el fin de contribuir a su propagación, conservación y uso sustentable.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar la propagación sexual y asexual de *Bougainvillea spinosa* a través del cultivo *in vitro*, a fin de contribuir a su conservación y uso sustentable.

2.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la germinación *in vitro* de semillas de *B. spinosa*.
2. Establecer las condiciones de cultivo *in vitro* que permitan la obtención y multiplicación masiva de plantas.
3. Evaluar la expresión morfogénica de explantes juveniles asociada al uso de reguladores de crecimiento.
4. Obtener unidades encapsulables como estrategia de conservación a mediano plazo.

3. Hipótesis

El cultivo de tejidos vegetales y la propagación sexual *in vitro* de *Bougainvillea spinosa* constituyen una alternativa para su propagación y conservación *ex situ*.

4. Marco Teórico

4.1 Contexto regional de la investigación: la degradación ambiental de la región norpatagónica y el alcance de las biotecnologías.

En el territorio argentino existe una creciente tendencia a la degradación de las tierras y desertificación, con un 12% de la superficie con altas tasas de erosión concentrada principalmente en zonas áridas y semiáridas, como la Patagonia (Informe del estado del ambiente, 2019). En el noreste de esta región, que comprende el sector más austral de la provincia fitogeográfica del Monte, las actividades ganadera y agrícola, han acelerado el proceso de desmonte (Gabella, 2015). Esta degradación, junto con los incendios, cada vez más frecuentes producto del cambio climático global, han contribuido a la pérdida de la biodiversidad, la erosión de los suelos y su deterioro fisicoquímico (Schumacher y Bugmann, 2006; Funk, 2016). En conjunto, todo ello ha puesto en crisis el concepto de sostenibilidad ecológica y social en la región.

En el orden internacional, se ha señalado la imperiosa necesidad de tomar medidas para conservar y usar de forma sostenible la biodiversidad (CDB, 1992; FAO, 2015; IPBES, 2019). Impera entonces la necesidad de emprender acciones que faciliten la conservación de la biodiversidad y la recuperación de áreas degradadas, al mismo tiempo que se promueva el desarrollo sostenible, especialmente en estos ambientes vulnerables. En este sentido, la biotecnología, y especialmente las técnicas de cultivo *in vitro* o de micropropagación, están siendo utilizadas para la producción de un gran número de individuos, en espacios reducidos y corto tiempo. Estas, junto con las unidades encapsulables o semillas sintéticas permiten la conservación *ex situ* de los recursos fitogenéticos (Clemente y Fay, 1997; Boeri y Dalzotto, 2018), y la creación de bancos de germoplasma *in vitro*.

El cultivo de tejidos ha sido ampliamente utilizado en diferentes etapas de programas de conservación de muchas especies nativas como el ombusillo (*Phytolacca tetramera*) (Cordal *et al.*, 2014), zampa (*Atriplex lampa*) (Estomba *et al.*, 2010), algarrobo blanco (*Prosopis alba*) (Castillo de Meier y Bovo, 2000), caldén (*Prosopis caldenia*) (Verdes, 2007), entre otras. Sin embargo, todavía existen especies poco estudiadas y multiplicadas en estas condiciones, como es el caso de *Bougainvillea spinosa*.

4.2 Características de *Bougainvillea spinosa*

Bougainvillea spinosa (Cav.) Heimerl (sinónimos: *Bougainvillea patagonica* Decne., *Bougainvillea spinosa* (Cav.) Heimerl f. *eubracteata*, *Bougainvillea spinosa* (Cav.) Heimerl f. *microbracteata*, *Bougainvillea spinosa* (Cav.) Heimerl f. *parviflora*, *Tricycla spinosa* Cav., *Tricycla spinosa* Cav. var. *parviflora*, *Bougainvillea patagonica* Decne. f. *eubracteata*, *Bougainvillea patagonica* Decne. f. *microbracteata*, *Bougainvillea spinosa* (Cav.) Heimerl var. *conferta*), es un arbusto ramificado de la familia Nyctaginaceae que alcanza una altura de entre 1-3 metros. Las ramas adquieren color

oscuro en período de reposo. Presenta espinas rígidas típicamente bifurcadas en el ápice y hojas espatuladas, levemente carnosas. *B. spinosa* presenta una flor solitaria, central, con tres brácteas, característica que la ubica como la única representante de la sección Trycicla (figura N°1). Éstas son ovado-cordadas, de 1-20 x 1-20 mm, glabras, blanco-amarillentas a rosado-liláceas, membranáceas, con nervios manifiestos (López y Anton, 2006). El resto de las especies del género (ubicadas en la sección Bougainvillea) presentan tres llamativas brácteas, cada una unida a una flor solitaria. Cada bráctea involucral permanece fusionada a un fruto y actúa como un ala, funcionando así como una unidad de dispersión (Ridley, 1930).



Figura N° 1. *Bougainvillea spinosa*: aspecto general de la planta y detalle de la flor.

Se distribuye desde Perú, Bolivia, Paraguay hasta la patagonia argentina en las Provincias Biogeográficas del Monte (Catamarca, Chubut, La Rioja, San Juan, Mendoza, Neuquén y Río Negro), Puneña (Jujuy y Salta), del Espinal (Buenos Aires) y Chaqueña (Córdoba, Chubut, La Pampa y San Luis) (Zuloaga y Anton, 2020).

A pesar de que existen varios estudios sobre la micropropagación de otras especies de este género, *Bougainvillea spinosa*, en particular, ha sido poco explorada y documentada (Abarca-Vargas y Petricevich, 2018).

4.3 Germinación *in vitro*

La germinación de semillas en condiciones *in vitro* permite obtener material estéril (plántulas), de calidad y con variabilidad genética, en cualquier época del año y en condiciones fitosanitarias apropiadas para los trabajos de cultivo *in vitro* (Hernández

y González, 2010). Para ello, las semillas (sin daños y signos de deterioro aparentes) deben ser colectadas de plantas madres de buen estado fitosanitario, fisiológico y genético, y luego, ser sometidas a un tratamiento de desinfección. Este proceso, permite controlar y prevenir la contaminación microbiana, aspecto que determinará en gran medida el éxito del sistema de propagación (Alvarado, 1998). Sin embargo, es muy complejo obtener un cultivo completamente aséptico, especialmente cuando se trata de especies leñosas. Para lograrlo, es necesario trabajar en ambientes adecuados, esterilizar los medios de cultivo y desinfectar superficialmente el material vegetal (Mroginsky y Roca, 1991). La proliferación de microorganismos en el cultivo puede afectar a los mismos, competir con el explante por el medio nutritivo o modificarlo. Si bien se utilizan varios compuestos químicos en el proceso de desinfección, el empleo de etanol y el hipoclorito de sodio es el más generalizado (Mroginsky y Roca, 1991). Otras sustancias pueden ser añadidas en este proceso como el peróxido de hidrógeno (Sharry, 2015), que además es un estimulante de la germinación (Barba-Espín *et al.*, 2010).

Para la germinación en condiciones *in vitro*, las semillas deben ser incubadas en medios de cultivo compuestos principalmente por agua, sales minerales y fuentes de carbono, como la sacarosa. Si bien los carbohidratos son necesarios para el desarrollo adecuado de las plántulas (Mroginsky y Roca, 1991), también pueden causar efectos indeseados, como el crecimiento de microorganismos patógenos (Martin, 2004; Martínez-Villareal *et al.*, 2016), la hiperhidricidad (Yaseen *et al.*, 2013) y el desarrollo de células indiferenciadas (callo) (Rafique *et al.*, 2013). Así, el control de estas condiciones permitirá el éxito de la germinación de las semillas y posterior cultivo (Levitus *et al.*, 2010).

Por otra parte, especialmente en las plantas de zonas áridas y semiáridas, existen diversos mecanismos naturales que ejercen un control sobre la germinación, de manera de que ésta se produzca en los momentos más adecuados. Así, en los ambientes más secos, la latencia impuesta por el tegumento seminal (latencia física) es un mecanismo frecuente, por lo que es necesario aplicar algún tipo de pretratamiento para lograr una germinación rápida y uniforme (Baskin y Baskin, 2003). En este sentido, es importante destacar que existe un amplio rango de tipos e intensidades de latencia. Así, Baskin y Baskin (1998) reportaron que la latencia física y fisiológica resultan efectivas y son las estrategias más frecuentes en arbustos de regiones áridas (85%). La latencia física es causada por tegumentos o frutos que impiden la imbibición de agua por parte de la semilla, y, por ende, el inicio de la germinación (Baskin y Baskin, 2014), mientras que la fisiológica se produce cuando las semillas son permeables al agua, pero poseen mecanismos fisiológicos de inhibición en el embrión, que evitan la emergencia de la radícula (Nikolaeva, 1977). El análisis de diferentes parámetros de germinación, tales como la capacidad germinativa, energía germinativa, tiempo medio de germinación y germinación diaria acumulada, permite identificar si las semillas presentan algún tipo de latencia. Sin embargo, los estudios sobre la germinación de este género se han llevado a cabo

mayoritariamente en especies tropicales y aún es limitada esta información en las Bougainvilleas de ecosistemas desérticos (Baskin y Baskin, 2014; Chaparro *et al.*, 2005; Beider, 2012; Rodríguez Araujo, 2021).

Por último, la obtención de plántulas axénicas a partir de la germinación *in vitro* garantiza la disponibilidad continua de material vegetal y la variabilidad genética (Bonga y Durzan, 1987).

4.4 El Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*: características y su aplicación en el género *Bougainvillea*

El “Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*” (CTV) consiste en un conjunto de técnicas que tienen como característica el uso de células, tejidos u órganos para propagar gracias a la totipotencialidad celular. Consiste en regenerar plantas completas a partir de explantes (ápices, órganos aislados, embriones, segmentos de órganos, óvulos, anteras, polen, entre otros) cultivados en medios nutritivos y condiciones adecuadas. Esta forma de cultivo tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de microorganismos contaminantes, como hongos y bacterias), y el control de los factores que afectan el crecimiento (Sharry, 2015).

Estas técnicas de propagación presentan grandes ventajas respecto a las metodologías *in situ*. Por un lado, permiten la producción de material vegetal para el establecimiento de cultivos libres de patógenos, a partir de una cantidad mínima de material inicial y en espacios reducidos. Por el otro, la obtención de nuevos compuestos de interés en la industria farmacéutica (metabolitos secundarios) a partir del cultivo de células indiferenciadas (callos) o de raíces u otros órganos vegetales (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011; Bonilla y Hernández, 2012; Pandino *et al.*, 2017).

Bajo condiciones de CTV, los diferentes explantes pueden producir distintas respuestas morfogénicas como (Mroginski y Roca, 1991; George y Sherrington, 1984):

- a) organogénesis directa, que consiste en la multiplicación de raíces o brotes provenientes de yemas axilares, terminales o laterales. El tejido inicial utilizado es meristemático;
- b) organogénesis indirecta, en este caso la formación de órganos (brotes adventicios o raíces) ocurre en presencia de un callo. Este consiste en una masa de células no organizadas (desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral) que ha derivado inicialmente de un órgano, tejido u otra parte escindida de la planta. El tejido usado como inicial es parenquimático;
- c) embriogénesis somática, los embriones somáticos pueden formarse directamente en el explante primario, o indirectamente a partir de células de callo cultivadas en suspensión o en un medio líquido.

Por otra parte, el cultivo de tejidos también es una herramienta para generar variabilidad genética. Las células desdiferenciadas obtenidas del cultivo de callos, de células o de protoplastos pueden generar variantes somaclonales (Sharry, 2015), es decir, plantas regeneradas que presenten mutaciones heredables a sus progenies (Tabares *et al.*, 1991). Así, a través de la vía indirecta (presencia de callo) y con la iniciación del cultivo *in vitro* a partir de material vegetal con alta variabilidad genética (como semillas), el CTV permite también conservar y propagar la diversidad genética.

4.4.1 Cultivo de tejidos *in vitro*

La respuesta obtenida *in vitro* dependerá de la planta madre, el tipo de explante, el medio de cultivo y las condiciones de aclimatación. En términos generales, para la micropropagación de especies leñosas, la elección y acondicionamiento de las plantas madres y de los explantes a utilizar (juveniles), es seguida de una etapa de multiplicación. Durante la misma, los explantes estériles se siembran en medios nutritivos suplementados con distintos reguladores de crecimiento, de acuerdo a la respuesta morfogénica esperada. Skoog y Miller (1957) plantean que todo proceso de diferenciación está regulado por el balance entre auxinas y citocininas. En general, según este modelo, se espera que cuando la relación auxina/citocinina es alta ($A/C > 1$) se formen raíces (rizogénesis), cuando es baja se produzcan vástagos (caulogénesis) y con relaciones cercanas a 1 se obtengan callos (Krikorian, 1995; Segura, 2008).

La obtención de brotes *in vitro* en el género *Bougainvillea* ha sido lograda exitosamente con el suplemento de reguladores de crecimiento (PGR) como bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (AG_3) (tabla N° 1). Sin embargo, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada al genotipo de la planta. Es muy frecuente que, en idénticas condiciones nutritivas y ambientales, las respuestas *in vitro* del cultivo de un determinado explante, o de una especie, difieran con el genotipo empleado (Anand *et al.*; 2016). Por ejemplo, en ambientes áridos y semiáridos, el crecimiento y desarrollo de las plantas están influenciados críticamente por factores abióticos impredecibles (Bielach *et al.*, 2017), situaciones que favorecen la síntesis de metabolitos, como las hormonas. Éstas, en forma individual o combinadas, participan de diferentes procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que otorgan tolerancia al estrés abiótico (Wani *et al.*, 2016). Así, en varias especies leñosas de ambientes xerofíticos ha sido observado la formación de brotes adventicios aun en ausencia de PGR, lo que podría estar relacionado con la presencia de elevados niveles de hormonas endógenas en los tejidos cultivados (Boeri *et al.*, 2019).

Por otra parte, la obtención de callos es una respuesta muy frecuente en el género *Bougainvillea*, tanto en cultivos suministrados con reguladores de crecimiento como en ausencia de ellos (tabla N° 1). Como se mencionó antes, la callogénesis presenta varios beneficios como la variación somaclonal, la obtención de embriones somáticos y la producción de metabolitos secundarios. Este último aspecto adquiere mayor relevancia, especialmente cuando se trata de especies a las que se les atribuyen numerosas propiedades medicinales, como es el caso de las bougainvilleas

(Rodríguez Beraud *et al.*, 2014; Figueroa, 2021). En relación a ello, se ha confirmado que los extractos de diferentes partes aéreas de *Bougainvillea spp.* tienen múltiples actividades farmacológicas, habiéndose determinado la presencia de hidrocarburos alifáticos, ácidos grasos, alcoholes grasos, compuestos volátiles, compuestos fenólicos, peltoginóides, flavonoides, fitoesteroles, terpenos, carbohidratos y betalaínas (Abarca-Vargas y Petricevich, 2018).

El enraizamiento es una de las etapas finales del cultivo de tejidos y resulta fundamental para continuar con la aclimatación, etapa crítica del CTV ya que determina la supervivencia fuera de las condiciones *in vitro* y posterior establecimiento a campo de las plantas (Espinosa *et al.*, 2005). En este sentido, si bien algunos autores han documentado la rizogénesis de *Bougainvillea spp.* bajo condiciones de cultivo de tejidos (tabla N° 1), otros han mencionado también la dificultad de enraizamiento que presentan los esquejes (Shah *et al.* 2006; Fanego *et al.*, 2009; Lakhotia *et al.*, 2014; Ibrinke, 2016).

Medio nutritivo, PGR y concentración utilizada	Especie y explante	Respuesta morfogénica	Autor y año
MS + BAP (5 mg/l) + AG ₃ (0,1 mg/l)	<i>B. spectabilis</i> y <i>B. peruviana</i> segmentos nodales	<i>B. spectabilis</i> : 1,27 brotes/explante <i>B. peruviana</i> : 2,10 brotes/explante	Kumari <i>et al.</i> , 2016
MS + BAP (2 mg/l) + ANA (1 mg/l)	<i>B. glabra</i> hojas	66% explantes desarrollaron callo	Rodríguez Salazar <i>et al.</i> , 2018
MS + BAP (diferentes concentraciones, de 0 a 1 mg/l) + AG ₃ (diferentes concentraciones 0 y 0,1 mg/l) Sin PGR	<i>Bougainvillea spp</i> (no específica) segmentos nodales	En todos los casos desarrolló callo	Escandón <i>et al.</i> , 2003
MS + diferentes concentraciones de 2,4-D	<i>Bougainvillea spp</i> (cultivar: Bahbha) hojas y entrenudos	En todos los casos desarrolló callo	Anand <i>et al.</i> , 2016
½ MS + IBA (2,5 mg/l)	<i>B. spectabilis</i> brotes	75% explantes desarrollaron raíz	Ahmad <i>et al.</i> , 2007

Tabla N° 1. Estudios de organogénesis en especies del género *Bougainvillea*.

MS: medio nutritivo de Murashige & Skoog (MS); 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; IBA: ácido indol-butírico.

4.4.2 Algunas dificultades del CTV y de su aplicación en especies leñosas

Generalmente, la propagación natural de especies leñosas se produce a través de semillas, las cuales son fuertemente dañadas por parásitos y depredadores, y frecuentemente presentan recalcitrancia o diferentes estrategias para regular su germinación (como la latencia). Por ello, la propagación vegetativa mediante técnicas biotecnológicas puede ser importante para el suministro adecuado de vitroplantas como material vegetal para futuros programas de forestación.

Entre las principales dificultades del cultivo *in vitro* de especies leñosas se destacan: la contaminación microbiana (Alvarado, 1998), el necrosamiento de los explantes, y la presencia de alteraciones morfológicas y fisiológicas como la hiperhidricidad y la oxidación fenólica (Guzmán y Gómez-Limm, 1997; Hernández y González, 2010). Así, para lograr una micropropagación exitosa es necesario prevenir y controlar este tipo de problemáticas.

4.4.2.1 La hiperhidricidad

Uno de los problemas frecuentes en el cultivo de tejidos de especies leñosas es la hiperhidricidad. Ésta tiene lugar cuando existen desarreglos anatómicos, morfológicos y fisiológicos en las plantas cultivadas *in vitro*, debido a la acumulación de agua en el protoplasto. Entre los desórdenes anatómicos se pueden mencionar la presencia de epidermis y cutículas delgadas, grandes espacios intercelulares, menor desarrollo del sistema vascular, estomas anormales y escasos, ausencia de parénquima en empalizada. Las anormalidades morfológicas consisten en la presencia de entrenudos cortos, color anormal (aspecto vítreo, transparente), arrosamiento, hojas más gruesas, elongadas y arrugadas, tallos de mayor diámetro (Olmos *et al.*, 2010). Entre los desórdenes fisiológicos, se encuentran la mayor absorción de agua, menor contenido de clorofila, menor capacidad fotosintética, hipolignificación, pérdida de dormancia apical y desarrollo de callo en la base del tallo (Debergh *et al.*, 1981; Debergh *et al.*, 1992; Cassells y Curry, 2001; Matsumoto *et al.*, 2001; Yuan-Long *et al.*, 2005). Entre las posibles causas de estas alteraciones se encuentran: el desequilibrio del potencial osmótico (Lara y Monter, 2002), las altas concentraciones de citocininas y la presencia de hidratos de carbono en el medio, que puede desencadenar una hipoxia y acumulación de etanol en las células, comportándose como un factor de estrés que conduce a la hiperhidricidad (Yaseen *et al.*, 2013). Asimismo, esta respuesta también está influenciada por el tipo de explante, medio de cultivo y envases utilizados (Debergh, 1992)

4.4.2.2 La oxidación de los tejidos

Otro proceso que puede limitar el establecimiento *in vitro* exitoso es la oxidación fenólica de los tejidos, y constituye uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies leñosas.

Generalmente, todos los vegetales, como producto de su metabolismo secundario, biosintetizan un elevado número de compuestos fenólicos, algunos de los cuales son indispensables para sus funciones fisiológicas y otros son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés (hídrico, luminoso, etc.) (Ortega, 2008). Los tejidos adultos de especies leñosas, particularmente de angiospermas, liberan al medio de cultivo pigmentos constituidos principalmente por polifenoles y taninos (Marks y Simpson, 1990). La síntesis de los precursores de fenoles está directamente influenciada por el contenido de sales y reguladores del crecimiento en el medio nutritivo. Existen diferentes alternativas tendientes a controlar la oxidación fenólica, como la incubación de los explantes en oscuridad, la adición de sustancias antioxidantes o de carbón activado a los medios de cultivo, el aumento de la frecuencia de los subcultivos, entre otras (George y Sherrington, 1984; Hernández y González, 2010).

4.5. Unidades encapsulables: consideraciones generales

Inicialmente, la técnica de encapsulación consistía en recubrir embriones somáticos con una cubierta gelatinosa como, por ejemplo, de alginato de sodio, para la producción de semillas sintéticas. Luego, también se usaron estructuras unipolares como brotes apicales o axilares, segmentos de raíces, etc., capaces de convertirse en una plántula completa. A estas semillas sintéticas no embriogénicas se las denomina “unidades encapsulables” y constituyen una alternativa en aquellas plantas en las que la embriogénesis somática no está bien establecida (Khan *et al.*, 2018). Se define entonces a la tecnología de la semilla sintética como el revestimiento de cualquier material vegetal meristemático, ya sea embriones somáticos, meristemas, brotes o microestacas (Navarro Ureña, 2002).

La matriz de alginato de sodio dentro de la que se encuentra inmerso el explante, le confiere a éste resistencia a la desecación y proporciona la presión mecánica necesaria para retenerlo dentro de la cápsula, durante el almacenamiento (West *et al.*, 2006). Además, esta matriz puede desempeñarse como un endosperma sintético, al ser suplementada con nutrientes y fuentes de carbono (Nieves *et al.*, 1998; Antonietta *et al.*, 1999; Navarro Ureña, 2002; Alatar y Faisal, 2012).

Por último, la aplicación exitosa de unidades encapsulables en programas de conservación depende de varios factores, tales como la luz, la temperatura y las condiciones de almacenamiento (Ray y Bhattacharya, 2008). Generalmente, estos programas utilizan temperaturas próximas a los 4°C para cultivos de clima templado y entre 10 y 15°C cuando se trata de germoplasma tropical (Keller *et al.*, 2006).

5. Materiales y métodos

5.1 Recolección de semillas

Sitio de recolección. La colecta se realizó en la región fitogeográfica del Monte, en el territorio de la localidad de Carmen de Patagones, partido de Patagones, sur de la

provincia de Buenos Aires, en las proximidades del “Cerro de la Caballada”, 40°48'40” S 62°58'08” O (figura N° 2).



Figura N° 2. Ubicación geográfica del sitio de recolección.

Plantas madres. Se seleccionaron un total de 10 plantas madres de buen porte, aspecto vigoroso y óptimo estado sanitario.

Época de recolección. La colecta de los frutos se realizó entre los meses de octubre y noviembre de 2018 y 2019.

Manejo de la semilla. Se procedió a retirar las brácteas que recubren la semilla y se seleccionaron aquellas de mejor aspecto (voluminosas y de color verde-amarillento).

5.2 Optimización del protocolo de desinfección

Se realizaron diferentes tratamientos para la desinfección. Para ello, las semillas previamente aisladas fueron sumergidas en diferentes tiempos de inmersión, concentraciones y combinaciones de soluciones desinfectantes como etanol, hipoclorito de sodio (OCINa) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (tabla N° 2). Posteriormente, bajo la campana de flujo laminar, las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (2, 5 y 5 minutos, respectivamente). Luego, las semillas fueron sembradas en placas de Petri (0,90 x 0,15 cm) con medio nutritivo de Murashige & Skoog (MS) (1962) diluido a la mitad de su concentración (½ MS) y

suplementado con 30 g/l de sacarosa (para los tratamientos t1, t2 y t3) o con 20 g/l de sacarosa (t4), en condiciones de esterilidad. Para ello, tanto las placas de petri como los medios de cultivo fueron previamente esterilizados en autoclave por 30 minutos a 120°C de temperatura y 1 atmósfera de presión.

	Soluciones y tiempo de inmersión	Concentración de sacarosa en el medio
Tratamiento N° 1 (t1)	Etanol (70%, 5 min) OCINa (20%, 10 min)	30 g/l
Tratamiento N° 2 (t2)	H ₂ O ₂ (30%, 4 min) Etanol (70%, 1 min) OCINa (20%, 10 min)	30 g/l
Tratamiento N° 3 (t3)	H ₂ O ₂ (30%, 4 min) Etanol (70%, 5 min) OCINa (20%, 10 min)	30 g/l
Tratamiento N° 4 (t4)	H ₂ O ₂ (30%, 4 min) Etanol (70%, 5 min) OCINa (20%, 10 min)	20 g/l

Tabla N° 2. Tratamientos de desinfección aplicados a la especie en estudio.

Las semillas previamente desinfectadas fueron incubadas en un cuarto de cultivo con condiciones de luz y temperatura controladas (fotoperiodo de 16 hs luz / 8hs oscuridad y 21 ± 2°C). Para cada tratamiento se registró el porcentaje de semillas contaminadas y el porcentaje de semillas germinadas semanalmente, hasta que no se observaron nuevos eventos germinativos y contaminación.

5.3 Evaluación de la germinación *in vitro*: parámetros germinativos y cinética de la imbibición

Las semillas previamente desinfectadas de acuerdo al protocolo establecido en el punto anterior fueron dispuestas bajo condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar) en placas de petri con medio ½ MS adicionado con 20 g/l de sacarosa. Se realizaron tres repeticiones de 25 semillas cada una (N=75). Finalmente, se incubaron en un cuarto de cultivo con condiciones de luz y temperatura controladas (fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad y 21 ± 2° C). Se realizó un recuento diario de las semillas germinadas hasta que no se observaron nuevos eventos germinativos (2 semanas).

En este trabajo se consideró como semilla germinada a aquella que contaba con la radícula visible. Finalmente, se evaluaron los siguientes parámetros germinativos:

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

Energía Germinativa (EG): porcentaje de germinación acumulada diaria cuando la tasa de germinación fue la más alta (González *et al.*, 2008). EG es uno de los parámetros considerados como indicadores del vigor de las semillas (Pece *et al.*, 2010).

Tiempo Medio de Germinación (TMG): indica el número promedio de días utilizados en la germinación (Rodríguez Araujo, 2021). Mide la velocidad y la dispersión del proceso (Bewley y Black, 1986). Se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$TMG = \frac{\sum D * ni}{\sum nt}$$

Donde D: es el número de días registrados desde el comienzo de la germinación, n: es el número de semillas germinadas en el día D y nt: número total de semillas germinadas.

Índice de Vigor (IV): expresado bajo la fórmula

$$IV = (a/1 + b/2 + c/3 \dots + z/n) \times 100/s$$

Donde a,b,c...z: es el número de semillas germinadas en el día 1,2,3...n; n: es el número total de días que dura el ensayo; s: número total de semillas sembradas (Jain y Saha, 1971)

Los valores de este parámetro, que también cuantifica la velocidad de la germinación, pueden oscilar entre 1-100, habiéndose determinado los siguientes valores:

IV < 5: velocidad de germinación *lenta*.

5 ≤ IV ≤ 11,11: velocidad de germinación *mediana*.

11,11 ≤ IV ≤ 33,33: velocidad de germinación *ligera*.

IV > 33,33: velocidad de germinación *rápida*. (Bradbeer, 1988)

Germinación Diaria Acumulada (GDA):

$$GDA = n * 100 / Nt$$

Donde n= es el número de semillas germinadas por día y Nt número total de semillas (Trujillo, 1996).

Curva de imbibición

Dado que la permeabilidad de las semillas está íntimamente influenciada por las características del tegumento seminal (Méndez *et al.*, 2008), se evaluó la cinética de imbibición de las semillas desprovistas de brácteas. Para ello, se registró el peso seco inicial (Pi) de 10 semillas de *B. spinosa* que luego fueron sumergidas en agua destilada. Los pesos se registraron y se pesaron al finalizar cada período de imbibición. El primer registro fue a los 20 minutos del inicio de la imbibición, y luego se pesaron cada 30 minutos, hasta que no se observaron variaciones. Entre cada periodo de imbibición, las semillas fueron mantenidas en oscuridad, a 25°C. El aumento en masa de las semillas fue calculado según Baskin *et al.* (2004):

$$\% \text{ incremento en masa} = [(W_i - W_d) / W_d] \times 100.$$

Donde, W_i = masa de imbibición y W_d = masa de semillas secas (previo al ensayo, P_i).

5.4 Multiplicación de *B. spinosa in vitro*: inducción a la organogénesis (caulogénesis, callogénesis y rizogénesis)

Para la inducción de organogénesis se realizaron diferentes ensayos de tres repeticiones de $n=10$ ($N=120$). Los explantes (segmentos nodales de aproximadamente 1,5 cm de alto, provenientes de plántulas *in vitro*) se cultivaron en ½MS, suplementado con diferentes combinaciones y concentraciones de auxinas, como el ácido indol-butírico (IBA); citocininas, como bencilaminopurina (BAP); y giberelinas, como el ácido giberélico (AG_3) (tabla N°3). Luego, los explantes fueron incubados bajo condiciones de luz y temperatura controladas (fotoperiodo de 16 hs luz / 8hs oscuridad y $21 \pm 2^\circ C$).

Medio nutritivo, reguladores de crecimiento y concentraciones	
Tratamiento N° 0 (t0)	½ MS (sin PGR)
Tratamiento N° 1 (t1)	½ MS + BAP (3,0 mg/l) + AG_3 (0,01 mg/l)
Tratamiento N° 2 (t2)	½ MS + IBA (2,5 mg/l)
Tratamiento N° 3 (t3)	½ MS + IBA (5 mg/l)

Tabla N° 3. Tratamientos para organogénesis aplicados a la especie en estudio.

Las respuestas organogénicas evaluadas fueron: la obtención de explantes con brotes; el número de brotes por explantes (brotes/explante); presencia de callo y obtención de raíces.

5.5. Unidades encapsulables

Para la formación de unidades encapsulables (UE) se utilizaron como explante secciones nodales de vitroplantas. Se realizaron tres repeticiones, de n=10 por tratamiento (N=90). Bajo la campana de flujo laminar, estos explantes fueron sumergidos en una matriz de alginato de sodio al 2% (p/v) y recogidos en pequeñas gotas, que posteriormente se dispusieron en una solución de cloruro de calcio (100 mM), con un tiempo de inmersión de entre 30 segundos y 1 minuto.

Las unidades encapsulables fueron cultivadas directamente en ½ MS (t0) y luego de una (t1) y dos semanas (t2) de almacenamiento en frío a 4°C (tabla N° 4). Las unidades encapsulables obtenidas fueron incubadas en condiciones de luz y temperatura controladas (fotoperiodo de 16 hs luz / 8hs oscuridad y 21 ± 2°C).

Condiciones de almacenamiento y cultivo de las UE	
Tratamiento N°0 (t0)	UE cultivadas en ½ MS directamente, sin almacenamiento en frío
Tratamiento N°1 (t1)	UE cultivadas en ½ MS luego de una semana de almacenamiento (4°C)
Tratamiento N°2 (t2)	UE cultivadas en ½ MS luego de dos semanas de almacenamiento (4°C)

Tabla N° 4. Tratamientos aplicados a las unidades encapsulables de la especie en estudio.

Al finalizar el ensayo (6 semanas para cada tratamiento), se registró el porcentaje de unidades que se convirtieron, es decir, en las cuales se observó la aparición de brotes por la ruptura de la matriz de las unidades (Ray y Bhattacharya, 2008). Asimismo, se registró el porcentaje de UE con presencia de callo y con oxidación.

5.6 Tratamiento estadístico de los datos

Los ensayos de este trabajo fueron realizados con un diseño completamente al azar. Las repeticiones y el número de muestra fueron ajustados de acuerdo al tipo de explante y metodología utilizada. Las respuestas obtenidas fueron analizadas mediante el uso del test no paramétrico de Kruskal-Wallis, mediante el programa Infostat-Statistical Software libre (Di Rienzo *et al.*, 2020).

6. Resultados y discusión

6.1 Optimización del protocolo de desinfección

Entre los diferentes tratamientos de desinfección evaluados, el t4 fue el único en el que no se registraron eventos de contaminación microbiana. Además, el mayor porcentaje de contaminación (24%) se obtuvo en el tratamiento t2 (gráfico N° 1).

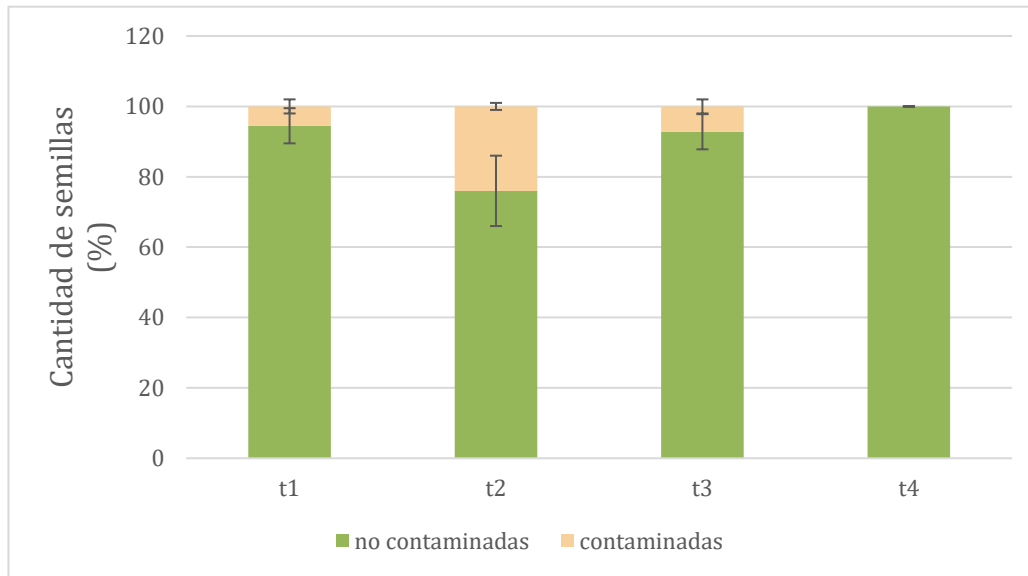


Gráfico N° 1. Porcentajes de semillas no contaminadas y contaminadas por tratamiento.

t1: etanol (70%, 5 min), OCINa (20%, 10 min) (30 g/l sacarosa); t2: H₂O₂ (30%, 4 min), etanol (70%, 1 min), OCINa (20%, 10 min) (30 g/l sacarosa); t3: H₂O₂ (30%, 4 min), etanol (70%, 5 min), OCINa (20%, 10 min) (30 g/l sacarosa); t4: H₂O₂ (30%, 4 min), etanol (70%, 5 min), OCINa (20%, 10 min) (20 g/l sacarosa).

De la comparación entre tratamientos realizados, surge que la contaminación disminuyó junto con la concentración de sacarosa en el medio de cultivo (de 30 g/l a 20 g/l) y el incremento del tiempo de inmersión en etanol (de 1 a 5 minutos). Como se mencionó en el apartado 4.3, la adición de hidratos de carbono y otros compuestos orgánicos al medio nutritivo lo convierte en un sustrato propicio para el desarrollo de microorganismos como hongos, levaduras y bacterias. Así, estos resultados se condicen con lo informado por Martin (2004) quien indicó que los medios suplementados con sacarosa presentaron mayor susceptibilidad a la contaminación microbiana. Además, la concentración de este hidrato de carbono incide sobre el potencial osmótico del medio de cultivo, y éste, sobre el desarrollo fúngico.

Cabe mencionar que en todos los casos donde se observó contaminación (t1, t2 y t3), ésta fue provocada por microorganismos fúngicos (figura N° 3).



Figura N° 3. Contaminación fúngica en semilla de *B. spinosa*.

Junto con la menor concentración de sacarosa se observaron otros efectos como la disminución de la hiperhidricidad y callogénesis de las plántulas germinadas.

Por un lado, en el t4 se pudo observar que, a diferencia de los demás tratamientos, las plántulas aquí desarrolladas no presentaron hiperhidricidad (figura N° 4). Así, la hiperhidricidad manifiesta en los cultivos con mayor concentración de sacarosa podría estar relacionada con el estrés de la plántula causado por hipoxia y acumulación de etanol durante la metabolización de los carbohidratos (Yaseen *et al.*, 2013). Asimismo, Lara y Monter (2002) mencionaron al potencial osmótico como una de las principales causas de este fenómeno. Así, conforme éste se hace más negativo, cambia el potencial matricial del medio y ello afecta tanto la absorción de agua de los tejidos como el proceso de hiperhidratación.

Por otro lado, la ausencia de callos en el tratamiento con menor concentración de sacarosa (t4) (figura N°4) coincide con lo informado por Rafique *et al.* (2013) quienes indicaron que un aumento de sacarosa en el cultivo *in vitro* resulta en un mayor crecimiento de callo.



Figura N° 4. Plántulas germinadas en tratamientos con sacarosa 30 g/l y 20 g/l.

A. Plántula germinada en medio $\frac{1}{2}$ MS suplementado con 30 g/l de sacarosa; B. Plántula germinada en medio $\frac{1}{2}$ MS suplementado 20 g/l sacarosa.

En relación al porcentaje de semillas germinadas, se pudo apreciar que el uso del peróxido de hidrógeno durante el proceso de desinfección y el tiempo de inmersión en el mismo (en t2, t3 y t4), condujo a una mejora del proceso germinativo (60%, 92,80% y 98,68% de semillas germinadas, respectivamente) en relación al t1 (50%) donde no se utilizó peróxido (gráfico N° 2). Sin embargo, mientras que el t3 y t4 alcanzaron porcentajes de germinación próximos al 100%, el t2 no superó el 60%, resultado que podría relacionarse con el mayor porcentaje de semillas contaminadas obtenidas en este caso (16,80% semillas contaminadas más que el t3).

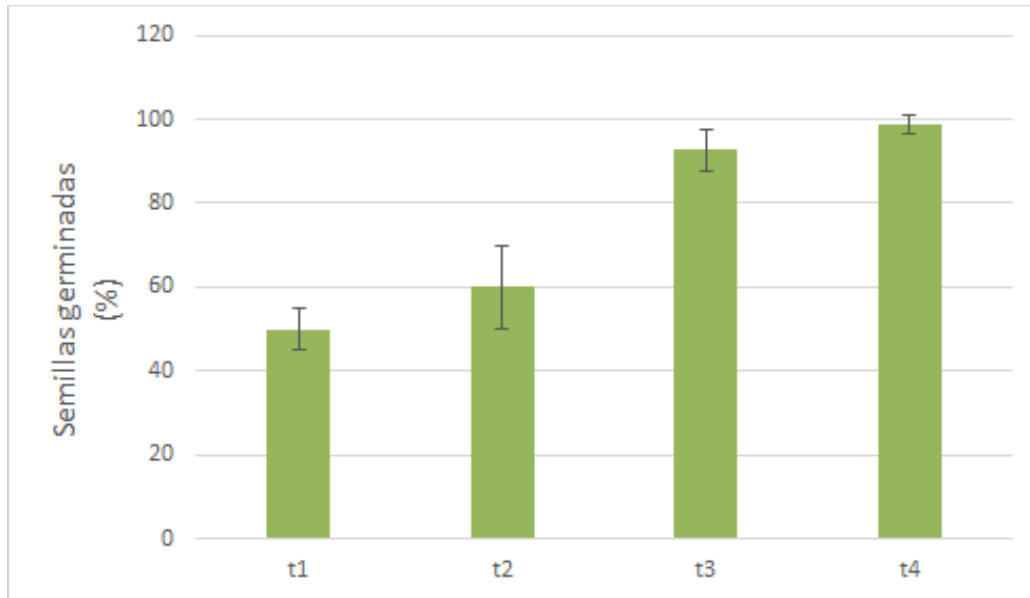


Gráfico N° 2. Porcentajes de semillas germinadas por tratamiento.

t1: etanol (70%, 5 min), OCINa (20%, 10 min) (30 g/l sacarosa); t2: H₂O₂ (30%, 4 min), etanol (70%, 1 min), OCINa (20%, 10 min) (30 g/l sacarosa); t3: H₂O₂ (30%, 4 min), etanol (70%, 5 min), OCINa (20%, 10 min) (30 g/l sacarosa); t4: H₂O₂ (30%, 4 min), etanol (70%, 5 min), OCINa (20%, 10 min) (20 g/l sacarosa).

Por otra parte, la incorporación de peróxido de hidrógeno en la desinfección pudo haber favorecido la germinación debido a que este compuesto promueve la producción de oxígeno en los tejidos, la ruptura del tegumento seminal y la oxidación de inhibidores de la germinación, como compuestos fenólicos y alcaloides, que suelen encontrarse en la cubierta seminal (Barba-Espin *et al.*, 2010). Además, de la comparación de los tratamientos t3 y t4 surge que, si bien el máximo porcentaje de germinación obtenido fue similar en ambos casos, el t4 lo alcanzó en menor tiempo (segunda y octava semana, respectivamente) (gráfico N° 3). Esta aceleración del proceso germinativo posiciona al t4 como el mejor tratamiento obtenido, hecho que podría deberse a la combinación del uso de peróxido de hidrógeno, previo a la siembra, con una menor concentración de sacarosa en el medio de cultivo (de 30 a 20 g/l).

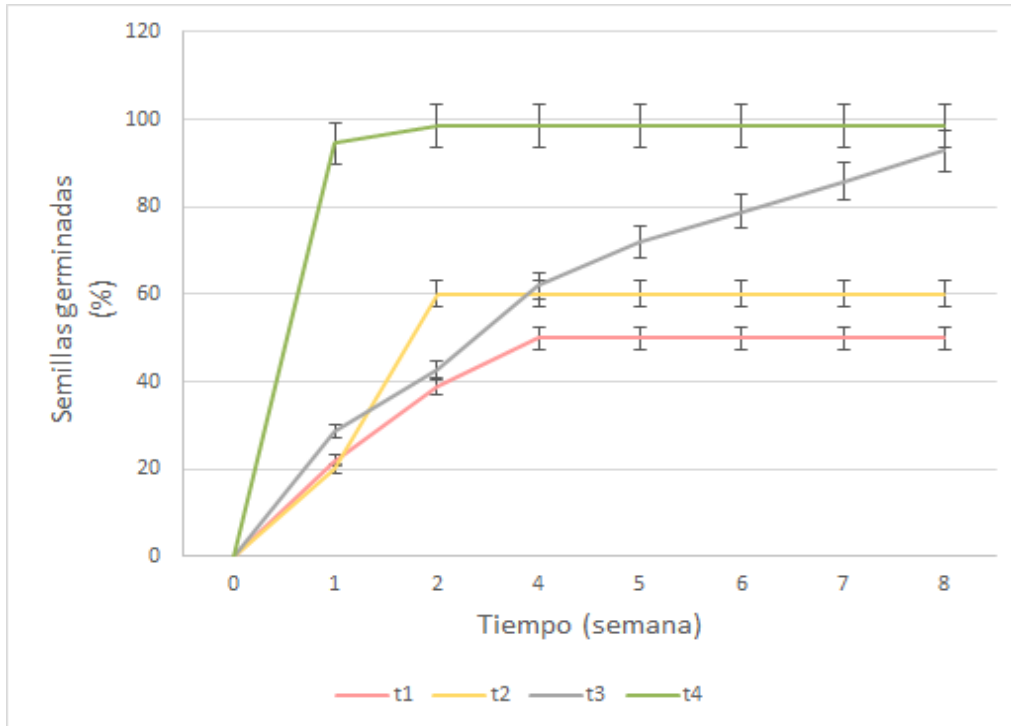


Gráfico N° 3. Porcentaje de semillas germinadas por semana por tratamiento.

t1: etanol (70%, 5 min), OCINa (20%, 10 min) (30 g/l sacarosa); t2: H₂O₂ (30%, 4 min), etanol (70%, 1 min), OCINa (20%, 10 min) (30 g/l sacarosa); t3: H₂O₂ (30%, 4 min), etanol (70%, 5 min), OCINa (20%, 10 min) (30 g/l sacarosa); t4: H₂O₂ (30%, 4 min), etanol (70%, 5 min), OCINa (20%, 10 min) (20 g/l sacarosa).

6.2 Germinación *in vitro*

El ensayo de germinación más efectivo (t4) alcanzó una mayor energía germinativa (EG: 61,33%) en relación a otras Nyctaginaceas, durante el primer día de ensayo (gráfico N° 4 y tabla N° 5). Por su parte, Ferrando Pardo *et al.* (2008) informaron una EG de 17% al cuarto día para semillas de *Boerhavia repens* L. *subsp.*, incubadas en condiciones similares de temperatura y luz. Asimismo, la máxima capacidad germinativa registrada en este tratamiento (t4) se obtuvo durante la segunda semana desde el inicio del ensayo (98,67%) (tabla N° 5), mientras que en *B. repens* ésta se alcanzó en la cuarta semana (41%). En cuanto al Índice de Vigor establecido por Bradbeer (1988) se determinó para *B. spinosa*, una velocidad de germinación rápida (IV>33,33), resultado que mejoró lo obtenido para *B. repens*, cuya velocidad de germinación fue ligera (IV:11,11 ≤ 33,33). Esta diferencia puede deberse a las condiciones experimentales llevadas a cabo para cada una de las especies, debido a las características propias del cultivo *in vitro*, tales como alta humedad relativa y el contenido de carbohidratos (La Rosa y Quijada, 2020).

CG (%)	EG (%)	TMG (días)	IV
98,67 ± 2,31	61,33 ± 9,24	1,79 ± 0,35	76,80 ± 3,53

Tabla N° 5. Parámetros germinativos evaluados para *B. spinosa*.

CG: capacidad germinativa; EG: energía germinativa; TMG: tiempo medio de germinación; IV: índice de vigor.

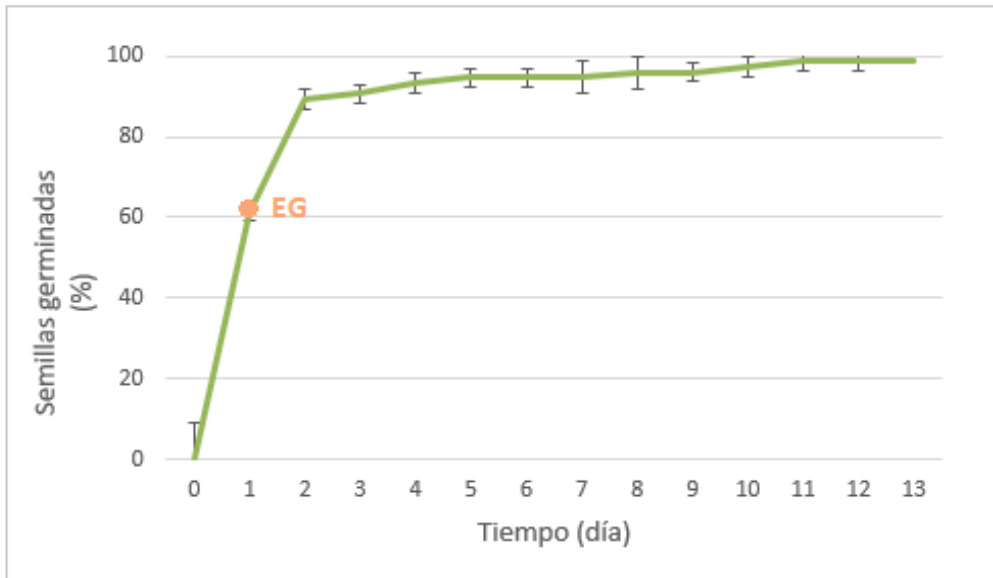


Gráfico N° 4. Germinación Diaria Acumulada (GDA).

Dado que *B. spinosa* tiene la característica de dispersar sus semillas dentro del perigonio, que conserva además sus tres brácteas membranosas, Chaparro *et al.* (2005) evaluaron el efecto de estas estructuras maternas sobre la germinación. Los resultados de este trabajo indican que las mismas ejercen un efecto inhibitorio obteniendo un valor máximo de germinación (80%) en ausencia de dichas estructuras. Por otra parte, Rodríguez Araujo (2021), reportó altos porcentajes de germinación (94-100%), tanto en el control como en aquellas semillas que recibieron pre-tratamientos de escarificación química (durante 5 minutos) y frío-húmedo (durante 7 y 30 días). Los porcentajes de germinación informados por estos autores para las semillas de *B. spinosa* (sin estructuras maternas) son comparables con los obtenidos en el presente estudio, donde además se obtuvo un TMG menor (1,79 días) que aquellos informados para esta misma por Rodríguez Araujo (2021).

Si bien Baskin y Baskin (1998) reportaron que la latencia física y fisiológica son las estrategias más frecuentes en arbustos de regiones áridas, en este estudio se pudo observar que las semillas de *B. spinosa* desprovistas de brácteas, alcanzaron una capacidad germinativa alta y lo hicieron rápidamente. Además, la energía germinativa

obtenida también fue superior respecto de lo informado para otras especies de la familia Nyctaginaceae. Así, los valores de estos parámetros indican que las semillas de *B. spinosa* desprovistas de estructuras maternas no presentan mecanismos de latencia. Esto fue además confirmado por la cinética observada en la curva de imbibición de las semillas, la cual demostró que el proceso germinativo se inició inmediatamente junto con la absorción de agua (primera etapa del proceso de germinación) (figura N° 5).

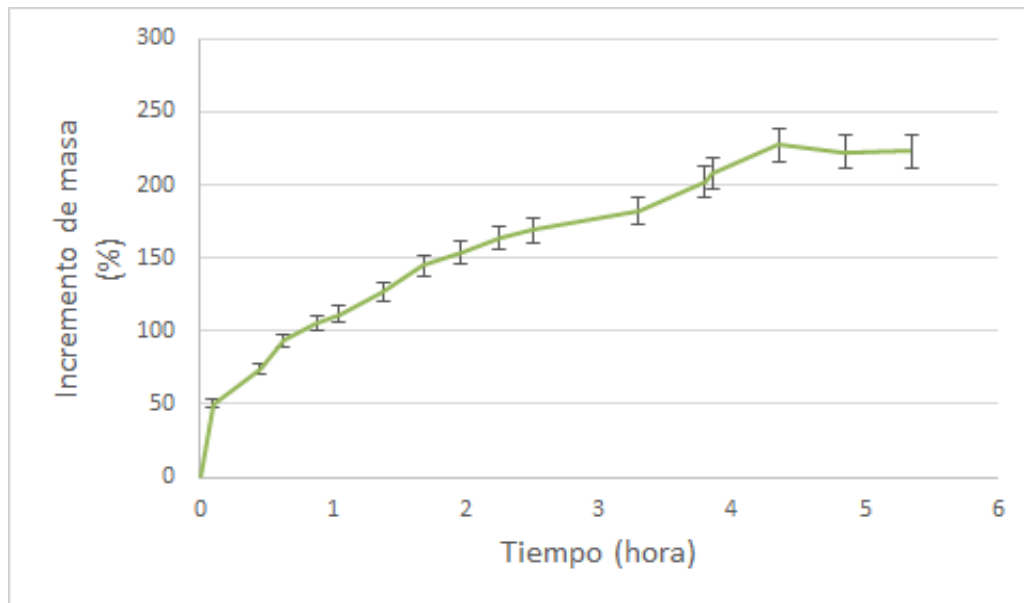


Gráfico N° 5. Curva de imbibición de las semillas estudiadas.

La cinética de imbibición observada se manifiesta con un constante incremento de masa en función del tiempo y en el TMG obtenido, cuyo valor fue incluso menor al reportado por Rodríguez Araujo (2021). Así, los resultados sobre la germinación aquí obtenidos, junto con los informados para esta especie por Rodríguez Araujo (2021), Beider (2012) y Chaparro *et al.* (2005), refuerzan la idea de falta de latencia en las semillas de *B. spinosa* cuando éstas son despojadas de las estructuras maternas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, este mecanismo representa una ventaja adaptativa frente a ambientes hostiles, como los del noreste patagónico. Así, la falta de latencia podría vincularse con el fenómeno de vecería, es decir, la variación cíclica en la producción de frutos/semillas en los distintos años, que ha sido observada en esta especie. Este fenómeno se produce frecuentemente en muchas especies nativas, especialmente en aquellas que habitan ambientes con marcada amplitud térmica, en las cuales se ha observado diferencias en las tasas de producción de frutos/semillas e incluso en la viabilidad, en un mismo año (Varela y Aparicio, 2011; Karlin y Accietto, 2014).

Por otra parte, los resultados de nuestro trabajo indican que las condiciones óptimas propias del cultivo *in vitro* favorecen los procesos germinativos. De esta manera, este

estudio constituye la primera evaluación de la germinación de *B. spinosa* bajo condiciones *in vitro*.

6.3 Multiplicación de *B. spinosa* *in vitro*: organogénesis

6.3.1 Respuesta: “inducción y proliferación de brotes”

A partir de estudios preliminares en el cultivo *in vitro* de esta especie, se observó que la adición de IBA en los medios nutritivos podría estar asociada a la obtención de brotes adventicios de calidad (datos no informados). Por ello, se evaluó la inducción de brotes (caulogénesis) en medios de cultivo suplementados con diferentes reguladores de crecimiento, entre los cuales se incluyó la adición de esta auxina (IBA).

Como se mencionó en el apartado 4.4.1, según el modelo de Skoog-Miller, se espera que cuando la relación auxina/citocinina es alta ($A/C > 1$) se induzca la formación de raíces (rizogénesis), cuando es baja se produzcan vástagos (caulogénesis) y con relaciones cercanas a 1 se obtengan callos (Krikorian, 1995; Segura, 2008). Sin embargo, del análisis de las respuestas morfogénicas observadas en el cultivo *in vitro* de *B. spinosa* surge que, a pesar de la adición de diferentes reguladores de crecimiento (t1: BAP 3 mg/l + AG₃ 0,01 mg/l; t2: IBA 2,5 mg/l), los explantes presentaron una tendencia a producir brotes adventicios, aún en ausencia de PGR (t0). Esta respuesta ha sido previamente informada en otras especies leñosas de ambientes xerofíticos y podría estar relacionada con mayores concentraciones endógenas de hormonas ante las condiciones de estrés donde estas plantas crecen (Boeri *et al.*, 2019). Estas condiciones favorecen la síntesis de metabolitos secundarios, especialmente aquellos que median la respuesta de las plantas frente a situaciones de estrés, como el ácido abscísico (ABA) y las citocininas (como el BAP) (Martínez Pérez *et al.*, 2014; Wani *et al.*, 2016). De esta manera, el aumento significativo en la producción de brotes observada en t1, podría deberse a que los niveles totales de citocininas aumentaron producto del efecto conjunto del BAP adicionado al medio y aquellas citocininas propias del tejido/explante. Así, en el tratamiento t1, se obtuvo un incremento tanto en el número de brotes/explante ($p < 0,0001$), como de explantes con brotes ($p = 0,0071$) (gráficos N° 6 y 7). En este sentido, la adición de auxinas (t2) podría contrarrestar el efecto de las citocininas endógenas y provocar así una disminución en la producción de brotes, aún por debajo de los valores obtenidos en el control (t0), a pesar de no verse reflejado en las diferencias halladas entre éste (t0) y t2 ($p > 0,05$). Así, estos resultados sugieren la posibilidad de desarrollar nuevos protocolos de multiplicación de *B. spinosa* en medios nutritivos libres de PGR, disminuir los costos de manejo, especialmente para la micropropagación clonal y minimizar los efectos negativos que puedan ser causados por el uso de reguladores de crecimiento (Boeri *et al.*, 2019).

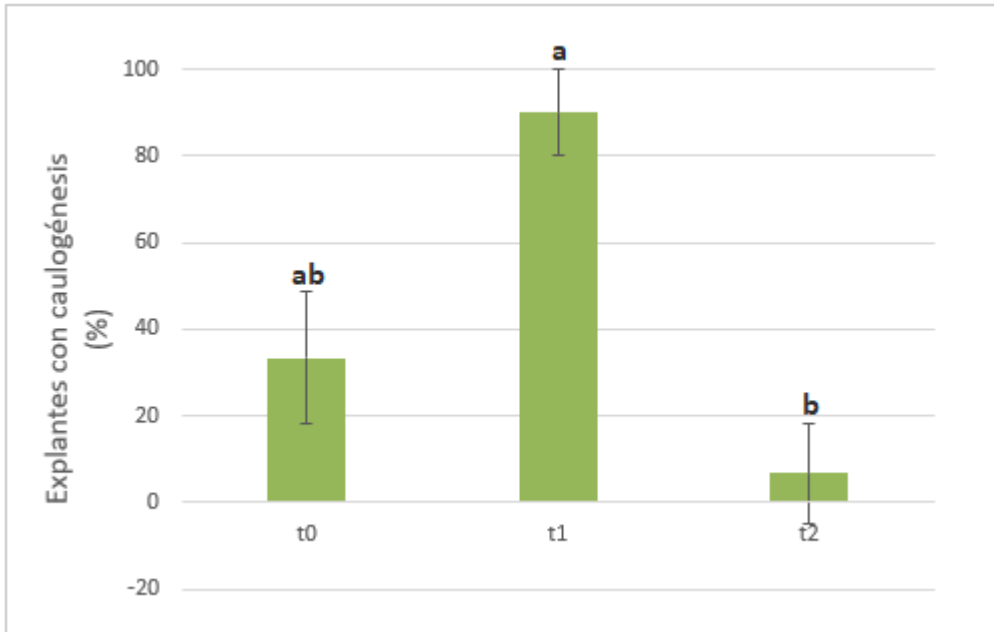


Gráfico N° 6. Explantes con caulogénesis, por tratamiento.

t0: sin PGR; t1: BAP 3 mg/l + AG₃ 0,01 mg/l; t2: IBA 2,5 mg/l

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

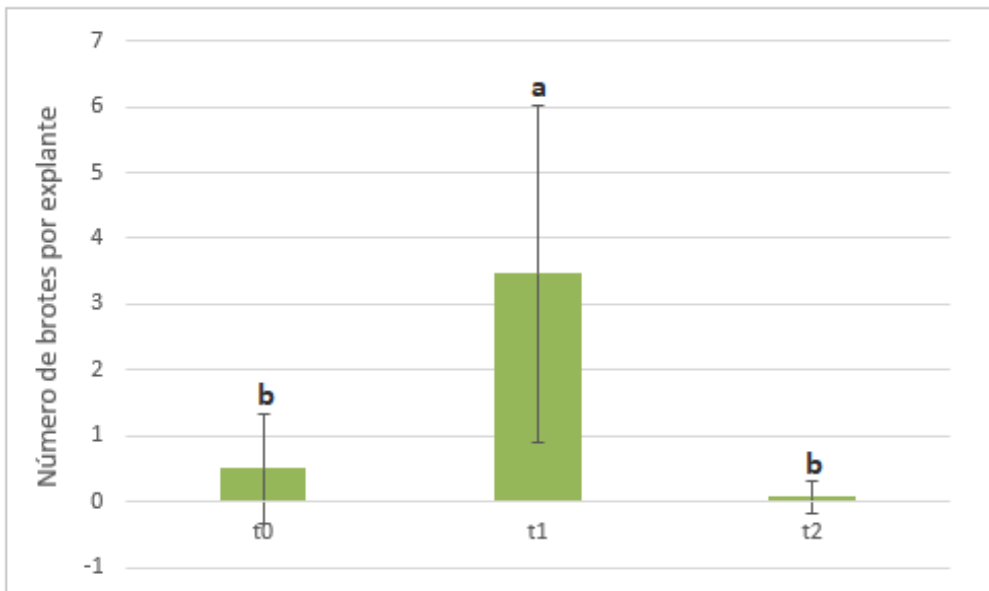


Gráfico N° 7. Número de brotes/explante, por tratamiento.

t0: sin PGR; t1: BAP 3 mg/l + AG₃ 0,01 mg/l; t2: IBA 2,5 mg/l

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

Por otra parte, el resultado obtenido en t1 (3,47 brotes/explante) fue superior al informado por Kumari *et al.* (2016) en segmentos nodales de *Bougainvillea spectabilis* y *Bougainvillea peruviana* (1,27 y 2,10 brotes/explante, respectivamente). Además, para obtener este resultado, Kumari *et al.* (2016) aplicaron mayores concentraciones de medio nutritivo (MS) y de reguladores de crecimiento (BAP y AG₃), respecto a los

adicionados en nuestro trabajo. Por otra parte, el 100% de los explantes con brotes obtenidos en el tratamiento t1 surgieron de un callo basal (organogénesis indirecta).

Respecto a la morfología de los brotes obtenidos, en el t1 presentaron un aspecto vítreo y transparente, con tallos de mayor diámetro, entrenudos cortos, hojas hinchadas, turgentes y frágiles, características propias de la hiperhidricidad (Sharry, 2015). Como se mencionó anteriormente, este fenómeno, está relacionado a desórdenes fisiológicos como la pérdida de dominancia apical y el desarrollo de callo en la base del tallo (Cassells y Curry, 2001), respuestas que también fueron observadas en t1. Por lo contrario, los brotes obtenidos en t0 y t2 no presentaron hiperhidricidad y, en este último caso, los brotes alcanzaron una mayor elongación respecto al t0 y t1 (figura N° 5). Estos resultados reflejan la influencia de factores como el tipo de explante, el medio nutritivo y los envases utilizados para el cultivo *in vitro*, sobre la hiperhidricidad (Debergh, 1992). Además, ante situaciones de alta retención de agua en los envases, la presencia de BAP (t1) en el medio nutritivo, podría inducir este tipo de desórdenes, tal como lo informó Debergh (1981).

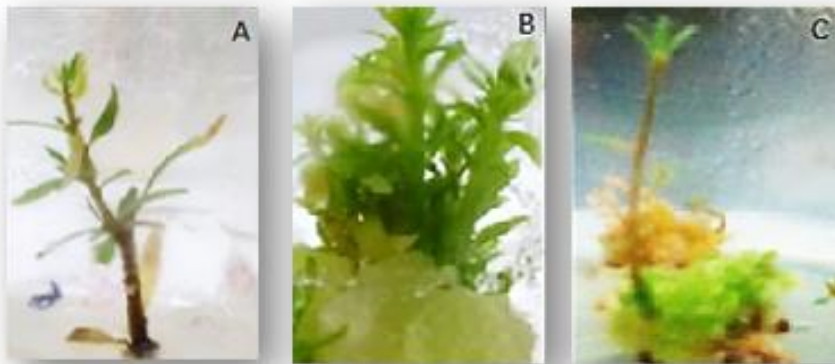


Figura N° 5. Morfología de los brotes según el tratamiento.
A. t0 (sin PGR); B. t1 (BAP 3 mg/l y AG₃ 0,01 mg/l); C. t2 (IBA 2,5 mg/l).

6.3.2 Respuesta: “inducción de callos”

Si bien un balance A/C cercano a 1 induce la callogénesis, la presencia de callos aún en medios de inducción de brotes, tal como fue observada en el ensayo anterior, nos permitió incluir este tratamiento en la evaluación de callogénesis. Se analizaron entonces los tratamientos t0, t1, t2 y t3 (apartado 5.4, tabla N° 3).

En todos los casos se observó la formación de callo en la base del explante, sin que se obtuvieran diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$) (tabla N° 6). Como se mencionó en el apartado 4.4.1 y tabla N° 1 esta respuesta ha sido obtenida en explantes de *Bougainvillea* spp. cultivados en medios nutritivos suplementados con PGR y en ausencia de ellos.

t0	t1	t2	t3
56,67% ± 25,17	96,67% ± 5,77	96,67% ± 5,77	90% ± 14,14

Tabla N°6. Explantes con callogénesis, por tratamiento.

t0: sin PGR; t1: BAP 3 mg/l + AG₃ 0,01 mg/l; t2: IBA 2,5 mg/l.; t3: IBA 5 mg/l.

Por un lado, Rodríguez-Salazar *et al.* (2018) obtuvieron un 66% de callos a partir de hojas introducidas *in vitro* de *B. glabra*, con BAP (2 mg/l) y ácido naftalenacético (ANA 1 mg/l). Por otro lado, Escandón *et al.* (2003) informaron la formación de callos en diferentes concentraciones de BAP y en ausencia de reguladores, en otras bougainvilleas. Sin embargo, la callogénesis ha sido también promovida únicamente con la adición de auxinas (Anand *et al.*, 2016). Así, en concordancia con los resultados obtenidos anteriormente (apartado 6.3.1) la presencia de callo en todos los tratamientos evaluados podría también asociarse con el balance endógeno hormonal de estos explantes.

Respecto a las características morfológicas de los callos obtenidos en los diferentes tratamientos, todos ellos fueron friables; presentaron principalmente aspecto vítreo a verde (sin oxidación) y, en menor medida, se evidenciaron algunos callos fenólicos (amarronados, con oxidación) (figura N° 6). Además, se observaron diferencias en cuanto al tamaño alcanzado. Los callos desarrollados en los medios suplementados con PGR, presentaron aproximadamente el doble de tamaño que aquellos obtenidos en t0, transcurrido el mismo periodo de tiempo (3 ± 0.5 cm y 1,5 cm ± 0.4, respectivamente).

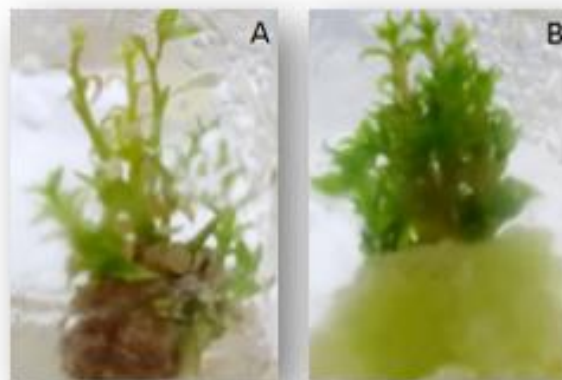


Figura N° 6. Tipos de callos.

A. Callo vítreo-fenólico; B. Callo vítreo-verde.

Como se mencionó en el apartado 4.4.1, la obtención de callos favorece la variación somaclonal, la producción de embriones somáticos y, particularmente, el desarrollo de callos vítreos como los obtenidos en este trabajo, lo cual representa una ventaja para la obtención de metabolitos secundarios *in vitro*, aspecto relevante debido al potencial farmacológico de esta especie (Rodríguez Beraud *et al.*, 2014).

6.3.3 Respuesta: “inducción de raíces”

Respecto a la formación de raíces, nuestros resultados indican que, con la adición de IBA (5 mg/l) (t3) se obtuvo un 10% \pm 10 de explantes con raíces (figura N°7), resultado esperado debido a que las auxinas favorecen la rizogénesis. Sin embargo, el porcentaje obtenido fue relativamente bajo y no se observaron diferencias significativas con los tratamientos t0 (sin PGR) y t2 (IBA 2,5 mg/l), ambos sin formación de raíces. Estos resultados difieren con los informados por Ahmad *et al.* (2007) quienes obtuvieron un mayor porcentaje de explantes con raíces (75%) *en B. spectabilis*, cuando adicionaron 2.5 mg/l de IBA al medio nutritivo.



Figura N° 7. Explante con formación de raíces.

El bajo porcentaje de explantes con raíces obtenido en este estudio podría estar relacionado con el balance endógeno de las auxinas y citocininas en la especie, tal como se explicó en los apartados 6.3.1. y 6.3.2. Al respecto, Fanego *et al.* (2009) indicaron que los bajos porcentajes de enraizamiento de las estacas cultivadas de *B. glabra* estarían relacionados con la reducida producción de auxinas endógenas en esta especie.

De esta manera, nuestros resultados sugieren que *B. spinosa*, podría presentar dificultades para el enraizamiento, tal como se describió en otras especies del género (Shah *et al.*, 2006; Fanego *et al.*, 2009; Lakhotia *et al.*, 2014; Ibironke, 2016).

6.4 Unidades encapsulables (UE)

La viabilidad y conversión de los tejidos meristemáticos encapsulados depende en gran medida de factores como la luz, la temperatura y el periodo de almacenamiento.

Sin embargo, la incubación bajo condiciones controladas de luz y temperatura de las UE sin pretratamiento de frío (t0) produjo un porcentaje de conversión similar (10%) al de aquellas que fueron previamente almacenadas a 4°C, durante 1 (t1) y 2 semanas (t2) (13,33%, en ambos tratamientos) (gráfico N° 8). Además, los brotes obtenidos bajo esas condiciones no presentaron los síntomas de etiolación (pérdida de color, tallos delgados y débiles) observados por Ray y Bhattacharya (2008) en *Boerhavia diffusa*. No obstante, bajo la misma temperatura (4°C), periodo de almacenamiento (2 semanas) y tipo de explante, el porcentaje de conversión informado por estos autores fue del orden del 90%, valor superior al obtenido en el presente estudio (13,33%) para *B. spinosa*. Estas respuestas podrían estar relacionadas con que, a diferencia de las unidades encapsulables de *B. spinosa*, las de *B. diffusa* fueron suplementadas con nutrientes (MS) y sacarosa. Como se mencionó en el apartado 4.5, los carbohidratos presentes en las unidades encapsulables favorecen el proceso de conversión (Navarro Ureña, 2002).

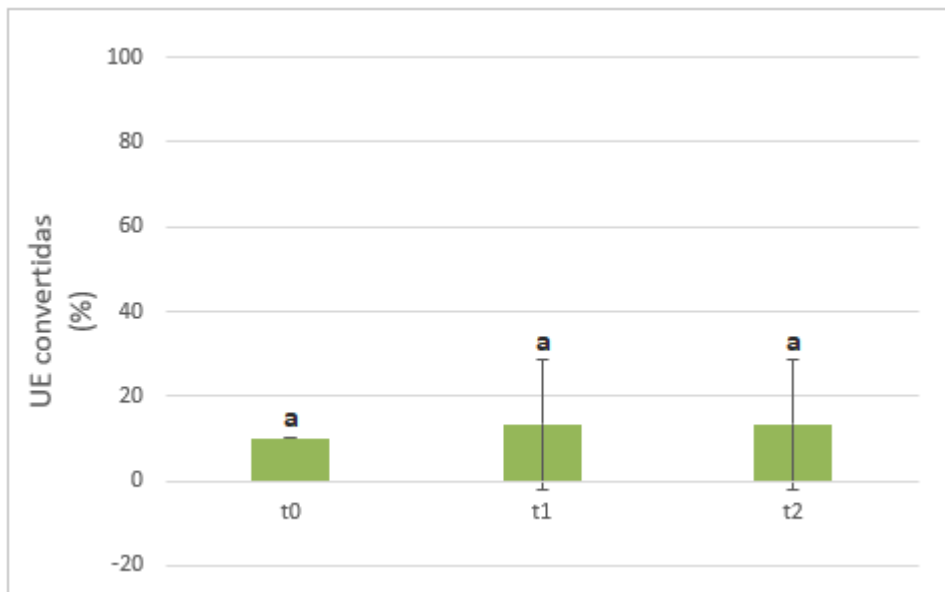


Gráfico N° 8. Porcentaje de unidades encapsulables convertidas, por tratamiento.

t0: cultivadas directamente en ½ MS sin almacenamiento previo; t1: cultivadas en ½ MS luego de una semana de almacenamiento (4°C); t2: cultivadas en ½ MS luego de dos semanas de almacenamiento (4°C).

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

La conversión de las UE de *B. spinosa* se inició con la activación de los brotes o yemas axilares de los explantes nodales y posterior ruptura de la matriz de encapsulamiento (figura N° 8). Sin embargo, luego de 6 semanas de incubación en condiciones *in vitro*, las plántulas obtenidas presentaron oxidación. Tanto en t1 como t2, el porcentaje de unidades encapsulables oxidadas aumentó conforme transcurrió el tiempo de ensayo (de 0% a 83,33% y de 0% a 73,33%, respectivamente).



Figura N° 8. Unidad convertida.

Mientras que las unidades encapsulables del t0 (sin almacenamiento en frío), permanecieron sin oxidación durante las primeras dos semanas y luego mostraron la misma tendencia que los demás tratamientos (de 0% a 87%) (gráfico N° 9). Esta respuesta podría explicarse con el mayor tiempo de exposición lumínica al que estuvieron sometidas las UE. En este sentido, George y Sherrington (1984) indicaron que las enzimas involucradas tanto en la biosíntesis como en la oxidación de los fenoles se incrementan con la luz, por lo que se recomienda mantener los explantes en la oscuridad unos días antes de pasarlos a una intensidad lumínica baja. Además, el almacenamiento a bajas temperaturas ha sido indicado como una estrategia para reducir los problemas de oxidación en explantes (Azofeifa, 2009), lo que explicaría la ausencia de ésta en los tratamientos t1 y t2 durante el periodo que permanecieron a 4°C.

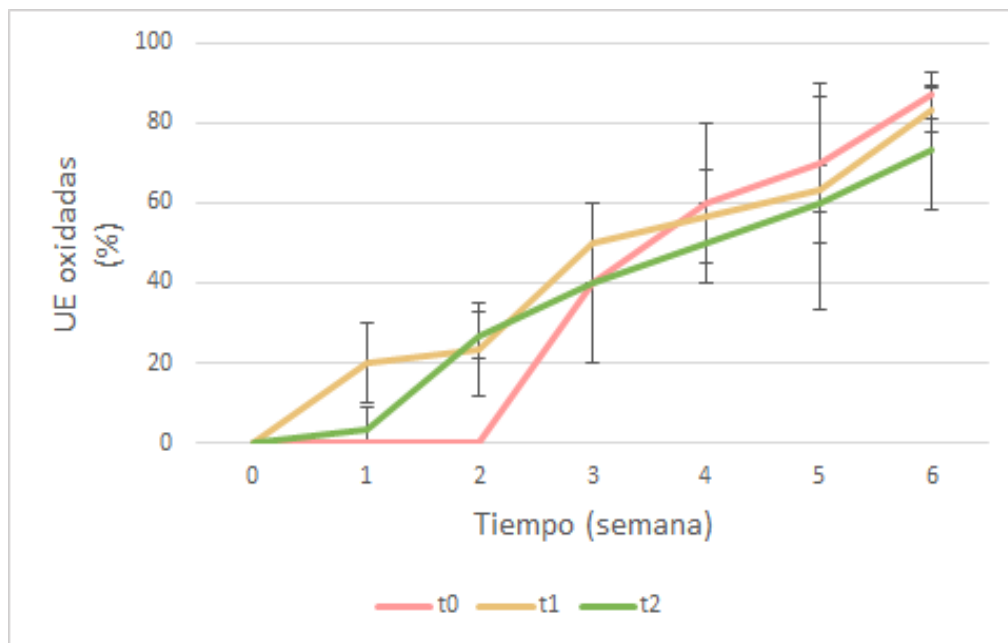


Gráfico N° 9. Unidades encapsulables que presentaron oxidación, por tratamiento.

t0: cultivadas directamente en ½ MS sin almacenamiento previo; t1: cultivadas en ½ MS luego de una semana de almacenamiento (4°C); t2: cultivadas en ½ MS luego de dos semanas de almacenamiento (4°C).

Por otra parte, el proceso de oxidación, que se manifiesta con el oscurecimiento y necrosis de los tejidos, ocurre muy frecuentemente en especies leñosas cultivadas en condiciones *in vitro* y puede comprometer tanto el crecimiento como la viabilidad de los explantes (Guzmán y Gómez-Limm, 1997; Hernández y González, 2010).

Otras respuestas morfogénicas fueron evidenciadas durante el período de incubación de las UE. En aquellas correspondientes al t0 y al t2 se observó la ruptura de la matriz de alginato y la emergencia de los explantes por elongación de los mismos, sin que éstos produjeran nuevas hojas (20% y 3,33%, respectivamente). Por otro lado, en todos los tratamientos se obtuvo explantes que desarrollaron callos en el interior de las unidades, algunos de los cuales aumentaron su tamaño hasta, incluso, emerger de la cápsula (gráfico N° 10 y figura N° 9). Generalmente, estos callos se originaron en la zona de corte del explante encapsulado (figura N° 9), coincidentemente con lo informado por Ahmad *et al.* (2010), quienes postularon que la acumulación de auxinas en el punto de lesión estimula esta proliferación celular.

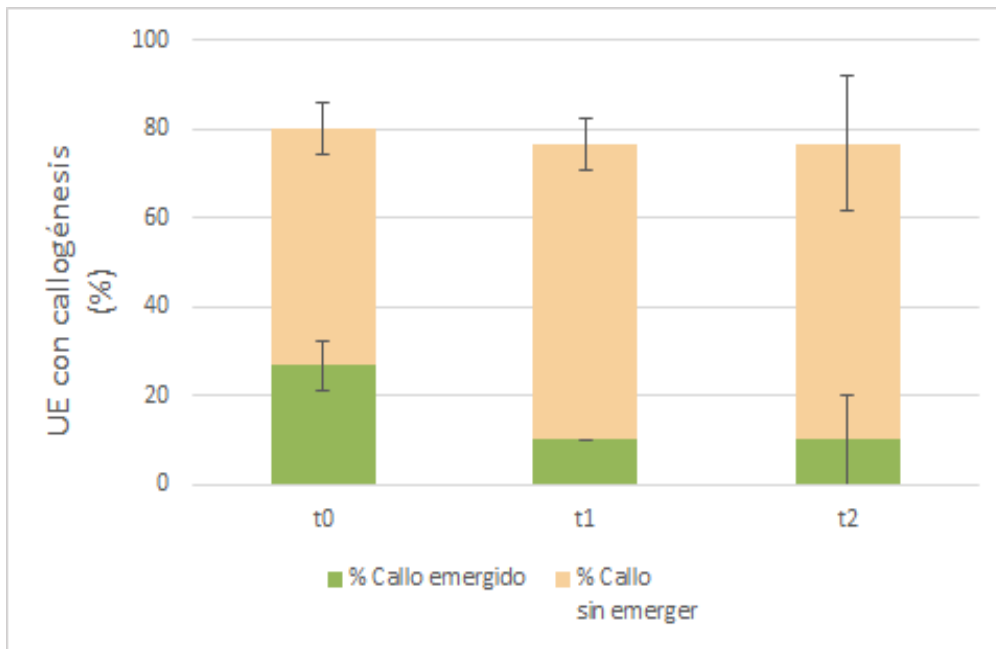


Gráfico N° 10. Unidades con formación de callo (callogénesis).

t0: cultivadas directamente en ½ MS sin almacenamiento previo; t1: cultivadas en ½ MS luego de una semana de almacenamiento (4°C); t2: cultivadas en ½ MS luego de dos semanas de almacenamiento (4°C).

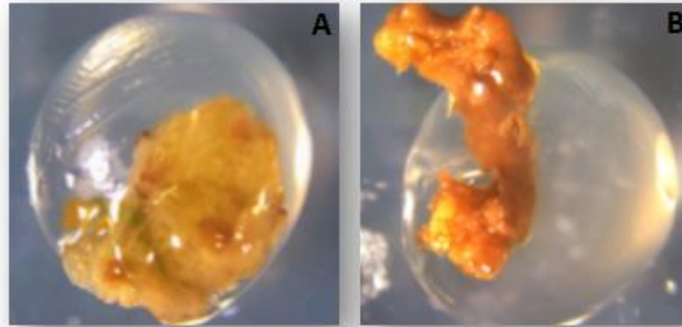


Figura N° 9. Unidades encapsulables con callos.

A. Callo dentro de la cápsula; B. Callo fuera de la cápsula (emergido) y en zona de cortes.

Los resultados obtenidos a partir del encapsulamiento de secciones nodales indican que es posible establecer un procedimiento de conservación para *B. spinosa*, durante dos semanas, a 4°C, sin que éstos pierdan la viabilidad y capacidad de conversión. En este sentido, existen evidencias que confirman la idoneidad de una temperatura de incubación baja (4°C o alrededor de ella) para el almacenamiento de semillas sintéticas y la conservación exitosa de diversas especies como *Punica granatum* y *Boerhavia diffusa* (Naik y Chand, 2006; Ray y Bhattacharya, 2008).

De esta manera, la técnica de encapsulación mediante propágulos sigue siendo una alternativa prometedora, especialmente en el caso de las especies leñosas, que presentan ciertas dificultades para la propagación y conservación (Bapat y Mhatre, 2005). No obstante, será necesario profundizar este conocimiento de modo de lograr el control de ciertas respuestas asociadas al cultivo de tejidos *in vitro* de especies leñosas, como el de la oxidación y la hiperhidricidad.

7. Conclusiones

- La combinación de la adición de peróxido durante la desinfección y la disminución de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo de las semillas permitió disminuir la contaminación microbiana y benefició el proceso germinativo, tanto por el mayor porcentaje de germinación obtenido como por el tiempo en lograrlo.
- Los resultados de los parámetros germinativos evaluados y la cinética de imbibición de las semillas desprovistas de brácteas demuestran la falta de latencia física de *B. spinosa*.
- Los brotes adventicios obtenidos aún en medios nutritivos libres de PGR, como consecuencia de un balance hormonal endógeno favorable, generan la posibilidad de multiplicar plantas sin la adición de éstos, y disminuir así los costos de manejo asociados al CTV.
- Es posible aplicar protocolos de micropropagación de *B. spinosa* por vía organogénica.

- La presencia de callos en diferentes condiciones y medios de cultivo permite a futuro desarrollar protocolos de producción masiva de metabolitos secundarios *in vitro*.
- Ante la escasa formación de raíces obtenidas en este trabajo, resulta necesario evaluar nuevas metodologías y condiciones experimentales de enraizamiento.
- Es posible establecer protocolos de conservación de esta especie a través de unidades encapsulables. Sin embargo, el éxito de los mismos dependerá en gran medida, del control o prevención de la oxidación fenólica.
- Este trabajo constituye el primer reporte de la aplicación de unidades encapsulables de *Bougainvillea spinosa*, y su posibilidad de aplicarlas para desarrollar protocolos de propagación y conservación *ex situ* de la especie.
- Esta tesis permitió generar los primeros avances en el conocimiento sobre la propagación sexual y asexual de *Bougainvillea spinosa* a través del cultivo *in vitro* y contribuir así a su conservación y uso sustentable.

8. Bibliografía

Abarca-Vargas, R., & Petricevich, V. L. (2018). *Bougainvillea* genus: A review on phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.

Ahmad, I., Lutfullah, G., Zamir, R., & Shah, S. T. (2007). *In vitro* response of various growth regulators on the regeneration of *Bougainvillea spectabilis* Willd. *Suranaree Journal of Science and Technology*, 14(2), 157-162.

Ahmad, N., Faisal, M., Anis, M., & Aref, I. M. (2010). *In vitro* callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. *South African Journal of Botany*, 76(3), 597-600.

Alatar, A. A., & Faisal, M. (2012). Encapsulation of *Rauvolfia tetraphylla* microshoots as artificial seeds and evaluation of genetic fidelity using RAPD and ISSR markers. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(7), 1367-1374.

Alvarado, Y. (1998). Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba*, 81-104.

Anand, P., Singh, K. P., Prasad, K. V., Kaur, C., & Verma, A. K. (2016). Betalain estimation and callus induction in different explants of *Bougainvillea* spp. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 87, 191-196.

Antonietta G.M., Manuel P., Alvaro S. (1999). Effect of encapsulation on *Citrus reticulata* ‘Blanco’ somatic embryo conversion. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 55: 235-237.

- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Bainbridge, D. A. (2007). *Guide for Desert and Dryland Restoration: New hope for Arid Lands*. Washington, Island Press.
- Barba-Espin, G., Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M. J., Albacete, A., Faize, L., Faize, M., ... & Hernández, J. A. (2010). Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. *Plant, Cell & Environment*, 33(6), 981-994.
- Bapat, V. A., & Mhatre, M. (2005). Bioencapsulation of somatic embryos in woody plants. *In Protocol for somatic embryogenesis in woody plants* (pp. 539-552). Springer, Dordrecht.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (1998). *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Elsevier.
- Baskin, C.C. & Baskin, J.M. (2014). *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*, 2nd edition. *Academic Press*, San Diego, California, USA., 1601 pp.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2003). Classification, biogeography, and phylogenetic relationships of seed dormancy. *Seed conservation: turning science into practice*, 518-544.
- Baskin, J. M., Davis, B. H., Baskin, C. C., Gleason, S. M., & Cordell, S. (2004). Physical dormancy in seeds of *Dodonaea viscosa* (Sapindales, Sapindaceae) from Hawaii. *Seed Science Research*, 14(1), 81-90.
- Beider, A. (2012). Viverización de especies nativas de zonas áridas. *Experimentia-Revista de Transferencia Científica*, 2, 9-67.
- Bewley, J. & M. Black. (1986). *Seed physiology of development and germination*. *Plenum Press*, New York. 101pp.
- Bielach, A., Hrtyan, M., & Tognetti, V. B. (2017). Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1427.
- Boeri, P. A., Espíndola, M., Dalzotto, D., Cedrés Gazo, M. L., Piñuel, M. L., & Sharry, S. (2019). ¿Es necesario suplementar reguladores de crecimiento al medio de cultivo? Respuestas morfogénicas *in vitro* de plantas leñosas de ambientes xerofíticos. *X Encuentro latinoamericano y del caribe de biotecnología agropecuaria y XI simposio Redbio Argentina*.
- Boeri P. & Dalzotto D. (2018). Propagación de especies en peligro de extinción. En: *Biotecnología y biodiversidad: diálogo de saberes*, Cap. 6. Varios autores

latinoamericanos. Sharry S. y Trujillo I. (Eds). La Plata, EDULP, 308pp. ISBN 978-987-4127-50-1.

Bonga J. M. & Durzan D. J. (eds) (1987) Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 3, *Martinus Nijhoff Publishers*, Boston. pp. 416.

Bonilla, M., & Hernández, O. (2012). Propagación *in vitro* de ñame (*Dioscorea* spp.): una perspectiva en la producción masiva de plántulas y conservación de germoplasma. *Agronomía*, 20(2), 65-72.

Bradbeer, J.W. (1988). Seed dormancy and germination. *Blackie*. New York.

Busso, C. A. & Fernández, O. A. (2018). Arid and semiarid rangelands of Argentina. In *Climate variability impacts on land use and livelihoods in drylands* (pp. 261-291). Cham, Switzerland, Springer International.

Cano Castillo, M. (2013). Aplicación de la micropropagación y criopreservación a la conservación *ex situ* de especies vegetales de interés.

Cassells, A. C., & Curry, R. F. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant cell, tissue and organ culture*, 64(2), 145-157.

Castillo de Meier, G., & Bovo, O. A. (2000). Plant regeneration from single-nodal-stem explants of legume tree *Prosopis alba* Griseb. *Biocell: official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica... et. al*, 24(2), 89-95.

CDB (1992) Convenio sobre la Diversidad Biológica. Río de Janeiro: ONU. <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>

Chaparro, A., Ruiz, M. B., & Parera, C. A. (2005). *Bougainvillea spinosa* Cav.. fisiología de la germinación. *Jornadas Argentinas de Botánica*. 30. 2005 11 06-10, 6 al 10 de noviembre de 2005. Rosario, Santa Fé. AR.

Clemente, M., & Fay, M. (1997). Aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en la propagación y conservación de especies amenazadas. *Monografías del Real Jardín Botánico de Córdoba*, (5), 43-50.

Cordal, M. B., Adema, M., Briones, V., Villarreal, B., Panarisi, M. H., Abedini, W., & Sharry, S. (2014). Induction of somatic embryogenesis in *Phytolacca tetramera*, medicinal species of Argentina. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 552-557.

Debergh, P., Aitken-Christie, J., Cohen, D., Grout, B., Von Arnold, S., Zimmerman, R., & Ziv, M. (1992). Reconsideration of the term ‘vitrification’ as used in micropropagation. *Plant cell, Tissue and organ culture*, 30(2), 135-140.

Debergh P., Harbaoui Y. & Lemeur R. (1981). Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiology Plant*. 53:181-187.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. & Robledo C.W. (2020) InfoStat versión 2020. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Escandón, A. S., Ferrari, P., Facciuto, G., Soto, S., Hagiwara, J. C., & Acevedo, A. (2003). Combinación de técnicas *in vitro* y *ex vitro* para la micropropagación de Santa Rita (Hibr) Una arbustiva de relevancia ornamental. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 32(1), 111-122.

Espinosa, M. G., Alcalá, V. M. C., Rivero, H. S. A., De La, J. L. R., & Ruiz, R. M. (2005). Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* *Eucalyptus urophylla* ST Blake *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, 1(3), 591-597.

Estomba, D., Fernández, H.M. & Stella, A. M. (2010) Antioxidantes y porfirinas de *Adesmia boronioides*, *Larrea divaricata* y *Atriplex lampa* cultivadas *in vitro*. *Revista de Facultad de Ciencias Agrarias*, 42 (2), 135-142.

Fanego, A., Soto, R., & Martínez, S. (2009). Brotación y enraizamiento de estacas procedentes de diferentes secciones de las ramas de *Bougainvillea glabra* Choisy. *Centro Agrícola*, 36(9).

FAO 2015 Informe de Diagnóstico de los principales valles y áreas con potencial agrícola de la Provincia de Río Negro. Proyecto FAO UTF ARG 017 – “Desarrollo Institucional para la Inversión” - Informe de Diagnóstico de los Principales Valles y Áreas con Potencial Agrícola de la Provincia de Río Negro - DT N°12 Aspectos Ambientales.

93p.http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/rlc/utf017arg/rionegro/DT_12_Aspectos_ambientales.pdf

Ferrando Pardo, I., Ferrer-gallego, P. P., Navarro Castilla, Á., & Laguna Lumbreras, E. (2008). Acciones de conservación *ex situ* de la población europea de "*Boerhavia repens*" L. subsp. "*repens*" ("Nyctaginaceae").

Figuroa, L. I. A. (2021). Estudio de la vía de activación de macrófagos murinos de la cepa BALB/c expuestos al extracto de *bougainvillea x buttiana* color naranja.

Funk, F. A. (2016). Procesos de degradación y recuperación en una estepa arbustivo-graminosa del noreste de la Región Patagónica.

Gabella, J. I. (2015). Dinámicas territoriales conducentes a la degradación ambiental en áreas rurales del sur de la región pampeana argentina.

George, F. & Sherrington, P. (1984). Plant Propagation by Tissue Culture. *Handbook and Directory of Commercial Laboratories*, Basingtoks, England: 109p.

González, M.; I. Quiroz, E. Gracia & B. Gutiérrez. (2008). Escarificación química con ácido sulfúrico como tratamiento pregerminativo para semillas de toromiro (*Sophora toromiro* Skotts.). *Ciencia e Investigación Forestal*. Vol 14 (1): 111-118.

Guzmán, P. & Gómez-Limm M.A. (1997). La genética y la fisiología molecular en el estudio de las plantas. *Avance y perspectivas*, Vol 16: 59-66.

Hernández, Y., & González, M. E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos tropicales*, 31(4), 00-00.

Hernández, J. A., & Pérez, D. R. (2021). Tratamientos germinativos para restauración ecológica en gran escala en tierras secas: avances en *Larrea cuneifolia* Cav.

Ibironke, O. A. (2016). Effects of rooting hormones on the propagation of bougainvillea from cuttings. *International Journal of Research*, 57.

Informe del estado del ambiente 2019. (2019). Recuperado 20 de octubre de 2021, de IEA Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible website: <https://informe.ambiente.gob.ar/>

IPBES (2019): Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity Ecosystem Services. S. Díaz, J. Settele, E. S. Brondízio E.S., H. T. Ngo, M. Guèze, J. Agard, A. Arneth, P. Balvanera, K. A. Brauman, S. H. M. Butchart, K. M. A. Chan, L. A. Garibaldi, K. Ichii, J. Liu, S. M. Subramanian, G. F. Midgley, P. Miloslavich, Z. Molnár, D. Obura, A. Pfaff, S. Polasky, A. Purvis, J. Razzaque, B. Reyers, R. Roy Chowdhury, Y. J. Shin, I. J. Visseren-Hamakers, K. J. Willis, and C. N. Zayas (eds.). IPBES secretariat, Bonn, Germany. 56 p.

Jain, N.K. & Saha J.R. (1971). Effect of storage length on seed germination in Jute (*Corchorus* spp). *Agronomy. Journal*. 63: 636-638.

Karlin, M., & Accietto, R. (2014). Viverismo de especies nativas. *Cartilla técnica*. Córdoba, Argentina: El Cuenco Equipo Ambiental.

Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:1222-1239

Keller, E. J., Senula, A., Leunufna, S., & Grube, M. (2006). Slow growth storage and cryopreservation tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration*, 29(3), 411-417.

- Khan, M. I., Ahmad, N., Anis, M., Alatar, A. A., & Faisal, M. (2018). *In vitro* conservation strategies for the Indian willow (*Salix tetrasperma* Roxb.), a vulnerable tree species via propagation through synthetic seeds. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 17-21.
- Krikorian, A. D. (1995). Hormones in tissue culture and micropropagation. *In Plant hormones* (pp. 774-796). Springer, Dordrecht
- Kumari, P. R. A. T. I. K. S. H. A., Swaroop, K., Janakiram, T., Singh, S. K., Prasad, K. V., & Jain, R. I. T. U. (2016). *In vitro* protocol for mass multiplication in *bougainvillea* (*Bougainvillea* sp) cv. Mahatma Gandhi and Refulgens. *Indian J. Agril. Sci*, 86(8), 1031-1036.
- Lakhotia, P., Singh, K. P., Singh, S. K., Singh, M. C., Prasad, K. V., & Swaroop, K. (2014). Influence of biotic and abiotic elicitors on production of betalain pigments in bougainvillea callus cultures. *Indian Journal of Horticulture*, 71(3), 373-378.
- Lara, M. A. C., & Monter, Á. V. (2002). Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25(2), 213-217.
- La Rosa, R., & Quijada, J. (2013). Germinación del sacha inchi, *Plukenetia volubilis* L. (McBride, 1951) (Malpighiales, Euphorbiaceae) bajo cuatro diferentes condiciones. *The Biologist (Lima)*, 11(1).
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina*. 258 p.
- López, H. A. & Anton A. M. (2006). Nyctaginaceae. In A. T. Hunziker [ed.], *Flora fanerogámica Argentina*, 1–22. Programa Pro ora, Córdoba, Argentina.
- Martínez Pérez, A., Albacete Moreno, A., Sánchez Iglesias, M. D. P., Pérez Alfocea, F., & Martínez Andújar, C. (2014). Efectos de la sobreproducción de ácido abscísico y citoquininas en la respuesta fisiológica y agronómica de tomate bajo estrés salino en invernadero. *III Workshop en Investigación Agroalimentaria – WiA3.14*. Cartagena
- Martínez-Villarreal, R., Garza-Romero, T. S., Moreno-Medina, V. R., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2016). Bases bioquímicas de la tolerancia al estrés osmótico en hongos fitopatógenos: el caso de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Revista argentina de microbiología*, 48(4), 347-357.
- Martin, K. P. (2004). *In vitro* propagation of the herbal spice *Eryngium foetidum* L. on sucrose-added and sucrose-free medium without growth regulators and CO₂ enrichment. *Scientia horticultrae*, 102(2), 277-282. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*,

- Marks, T. R., & Simpson, S. E. (1990). Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. *Journal of horticultural science*, 65(2), 103-111.
- Matsumoto, T., Mochida, K., Itamura, H., & Sakai, A. (2001). Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. *Plant Cell Reports*, 20(5), 398-402.
- Méndez-Natera, J. R., Merazo, P. J. F., & Montaña, M. N. J. (2008). Relación entre la tasa de imbibición y el porcentaje de germinación en semillas de maíz (*Zea mays* L.), caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) y quinchoncho (*Cajanus cajan* (L.) Mill.). *UDO Agrícola*, 8, 61-66.
- Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. *Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)*. Cali, Colombia, 19-40.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Naik S.K. & Chand P. K. (2006) Nutrient-alginate encapsulation of *in vitro* nodal segments of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Scientia Horticulturae* 108, 247-252
- Navarro-Ureña, J. A. (2002). Encapsulamiento de meristemas de papa (*Solanum tuberosum*) para la crioconservación y la propagación en invernadero.
- Nieves N.; Lorenzo, J.C.; Blanco M.A.; Gonzalez J.; Perralta H.; Hernandez M.; Santos R.; Concepcion O.; Borroto C.G.; Borroto E.; Tapia R.; Martinez M.F. & Gonzalez F.A. (1998). Artificial endosperm of Cleopatra tangerine zygotic embryos: A model for somatic embryoencapsulation. 4: 77-83
- Nikolaeva, M. G. (1977). Factors controlling the seed dormancy pattern. *Physiology and Biochemistry of Seed dormancy and Germination*.
- Olmos, S; Luciani G & Galdeano, E. (2010). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Parte IV: Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Capítulo 1 Micropropagación. Buenos Aires, Argentina, pp. 353-362.
- Ortega, E. (2008) Fisiología del estrés. Curso de posgrado, Facultad de Biología, Universidad de La Habana.
- Pandino, G., Meneghini, M., Tavazza, R., Lombardo, S., & Mauromicale, G. (2017). Phytochemicals accumulation and antioxidant activity in callus and suspension cultures of *Cynara scolymus* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(1), 223-230.

Pece, M., Gaillard, C., Acosta, M., Bruno, C., & Saavedra, S. (2010). Tratamientos pregerminativos para Tipa colorada (*Pterogyne nitens* Tul.). *Foresta veracruzana*, 12(1), 17-25.

Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología vegetal*, 11(4).

Pérez, D. R., Pilustrelli, C., Farinaccio, F. M., Sabino, G. & Aronson, J. (2020). Evaluating success of various restorative interventions through drone-and field-collected data, using six putative framework species in Argentinian Patagonia. *Restoration Ecology*, 28, 44-53.

Rafique, R., Fatima, B., Usman, M., Iqbal, M. S., Hasan, S. U., Shabbir, K., ... & Rasheed, M. (2013). Effect of sucrose on *in vitro* callogenesis, embryogenesis and organogenesis of *Dendrobium sabin* H. *International Journal of Modern Agriculture*, 2(1), 43-47.

Ray, A., & Bhattacharya, S. (2008). Regeneration of genetically uniform *Boerhaavia diffusa* by culture of nodal explants and synthetic seeds. *Int. Jr. Plant Ded. Biol*, 2, 123-127.

Reynolds, J. F., Smith, D. M. S., Lambin, E. F., Turner, B. L., Mortimore, M., Batterbury, S. P., ... & Huber-Sannwald, E. (2007). Global desertification: building a science for dryland development. *Science*, 316, 847-851.

Ridley, H. N. (1930). *La dispersión de plantas en todo el mundo*. L. Reeve & Co., Ashford, Reino Unido.

Rodríguez Araujo, M. E. (2021). *Rehabilitación ecológica de sitios degradados por disturbios severos en el Monte Austral Neuquino: evaluación de la siembra directa con especies nativas* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Rodríguez Beraud, M. M., Latsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2014). Inducción *in vitro* de calogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 111-118.

Rodriguez-Salazar, C. M., Roman-Reynosa, J., Avila-Reyes, S. V., Loring-Younce, F., Jiménez-Aparicio, A. R., & Evangelista-Lozano, S. (2018). Cellular Forms in Cultivation in Suspension of *Bougainvillea glabra* Choisy Variety Surprise. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, 8, 203-211.

Safriel, U., Adeel, Z., Niemeijer, D., Puigdefabregas, J., White, R., Lal, R., ... & King, C. (2005). Dryland systems. In *Ecosystems and Human Well-being: Current State and Trends.: Findings of the Condition and Trends Working Group* (pp. 623-662). Island Press. Washington D.C.

Saleem, H., Usman, A., Mahomoodally, M. F., & Ahemad, N. (2020). Bougainvillea glabra (choisy): A comprehensive review on botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicity. *Journal of ethnopharmacology*, 113356.

Segura J. (2008). Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. En Azcon J, Talon M, editores. Fundamentos de fisiología vegetal. 2.a ed. Barcelona (España): McGraw-Hill. p. 349-376.

Shah, S. T., Zamir, R., Muhammad, T., & Ali, H. (2006). Mass propagation of *Bougainvillea spectabilis* through shoot tip culture. *Pakistan Journal of Botany*, 38(4), 953.

Sharry, S. (2015). *Plantas de probeta*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).

Schumacher, S., & Bugmann, H. (2006). The relative importance of climatic effects, wildfires and management for future forest landscape dynamics in the Swiss Alps. *Global Change Biology*, 12(8), 1435-1450.

Skoog, F., & Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. *In Vitro Symp Soc Exp Biol*.

Tabares, E., Pachón, J., & Roca, W. M. (1991). Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. *Cultivo de tejidos en la agricultura*. W. Roca y L. Mroginski (eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia.

Trujillo, E. (1996). Análisis y pruebas rápidas de la calidad de las semillas. En: Mejoramiento genético, selección y manejo de fuentes semilleras y de semillas forestales, Unidad 3: Recolección y manejo de semillas forestales. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 152 pp.

Varela, S. A., & Aparicio, A. G. (2011). Aspectos básicos sobre semillas y frutos de especies forestales. Recomendaciones para su cosecha. *Serie técnica Sistemas Forestales Integrados Área Forestal-INTA EEA Bariloche. Silvicultura en vivero, Cuadernillo, 1*.

Verdes, P. (2007). Notas: Micropropagación de *Prosopis caldenia* Burk.: estado actual y perspectivas. *Revista Científica Agropecuaria*, 11(1), 45-51.

Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*, 4(3), 162-176.

West, T. P., Ravindra, M. B., & Preece, J. E. (2006). Encapsulation, cold storage, and growth of *Hibiscus moscheutos* nodal segments. *Plant cell, tissue and organ culture*, 87(3), 223-231.

*Aplicación de biotecnologías para la propagación y conservación de “monte negro”
(Bougainvillea spinosa (Cav.) Heimerl.)*

Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., & Hafiz, I. A. (2013). Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular biology reports*, 40(4), 2837-2849.

Yuan-Long, W. A. N. G., Ming-Jen, F. A. N., & Song-luan, L. I. A. W. (2005). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya L.*) by vitrification. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46.

Zuloaga, F., & Anton, M. (2020). *Flora Argentina*. <http://www.florargentina.edu.ar>