

Práctica Laboral



**ESTABLECIMIENTO 'IN-VITRO' DE GAULTHERIA NUBIGENA
(ERICACEAE), UNA ESPECIE AMENAZADA DEL
BOSQUE ANDINO PATAGÓNICO**



Presentado por:

MARÍA JULIETA MONTERVINO

Supervisores:

ING. AGR. HERNÁN MATTES FERNÁNDEZ

ING. AGR. DIANA ORLOV

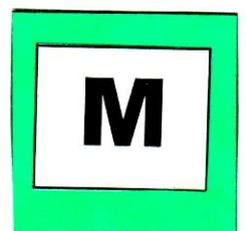
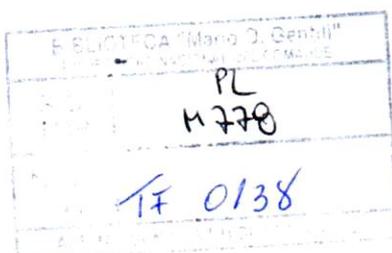


Universidad Nacional del Comahue

Asentamiento Universitario San Marín de los Andes

Tecnatura Universitaria en Espacios Verdes

Agosto 2018



RESUMEN

Se realizaron ensayos de micropropagación de *Gaultheria nubigena* (Phil.), *Gaultheria mucronata* y *Gaultheria poeppigii*. Se utilizaron explantes caulinares, foliares y rizomáticos. Para la fase de establecimiento 'in vitro' se utilizó el medio *Woody Plant Medium* (WPM), suplementado con citoquininas (BAP) y auxinas (ANA). Se evaluaron distintos tratamientos de desinfección a base de etanol (alcohol etílico) e hipoclorito de sodio (lavandina comercial). Antes de la desinfección, los explantes se lavaron durante 30 minutos en una solución con un polvo abrasivo desinfectante y, durante la desinfección se les agregó *Tween 20*. En uno de los ensayos, antes de la extracción a campo del material vegetal, se aplicó un fungicida sistémico. En la mayoría de los casos el porcentaje de explantes contaminados disminuyó a medida que aumentaba el grado de concentración de hipoclorito de sodio (NaClO), siendo el tratamiento de 20% el que, definitivamente, resultó más efectivo. En el último ensayo de desinfección y establecimiento in-vitro, con explantes caulinares de *G. mucronata*, se observó una mayor efectividad y notable diferencia entre las 2 concentraciones utilizadas. El porcentaje de contaminación alcanzó un 80 % en el tratamiento de 15 % NaClO, y un 60 % (9/15) en el tratamiento de 20 % NaClO. A 2 meses del establecimiento, en ningún caso se observó una respuesta organogénica en los explantes.

Palabras Clave: micropropagación, desinfección, especie nativa, especie vulnerable.

INTRODUCCIÓN

La especie *Gaultheria nubigena* (Phil.), conocida como chaura "de las cascadas" o "de las nubes", es nativa del Bosque Andino Patagónico y está clasificada como vulnerable (categoría VU) en la Lista Roja de la Unión Internacional a la Conservación de la Naturaleza (UICN) (ref¹).

La especie posee solo ocho poblaciones conocidas hasta la fecha y es de distribución muy restringida. Abarca las regiones VIII de Bío-Bío y X de Los Lagos en Chile y las provincias de Neuquén y Río Negro en Argentina (ref²).

Se eligió el método de cultivo 'in-vitro' por ser el que menor cantidad de material vegetal demanda para realizar los ensayos y esto es importante considerando que se trata de especies vulnerable (Categoría VU). Este método permite propagar masivamente material vegetal sano en cualquier época del año y en corto tiempo, permitiendo la conservación de su potencial genético y su calidad sanitaria.

(ref¹) <http://www.iucnredlist.org/details/133713/0>

(ref²) HERMANN, P. M.; CAMBI, V. N. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 41(3-4): 317-322

OBJETIVO

Lograr la propagación vegetativa de la especie mediante el método de cultivo 'in-vitro', con el fin de poder contribuir a su conservación.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Material experimental. Se trabajó a partir de microestacas de *G. nubigena* seleccionadas y recolectadas de plantas ubicadas en Las Cascadas de Ñivinco, área protegida del Parque Nacional Nahuel Huapi (PNNH), a principios de otoño y principios de primavera de 2017. Las mismas fueron conservadas en condiciones similares a su hábitat natural hasta el momento de iniciar los ensayos. Debido a la dificultad en establecer los explantes de *G. nubigena* se decidió ensayar el establecimiento con otras dos especies del género: *G. poeppigii* y *G. mucronata*. La primera fue recolectada durante la primavera de 2017 y la segunda en el otoño del siguiente en el Cerro Bandurrias, área protegida del Parque Nacional Lanín (PNL).

Descripción de las especies

Gaultheria nubigena

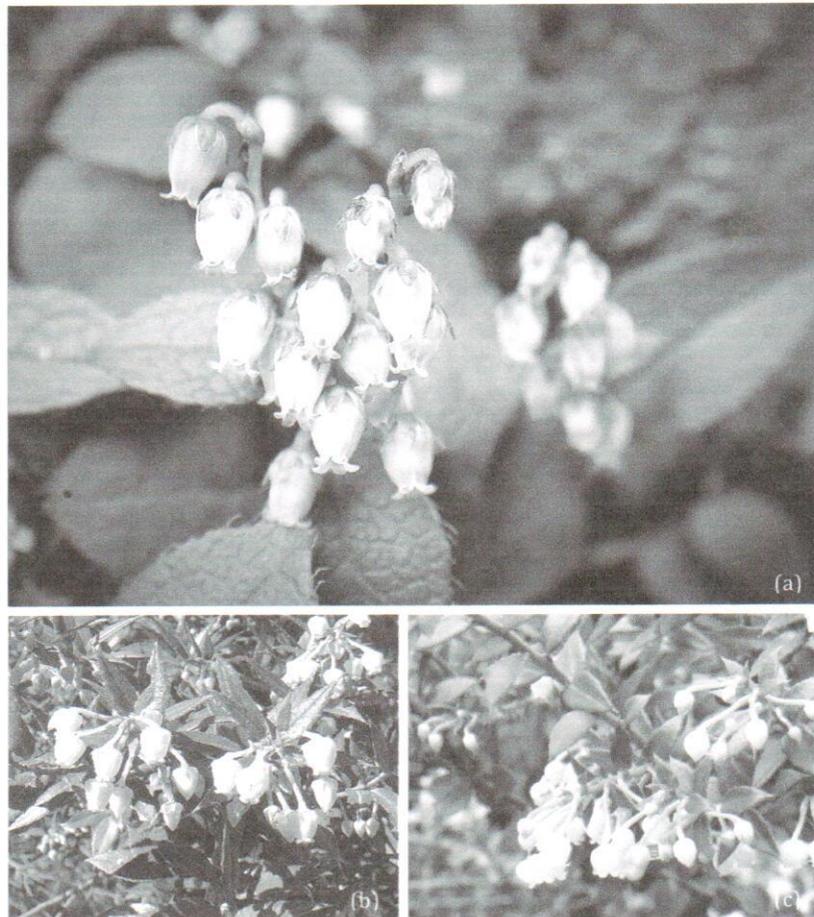
Subarbusto con tallos colgantes, rastreros, postrados o procumbentes, delgados y glabros, que crece sobre el musgo que se forma en grietas de rocas próximas a cascadas o en zonas donde fluye el agua en forma constante. Hojas glabras en la haz y finamente pubescente en el envés, lámina de 10-16 x 8-12 mm, aovada hasta redondeado-aovada, débilmente cordiforme en la base, ápice agudo, borde delicadamente aserrado con los dientecillos terminados en cilios muy evidentes, color castaños, de 2 mm de largo. Flores hermafroditas, dispuestas en cimas axilares y terminales de hasta 2 cm, con 5-15 flores, pedúnculo finamente pubescente; pedicelo de 3-4 mm en la axila de una bráctea, con dos bractéolas opuestas en su base. Corola rosada de 5 mm, urceolado-cilíndrica, androceo con 10 estambres, 5 largos y 5 cortos, los más cortos alcanzan la mitad de la corola, gineceo con ovario de 1 mm, glabro, estilo es de 2,5 mm y estigma obtuso. Fruto globoso y seco, una cápsula coriácea, los lóbulos del cáliz muy poco engrosados (Fig. a).

Gaultheria poeppigii

Arbusto erguido, de 30-150 cm de altura, o tendido (10-20 cm), denso, ramillas finamente pubescentes y laxamente setosas, que crece preferentemente en el ámbito de los bosques de *Nothofagus* y en el margen inferior del piso andino. Hojas brevemente pecioladas, las más jóvenes finas y laxamente pubescentes especialmente en los bordes, lámina de 10-20 x 7 mm, ovado-elíptica, anchamente oblongo-elípticas, algo aguda a causa de la costilla media prolongada, margen engrosado con 4-7 dientes redondeados a cada lado. Especie dioica. Flores unisexuales, solitarias, axilares, pedicelos de 4-5 mm, pubescentes, a veces, con glándulas estipitadas aisladas y caedizas, en la base están rodeados de 4 brácteas pequeñas y 2 bractéolas. Cáliz profundamente 5-partido, lóbulos de 1,5-2 mm, triangulares. Corola de 3 mm, urceolada. Las flores masculinas tienen 10 estambres, 5 más cortos, con anteras de 1-1,2 mm, anchamente ovoide-oblongas y filamentos de 1-1,5 mm, gineceo con ovario estéril. Las flores femeninas tienen un androceo estéril y el gineceo con ovario fértil, de 1,5 mm globoso y piriforme. Fruto, una baya de 4-6 mm de diámetro, globosa, algo deprimida, de color blanco, rosado o morado (Fig. b).

Gaultheria mucronata

Arbusto de 20 cm hasta 2,5 de altura, erguido, con ramas robustas, ramillas glabras o pubescentes y laxamente setosas, que crece en los bosques de *Nothofagus siempreverdes* y en los matorrales costeros primarios y secundarios. Hojas pecioladas, duras y coriáceas, glabras, lámina de 1-2 x 0,5-1 cm, aovado-elíptica hasta aovado-oblonga, engrosada en el borde y provista de 4-5 dientes redondeados gruesos a cada lado, ápice atenuado y terminado en un mucrón rígido de 1 mm. Especie dioica. Flores unisexuales, solitarias, axilares, pedicelo de 5-12 mm, finamente pubescente y laxamente setoso, rodeadas en la base, por varias brácteas pequeñas y dos bractéolas casi opuestas. Cáliz profundamente 5-partido, lóbulos de 2 mm angostamente triangulares, algo agudos. Flores masculinas con una corola de 5 mm, campanulada, androceo con 10 estambres, anteras de 1 mm, filamentos de 1,2-1,5 mm, gineceo con ovario de 1,2 mm, piriforme, estéril. Flores femeninas con una corola de 4 mm, urceolado-cilíndrica, estambres estériles, gineceo con ovario fértil, estigma con 5 lóbulos bien desarrollados. Fruto, una baya de 6-10 mm de diámetro, algo deprimida, casi globosa, rosada, raramente blanca, cáliz ni acrescente ni carnoso (Fig. c).

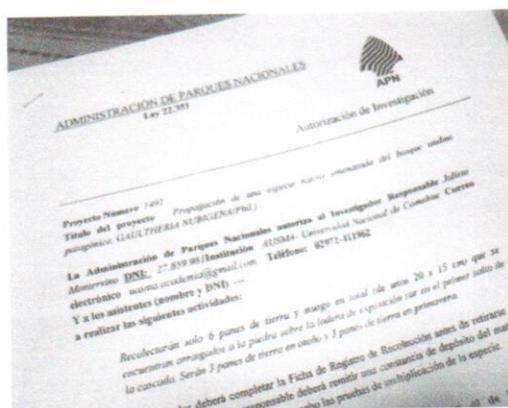


(a) *Gaultheria nubigena*. (b) *Gaultheria poeppigii*. (c) *Gaultheria mucronata*.

Permisos y recolección. Se solicitó aval y seguro al Asentamiento Universitario San Martín de los Andes, Universidad Nacional del Comahue (AUSMA - UNCO) para obtener, de la Administración de Parque Nacionales, una autorización de investigación en el PNNH, Cascadas de Ñivinco, sobre la ruta Nacional N° 40, durante el año 2017.

Se completó una Ficha de Registro de Recolección y entregó una Constancia de Depósito del Material Biológico de la institución donde se llevaron a cabo las pruebas de desinfección y posterior multiplicación de la especie (AUSMA - UNCO). Se coordinó con personal del Parque Nacional para ser acompañados, durante la recolección, por el guardaparque de la Seccional Villarino.

Método de recolección del material vegetal. Se recolectaron 6 panes de tierra y musgo que contenían la especie *G. nubigena*, 3 en otoño y 3 en primavera (de unos 20 x 15 cm), que se encuentran arraigados a la piedra sobre la ladera de exposición sur en el primer salto de la cascada. En primavera también se optó por recolectar material vegetal de *G. poeppigii*, que se encuentra bordeando todo el camino. A comienzos de otoño de 2018 se trabajó en campo y recolectó material vegetal de *G. mucronata* en el Cerro Bandurrias, tierras de la comunidad mapuche declaradas como reserva nacional.



Autorización de Investigación (APN).



Recolección de material vegetal.

Medio de cultivo. Se elaboraron soluciones madre del medio de cultivo 'Woody Plant Medium' (WPM) el más utilizado, según biografía consultada, para los tratamientos in-vitro de las diferentes especies de la familia Ericacea.

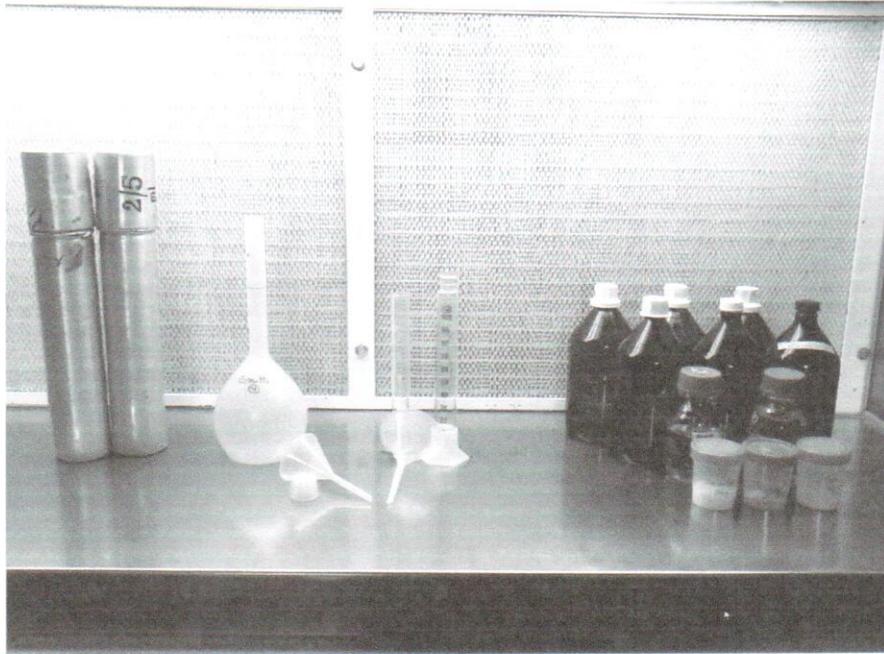
La solución final se preparó en Cámara Estéril de flujo laminar, se colocaron en un matraz aforado (1L), con la ayuda de probetas, pipetas y embudos, los distintos nutrientes, las vitaminas, los aminoácidos, la citoquinina BAP (6-bencilaminopurina), la auxina ANA (ácido 1-naftalenacético), el myo-inositol y la sacarosa. Se lo pasó a un matraz Erlenmeyer, se midió el pH, se lo reguló en 5,7 y se agregó el agar-agar, mezclándolo y llevándolo a baño María hasta lograr la correcta disolución y gelificación componentes. Se colocó en frascos, se taparon con aluminio y se mandaron a esterilizar en autoclave.

ESTABLECIMIENTO 'IN-VITRO' DE GAULTHERIA NUBIGENA
(ERICACEAE), UNA ESPECIE AMENAZADA DEL BOSQUE ANDINO PATAGÓNICO

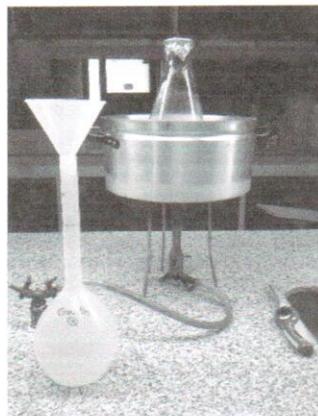
Composición química del medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium)		
Compuestos		(mg/l)
Macronutrientes		
I	Sulfato potásico (K ₂ SO ₄)	990
	Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	400
	Sulfato de magnesio, heptahidratado (Mg SO ₄ .7H ₂ O)	370
	Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	170
II	Cloruro de calcio, bihidratado (Ca Cl ₂ .2H ₂ O)	96
III	Nitrato de calcio, tetrahidratado (Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O)	556
Micronutrientes		
I	Sulfato de magnesio, monohidratado (Mn SO ₄ .H ₂ O)	22,3
	Sulfato de zinc, heptahidratado (Zn SO ₄ .7H ₂ O)	8,6
	Ácido bórico (H ₃ BO ₂)	6,2
	Sulfato cúprico, pentahidratado (Cu SO ₄ .5H ₂ O)	0,25
	Molibdato de sodio, bihidratado (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	0,25
II	Sulfato ferroso, heptahidratado (Fe SO ₄ .7H ₂ O)	27,8
	Sal de sodio del ácido etilendiamino tetracético (Na ₂ EDTA)	37,3
Vitaminas		
Thiamine - HCL (B1)		1
Nicotinic acid (B3)		0,5
Pyridoxine - HCL (B6)		0,5
Aminoácidos		
Glycine		2

Solución final del medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium)		
Compuestos		ml
Macronutrientes		
I	Sulfato potásico (K ₂ SO ₄)	100
	Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	
	Sulfato de magnesio, heptahidratado (Mg SO ₄ .7H ₂ O)	
	Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	
II	Cloruro de calcio, bihidratado (Ca Cl ₂ .2H ₂ O)	100
III	Nitrato de calcio, tetrahidratado (Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O)	100
Micronutrientes		
I	Sulfato de magnesio, monohidratado (Mn SO ₄ .H ₂ O)	10
	Sulfato de zinc, heptahidratado (Zn SO ₄ .7H ₂ O)	
	Ácido bórico (H ₃ BO ₂)	
	Sulfato cúprico, pentahidratado (Cu SO ₄ .5H ₂ O)	
	Molibdato de sodio, bihidratado (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	
II	Sulfato ferroso, heptahidratado (Fe SO ₄ .7H ₂ O)	10
	Sal de sodio del ácido etilendiamino tetracético (Na ₂ EDTA)	
Vitaminas		
Thiamine - HCL (B1)		10
Nicotinic acid (B3)		
Pyridoxine - HCL (B6)		
Aminoácidos		
Glycine		10
Citocininas		
BAP (6-bencilaminopurina) 1g/L		0,5
Auxinas		
ANA (ácido 1-naftalenacético) 0,1 g/L		0,2
Compuestos		gramos
Myo-Inositol		0,1
Sacarosa (C₁₂H₂₂O₁₁)		30
Agar-agar (gelificante)		7

ESTABLECIMIENTO 'IN-VITRO' DE GAULTHERIA NUBIGENA
(ERICACEAE), UNA ESPECIE AMENAZADA DEL BOSQUE ANDINO PATAGÓNICO



Preparación de solución final en equipo de flujo laminar.



Baño María, disolución y gelificación de agar-agar.



Medio de cultivo en frascos, listo para esterilizar.

Esterilización de medios de cultivo, insumos e instrumental. El medio de cultivo se sometió a esterilización en autoclave a una temperatura de 120 °C y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos. Se utilizaron para realizar los ensayos de desinfección distintos elementos como: cajas de Petri, probetas de (100 ml), matraz Erlenmeyer (250 ml), coladores, vasos de precipitado, agua destilada, cajas con pinzas y bisturís, que fueron también esterilizados en autoclave. Se los sometió a una temperatura de 120 °C (1 atmósfera) durante 45 minutos.



Autoclave - AUSMA.



Material y elementos esterilizados.

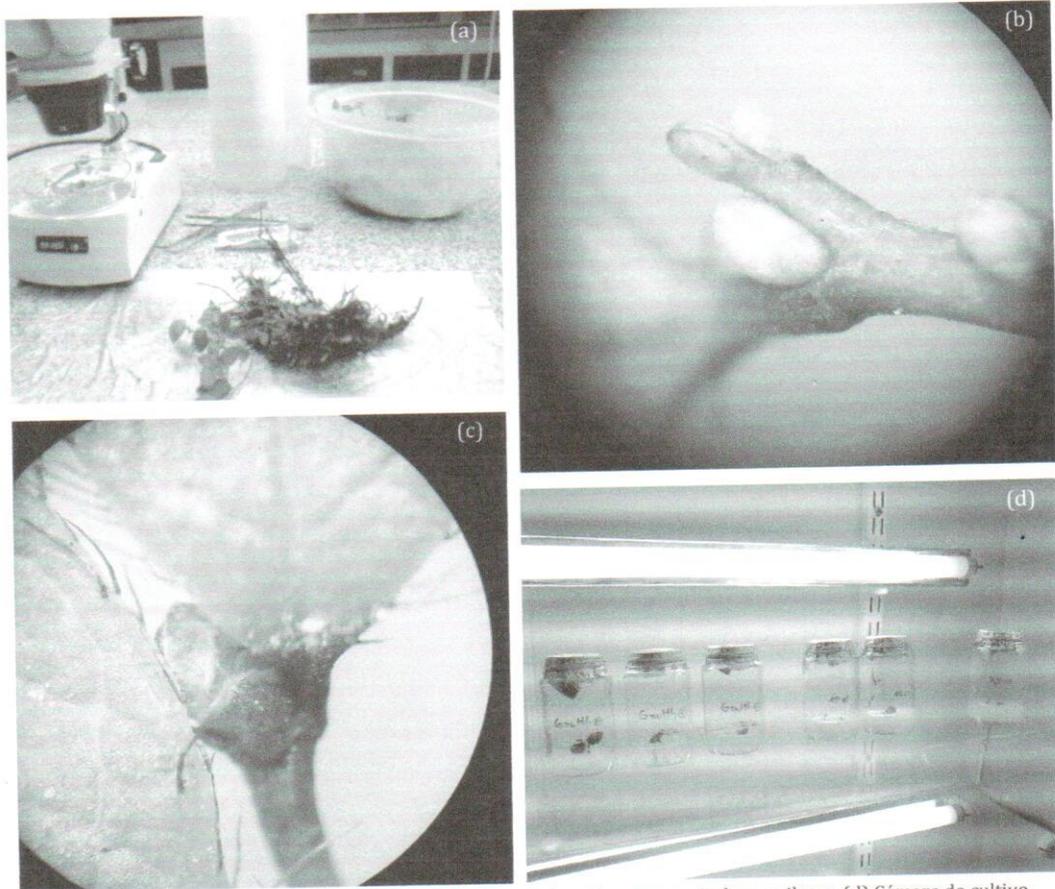
ENSAYOS DE DESINFECCIÓN Y ESTABLECIMIENTO

1º ensayo (abril 2017): De las plantas de *G. nubigena* recolectadas a comienzos de otoño en las Cascadas de Ñivinco, se seleccionaron y cortaron explantes caulinares de 2,0 - 2,5 cm de longitud, con 2 o 3 yemas axilares. Se les realizó una pre-desinfección con agua destilada (500 ml) y 2 gotas de hipoclorito de sodio (NaClO), en agitación mecánica durante 30 minutos. Se los enjuagó y, en equipo de flujo laminar se sometieron a inmersión en etanol (C₂H₆O) al 70% durante 1 minuto, se los enjuagó 3 veces durante 5 minutos con agua destilada estéril (ADE) y, por último, se les realizó una desinfección más intensa, de 10 minutos, con NaClO comercial (55g/l de cloro activo) en 3 concentraciones distintas: 7,5 % - 10 % - 15 %. Cada tratamiento consistió de 16 explantes. Se enjuagó 3 veces con ADE durante 5 minutos. Prewio al establecimiento in-vitro, a los explantes caulinares, se les eliminó los extremos superior e inferior, fraccionándolos en segmentos iguales de 1,5 cm y se sembraron en los frascos de a 2, en posición inclinada de 30/45°. En primer lugar, los cultivos se incubaron en estufa de cultivo en oscuridad a 22 - 24 °C durante una semana. Posteriormente, se llevaron a cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, a una temperatura de 22 a 24 °C e intensidad lumínica variable (800 a 3000 lux). Se observaron durante dos meses.

2º ensayo (mayo 2017): De las mismas plantas de *G. nubigena* recolectadas a comienzos de otoño en las Cascadas de Ñivinco se optó, en este segundo ensayo, por trabajar con explantes foliares. Se cortaron secciones de tejido de aproximadamente 1 cm², a los que se les realizó el mismo procedimiento de pre-desinfección y desinfección del primer ensayo. Para este caso se utilizaron solo las dos (2) concentraciones más altas de NaClO comercial (55g/l de cloro activo): 10 % - 15 %, dividiendo los treinta y dos (32) explantes en 16 para cada tratamiento. Prewio al establecimiento in-vitro, a los explantes foliares, se les recortaron todos

**ESTABLECIMIENTO 'IN-VITRO' DE GAULTHERIA NUBIGENA
(ERICACEAE), UNA ESPECIE AMENAZADA DEL BOSQUE ANDINO PATAGÓNICO**

los extremos necrosados durante el procedimiento de desinfección, fraccionándolos en iguales segmentos de aproximadamente 0,5 cm² y se sembraron de a 2 sobre la cara abaxial. Se incubaron en estufa de cultivo en oscuridad a 22 - 24 ° C durante una semana y, posteriormente, se llevaron a cámara de cultivo con igual fotoperiodo, temperatura e intensidad lumínica del 1º ensayo.

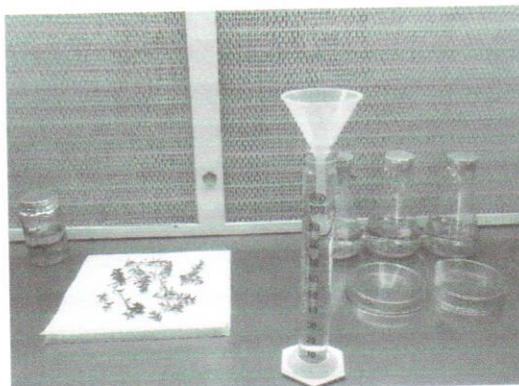


(a) Selección de explantes en laboratorio. (b) y (c) Vistas con lupa de yemas apicales y axilares. (d) Cámara de cultivo.

3º ensayo (octubre 2017): De las plantas de *G. nubigena* y *G. poeppigii* recolectadas en primavera de las Cascadas de Ñivinco, se seleccionaron y cortaron explantes caulinares de 2,0 - 2,5 cm de longitud, con 2 o 3 yemas axilares y se les realizó el mismo procedimiento de pre-desinfección que en el primer ensayo, con el agregado de una pequeña cantidad de polvo abrasivo (tipo *Odex*) y cepillado posterior para ayudar a eliminar partículas contaminantes. En la desinfección con NaClO comercial (55g/l de cloro activo), se agregó un par de gotas de *Tween 20* en cada concentración: 15 % - 20 %, dividiendo los veinte (20) explantes de cada especie en diez (10) para cada tratamiento. Se continuó con el mismo procedimiento de los anteriores ensayos.

4º ensayo (noviembre 2017): De las mismas plantas de *G. nubigena* recolectadas en primavera de las Cascadas de Ñivinco, se decidió también experimentar con

explantes rizomáticos de 1,5 - 2,0 cm de longitud, con 2 o 3 yemas axilares a los que se les realizó el mismo procedimiento de pre-desinfección y desinfección que en el anterior ensayo y las mismas 2 concentraciones de NaClO comercial (55g/l de cloro activo): 15 % - 20 %, dividiendo los veinticuatro (24) explantes en doce (12) para cada tratamiento. Se continuó con el mismo procedimiento de los anteriores ensayos.



Tratamiento de desinfección en equipo de flujo laminar.



Explantes ya establecidos in-vitro.

5º ensayo (abril 2018): En esta última instancia se decidió trabajar con la especie *G. mucronata*, que es la más abundante o reconocida del género y se encuentra fácilmente en los alrededores de San Martín de los Andes. Para este caso se trabajó con plantas que se encuentran en el Cerro Bandurrias, camino al mirador. Se las analizó y seleccionó según sus características de crecimiento y sanidad. A campo, se les aplicó un fungicida sistémico (carbendazim-benzimidazole 50g) y a las 48 hs se las recolectó y llevó directo al laboratorio experimental para continuar con el procedimiento de pre-desinfección y desinfección correspondiente. Se eligieron y seccionaron explantes caulinares de 2,0 - 2,5 cm de longitud, siempre con 2 o 3 yemas axilares. Se trabajó con las 2 más altas concentraciones: 15 % - 20 %, dividiendo los treinta y dos (32) explantes en dieciséis (16) para cada concentración. Los cultivos fueron llevados directamente a cámara de cultivo con igual fotoperíodo y temperatura del 1º ensayo, pero a menor intensidad lumínica. Se observaron, como en todos los ensayos, durante dos meses.

Al finalizar cada ensayo se evaluó la efectividad de los distintos tratamientos de desinfección y el efecto del medio de cultivo sobre: número de explantes viables, incidencia de procesos necróticos, de contaminación y proliferación de tejidos.

RESULTADOS

En el 1º ensayo de desinfección y establecimiento in-vitro de microestacas caulinares de *G. nubigena*, se observó poca efectividad en todas las concentraciones empleadas, pero hubo un porcentaje levemente más bajo de explantes contaminados con la mayor concentración. El porcentaje de explantes contaminados alcanzó un 87,5 % (14/16) en el tratamiento de 7,5% NaClO, un 100% (16/16) en el tratamiento de 10% NaClO y un 75 % (12/16) en el

**ESTABLECIMIENTO 'IN-VITRO' DE GAULTHERIA NUBIGENA
(ERICACEAE), UNA ESPECIE AMENAZADA DEL BOSQUE ANDINO PATAGÓNICO**

tratamiento de 15% NaClO. Pasados los dos meses no se observó proliferación de tejidos en los explantes que quedaron viables.

En el 2° ensayo de desinfección y establecimiento in-vitro de segmentos foliares de *G. nubigena* se observó, ya a los pocos días del establecimiento, una avanzada oxidación y necrosis de todos los tejidos en ambas concentraciones.

En el 3° ensayo de desinfección y establecimiento in-vitro de microestacas caulinares de *G. nubigena* y *G. poeppigii*, se observó una mayor efectividad en la concentración más alta de ambas especies tratadas. Para *G. nubigena*, el porcentaje de explantes contaminados alcanzó un 90 % (9/10) en el tratamiento de 15 % NaClO, y un 70 % (7/10) en el tratamiento de 20 % NaClO. Para *G. poeppigii*, el porcentaje de explantes contaminados alcanzó un 100 % (10/10) en el tratamiento de 15 % NaClO, y un 80 % (8/10) en el tratamiento de 20 % NaClO. Pasados los dos meses no se observó proliferación de tejidos en los explantes que quedaron viables.

En el 4° ensayo de desinfección y establecimiento in-vitro, de microestacas rizomáticas de *G. nubigena*, se observó una baja y similar efectividad en las 2 diferentes concentraciones. El porcentaje de explantes contaminados alcanzó un 91,7 % (11/12) en el tratamiento de 15 % NaClO, y un 91,7 % (11/12) en el tratamiento de 20 % NaClO. Pasados los dos meses no se observó proliferación de tejidos en los explantes que quedaron viables.

En el 5° ensayo de desinfección y establecimiento in-vitro, de microestacas caulinares de *G. mucronata*, se observó una mayor efectividad y notable diferencia entre las 2 concentraciones utilizadas. El porcentaje de explantes contaminados alcanzó un 80 % (12/15) en el tratamiento de 15 % NaClO, y un 60 % (9/15) en el tratamiento de 20 % NaClO. Pasados los dos meses no se observó proliferación de tejidos en los explantes que quedaron viables.

TABLA DE RESULTADOS							
CANTIDAD DE EXPLANTES CONTAMINADOS							
Ensayo Nº	Especie	Fecha de recolección	Tipo de explante	Tratamiento de Hipoclorito de sodio (NaClO)			
				7,50%	10%	15%	20%
1	<i>G. nubigena</i>	15/4/2017	caulinar	(14/16) 87,5%	(16/16) 100%	(12/16) 75% (*)	
2	<i>G. nubigena</i>	15/4/2017	hoja	oxidación y necrosis			
3	<i>G. nubigena</i>	3/10/2017	caulinar			(9/10) 90%	(7/10) 70% (*)
3'	<i>G. poeppigii</i>	3/10/2017	caulinar			(10/10) 100%	(9/10) 80% (*)
4	<i>G. nubigena</i>	3/10/2017	rizoma			(11/12) 91,7%	(11/12) 91,7% (*)
5	<i>G. mucronata</i>	7/4/2018	caulinar			(12/15) 80%	(9/15) 60% (*)

(*) En los tratamientos con mayor concentración de Hipoclorito de sodio (NaClO) se observan los menores porcentajes de contaminación.

TIPOS DE CONTAMINACIÓN - Ensayo N° 5				
Especie <i>G. mucronata</i> - Tipo de explante: caulinar				
Tratamiento de Hipoclorito de sodio (NaClO)	Cantidad total de explantes	Explantes SANOS	Contaminación por HONGOS	Contaminación por BACTERIAS
15%	15	3	3 (*)	9
20%	15	6	5 (*)	4

(*) En las contaminaciones por hongos se pudieron reconocer 3 pertenecientes al género *alternaria sp.* y 1 perteneciente al género *penicilium sp.* (ambos hongos imperfectos).

DISCUSIÓN

Se observó, a lo largo de esta práctica, que las microestacas de *Gaultheria sp.* tomadas de plantas de campo y cultivadas in vitro sufren necrosis y un alto grado de contaminación por bacterias y hongos. La muerte de los explantes puede deberse a los tratamientos de desinfección que deben ser aplicados para eliminar los contaminantes superficiales.

Se conoce que cuando los explantes primarios proceden de especies adultas y leñosas tomadas de campo, en la mayoría de los casos, presentan dificultad tanto en el establecimiento de cultivos in vitro como en la proliferación. Dicha dificultad se debe, en gran parte, al alto grado de contaminación exógena y endógena de estas especies y a la escasa reactividad de las mismas.

En el último ensayo, donde se incluyó una desinfección previa en campo con un fungicida sistémico, se observó una mayor efectividad en el tratamiento. Hubo una notable menor contaminación. La desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO 55g/l) al 20 % durante 10 minutos resultó ser la que permitió obtener mayor cantidad de explantes caulinares de ***Gaultheria mucronata*** libres de contaminantes superficiales. En ninguno de los casos, las hormonas del medio de cultivo (BAP y ANA), a las concentraciones seleccionadas, indujeron la proliferación de tejidos. Por lo tanto, se sugiere investigar otro medio de cultivo como el Anderson, otras concentraciones de BAP y otras citoquininas, como la 2 - Isopentenil Adenina (2 IP), utilizada también en otras especies de Ericáceas.

Distintas observaciones indican que no solo la composición del medio de cultivo afecta el desarrollo de yemas sino que, además, tanto el tipo de citoquinina como su concentración interactúan afectando de manera directa la inducción de crecimiento y desarrollo de yemas axilares en explantes de esta misma familia de especies. En este contexto, afirman también que la capacidad de regeneración de los tejidos es altamente dependiente del tipo de citoquinina, su concentración, así como también de especie elegida.

El cultivo de plantas en invernadero y la aspersión periódica con un fungicida, posiblemente contribuya a disminuir la presencia de contaminantes en los explantes en la etapa de establecimiento in-vitro.

GRADO DE APROVECHAMIENTO

Esta práctica me permitió entender la importancia de una investigación científica, la previa búsqueda bibliográfica, la recopilación de antecedentes sobre el tema elegido, la solicitud de permisos para extraer el material vegetal necesario para los ensayos, el manejo y contratiempos del trabajo en campo, el instrumental de laboratorio y la metodología a la hora de trabajar en cultivo in-vitro.

Un gran desafío al enfrentar problemas reales, buscar alternativas y soluciones, aprovechando todos los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera, notando también algunas faltantes en contenidos, horas cátedra y práctica, pero pudiendo ajustar o reforzar conocimientos con esta experiencia de trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a Sebastián, por su amor, comprensión y apoyo incondicional a todo lo que emprendo.

A todo el personal de AUSMA, docente, no docente, alumnos, compañeros de cursadas. Me llevo bonitos recuerdos y preciadas amistades.

A Parques Nacionales, personal administrativo y guardaparques, por su colaboración en todo lo que fue pedidos de permiso y trabajo de campo.

Y en especial a mis supervisores, Hernán Mattes, por su predisposición, acompañamiento y asesoramiento a lo largo de esta práctica y Diana Orlov, por su contención e incentivación en esta etapa y a lo largo de toda la carrera.

BIBLIOGRAFÍA

- MARCOTRIGIANO, M. ; MCGLEW, S. 1991. Sistema de micropropagación en dos etapas para arándanos. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 911-916.
- REED, B.M. ; ABDELNOUR, E.A. 1991. El uso de la zeatina para iniciar cultivos in vitro de especies y cultivares de *Vaccinium*. *Horticultural Science* 26: 1320-1322.
- CORREA, M. N. 1999. Flora Patagónica. Parte VI. Dicotyledones. Gamopétalas. De Ericaceae a Calyceraceae. Tomo VIII. Colección Científica de INTA. 536 pp.
- GONZÁLEZ, M. ; LÓPEZ, M.; VALDES, E. ; ORDAS, J. 2000. Micropropagación de tres especies de bayas usando segmentos nodales de plantas cultivadas en el campo. *Annals of Applied Biology* 137(1): 73-78
- JAAKOLA, L. ; TOLVANEN, A. ; LAINE, K. ; HOHTOLA, A. 2001. Efecto de la concentración de N6-isopenteniladenina sobre el inicio del crecimiento in vitro y el enraizamiento de microestacas de arándano y arándano rojo. *Cultivo de células vegetales, tejidos y órganos* 66: 73-77.
- CETEFFHO - INTA. 2002. Aplicaciones del Cultivo in vitro en Especies Ornamentales.
- EZCURRA, C. ; BRION, C. 2005. Plantas del Parque Nacional Nahuel Huapi. Catálogo de la flora vascular del Parque Nacional Nahuel Huapi, Argentina. Universidad Nacional del Comahue y Red Latinoamericana de Botánica, San Carlos de Bariloche. 70 pp.
- HECHENLEITNER, P. V. ; M. F. GARDNER ; P. I. THOMAS. 2005. Plantas amenazadas del Centro-Sur de Chile. Distribución, conservación y Propagación. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo. 188 pp.
- DEBNETH, S. 2005. Efectos de la fuente de carbono y la concentración en el desarrollo de brotes de arándano rojo (*Vaccinium vitis-idaea* L.) cultivados in vitro a partir de explantes nodales. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41: 145-150.
- HERMANN, P. M. ; CAMBI, V. N. 2006. *Gaultheria nubigena* (Ericaceae), una especie rara en Argentina. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 41 (n.3-4): 317 - 322.
- BARTHELEMY, D. ; BRION, C. ; PUNTIERI, J. 2008. Plantas de la Patagonia. República Argentina. Vázquez Mazzini Editores. 240 pp.
- COMITA, J. L. ; MARIOSIA, C. Año 2008. Registro de especies de flora de valor especial. Primer registro de *Gaultheria nubigena* en Parque Nacional Lanín.
- BISHEIMER, M. V. 2012. Flores de la Patagonia Argentina. Serie Patagonia. Neuquén, Argentina. 120 pp.

ESTABLECIMIENTO 'IN-VITRO' DE GAULTHERIA NUBIGENA
(ERICACEAE), UNA ESPECIE AMENAZADA DEL BOSQUE ANDINO PATAGÓNICO

- TEILLIER, S. ; ESCOBAR, F. 2013. Revisión del género Gaultheria L. (Ericaceae) en Chile. Gayana Bot. 70(1): 136-153.
- <http://www.floraargentina.edu.ar> Flora Argentina. Plantas Vasculares de la República Argentina.
- http://www.sib.gov.ar/ficha/PLANTAE*gaultheria*nubigena SIB. Sistema de Información de Biodiversidad. Administración de Parques Nacionales.
- www.iucnredlist.org/details/133713/0 Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Lista Roja de especies amenazadas.