

***“APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS
BIOTECNOLÓGICAS EN LA MICROPROPAGACIÓN
DE ESPECIES ARBÓREAS NATIVAS DE LA SELVA
MISIONERA EN PELIGRO DE EXTINCIÓN”***

EVELYN RAQUEL DUARTE

***Tesis para optar el grado de Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste en
el Área de Recursos Naturales***

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Facultad de Ciencias Agrarias

2015

RESUMEN

La Selva Misionera es considerada una de las eco-regiones del país con mayor diversidad biológica. Sin embargo, la explotación extractiva de sus principales especies arbóreas maderables y la falta de acciones complementarias de manejo, provocan un alto grado de erosión genética que compromete la sustentabilidad del sistema; requiriéndose de acciones concretas que promuevan la restauración de la biodiversidad mediante la implantación de las especies de mayor consumo. En este contexto, el objetivo general del trabajo fue desarrollar procedimientos de propagación masiva que permitan la obtención de plantas de las especies amenazadas o en peligro de extinción.

A partir de la recolección de frutos y semillas de ejemplares de *Balfourodendron riedelianum* (guatambú blanco), *Cedrela fissilis* (cedro misionero), *Cordia trichotoma* (peteribí), *Handroanthus heptaphyllus* (lapacho rosado) y *Myrocarpus frondosus* (incienso) que crecen en la Reserva de Usos Múltiples de la Facultad de Ciencias Forestales (Universidad Nacional de Misiones), se desarrollaron sendos experimentos que permitieron el establecimiento *in vitro* y germinación de las semillas de la mayoría de las especies estudiadas, excepto *M. frondosus*; las que fueron utilizadas como fuente dadora de explantes en los ensayos de organogénesis y micropropagación.

Los resultados obtenidos indican la posibilidad de propagar estas especies ya sea a través de un proceso de organogénesis indirecta (*B. riedelianum*), micropropagación a partir del cultivo *in vitro* de segmentos caulinares (*C. fissilis*, *C. trichotoma*, *H. heptaphyllus*); o bien, por combinación de ambas técnicas (*B. riedelianum*), cuyas plantas resultantes se adaptan rápidamente a las condiciones ambientales externas durante la fase de aclimatación.

ABSTRACT

The Misiones rainforest is considered one of the eco-regions with the greatest biodiversity. However, the extractive exploitation of its main timber tree species and the lack of additional management actions, cause a high degree of genetic erosion that compromises the system sustainability; requiring specific actions to promote restoration of biodiversity by implanting the most widely consumed species. Along these lines, the main objective was developing procedures of mass propagation that will produce plants from endangered species.

Fruits and seeds were collected from *Balfourodendron riedelianum*, *Cedrela fissilis*, *Cordia trichotoma*, *Handroanthus heptaphyllus*, and *Myrocarpus frondosus* wild plants growing in the wildlife reserve (Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional de Misiones). The obtained results allowed the *in vitro* establishment and germination of seed from the majority of the studied species, except *M. frondosus*, which were used as source of explants in the assays of organogenesis and micropropagation. The results indicate the possibility of spreading these species either through a process of indirect organogenesis (*B. riedelianum*), micropropagation from *in vitro* culture of stem-segments (*C. fissilis*, *C. trichotoma*, *H. heptaphyllus*); or, by combining both techniques (*B. riedelianum*). The propagated plants swiftly adapt to the external environmental conditions during acclimation.

Los experimentos llevados a cabo en esta tesis han sido realizados en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET), Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE).

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Pedro A. Sansberro

CO-DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Claudia V. Luna

*Queda prohibido no sonreír a los problemas, no luchar por lo que quieres,
abandonarlo todo por miedo y no convertir en realidad tus sueños.*

Pablo Neruda

Dedicado a

*A Mi madre por ser mi apoyo y fortaleza incondicional en toda mi vida
A mis sobrinos Kiara, Agustina, Ulises, Gabriel, Brhiana, Emily y Santino
quienes con su cariño me brindaron la fuerza que necesitaba para seguir adelante.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar a mi lado y darme la fuerza y sabiduría que me permitió concluir con esta etapa de mi vida, ya que sin su bendición no habría sido posible.

A mi madre, quien ocupando el lugar de padre y madre me ha dado el empuje y ha sido siempre mi soporte incondicional frente a cualquier problema que se presentara. Por ser un ejemplo de mujer, manteniéndose siempre firme ante sus convicciones, olvidando muchas veces su propia felicidad.

A mis hermanos Adrián, Javier, Hugo y Daniel quienes me ayudaron y acompañaron siempre.

A mi Director de tesis el Dr. Pedro Sansberro quien confió en mí, y dedicó tanto tiempo de su vida enseñándome y guiándome en camino, y hacer todo lo posible para concluir esta tesis.

A mi Co-Directora la Dra. Claudia Luna que además de enseñarme y guiarme en la realización de esta tesis, también me brindó cariño y una gran amistad, convirtiéndose en un apoyo fundamental para poder lograr esta tesis.

Al Dr. Luis Mroginski, por darme la oportunidad de ejecutar este proyecto en el Instituto de Botánica del Nordeste para lo cual brindó el equipamiento e infraestructura del Laboratorio de Fisiología Vegetal a su cargo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca otorgada para realizar esta tesis.

A los profesionales y técnicos de la Facultad de Ciencias Agrarias e Instituto de Botánica del Nordeste por la colaboración prestada en todo momento.

A la Universidad Nacional del Nordeste.

A la Facultad de Ciencias Agrarias.

Al Banco Regional de Semillas de la Facultad de Ciencias Forestales por ceder semillas de guatambú, lapacho e incienso.

A la Dra. Ana María Gonzalez por su asesoramiento durante realización de los cortes anatómicos.

A la Dra. Carolina Peichoto por su asesoramiento en cuestiones botánicas.

A Dra. Ernestina Galdeano por su asesoramiento y apoyo en la identificación del insecto *Amblycerus longesuturalis*.

A la Ing. Ftal. Beatriz Eibl por su asesoramiento en cuestiones fisiológicas de semillas.

A la Dra. Adriana Salinas y al Dr. Collante por realizar imágenes radiográficas en las semillas de *Cordia trichotoma*.

A la Familia Mattes quienes cedieron gentilmente la posibilidad de cosechar semillas de los árboles semilleros de su propiedad.

A mis compañeros de laboratorio Maximiliano, Fabiana, Laura, Natalia, Edgardo, Gabriela, Candela, María Laura, Laurita, María Antonia, Francisca, Ricardo, Mónica, Eduardo F., Graciela, Eduardo M., Patricia y Mirta por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

A mis amigos Claudio, Guillermo, Diego, Daily, Liliana, Pablo, Luis y César.

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la concreción de esta tesis.

A todos ustedes que caminaron junto a mí en este periodo de mi vida y me brindaron su valioso tiempo, conocimiento y cariño. ¡MUCHAS GRACIAS!

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Trabajo Publicado

Detección de daño del coleóptero *Amblycerus longesuturalis* para la selección y germinación *in vitro* de semillas de Peteribí (*Cordia trichotoma* [Vell.] Arrab. ex Steudel). Duarte, E.; Acevedo, M; Sansberro, P; Luna, C. Revista de la Facultad de Agronomía de La Plata 112 (1): 18-27. 2014.

Trabajos Enviados para su Publicación

In vitro propagation of *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos by shoot cultures. Por: Duarte, E; Sansberro, P; Luna C. Revista: **Trees - Structure and Function**.

Efecto de la testa sobre la germinación de semillas de *Handroanthus heptaphyllus* tras distintos tiempos de almacenamiento. Por: Duarte, E; Avico, E; Sansberro, P; Luna, C. Revista Ciencias Agronómicas. Universidad Nacional de Rosario.

Presentaciones a Congresos Internacionales

Direct shoot regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus elliottii* x *P. caribaea* hybrids and plantlets production assisted by temporary immersion bioreactors. Por: Fortes, N; Duarte, E; González, A; Sansberro, P; Luna, C. 2014. IUFRO Working Party 2.09.02 - Somatic Embryogenesis and Other Vegetative Propagation Technologies. Vitoria-Gasteiz, España.

Presentaciones a Congresos Nacionales y Regionales

Uso de Biorreactores de inmersión temporal (BIT) para promover la rizogénesis adventicia de una especie arbórea Duarte, E; Sansberro, P; Luna, C. 2013.VIII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina.

Regeneración *in vitro* de yemas adventicias a partir del cultivo de segmentos caulinares de *Cedrela fissilis*. Duarte, E; Luna, C; Sansberro, P. 2011.VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina.

Presentaciones en Reuniones Científicas

Métodos comparativos de determinación de Viabilidad en Semillas Forestales Nativas. Barone, J; Duarte, E; Luna, C. 2014. XXIII Reunión de Comunicaciones Científicas, Técnicas y de Extensión (FCA-UNNE).

Germinación *in vitro* de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos (Bignoniaceae). Duarte, E; Luna, C; Sansberro, P. 2011. XXII Reunión de Comunicaciones Científicas, Técnicas y de Extensión (FCA-UNNE).

Morfometría de semillas de *Cordia Trichotoma* (Vell.) Arrab. Ex. Steudel de dos diferentes procedencias. López, E; Duarte, E; Luna, C. 2014. XX Reunión de Comunicaciones Científicas, Tecnológicas (SGCyT –UNNE).

XIX Reunión de Comunicaciones Científicas, Tecnológicas (SGCyT –UNNE). Germinación *in vitro* de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos (Bignoniaceae). Duarte, E; Luna, C; Sansberro, P. 2012.

Germinación *in vitro* de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos (Bignoniaceae). Duarte, E; Luna, C; Sansberro, P. 2013. XXI Jornadas de Jóvenes Investigadores de la AUGM.

PREMIOS

2do Puesto al mejor trabajo presentado por becario en la XIX Reunión de Comunicaciones Científicas, Tecnológicas (SGCyT –UNNE). Germinación *in vitro* de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos (Bignoniaceae). Duarte, E; Luna, C; Sansberro, P. 2012.

Abreviaturas:

AFA: Etanol 70°, Formol y Ácido acético

ANA: Ácido Naftalenacético

BAP: 6-Bencil-Aminopurina

GA₃: Ácido Giberélico A₃

IBA: Ácido indolbutírico

IBIF: Instituto de Botánica e Investigación Forestal

IPEC: Instituto Provincial de Estadística y Censo

IRAM: Instituto Argentino de Normalización y Certificación

IT: Inmersión Temporal

IUCN: International Union for Conservation of Nature

IVG: Índice de Velocidad de Germinación

MS: Murashige y Skoog, 1962

SAyDS: Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable

SCC: Segmento caulinar a la altura de inserción de los cotiledones

SCF: Segmento caulinar correspondiente al primer nudo por encima de los cotiledones

SIB: Sistema de Información de la Biodiversidad

SINASIP: Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas

TDZ: Thidiazuron

TMG: Tiempo Medio de Germinación

UMSEF: Unidad de Manejo del Sistema de Evaluación Forestal

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	4
SITUACIÓN ACTUAL DE LOS BOSQUES.....	4
En el contexto mundial.....	4
En el contexto nacional	5
Selva Misionera.....	9
SITUACIÓN ACTUAL DE LAS ESPECIES OBJETO DEL ESTUDIO	12
<i>Balfourodendron riedelianum</i> (Engl.) Engl.....	12
Descripción taxonómica y botánica.	12
Distribución natural.....	14
Importancia ecológica y económica.	14
Estado de conservación	15
Manejo del cultivo.....	15
Producción de plantines	16
<i>Cedrela fissilis</i> Velloso	17
Descripción taxonómica y botánica.	17
Distribución natural.....	19
Importancia ecológica y económica	19
Estado de conservación	20
Manejo del cultivo.....	21
Producción de plantines	22
<i>Cordia trichotoma</i> [Vell.] Arrab. ex Steudel.....	23
Descripción taxonómica y botánica.	23
Distribución natural.....	24
Importancia ecológica y económica.....	25
Estado de conservación	25
Manejo del cultivo.....	26
Producción de plantines	26
<i>Handroanthus heptaphyllus</i> (Vell.) Mattos	27
Descripción taxonómica y botánica.	27
Distribución natural.....	29
Importancia ecológica y económica.....	29

Estado de conservación	30
Manejo del cultivo.....	31
Producción de plantines	31
<i>Myrocarpus frondosus</i> Allemão	32
Descripción taxonómica y botánica.	32
Distribución natural.....	35
Importancia ecológica y económica.....	35
Estado de conservación	36
Manejo del cultivo.....	36
Producción de plantines	36
OBJETIVO GENERAL	37
OBJETIVOS PARTICULARES	37
HIPÓTESIS GENERAL	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
Material vegetal	38
Establecimiento y germinación <i>in vitro</i> de semillas	38
Inducción de organogénesis.....	39
Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales	39
Crecimiento de los brotes obtenidos por organogénesis y/o establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos caulinares	40
Enraizamiento y aclimatación.....	40
Análisis histológico.....	41
Detección y clasificación de daños producidos por <i>Amblycerus longesuturalis</i> en <i>Cordia trichotoma</i>	42
Diseño experimental y análisis estadístico	43
RESULTADOS	44
<i>Balfourodendron riedelianum</i> (Engl.) Engl.....	44
Establecimiento y germinación <i>in vitro</i> de semillas.....	44
Inducción de organogénesis y obtención de plantas	45
<i>Cedrela fissilis</i> Velloso	49
Establecimiento y germinación <i>in vitro</i> de semillas.....	49
Establecimiento, multiplicación y obtención de plantas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de segmentos caulinares.	51
<i>Cordia trichotoma</i> [Vell.] Arrab. ex Steudel.....	56

Establecimiento y germinación <i>in vitro</i> de semillas.....	56
Detección e incidencia del daño producido por <i>A. longesuturalis</i>	56
Escarificación, desinfección y germinación <i>in vitro</i> de semillas	59
Establecimiento, multiplicación y obtención de plantas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de segmentos caulinares.	60
<i>Handroanthus heptaphyllus</i> (Vell.) Mattos	63
Establecimiento y germinación <i>in vitro</i> de semillas.....	63
Establecimiento, multiplicación y obtención de plantas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de segmentos caulinares.	66
<i>Myrocarpus frondosus</i> Allemão	70
Establecimiento y germinación <i>in vitro</i> de semillas.....	70
DISCUSIÓN.....	71
Establecimiento y germinación <i>in vitro</i> de semillas	71
Detección de <i>Amblycerus longesuturalis</i> en <i>C. trichotoma</i>	72
Inducción de organogénesis	73
Micropropagación a partir del cultivo <i>in vitro</i> de segmentos caulinares.	75
CONCLUSIONES.....	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

INTRODUCCIÓN

SITUACIÓN ACTUAL DE LOS BOSQUES

En el contexto mundial

Basado en la Ley Nacional N° 13.273, se denomina “Bosque” a toda formación leñosa, sea ésta de origen natural o artificial. Los bosques nativos son aquellos ecosistemas forestales que se caracterizan por presentar una máxima complejidad, conformada por una enorme diversidad de especies de plantas y animales que interactúan entre sí (polinización, predación, ciclo de nutrientes, dispersión) y una limitada capacidad de auto-conservación y autorregulación. Presentan características intrínsecas y múltiples funciones que, en su estado natural, comprenden una gran variedad de beneficios tangibles e intangibles que propician la continuidad de la vida en el planeta tales como diversidad de microclimas, refugio de fauna y flora, protección de los suministros de agua potable y fertilidad de suelos, fuente de energía, lugar de vida de comunidades campesinas y aborígenes (Ley N° 26.331; Brown, 2009); a la vez que proporcionan diversos productos que permiten satisfacer las necesidades alimentarias, medicinales, industriales y recreativas de la humanidad (Bertonati, 2009).

En el mundo, los bosques abarcan una extensión de 4.000 millones de hectáreas, equivalente al 31% de la superficie terrestre. La mayor parte (3.720 mil millones ha), pertenecen a bosques nativos, de las cuales 1.640 millones ha son bosques templados y boreales con predominio de diversas especies de coníferas; mientras que 1.760 millones ha corresponden a bosques y selvas tropicales que se caracterizan por su vasta biodiversidad (FAO, 2006). De hecho, el 53% del área afectada corresponde a los cinco países con mayor riqueza forestal (Rusia, Brasil, Canadá, Estados Unidos de América y China). Cerca del 8% (330 millones de ha) de la superficie boscosa tiene como función principal la protección del suelo y los recursos hídricos para su conservación, control de aludes, estabilización de dunas y protección costera (FAO, 2010).

Basado en el último relevamiento realizado en el año 2010, el 49% de la superficie de América Latina y el Caribe es ocupada por bosques, alcanzando 891 millones de hectáreas que albergan el 57% de los bosques nativos existentes en el planeta (FAO, 2011). Sin embargo, el crecimiento demográfico y consecuentemente, el incremento de la actividad económica suscitado en las últimas décadas, afectó negativamente la existencia de los bosques nativos, disminuyendo notablemente la cobertura forestal en la mencionada región (Izoko y Burneo, 2003; FAO, 2011; 2012).

Tomando en consideración que la tasa de crecimiento de la población mundial ascendería 22% para el año 2030 (FAO, 2009) y que ésta, ocurriría principalmente en los países en vías de desarrollo, traería consigo una creciente demanda de productos naturales determinando una mayor necesidad de tierras arables para satisfacer la demanda de productos agrícolas. Este hecho, sin lugar a dudas, acrecentará el uso desmedido de los recursos naturales del monte (Celestino *et al.*, 2005). En este contexto, se prevé que la producción y el consumo de productos madereros y dendro-energéticos aumenten, siguiendo el ritmo de las tendencias históricas (FAO, 2009).

Esta fuerte presión de la demanda de productos forestales, como así también, de alimentos, fibras y combustibles refleja un serio problema de deforestación mundial, especialmente de bosques tropicales. Cerca de 13 millones de hectáreas son deforestadas anualmente con fines agrícolas, principalmente en Sudamérica (65%), donde la cuenca amazónica sufre una disminución de 3,1 millones de hectáreas por año (FAO, 2006). En tal escenario, los países de América del Sur registraron una pérdida neta en la superficie forestal durante el periodo 2000-2005, excepto Chile y Uruguay, quienes presentaron tendencias positivas debido a programas de plantación industrial a gran escala. Los nuevos bosques implantados con fines industriales en Argentina, Uruguay y Colombia, podrían contrarrestar la desaparición de bosques nativos en términos de recursos maderables, sin embargo no evitarían el daño ecológico causado por la disminución de la biodiversidad (FAO, 2009).

En el contexto nacional

El primer inventario nacional indica que el 12% de la superficie continental corresponde a bosques nativos (33,2 millones de hectáreas), distribuidos en 5 de las 6 regiones forestales (Tabla 1) identificadas en el país (Atlas de los Bosques Nativos Argentinos, 2003).

Los Bosques Nativos fueron sometidos a importantes procesos de degradación, a partir de fines del siglo XIX como consecuencia de un conjunto de factores tales como la falta de conocimiento, de previsión a largo plazo y de un ineficiente control estatal (Salusso, 2008).

Tabla 1: Superficie cubierta por bosques nativos diferenciada por región forestal.

Región Forestal	Tierras Forestales (ha)	Bosques Rurales (ha)	Total Bosque Nativo (ha)
Selva Misionera	914.823	538.588	1.453.381
Selva Tucumano Boliviana	3.697.483	29.352	3.726.835
Bosque Andino Patagónico	1.985.495	-	1.985.495
Parque Chaqueño	22.040.637	1.327.347	23.367.984
Monte	-	-	-
Espinal	2.488.066	168.681	2.656.747

Fuente: UMSEF (2002).

La actividad forestal se basó principalmente en la producción de madera de tipo extractivo, con cortes indiscriminados y selectivos de las especies más valiosas y sin ningún plan de manejo racional del recurso determinando un rápido deterioro de la calidad de los bosques (SAyDS, 2005). En 1940 se disponía de más de 2 ha de bosque nativo por persona; mientras que en la actualidad este valor es inferior a 1 ha (UMSEF, 2007), generándose una pérdida de dos tercios del capital forestal en el transcurso del último siglo (Bertonati, 2009).

Durante la década del 80, nuestro país comenzó un período de deforestación que fue favorecido por la inversión en infraestructura, los avances tecnológicos (cultivos transgénicos y siembra directa) y el contexto internacional de globalización, acentuándose en los '90 y continuando hasta nuestros días. En la mencionada década se registró una disminución boscosa de 293.000 hectáreas por año; hecho por el cual, Argentina se situó entre los 10 países con mayor pérdida de bosques (FAO, 2010).

Según datos recopilados por la Unidad de Manejo del Sistema de Evaluación forestal (UMSEF), la superficie cubierta por bosques en el año 1987 fue de 35.180.000 ha reduciéndose continuamente por cambio del uso de la tierra (Fig. 1). En tal escenario, Argentina transformó la superficie boscosa en tierras agrícolas alrededor de 200.000 ha/año durante el periodo 1998/2002, ascendiendo a 300.000 ha/año entre 2002 y 2006, debido principalmente al avance de las plantaciones de soja (UMSEF, 2007; Brown, 2009). Hecho por el cual, el porcentaje de pérdida anual de bosques nativos en la República Argentina en el periodo 1998-2002 promediaba un 0,82% anual, elevándose a 1,23% a partir del año 2002, manteniéndose en la actualidad. Las provincias con mayor pérdida de superficie boscosa incluyen a Santiago del Estero (619.850 ha), Salta (414.517 ha), Chaco (168.588 ha) y Formosa (153.257 ha) (Fig. 2); mientras que las regiones del Parque Chaqueño, Selva Misionera y Selva Tucumano-Boliviana

soportaron el mayor impacto con una tasa anual de deforestación en los últimos 20 años de -1,44; -1,13 y -0,42 respectivamente (UMSEF, 2012; SAyDS, 2012).

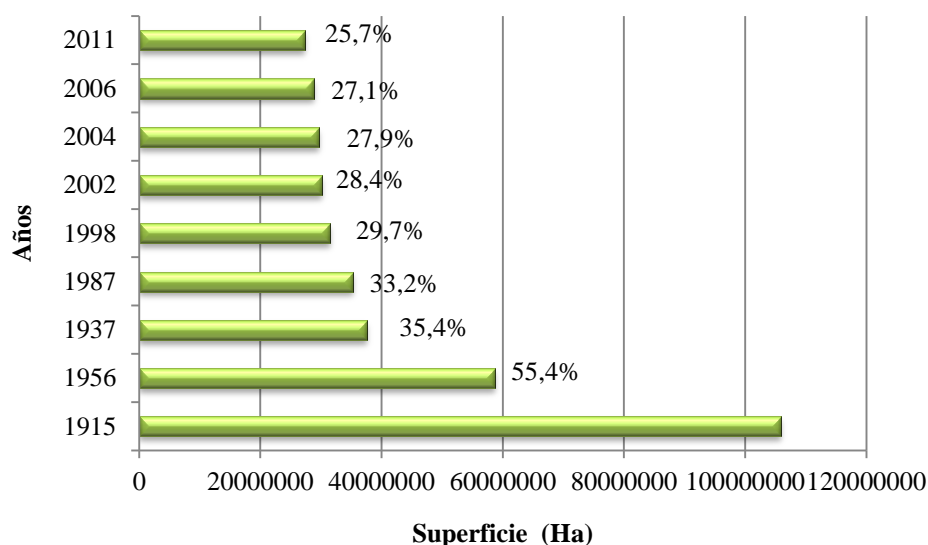


Fig. 1: Superficie de bosque nativo en hectáreas de la República Argentina durante el periodo 1915-2011. Recopilación de datos de Zarrilli, 2008 y SAyDS, 2014. A la derecha de cada barra se expresa en porcentaje la superficie remanente de bosque nativo con respecto al año 1915.

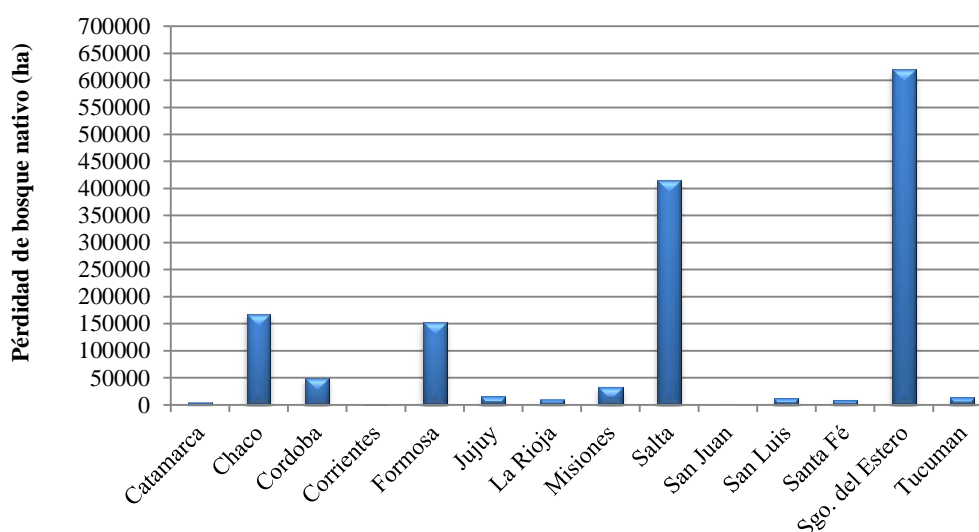


Fig. 2: Pérdida de bosques nativos por provincia en el periodo 2006-2011. Datos tomados de UMSEF, 2012.

Dado el grado de explotación al que fueron sometidos los bosques nativos con el propósito de extraer madera y extender la frontera agrícola, éstos se encuentran altamente degradados y empobrecidos requiriéndose de manera urgente la implementación de programas de manejo que favorezcan su recuperación (UMSEF, 2007). En este marco, en el 2007 el Congreso de la Nación sancionó la Ley N° 26.331 de “Presupuestos Mínimos para la Protección Ambiental de los Bosques Nativos”,

donde se establece, que cada provincia debe realizar el Ordenamiento Territorial de sus Bosques Nativos, con la finalidad de regular la protección, enriquecimiento, restauración, aprovechamiento y manejo de los bienes y servicios ambientales que producen los bosques, zonificando territorialmente la superficie remanente en tres categorías; Categoría I o Roja, comprende las áreas de bosques que deben conservarse sin actividades extractivas; Categoría II o Amarilla, las áreas que no podrán ser desmontadas, pero sí someterse a actividades de uso sustentable y Categoría III o Verde, a las tierras forestales que podrán ser convertidas a otro tipo de uso (Fig. 3), a fin de promover la conservación y uso sustentable de los mismos (Izquierdo y Clark, 2012; UMSEF, 2012).

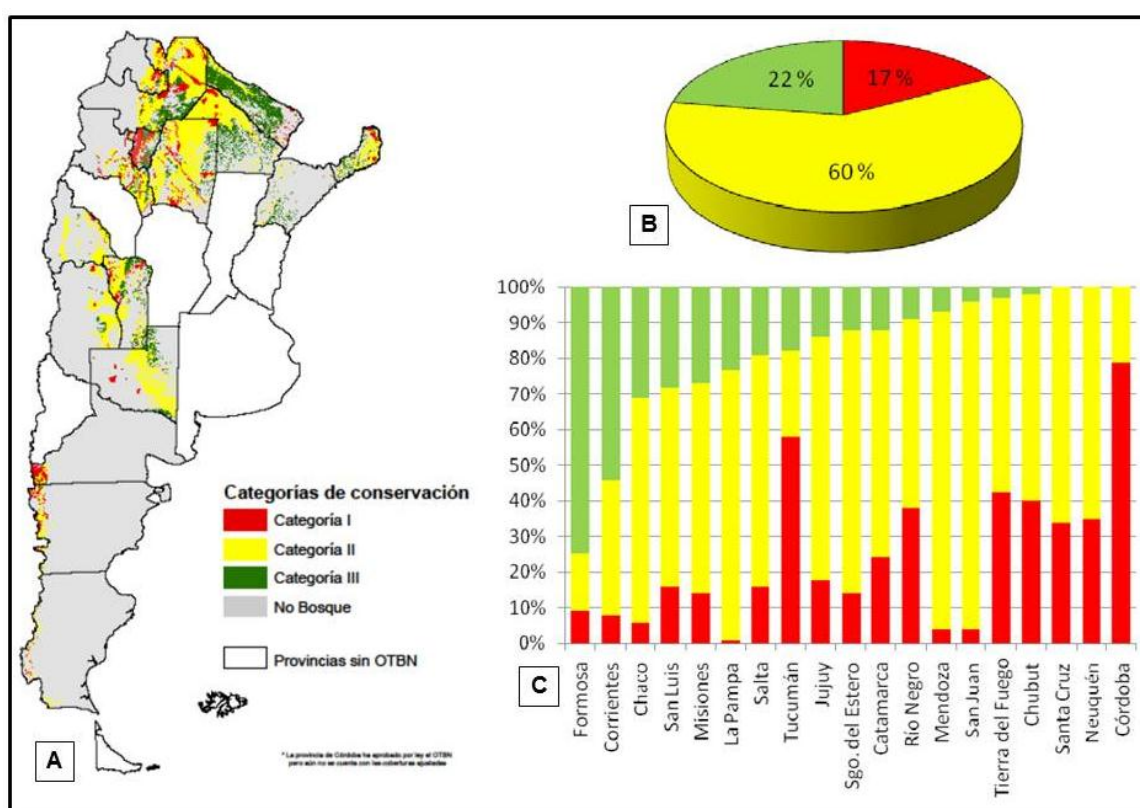


Fig. 3: Bosques nativos de la República Argentina y participación de cada categoría según la Ley N° 26.331. **A,** Ubicación en el país. **B,** Participación de cada categoría a nivel nacional. **C,** A nivel provincial (SAyDS, 2013).

En la actualidad, 21 provincias han finalizado y aprobado por ley su Ordenamiento Territorial de Bosque Nativo. Córdoba, La Rioja y Neuquén aún no cuentan con la acreditación de la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable; mientras que, Buenos Aires y Entre Ríos, se encuentran en etapa de desarrollo. La superficie total de bosques nativos categorizada como roja es de 8.490.821 ha, amarillo de 29.405.523 ha y verde de 10.982.240 ha (SAyDS, 2013).

Selva Misionera

La Provincia de Misiones presenta dos regiones ecológicas bien diferenciadas, la Selva Misionera o Paranaense y los campos y malezales. La primera región constituye una selva densa, hidrófila y semi-decídua compuesta por una comunidad climáxica, con numerosos estratos encontrándose casi toda forma de vida biológica, predominando los fanerófitos de hojas perenes y se localiza desde la región centro de la provincia hasta el norte en el límite con Brasil (IPEC, 2012). El ecosistema de los campos y malezas se ubica en la franja sur de la provincia y se distinguen dos ambientes ecológicos, uno de selvas bajas con árboles de menor fuste donde se destacan ejemplares arbóreos como el Urunday (*Astronium balansae*), el Aguaribay (*Schinus molle*), el Curupay (*Anadenanthera macrocarpa*) y Tatané (*Pithecellobium scalare*), que forman pequeños bosques que acompañan los cursos fluviales; y otro, de pastizales, donde la vegetación característica son las gramíneas y predominan especies como *Paspalum* sp., *Panicum* sp. y *Eragrostis* sp., que forman sabanas que alternan con los bosques (Atlas de los Bosques Nativos de la Argentina, 2003; IPEC, 2012).

La Selva Misionera ocupa la tercera parte del territorio provincial y posee un clima subtropical húmedo con precipitaciones todo el año que varían entre los 1.000 a 2.200 mm anuales. La temperatura media anual es de 16-22°C, con mínimas y máximas absolutas de -2,5°C y 42°C, respectivamente. Presenta una frecuencia de heladas de 2,1 entre los meses de junio y agosto (Dimitri, 1975; Di Bitetti *et al.*, 2003). Constituye una de las eco-regiones del país con mayor diversidad biológica, conformada por 4-5 estratos verticales de 30 a 40 metros de altura que forman una densa cobertura arbórea con unas 330 especies; de las cuales, más del 40% se encuentran bajo diversos grados de riesgos de conservación. Del total de especies arbóreas autóctonas registradas sólo se aprovechan aproximadamente unas 20 especies que revisten una elevada cotización en el mercado, entre ellas, “incienso” (*Myrcarpus frondosus*), “laurel” (*Nectandra saligna*), “guatambú blanco” (*Balfourodendron riedelianum*), “cedro misionero” (*Cedrela fissilis*) y “peteribí” (*Cordia trichotoma*) (SAyDS, 2001; UMSEF, 2007; Gartland y Bohren, 2008).

El mayor impacto del modelo extractivo reside en la erosión genética causada por la presión de selección que se origina al eliminarse los mejores ejemplares adultos dejando en pie aquellos generalmente enfermos, de escaso valor genético para la futura generación (Rodríguez *et al.*, 2005). Sumado a este hecho, las tasas excesivas de corte y la falta de acciones complementarias de manejo, dan como resultados la aparición de

bosques degradados con una excesiva proliferación de cañas de las especies *Chusquea ramosissima* y *Merostachys clausenii* que, junto con la proliferación de lianas *Adenocalymna* sp. y *Arrabidaea* sp., impiden la regeneración de las especies arbóreas del bosque requiriendo de períodos prolongados para su establecimiento (Campanello *et al.*, 2007 a, b).

La Selva Misionera con una superficie actual de 1.161.497 ha y una profusa diversidad biológica, es la unidad de vegetación menos estudiada del país y con el ritmo más acelerado de urbanización y deforestación. A fin de frenar la permanente degradación de los bosque nativos y fomentar el uso sustentable de los mismos, resulta imprescindible promover la restauración de su biodiversidad mediante la implantación de las especies de mayor consumo; para lo cual es necesario contar con un sistema de propagación y crioconservación del germoplasma nativo, a fines de su utilización en programas estratégicos de recuperación en esta región de alto desarrollo que representa uno de los últimos remanentes de vegetación de ecosistemas subtropicales húmedos en la región noreste del país (Rodríguez *et al.*, 2005; SAyDS, 2012).

La explotación con fines comerciales se remonta a la época jesuítica (1609-1767), extrayéndose principalmente dos productos, yerba mate y madera (Atlas de los Bosques Nativos de la Argentina, 2003). A partir del siglo XX la Selva Misionera es considerada como un freno al progreso sobre el cual se debería avanzar para transformarla en un área productiva, este hecho condujo a la promoción de la actividad forestal y a la colonización de pequeños y medianos productores rurales. Siendo el colono el principal actor de la expansión agraria con un tipo de producción basada en el trabajo familiar y el cultivo de especies anuales (tabaco) y perennes (yerba mate y té) (Carpinetti, 2009).

La actividad forestal consistió principalmente en la extracción maderera de especies como el *Cedrela fissilis*, *Handroanthus heptaphyllus*, *Cordia trichotoma* y *Myrocarpus frondosus* conocidas como “maderas de ley” (Cabrera, 1994). Posteriormente, se incorporaron otras especies como *Balfourodendron riedelianum*, *Apuleia leiocarpa* (grapia), *Enterolobium contortisiliquum* (timbó), *Peltophorum dubium* (cañafistola), *Cabrlea canjerana* (cancharana), *Parapiptadenia rigida* (anchico colorado) y otras de menor calidad maderera. Este aumento en el número de especies generó una intensa explotación forestal resultando en un empobrecimiento del bosque y pérdida de biodiversidad, conservándose relictos de selva solo en lugares de difícil acceso (SAyDS, 2005).

La explotación forestal intensiva sin criterios ecológicos o de conservación disminuyó rápidamente la superficie boscosa, transformándose en una de las regiones del país más afectada denotando una pérdida de 15.603 ha anuales (SAyDS, 2012). En tal sentido, de las 2.000.000 de hectáreas de masa boscosa que cubrían la provincia de Misiones, en la actualidad solo quedan 40.000 ha de bosques prístinos, 800.000 ha de bosques secundarios y 700.000 ha son sometidas al cultivo agrícola; hecho por el cual, solo el 30% de la Selva Misionera está cubierta por bosques nativos que se distribuyen homogéneamente, donde el 47% corresponde a fragmentos o parches menores de 100 ha y sólo el 22% se presentan en parches mayores a 1.000 ha que se encuentran en distintos estados de uso, principalmente bosques degradados y no productivos desde el punto de vista maderero (Mac Donagh y Rivero, 2006; Drozd *et al.*, 2010).

En tal sentido, resulta meritorio destacar una serie de acciones para detener los procesos de deterioro ambiental por el avance de la deforestación, como destinar el 1,7% de sus bosques a reservas naturales provinciales, nacionales e internacionales (Izquierdo *et al.*, 2008). Asimismo, la provincia cuenta con instrumentos legales para apoyar a la conservación como la Ley provincial N° 3.631 de corredor verde que promueve el desarrollo sostenible e intenta evitar el aislamiento de las áreas protegidas. La Ley de Planificación del Paisaje que es la adhesión provincial a la Ley Nacional N° 26.331 ("Ley de Bosques") que establece las áreas de alto valor de conservación donde no se permiten actividades productivas (zona roja) abarcando una superficie de 224 km² (Fig. 4), los sectores de mediano valor de conservación, donde se permite actividades sostenibles sin pérdida de la cobertura forestal, tales como aprovechamiento sustentable, turismo, recolección e investigación científica (zona amarilla) que comprenden unos 967 km², y las regiones de bajo valor de conservación donde el uso de la tierra puede ser convertida a otros usos (zona verde) alcanza unos 448 km² (Izquierdo y Clark, 2012; Alcobé, 2009).

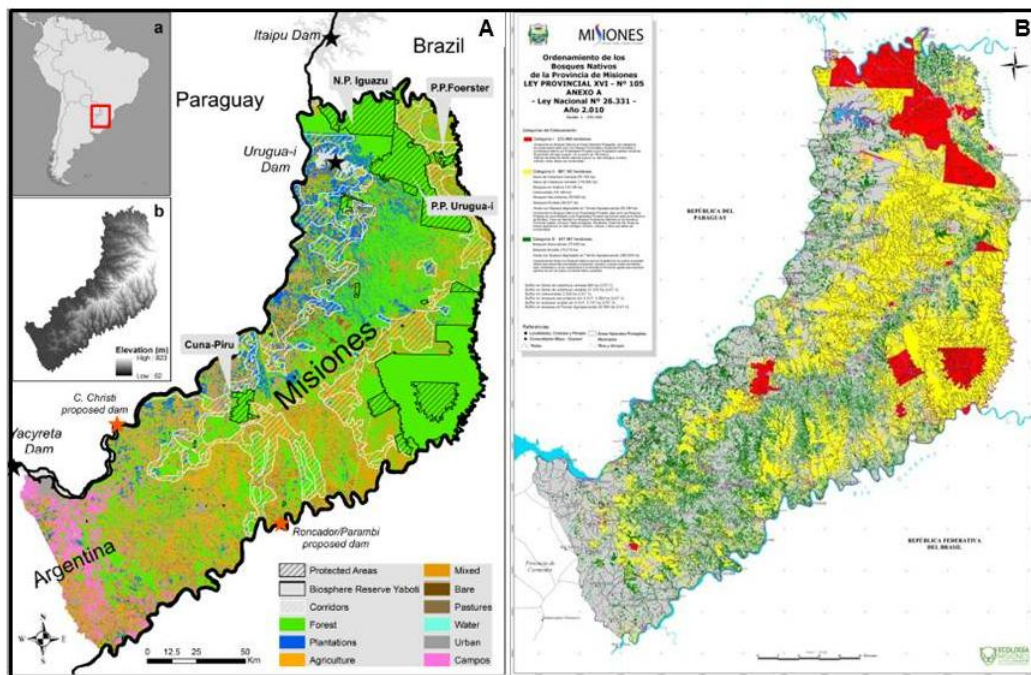


Fig. 4: Selva Misionera. A, Distribución de la Selva Paranaense en la Provincia de Misiones B, Ordenamiento territorial según la Ley 26.331. Fuente: Izquierdo y Clark (2012).

SITUACIÓN ACTUAL DE LAS ESPECIES OBJETO DEL ESTUDIO

Balfourodendron riedelianum (Engl.) Engl.

Descripción taxonómica y botánica.

Reino: Plantae
 División: Magnoliophyta (Angiospermae)
 Clase: Magnoliopsida (Dicotyledonae)
 Orden: Rutales
 Familia: Rutaceae
 Género: *Balfourodendron*
 Especie: *riedelianum*
 NC: **Guatambú blanco**

La familia Rutaceae está representada por 160 géneros y 1.900 especies distribuidas principalmente en regiones húmedas de clima atlántico a ecuatorial (Groppo *et al.*, 2008; Barth, 1982). En nuestro país ésta es representada por cinco géneros de especies nativas (Hunziker, 1984; Xifreda, 1999); cultivándose varias especies exóticas de interés ornamental y frutal, entre las que se incluyen varios representantes del género *Citrus* (Miranda *et al.*, 2000).

Se caracteriza por presentar portes herbáceos, arbustivos o arbóreos, inermes o con espinas y hojas alternas u opuestas simples, trifoliadas digitadas o pinnadas, persistentes o caedizas, glabras o pubescentes. Algunas especies son aromáticas debido a la presencia de glándulas de aceites esenciales; presentando flores

bisexuales, unisexuales o hermafroditas, pequeñas o medianas, de distribución solitaria o dispuesta en diversos tipos de inflorescencias; además de variados tipos de frutos, entre los que se destacan las drupas, cápsulas, sámaras, folículos y bayas (Dimitri, 1987; Zamora, 2006).

Balfourodendron riedelianum es un árbol caducifolio de copa alargada, redondeada a semi-globosa, aunque en ocasiones irregular y achatada; de tronco recto y cilíndrico a levemente tortuoso que puede alcanzar de 20 a 35 m de altura y diámetro a la altura del pecho (DAP) de 30 a 100 cm. La corteza, color ceniza a pardo-cenicienta, lisa a áspera, con lenticelas blanco amarillentas y espesor de hasta 20 mm (Carvalho, 1994; Dimitri, 1987; Salazar *et al.*, 2000). Hojas trifolioladas, inermes, de filotaxis opuesta con pecíolos de 3 a 8 cm de largo, folíolos de 5 a 12 cm de largo y de 2 a 5 cm de ancho, con ápice agudo, brevemente peciolulados con domacios en criptas o en hoyos tipo “mechón de pelos” en el envés de la lámina y en las axilas de las intersecciones de la venación principal y secundarias (Solís, 2002). El limbo presenta glándulas puntiformes en el envés (Miranda *et al.*, 2000). Presenta flores hermafroditas, blanco verdosas, pequeñas, dispuestas en amplias panículas terminales de 5 a 10 cm de longitud. El fruto es una sámara leñosa provista de 3-4 alas semicirculares (Fig. 5) que contienen hasta 4 semillas (Dimitri, 1987; Salazar *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2000; Degen de Arrúa *et al.*, 2008).



Fig. 5: A, Ejemplar típico de *Balfourodendron riedelianum* en su hábitat natural. Árbol. B, Frutos tipo sámaras leñosas. C, Semillas maduras. La barra indica 1 cm.

Las semillas son elipsoides, negras con endosperma de color amarillo provisto de sustancias lipoprotéicas con funciones de reserva que nutrirán al embrión

axial, de color blanco, con cotiledones carnosos, eje hipocótilo-radícula corto y plúmula reducida (Lacerda Da Silva y Sartori Paoli, 2006). Almacenadas en condiciones ambientales naturales, mantiene su viabilidad de tres a cuatro semanas; sin embargo, en cámara a 5 °C, ésta puede extenderse hasta 18 meses. La germinación es epigea, iniciándose entre el día 27 y 150 después de la siembra brindando una tasa de germinación que oscila entre 20 y 80% (Salazar *et al.*, 2000; Ramalho Carvalho, 2004), presentando de 6.000 a 15.000 semillas por kilo (Salazar *et al.*, 2000).

Distribución natural

B. riedelianum habita naturalmente el Bosque Atlántico semi-caducifolio; que se extiende por el sur de Brasil, noreste de Argentina (en la provincia de Misiones) y este de Paraguay (Lino *et al.*, 2011). Se distribuye entre los 10° y 30° de latitud Sur, desde los 80 hasta los 1.000 m.s.n.m, con precipitaciones que varían entre 1.000 y 2.200 mm anuales y temperaturas medias que oscilan entre los 17 y 26 °C (Salazar *et al.*, 2000). Actualmente se encuentra citada solo en dos áreas protegidas: la Reserva Natural Estricta San Antonio y Parque Nacional Iguazú, Misiones, Argentina (SIB, 2004).

Importancia ecológica y económica.

Es considerada de hábito intermedio entre las categorías heliófilas y esciófilas y tolera sombra parcial durante su estadio juvenil (Carvalho, 1994). Es una especie sucesional tardía (Durigan y Nogueira, 1990), termohigrófila, delicada y medianamente longeva (Scordo Mateo, 2013), habitando frecuentemente en capueras, bosques secundarios y pastizales (Salazar *et al.*, 2000). Presenta una dispersión anemocórica cuyo patrón espacial es en forma de agregados en cortas distancias, reflejando limitaciones en la dispersión de las semillas (Alcántara *et al.* 1997; Condit *et al.*, 2000; Seidler y Plotkin, 2006). Se destaca la existencia de procesos denso-dependientes de predación de semillas, herbivoría y ataque de patógenos que limitaría la regeneración en la cercanía de individuos adultos (Janzen, 1970; Connell, 1971; Augspurger, 1984; Wills *et al.*, 1997). En estos ambientes, los individuos remanentes juegan un rol fundamental sobre la lluvia de semillas, ya sea como perchas de dispersores o por el aporte de sus propias semillas (Pinazo *et al.*, 2009; Rother *et al.*, 2009), y también pueden actuar como facilitadores de la regeneración (Campanello *et al.*, 2007b).

Reviste un marcado interés económico por las características organolépticas de su madera (Lacerda Da Silva y Sartori Paoli, 2006) que presenta grano recto, textura fina y anillos poco demarcados; observándose en su corte tangencial líneas de color más claro en sentido oblicuo (veteado suave) originados por los vasos y tejidos parenquimáticos. Posee una albura de color blanco amarillento, el duramen amarillento parduzco, aunque tiene alta densidad (peso específico de $0,840 \text{ gr}\cdot\text{cm}^{-3}$) (Martinuzzi, 2010), se caracteriza por ser poco durable (vida útil estimada entre 5 y 10 años) (IRAM, 1998).

Brinda una madera de fácil trabajabilidad, no ofrece resistencia al aserrado, maquinado y encolado; por lo que resulta muy útil en la construcción de muebles de alta gama, decoración de interiores, artículos de deporte y carpintería en general (Salazar *et al.*, 2000; Martinuzzi, 2010). Ésta es utilizada por los Guaraníes en la fabricación de instrumentos musicales, principalmente en la construcción de tapa y fondo de la caja de resonancia, mástil y clavijero para guitarras, cuerdas, mango y puente de los violines (Keller, 2010). Algunos productos de su metabolismo secundario presentan propiedades medicinales potencialmente útiles en la fabricación de sustancias antiparasitarias (Ferrari Marques, 2006).

Estado de conservación

En la actualidad, gran parte de su cobertura ha desaparecido como consecuencia del avance de la actividad agrícola-ganadera, particularmente en Brasil y Paraguay, quedando tan sólo 8% de ella y en forma muy fragmentada (Galindo-Leal y Gusmão Camara, 2003). Estos fragmentos remanentes exhiben alteraciones en la estructura y funcionamiento del ecosistema como consecuencia de los efectos de borde y la reducción de las poblaciones de árboles de los estratos superiores por tala selectiva (Tabarelli y Mantovani, 2000; Campanello *et al.*, 2009). Se encuentra en la categoría de conservación “en peligro” lo que significa que si no se revierte su situación actual, enfrenta un alto riesgo de extinción en los próximos 10 años (IUCN, 2004). En la región forestal del Bosque Atlántico, la densidad absoluta disminuyó abruptamente pasando de 15,6 árboles/ha en 1999 a 5,95 árboles/ha en el año 2008 (de Souza Carvalho, 2009).

Manejo del cultivo

B. riedelianum crece bien en suelos fértiles, no se adapta a sitios degradados (Barth *et al.*, 2008). Los plantines se producen tradicionalmente en maceta y se

mantienen en vivero hasta alcanzar un tamaño adecuado (entre 40 y 60 cm de altura) para su plantación definitiva, presentando en la mayoría de los casos una sobrevivencia del 98% durante la implantación (Crechi, 2004).

Existen ensayos preliminares que permiten evaluar el crecimiento del guatambú en condiciones ambientales disímiles. En el dosel selvático, caracterizado por la conjunción de numerosas especies con hábitos de crecimiento dispares que conforman distintos estratos, acompañados de una flora y fauna particular de un ambiente cálido y húmedo, presenta una tasa de crecimiento lenta a moderada (López *et al.*, 1987); mientras que, en condiciones de cultivo comercial, los resultados obtenidos evidencian una mayor velocidad de crecimiento que le permite alcanzar 5 m de altura y 6 cm de DAP a los 12 años de implantado (Crechi *et al.*, 2010). Se puede implantar a pleno sol, en pequeñas masas puras en áreas libres de heladas; requiriendo protección hasta alcanzar 1,5 metros de altura (Montagnini *et al.*, 2006 a,b; Barth *et al.*, 2008). Dado que su crecimiento es marcadamente monopódico, sólo eventualmente precisa podas de corrección del fuste (Ramalho Carvalho, 2004; Montagnini *et al.*, 2006 a, b). Asimismo, esta especie puede implantarse de manera consociada con otras especies perennes tales como pinos y yerba mate (Eibl *et al.*, 2000); siendo apta para incluirse en planes de enriquecimiento de bosques degradados debido a su plasticidad y rápida adaptación (López *et al.*, 1987).

Entre las plagas que afectan a *B. riedelianum* se encuentran los insectos de la familia Brentidae (*Brenthus* y *Anchoragus*), Scolytidae, Cerambycidae y Platypodidae, que provocan perforaciones formando galerías en la corteza y la madera (Ramalho Carvalho, 2004).

Producción de plantines

La obtención de semillas de poblaciones naturales es una solución para abastecer la demanda, pero en la actualidad, su cosecha es costosa y escasa debido principalmente a la dificultad de encontrar en montes que son naturalmente multi-específicos (Niella *et al.*, 2013). La germinación se produce entre los 27 a 150 días pos-siembra (FAO, 1986; Broz *et al.*, 2010); evidenciándose un crecimiento lento en condiciones de vivero (Ramalho Carvalho, 2004).

Existen antecedentes de propagación agámica a partir de la inducción de brotación forzada de árboles adultos que son utilizados como fuente de explantes; sin embargo, hasta el momento no se cuenta con un protocolo eficiente de multiplicación

(Niella *et al.*, 1996). El enraizamiento de estacas provenientes de individuos juveniles no requiere del uso de fotohormonas para su inducción (Niella y Rocha, 2007).

Cedrela fissilis Velloso

Descripción taxonómica y botánica.

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Dicotiledónea
Orden: Sapindales
Familia: Meliaceae
Género: *Cedrela*
Especie: *fissilis*
NC: **Cedro Misionero**

La familia Meliaceae está representada por 51 géneros y 800 especies distribuidas en el planeta; de los cuales, 7 géneros y 126 especies se encuentran en América. Habita las regiones tropicales y subtropicales y en menor medida, zonas templadas (German-Ramírez, 2005). Se divide en dos subfamilias, Swietenioideae y Cedreloideae (Smith, 1960). El género *Cedrela* se encuentra incluido en la tribu Cedreleae, subfamilia Swietenioideae (Pennington y Styles, 1975; Pennington *et al.*, 1981; Mabberley, 1997, Muellner *et al.*, 2003). Cuenta con 69 especies, incluyendo árboles que crecen en América, India, Sudeste Asiático y Australia. En 1960 Smith efectuó una revisión del género y, a partir de ella, las especies de Asia y Australia se incluyeron en el género *Toona*, permaneciendo en América el género *Cedrela* (Patiño Valera, 1997). Muellner *et al.* (2010), reconocieron 17 especies en América Central y América del Sur, restringidas principalmente a bosques húmedos y deciduos; mientras que Zapater *et al.* (2004) determinaron la existencia de una nueva especie en Argentina: *C. saltensis*.

Caracterizado por árboles o arbustos polígamo-monoicos o polígamo-dioicos con hojas persistentes o deciduas, alternas, rara vez opuestas o arregladas en espiral; compuestas 1-2-3 pinadas o palmada, rara vez simples y exestipuladas, con los foliolos por lo común enteros y excepcionalmente lobados, aserrados, crenados o espinosos; sus flores son hermafroditas o unisexuales, actinomorfas con órganos reproductores rudimentarios, dispuestas en inflorescencias axilares o terminales, usualmente paniculadas. Los frutos son capsulas, bayas o drupas; con semillas solitarias a numerosas en cada lóculo, a veces aladas y generalmente ariladas. Las

semillas poseen un tegumento delgado, con o sin endospermo y el número cromosómico es $2n=16$ (Dimitri, 1987; Rzedowski y Rzedowski, 1993; German-Ramírez, 2005).

Cedrela fissilis Vell. es un árbol caducifolio de gran porte alcanzando 20 a 40 m de altura, de fuste cilíndrico de hasta 150 cm de DAP, con ramas ascendentes frágiles, glabras o con pelos simples, lenticelas marrones y copa redondeada a densa (Fig. 6 A) (Varela y El Souki, 2013). La corteza es marrón rojizo con fisuras longitudinales que alcanzan hasta los 2 m de longitud y de 1 a 2 cm de profundidad en forma de “V”, con fisuras transversales de menor profundidad delimitando escamas rectangulares longitudinales; posee láminas internas y el grosor total es de 3-5 cm, a la que se le atribuye propiedades medicinales (Salazar *et al.*, 2000; Gartlant *et al.*, 2001; Toledo *et al.*, 2008). Hojas compuestas-paripinnadas, 18-25 cm de longitud, pecíolos 5-8 cm de longitud, folíolos 18-20, desde opuestos hasta alternos, oblongo-lanceolados, indumento denso-tomentoso en la cara inferior, cuando se desprenden exhalan un fuerte olor similar a la cebolla, peciolulos 0,18-0,3 cm de longitud, ápice corto acuminado, base generalmente redondeada o ligeramente cordada (Dimitri, 1987; Ramalho Carvalho, 2005; Varela y El Souki, 2013).

Planta monoica con flores diclinas o unisexuales por aborto, las masculinas son más alargadas que las femeninas con maduración en tiempos diferentes (primero las femeninas), inflorescencias laterales o subterminales, panículas densas y tupidas terminales de 27 a 33 cm de largo (Ramalho Carvalho, 2005; Toledo *et al.*, 2008). Flores unisexuales, pentámeras, cortopediceladas de color blanco amarillentas hasta rosado, pubescentes actinomorfas y pentámeras, dispuestas en panículas. Cáliz irregularmente dentado. Corola dialipétala, pétalos 5, libres, poco pubescentes. Androginóforo presente. Estambres 5, libres, anteras largas. Ovario súpero (Varela y El Souki, 2013). El fruto es una cápsula piriforme leñosa (Fig. 6 B), dispuesta en manojos, oblonga a cilíndrica de 3 a 10 cm de longitud y de 3 a 5 cm de diámetro, con lenticelas ocreas o blanquecinas que se distribuyen más o menos regularmente en toda la superficie, dándole una textura áspera. La dehiscencia es septifraga, abriéndose por cinco valvas dejando en el centro una columela leñosa (Salazar *et al.*, 2000; Ramalho Carvalho, 2005; Zapater *et al.*, 2004; Toledo *et al.*, 2008; Varela y El Souki, 2013). Las semillas son castaño rojizas, con alas y aplanadas de 2,5 a 2,7 cm de largo (Fig. 6 C), contiene 30 a 100 semillas viables por fruto (Ramalho Carvalho, 2005).



Fig. 6: *Cedrela fissilis*. **A**, ejemplar en su hábitat natural; **B**, frutos; **C**, semillas. La barra indica 2 cm (B) y 5 mm (C).

Distribución natural

Se encuentra desde el norte de Argentina hasta Panamá y Costa Rica (Pennington *et al.*, 1981), más precisamente entre los 12° latitud Norte y 33° latitud Sur, en regiones con precipitaciones anuales que varían desde los 850 a los 2.200 mm y temperaturas de 15 a 25°C (Salazar *et al.*, 2000; Zapater *et al.*, 2004, Grau *et al.*, 2006). Es una especie característica de la Selva Paranaense o Misionera; muy frecuente en la provincia homónima (Zapater *et al.*, 2004). Su patrón actual de distribución se correspondería con remanentes de una distribución pretérita mayor, que sobrevive solo en los márgenes de la Cuenca Amazónica (Ríos *et al.*, 2010).

Importancia ecológica y económica.

Es una especie presente en bosques con follaje caedizo, tierras bajas no inundables y bosques bajos de montaña (Pennington y Edwards, 2001; Ríos *et al.*, 2008). Florece de setiembre a diciembre (con mayor intensidad en octubre), los frutos maduran en invierno cuando la planta no posee follaje (Styles, 1981; Zapater *et al.*, 2004). Si bien produce abundantes semillas, que son diseminadas por el viento en condiciones naturales, tiene una muy baja regeneración (IBIF, 2007).

Su aspecto estético y su porte determinan su empleo frecuente en parques y jardines, brindando un tronco recto y corteza gruesa, además de flores claras (blancas o amarillas) que destacan su belleza (Rodríguez *et al.*, 2009). Posee una madera liviana a moderadamente pesada con una densidad básica de 0,43 gr·cm⁻³ a lo largo

del fuste (Valério *et al.*, 2008). La albura es de color amarillo ocre rosado y el duramen castaño rosado a rojizo, de porosidad semicircular, grano recto a oblicuo y de textura gruesa heterogénea y diseño pronunciado, es una madera poco durables sensible al ataque de hongos, pero resistente al ataque de insectos. No ofrece dificultades al aserrado, maquinado, debobinado encolado, clavado atornillado y al acabado superficial, siendo ampliamente utilizada en muebles, terciados, revestimiento de interior, construcciones navales, molduras, zócalos, puertas, ventanas, tableros alistonados y tableros compensados (Martinuzzi, 2010).

El alto valor comercial que tiene la madera de *C. fissilis*, la hace muy apreciada para plantaciones con fines comerciales (Biernaski, 2010) y además posee un alto potencial para ser utilizada en métodos de enriquecimiento por siembra directa en campos abandonados (Meneghello y Mattei, 2004). Es considerado además un árbol melífero, rico en néctar y polen; extrayéndose de su madera aceites volátiles y perfumados y de su corteza una serie de taninos. Las hojas pueden ser utilizadas como forraje y se informaron algunas aplicaciones medicinales relacionadas con la actividad de sus aceites volátiles sobre el desarrollo de *Staphylococcus aureas* y *Escherichia coli* (Lago *et al.*, 2004).

Estado de conservación

C. fissilis es una de las especies de madera valiosa de la Selva Paranaense y por lo tanto es sometida a una fuerte extracción (Pinazo *et al.*, 2008). Se encuentra en la categoría de conservación “en peligro” (IUCN, 1998). Esta especie presenta muy baja densidad (1 árbol en 10 hectáreas) en bosques primarios y mayor abundancia en vegetación secundaria (Kageyama, 1996; Gandara, 1995).

En un proyecto de investigación sobre Metodología para Conservación Genética *in situ*, conducido por la Universidad de São Paulo y por CENARGEN/EMBRAPA, con recursos de FAO, FAPESP-Brasil; GEF/BIRD e IPGRI, están involucradas varias especies del género *Cedrela* considerándose las como modelos de especies raras en el Bosque Atlántico (Patiño Varela, 1997). Según Kageyama y Gandara (1993), la conservación genética *in situ* se debe orientar por especies banderas, o aquellas que necesitan de grandes áreas para la conservación de poblaciones de sus especies, y que podrían representar a la comunidad. Estos autores consideran las especies anormales en su distribución natural como modelos para conservación *in situ*, considerando como tal a *C. fissilis*. Actualmente, se realizan

numerosos estudios en Brasil con *C. odorata* y *C. fissilis*, a fin de conocer la diversidad genética de sus poblaciones naturales, buscando la conservación de sus recursos. Existen procedimientos de almacenamiento *ex situ* que están disponibles para la conservación a mediano y largo plazo (Nunes *et al.*, 2007). De igual modo, *C. fissilis* es una de las especies incluidas en el proyecto de investigación sobre la conservación *ex situ* de especies nativas de importancia en el NE de Corrientes (USAL-Corrientes) en compañía de *Myrocarpus frondosus*, *Handroanthus heptaphyllus*, *Cordia trichotoma* y *Araucaria angustifolia*; el cual será de gran utilidad para generar información acerca de la ecología y comportamiento en plantación (Pezzutti y Caldato, 2014).

Manejo del cultivo

Es una especie con alta capacidad de adaptación a diferentes condiciones de luz. Si bien, puede germinar indistintamente bajo condiciones de luz y sombra, su crecimiento se restringe considerablemente en situaciones de baja irradiancia lumínica, requiriendo de aperturas en el dosel para promover su desarrollo (Santos *et al.*, 2006).

En estado de plántula se caracteriza por presentar indumentos de pelos simples, con folíolos grandes y fuerte olor a ajo al estrujarlas que facilitan su identificación (Toledo *et al.*, 2005; Mostacedo *et al.*, 2003). Presenta un alto grado de dependencia de los hongos micorrícicos arbusculares en la fase de vivero; siendo necesaria la simbiosis con *Glomus clarum* para garantizar el éxito del establecimiento y crecimiento de los plantines a campo (Rocha *et al.*, 2006). Aunque poco usual, se puede hacer siembra directa de las semillas en campos abandonados, con buen nivel de germinación (Meneghello y Mattei, 2004; Grings y Brack, 2011). Actualmente, la demanda de plántulas de cedro está destinado a restaurar bosques (Saldias *et al.*, 1994). La plaga de mayor incidencia lo constituye la mariposa barrenadora del brote (*Hypsipyla grandella*). Ésta ovipone en los brotes jóvenes, más específicamente, en la base de los pecíolos de las hojas, pudiendo ocasionar la muerte del brote apical (González Morengi, 2006). Si bien es una especie de fácil adaptabilidad y alto valor comercial no existen plantaciones de cedro en grandes extensiones, debido a la susceptibilidad al ataque de la plaga antes mencionada (del Castillo y Tarnowski, 2005; Ramalho Carvalho, 2005, Maiocco *et al.*, 2008).

Se trata de una especie de rápido crecimiento a cielo abierto (del Castillo *et al.*, 2005; 2006). El turno de corte requiere de 20 a 25 años con un DAP promedio de 45 cm (Morales Ortiz y Herrera Tuz, 2009).

Producción de plantines

C. fissilis es una planta alógama con semillas que integran el grupo de las ortodoxas (Ramalho Carvalho, 2005). A fin de obtener una cosecha óptima de los frutos, ésta debe realizarse los 30 días de la antesis floral cuando inicia la dehiscencia, la coloración del fruto es marrón oscuro y el tenor de humedad es del 22,4% (Corvello *et al.*, 1999b). Inmediatamente después de la cosecha, la germinación puede alcanzar entre 70 y 92% (Corvello *et al.*, 1999 a; Masetto *et al.*, 2008). En condiciones naturales, las semillas pueden ser almacenadas hasta 6 meses (Peixoto *et al.*, 2008; Tourinho Salamoni *et al.*, 2012); en cámara seca hasta doce meses alcanzando una germinación de 33 a 45% mientras que si éstas son almacenadas en cámara fría, el poder germinativo alcanza 86% transcurridos 12 meses (Corvello *et al.*, 1999 a; Lazarotto *et al.*, 2013). Se siembra en almácigos o en tubetes, siendo el sustrato más apropiado la vermiculita. La germinación es epigea, iniciándose entre los 5 y 75 días después de la siembra. Las plántulas alcanzan una altura de entre 40 y 80 cm luego de 4 a 5 meses (Ramalho Carvalho, 2005). Durante los primeros estadios en el campo son sensibles a heladas por lo que deben permanecer cubiertas durante el invierno (Maiocco *et al.*, 2008). Presentan alta dependencia micorrízica ya que poseen escasa habilidad para absorber fósforo en ausencia de la simbiosis (Siqueira y Saggin-Júnior, 2001; Rocha *et al.*, 2006).

Frente a la escasa disponibilidad de árboles semilleros que brinden semillas de calidad, la propagación asexual se constituye en una valiosa alternativa. En este sentido, las estacas caulinares con hojas, obtenidas a partir de material seminal, constituyen un método válido para su propagación vegetativa (Xavier *et al.*, 2003). Asimismo, existe en la literatura varios trabajos que indican la posibilidad de producir plantas mediante micropropagación (Da Costa Nunes *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2003, 2007; Martínez *et al.*, 2008; de Souza Laudano, 2005; de Souza Ribeiro *et al.*, 2013). Se realizaron estudios tendientes a inducir organogénesis a partir del cultivo *in vitro* de distintos explantes (Pilatti, 2011; Pilatti *et al.*, 2011); sin embargo, quizás el avance más importante lo constituya la posibilidad de inducir

embriogénesis somática en cultivos de embriones cigóticos; brindando un 85% de sobrevivencia de las plantas aclimatadas (Vila *et al.*, 2009).

Finalmente, en la literatura existe información que indican la posibilidad de conservar semillas y órganos a corto y largo plazo (Nunes *et al.*, 2003; 2007; de Souza Laudano, 2005).

Cordia trichotoma [Vell.] Arrab. ex Steudel.

Descripción taxonómica y botánica.

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Dicotiledónea
Orden: Lamiales
Familia: Boraginaceae
Género: *Cordia*
Especie: *trichotoma*
NC: **Peteribí, loro negro**

La familia Boraginaceae está conformada por plantas arbóreas, arbustivas y herbáceas anuales o perenes de regiones tropicales, sub-tropicales y templadas; con 130 géneros y aproximadamente 2.500 especies que habitan en las regiones tropicales, subtropicales y templadas del planeta. La importancia económica de la familia se restringe a dos especies maderables *Patagonula americana* (guayaibí) y *Cordia trichotoma* (peteribí). No obstante, algunas especies de los géneros *Heliotropium*, *Myosotis* y *Cynoglossum* son cultivadas con fines ornamentales (Pérez-Moreau, 1994).

Cordia trichotoma es un árbol de hojas caducas, y fuste recto y cilíndrico que puede alcanzar 20 a 35 m de altura 40 a 100 cm de DAP. Su corteza es oscura castaña grisácea, áspera y con surcos longitudinales profundos; las ramitas jóvenes con pelos simples y estrellados entremezclados, además de lenticelas blanquecinas. Hojas alternas de lámina simple oblongas o lanceoladas con haz glabro o glabrescente y envés con densa pubescencia (pelos simples y estrellados) con peciolo pubescente. Planta polígama con flores blancas y pequeñas dispuestas en inflorescencias paniculiformes; presenta panículas cimosas terminales, laxas, pedicelos piloso-estrellados; cáliz terminado en 5 dientes breves, apiculados, densamente pubescente por fuera; corola infundibuliforme, con el tubo casi igual al cáliz, lóbulos obovados u oblongos; estambres insertos en la parte superior del tubo corolino (Ariza Espinar *et al.*, 2006). Fruto núcula proveniente de un ovario ínfero,

de aspecto cilíndrico encerrado por el cáliz y la corola de 8 a 13 mm de largo y de 3 a 4 mm de ancho (Cabrera, 1983; Pérez-Moreau, 1994; Salazar *et al.*, 2000, Carvalho, 2002; Fick *et al.*, 2007; Roman *et al.*, 2009), cilindroideo, que al alcanzar la madurez se desprende conservando la corola y el cáliz (Ariza Espinar *et al.*, 2006) que favorecen la dispersión anemócora (de Souza, 2008). En la época de disseminación es un aquenio con cotiledones foliáceos, en la germinación el fruto se comporta como un pixídeo, ya que presenta un opérculo, por la cual se permite la salida de la radícula (Kuniyoshi, 1983). La semilla es elipsoidal, de 6 mm de largo y 2 mm de diámetro y la semilla propiamente dicha se encuentra presa dentro del fruto (Carvalho, 2002). El peso de mil semillas es de 31,25 gr, comprendiendo de 24.591 a 32.557 semillas por kg. (Maffra *et al.*, 2010; Felippi *et al.*, 2012) (Fig. 7). La germinación es epigea y las plántulas son fanerocotiledonar (Felippi *et al.*, 2012).



Fig. 7: *Cordia trichotoma*. **A**, Ejemplar en su hábitat natural; **B**, fruto con restos florales; **C**, fruto limpios. En B y C la barra indica 1 cm.

Distribución natural

Se extiende por la zona oriental de Brasil desde Ceará a Río Grande do Sul y por el oeste a través de Paraguay, al noroeste de Argentina y Bolivia. Está presente en dos regiones fitogeográficas de Argentina, Selva Misionera y distrito Oranense de la Selva Tucumano-Boliviana (Biloni, 1990; Dimitri, 1998), desde los 30 hasta los 1.000 m.s.n.m., con precipitaciones anuales que varían desde los 950 a los 2.200 mm y temperaturas de 16 a 26°C. Se encuentra desde el bosque deciduo alto hasta el bosque montano, piso inferior, cálido húmedo y la selva Misionera, formando parte

del estrato arborescente superior (Biloni, 1990; Dimitri, 1998; Salazar *et al.*, 2000, Carvalho, 1988). Por otra parte, se determinó una nueva especie a partir de madera petrificada, asignándose a la familia Boraginaceae; con mayor parentesco con la especie actual *C. trichotoma*. Dado que ésta proviene de las sedimentaciones del Paleoceno superior de Chubut (Brea y Zucol, 2006); lo que sugiere la existencia de selvas que se habrían desarrollado bajo condiciones de clima cálido y húmedo.

Importancia ecológica y económica.

Es una especie heliófila típica de vegetación secundaria, común en sitios deforestados y potreros, poco exigente en suelos (Salazar *et al.*, 2000). Desde el punto de vista ecológico es una especie muy competitiva, pionera con alto poder de dispersión de semillas; coloniza sitios de rozados, chacras y sobre todo claros de la selva; con excelente regeneración natural; intolerante a la sombra por ello se reproduce bien en sitios abiertos y disturbados por el fuego (Montagnini *et al.*, 1995).

Se propaga por semillas; sin embargo, la viabilidad disminuye rápidamente cuando éstas son almacenadas a temperatura ambiente (Fick, 2007; Ferreira Lima *et al.*, 2008), prolongándose su facultad germinativa en condiciones de bajas temperaturas y baja HR (Rodrigues *et al.*, 2007). El mayor inconveniente que limita la producción de semillas es ocasionado por el coleóptero *Amblycerus longesuturalis* (Pic), (Salazar *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2001). Estudios previos determinaron que las hembras adultas de *A. longesuturalis*, (Bruchidae), ovipositan las semillas de *C. trichotoma*, cuyos estados larvales pueden completar su ciclo hasta madurez a expensas de las reservas cotiledonares (Barrance *et al.*, 2003), ocasionando daños severos que determinan la muerte del embrión. Cabe destacar que la incidencia del género *Amblycerus* afecta a otras especies del mismo género tales como *C. alliadora* y *C. gerascanthus* (Salazar *et al.*, 2000).

Debido a ciertas características organolépticas de su madera (veteado, color, etc.) que determinan un alto valor decorativo, presenta un marcado interés en la industria del debobinado, faqueado y mueblería fina (Salazar *et al.*, 2000); considerándose desde el punto de vista económico una especie prioritaria para la región nordeste de Argentina (Crechi *et al.*, 2004, 2010).

Estado de conservación

El Peteribí integra la lista de especies amenazadas en peligro o en estado de vulnerabilidad (IUCN, 2008). Por tal motivo, conforma una de las cinco especies

incluidas en el proyecto de investigación sobre la conservación *ex situ* de especies nativas de importancia en el NE de Corrientes (USAL-Corrientes); el cual será de gran utilidad para generar información acerca de la ecología y comportamiento en plantación (Pezzutti y Caldato, 2014).

Manejo del cultivo

Responde muy bien al establecimiento en áreas sin heladas o heladas leves, en suelos de buena fertilidad natural en las siguientes modalidades: a) plantación mixta a pleno sol, asociado con especies de crecimiento similar o superior en altura; b) vegetación matricial: En los primeros estadios de crecimiento soporta niveles moderados de sombra, pudiendo ser plantada en fajas de 3 a 4 m de largo abiertas en la vegetación secundaria (López *et al.*, 1987; Ortiz Domínguez, 1993). En general, esta especie se maneja en plantaciones con una densidad inicial de 1.600 plantas/ha y con un marco de plantación de 2,5 m x 2,5 m. (Britos Paniagua *et al.*, 2006). Posee un crecimiento inicial rápido manifestando una tasa de crecimiento volumétrico de 14,3 m³/ha/año (Schneider *et al.*, 2006; Brack *et al.*, 2011).

Los coleópteros *Cistudinella* sp. y *Psalidonota contemta* (Chrysomelidae) producen daños severos en las hojas limitando su explotación silvícola en la provincia de Misiones (López *et al.*, 1987; Ortiz Domínguez, 1993).

Producción de plantines

Las semillas deben ser sembradas o almacenadas inmediatamente después de su cosecha. Si bien, presentan un comportamiento ortodoxo, éstas pierden su poder germinativo en pocas semanas, siendo además dañadas por gorgojos. Dado que presenta dormición ocasionada por los tegumentos; es posible su reversión por escarificación mecánica. En ausencia de un tratamiento pre-germinativo, la germinación es lenta, iniciándose a los 20 días y finalizando a los 60 días desde la siembra, alcanzando entre un 60 y 80% de germinación (Floriano, 2004; Eibl *et al.*, 2012; Brack *et al.*, 2011). Se recomienda sembrar las semillas en germinadores y repicar las plantas a bolsas de polietileno o tubetes de tamaño medio. Posee una raíz principal pronunciada; razón por la cual, es sensible a la poda de raíces (Carvalho, 2002).

Mantovani *et al.*, (2001) obtuvieron múltiples brotes *in vitro* a partir del establecimiento de segmentos nodales informando que el uso de carbón activado en la fase de enraizamiento promueve el proceso morfogénico. Del mismo modo Fick

(2007) desarrolló un protocolo de propagación a partir del cultivo *in vitro* de segmentos nodales, ápices caulinares y microestacas extraídos de plántulas obtenidas por germinación *in vitro* de semillas. Schendelbek *et al.*, (2008), establecieron segmentos nodales obtenidos de plantas madres; a su vez determinaron que las condiciones de crecimiento de la planta madre, la recolección de los brotes en el período de crecimiento activo y los tratamientos fitosanitarios influyen notablemente en el establecimiento de segmentos nodales; determinándose que la protección de las plantas madres a la exposición de la luz solar permite reducir el ennegrecimiento tisular durante la fase de establecimiento. Por su parte, Heberle (2010) desarrolló un procedimiento de propagación mediante el uso de microestacas y más recientemente, González y Barth (2013) informaron acerca de la posibilidad de propagar esta especie mediante el cultivo de ápices.

Handroanthus heptaphyllus (Vell.) Mattos

Descripción taxonómica y botánica.

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Dicotiledónea
Orden: Lamiales
Familia: Bignoniaceae
Género: *Handroanthus*
Especie: *H. heptaphyllus*
NC: **Lapacho negro**

La familia Bignoniaceae comprende un gran número de taxones entre los que se encuentran lianas, arbustos y árboles distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales del planeta (Soltis *et al.*, 2011). Su distribución pantropical, casi cosmopolita, consta de 120 géneros y unas 1.000 especies; situándose la mayor fuente de diversidad en el norte de América del Sur (Gentry, 1992; Rzedowski y Rzedowski, 1993; Castroviejo *et al.*, 2005; Martínez y Ramos, 2012).

En nuestro país se identificaron más de 20 géneros (Arbo, 1999; Hurrell *et al.*, 2012). Recientemente, apoyado por técnicas moleculares, el género *Tabebuia* fue segregado en *Roseodendron* Miranda (sin representantes en Argentina) y *Handroanthus* Mattos.

Handroanthus heptaphyllus (Vell.) Mattos, sinonimia: *Tabebuia heptaphylla* (Velloso) Toledo, es confundida con *H. impetiginosa* debido a que éstas presentan

caracteres morfológicos en común (Lozano y Zapater, 2008); hecho por el cual, su identificación es intensamente debatida (Justiniano *et al.*, 2000).

El lapacho negro es un árbol de follaje caduco que puede alcanzar de 20 a 30 m de altura y 0,8 a 1,5 m de diámetro con un fuste recto y cilíndrico de 12 m de largo (SAyDS, 2003; Lozano y Zapater, 2008), con ramas dicotómicas, tortuosas y gruesas que forman una copa moderadamente amplia y globosa (Martó, 2005). Sus hojas son palmadas con 5 a 7 folíolos y pecíolo de 3,5 a 8 cm longitud. Los folíolos son ovados, oblongos y elípticos, discoloros, semi-coriáceos, borde regular y completamente aserrado, de ápice acuminado y base cuneada, el haz puede presentar algún tricoma simple y corto y el envés escamas pequeñas y semi-densas. En individuos jóvenes la corteza es de 1-2 cm de espesor; de color gris claro y lisa, con numerosas lenticelas pequeñas; en los adultos es áspera gruesa, castaño-grisácea a gris oscura, con grietas pronunciadas longitudinales y transversales (Lozano y Zapater, 2008). Presenta flores hermafroditas y zigomorfas dispuestas en panícula de 6-9 cm longitud, pauci o multiflora con hasta 40 flores. Tanto el raquis como los pedicelos están densamente cubiertos por tricomas dendroides cortos, flexuosos, blanquecinos. El fruto es una cápsula loculicida cilíndrica de hasta 40 cm de largo y 1 cm de ancho, de color pardo verdosa con numerosas semillas (Fig. 8). Las semillas son de 1,5 cm de largo por 1 cm de ancho, chatas con dos alas membranáceas y translúcidas y color castaño oscuro en el centro (SAyDS, 2003; Lozano y Zapater, 2008).

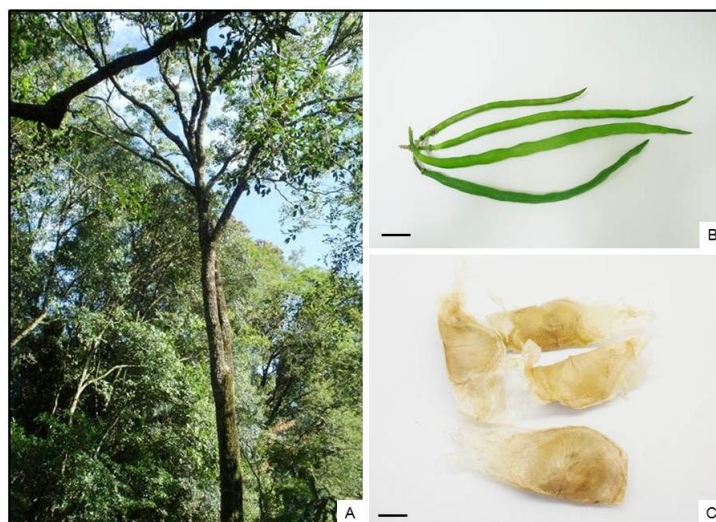


Fig. 8: *Handroanthus heptaphyllus*; **A**, ejemplar en su hábitat natural; **B**, frutos y **C**, semillas. La barra indica 5 cm (B) y 5 mm (C).

El periodo de floración inicia entre mediados de julio y primera quincena de agosto; mientras que la dehiscencia de los frutos ocurre mayormente en los meses de octubre a diciembre (Lozano y Zapater, 2008). Las semillas presentan un comportamiento ortodoxo. En condiciones ambientales naturales pierden rápidamente viabilidad, pudiendo ser conservadas hasta seis meses. Dispuestas en cámara fría con un contenido de humedad del 8%, éstas pueden ser almacenadas hasta 26 meses (Correira de Mello y Souza da Eira, 1995).

Distribución natural

Se distribuye en una faja en forma de U por el E de la provincia de Formosa y Chaco, NE de Santa Fe y Entre Ríos, y gran parte de Corrientes y Misiones (Lozano y Zapater, 2008), asociándose a las áreas fluviales de grandes ríos como el Paraná, Uruguay y Paraguay; en menor medida a cursos menores y zonas muy húmedas, ocupando llanuras y serranías bajas con altitudes variables entre 130 y 800 m.s.n.m.

Importancia ecológica y económica.

Esta especie reviste gran importancia ecológica y económica (Mori, 2010). Requiere clima predominante cálido y húmedo, con precipitaciones de 800 a 1.500 mm anuales, con inviernos suaves y veranos cálidos (Lozano y Zapater, 2008). Prefiere los suelos bajos con alto contenido de arcilla y húmedos (Gentry, 1992). Es considerada una especie heliófila, mesohigrófila, de crecimiento lento y longeva (Tortorelli, 1956), muy cultivada en el centro y norte del país (Lozano y Zapater, 2008).

La germinación es afectada por la disponibilidad y calidad de luz. En condiciones de sotobosque la germinación alcanza 56%; mientras que en los claros del bosque donde reciben una mayor radiación lumínica ésta puede ser cercana al 80%; hecho por el cual, posee capacidad de regeneración tanto en ambientes soleados como sombreados, teniendo crecimientos lentos bajo dosel y altas tasas de crecimiento cuando son plantadas a cielo abierto (Borges, 2012). Otro factor que influye sobre la germinación, es el tipo de sustrato utilizado, suelos arcillosos con alto contenido de materia orgánica, la germinación supera 40%, en tanto que en suelos arenosos, ésta es cercana al 15% (Bocchese *et al.*, 2007). Un tercer factor que influyente en la germinación de *H. heptaphyllus*, es la posición de los frutos en la copa del árbol; las semillas de frutos provenientes del tercio superior de la copa germinan en un 42%; mientras que en aquellas semillas originadas a partir de frutos

localizados en el tercio inferior, ésta no supera el 10 % (Damasceno Ribeiro *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista económico, las características organolépticas de su madera revisten un creciente interés industrial debido a su dureza y densidad, presentando una albura de color blanco-amarillo y duramen pardo-verdoso con vetado suave (López *et al.*, 1987). Presenta un grano oblicuo entrecruzado con textura fina heterogénea. Se clasifica como una madera de excelente calidad, muy durable con duramen resistente al ataque de hongos, insectos y termitas (Carvalho, 2003).

En cuanto a la trabajabilidad presenta dificultad debido a su dureza y abrasividad. Requiere un secado lento para obtener un material de calidad sin que se produzcan deformaciones, grietas y rajaduras. Es utilizada en mueblería, ebanistería, carpintería de interior, en escaleras, en la construcción de puentes, construcciones rurales, obras hidráulicas, postes, tornerías, mango de herramientas y pisos (Martinuzzi, 2010). Tiene amplia aplicación en la construcción naval debido a la maleabilidad y la resistencia, se utiliza comúnmente en construcciones portuarias (Reitz *et al.*, 1988).

El lapachol obtenido de la corteza, constituye un principio activo alternativo en el control de termitas, por sus efectos repelentes e insecticida (Arcos-Roa *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2012). Asimismo, es ampliamente utilizado en medicina popular basado en sus propiedades farmacológicas útiles en tratamiento para la tos, inflamaciones, heridas y lesiones en general (López *et al.*, 1987; Alonso, 2000). Por su porte robusto y flores vistosas rosadas, se cultiva con fines ornamentales en parques y avenidas (Zapater *et al.*, 2005).

Estado de conservación

Dado el creciente interés industrial, el lapacho integra la lista de especies amenazada de extinción (Mori, 2010); en tanto que en Brasil es categorizada como especie vulnerable (Itonan *et al.*, 1992). La explotación extractiva irracional ha reducido considerablemente el número de ejemplares en los bosques (Mori *et al.*, 2012). La ejecución de proyectos de investigación enmarcados en el Programa de Ecología de Especies Nativas han aportado información acerca de la fenología de las especie, marcación de árboles semilleros, germinación y almacenamiento de semillas, preparación de plantines con fines de implantación en ensayos a campo o

bajo cubierta destinadas al enriquecimiento y plantación a cielo abierto. Torretta y Cerino (2013) realizaron estudios relacionados con la biología reproductiva de la especie en las formaciones boscosas del NE de Argentina brindando información potencialmente útil en la aplicación de programas de mejoramiento.

Manejo del cultivo

Requiere de suelos con fertilidad media-alta, buen drenaje y texturas que varían de franca a arcillosa (Carvalho, 2003). Es sensible a las heladas en la etapa juvenil. Los individuos adultos pueden soportar heladas moderadas sin inconvenientes. Tiene cierta tolerancia a suelos anegados temporalmente y compactados (Scordo Mateo, 2013).

Debido a su extensa distribución natural, ha sido indicada para la restauración de los ecosistemas forestales; siendo utilizada en reemplazo de vegetación ribereña en sitios sin inundaciones (Pires de Freitas, 2012). Es altamente recomendable para sitios con déficit de humedad (Schrepel, 2010).

Es conveniente la plantación con un marco de 3 m x 6 m, sola o consociada con yerba mate (Barth *et al.*, 2008). Se adapta perfectamente a los sistemas agrosilvícolas por lo que puede ser empleada en correcciones de terrenos degradados de la región (Eibl *et al.*, 1997; Montagnini *et al.*, 2006a).

Presenta una deficiente poda natural demandando un manejo silvícola intenso para incrementar su altura comercial (Carvalho, 2003). En el dosel de plantaciones comerciales, la producción máxima de madera volumétrica es de 6,6 m³·ha·año con incrementos dimétricos medio anual de 11,8 mm (Carvalho, 2003; Póvoa de Mattos *et al.*, 2005).

Producción de plantines

H. heptaphyllus es una especie alógama (Torretta y Cerino, 2013) y la propagación es principalmente por semillas (do Amaral *et al.*, 2011). Los valores de germinación y vigor permanecen inalterables durante un periodo de 90 días, crioconservadas a -170 y -196°C (de Lima Tresena *et al.*, 2009; Higa *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2011). Un factor importante en el almacenamiento de las semillas de esta especie, es el contenido inicial de humedad, pudiendo ser almacenadas hasta nueve meses en condiciones de medio ambiente con un contenido de humedad inicial de 7,8%. En vivero si se utiliza como sustrato suelo arcilloso y materia orgánica (sustrato sin déficit hídrico) para la siembra, las plantas de *H. heptaphylla* logran

buen crecimiento y diferenciación, en tanto que si se utiliza sustratos compactados o arena se produce una elevada mortalidad de las plantas (Bocchese *et al.*, 2007; Zumkeller Sabonaro *et al.*, 2009; Brack *et al.*, 2011). La tasa de germinación varía entre el 60 y 100% y las semillas germinan entre los 7 y 10 días después de la siembra, finalizando a los 28 días. Presenta un rápido crecimiento en condiciones de vivero pudiendo alcanzar 25 cm de altura a los 150 días de la siembra. De igual modo, en el campo presenta un crecimiento relativamente rápido, acusando incrementos en altura entre 0,5 y 1,5 m por año, característica que la hace muy deseada para las forestaciones (Longhi, 1995; Justiniano *et al.*, 2000; Zapater *et al.*, 2005; Montagnini *et al.*, 2006b, Damasceno Ribeiro *et al.*, 2010).

En la literatura existe información relacionada con la propagación vegetativa a través del enraizamiento de estacas (Pires de Freitas, 2012; Ovando *et al.*, 2013). Asimismo, es factible el establecimiento *in vitro* y germinación de semillas inmaduras (Higa, 2006; Fiori *et al.*, 2014) para ser utilizados como fuentes de explantes en la micropropagación (Higa, 2006).

Myrocarpus frondosus Allemão

Descripción taxonómica y botánica.

Reino: Plantae
División: Fanerógama
Clase: Dicotiledónea
Orden: Fabales
Familia: Fabaceae
Género: *Myrocarpus*
Especie: *frondosus*
NC: **Incienso**

La familia Fabaceae incluye numerosas especies arbóreas distribuidas ampliamente en el mundo (Watson y Dallwitz, 1992). Hasta el momento, se identificaron 730 géneros y 19.400 especies que representan el 9,4 % de las eucotiledóneas (Stevens, 2001). Determinaciones realizadas por Burnham y Johnson (2004) indican que aproximadamente el 16% de las plantas leñosas de los bosques lluviosos neotropicales pertenecen a esta familia. En nuestro país se identificaron 101 géneros nativos, 14 adventicios y aproximadamente 580 especies. Posee un alto valor económico, obteniéndose alimentos, forraje, abonos, especias, medicina, taninos, maderas, gomas, resinas y tintes (Sánchez de Lorenzo-Cáceres, 2008).

Son árboles, arbustos, hierbas anuales o perennes (Sánchez de Lorenzo-Cáceres, 2008), espinosos o inermes; con ramas alternas u opuestas, aladas o ápteras; de hojas alternas u opuestas, estipuladas o no, pulvinuladas o no, pecioladas o sésiles, simples o compuestas desde unifolioladas hasta bipinnadas a veces reducidas a filodios; en el caso de hojas compuestas el raquis a veces terminado en espina, mucrón o zarcillo; folíolos con estipelas o sin ellas, pulvinulados o no, con márgenes dentados o aserrados. Las flores pueden ser solitarias o dispuestas en inflorescencias terminales o axilares. Fruto legumbre, a veces carnosa, con tabiques longitudinales, transversales, o sin tabiques, a veces articulada (lomento), ecepcionalmente alada; la dehiscencia puede ser ventral y/o dorsal o, incluso indehiscente. Los frutos pueden contener de 1 a numerosas semillas, con o sin estroffolo, con o sin endospermo (Valdés Castrillón *et al.*, 1987).

Myrocarpus frondosus Allemão; conocido trivialmente como “incienso”, es un árbol perennifolio a semi-caducifolio que alcanza alturas de 6 a 35 m de altura (Dimitri, 1987; Salazar *et al.*, 2000; Sartori y Azevedo Tozzi, 2004) (Fig. 9 A), y diámetros de 50 a 100 cm (López *et al.*, 1987; Salazar *et al.*, 2000), con fuste recto, cilíndrico y libre de ramas de 8 a 15 m, y copa angosta de forma orbicular con ramas ascendentes, tortuosas y dicotómicas; de follaje verde oscuro y corteza de color grisáceo a pardo grisáceo áspera con surcos longitudinales profundos y grosor de 3 a 4 cm, al rasparla despiden un olor característico de incienso (López, *et al.*, 1987; Salazar *et al.*, 2000). De ramas cilíndricas, raramente cuadrangulares, lenticeladas. Posee hojas compuestas alternas imparipinadas de 5 a 8 folíolos elípticos u ovados con ápice acuminado y base atenuada, asimétrica, redondeada, margen entero o crenado y discoloreo (Sartori y Azevedo Tozzi, 2004). Presenta flores de 2,6 a 4 mm de largo blancas o blanco-verdosas; cáliz campanulado y pétalos elípticos, dispuestas en inflorescencia racimo axilar de 2 a 10 cm de largo. Su fruto es una sámara plana, verde amarillenta con dos alas membranosas por los lados, la región seminífera 3-7 mm ancho, acastañada, escalariforme (Fig. 9 B), estipe 3-6,8 mm largo, base asimétrica, cáliz persistente, raramente también los estambres, con ápice agudo y apiculado, contiene de una a dos semillas por fruto, cilíndricas, resinosas y aromáticas con testa de color café oscura y rugosa, posee un embrión cilíndrico, elongado y reticulado. Produce aproximadamente 900 a 1.200 semillas por kilogramo, y las mismas son recalcitrantes, pierden viabilidad rápidamente, por lo

que se aconseja cosecharlas y sembrarlas inmediatamente. La germinación de semillas nuevas, recién cosechadas varía entre 75 y 85 % (López, *et al.*, 1987; Salazar *et al.*, 2000; Sartori y Azevedo Tozzi, 2004).



Fig. 9: *Myrocarpus frondosus*. **A**, ejemplar en su hábitat natural; **B**, frutos. La barra indica 1 cm.

La primera floración ocurre a partir de los 10 años de edad, entre los meses de agosto y octubre; mientras que la fructificación tiene lugar entre octubre y diciembre, presentando una dispersión anemocórica (López *et al.*, 1987; Salazar *et al.*, 2000).

La madera del incienso tiene cierto contenido de tanino, resinas y gomorresinas que favorecen su utilización a la intemperie (Lorenzi, 1998). En este sentido, se demostró que extractos crudos de la corteza de incienso son efectivos en el control de hongos que afectan el cultivo de yerba mate y té (Jerke *et al.*, 2008). En las antiguas misiones jesuíticas que habitaron el nordeste argentino se lo utilizaba por sus características balsámicas, ya que efectuando incisiones en la corteza exuda una resina aromática semejante a la mirra, que se utilizaba en los templos en reemplazo del verdadero incienso (Dimitri, 1998). Posee un duramen de color castaño claro a castaño oscuro y albura de color blanco ocráceo, dura y pesada, con peso específico de 0,87 a 1,02 gr·cm⁻³, con textura fina y grano derecho a oblicuo. De gran durabilidad natural, muy resistente al ataque de hongos e insectos, al exterior en contacto con el suelo se estima una durabilidad de 30 años.

Distribución natural

Su distribución abarca una amplia zona comprendida entre Bolivia, S de Brasil, SO de Paraguay, N de Argentina y N de Uruguay (Reitz *et al.*, 1988; Dimitri, 1998), en bosques estacionales deciduos sub-montanos teniendo una distribución altitudinal que varía de los 60 a 1.000 m.s.n.m; con precipitaciones anuales de 1.100 a 2.200 mm y temperaturas de 16 a 23°C (Salazar *et al.*, 2000; Sartori y Azevedo Tozzi, 2004).

Importancia ecológica y económica.

El incienso pertenece al estrato arbóreo superior, se trata de una especie secundaria, semi-heliófila, requiriendo sombreado moderado (Caldato y Pezzutti, 2010). Requiere suelos profundos y húmedos con buen drenaje y textura franca arcillosa. Se encuentra a menudo en la parte inferior de los valles, al comienzo de las laderas o zonas con suelos húmedos. Se comporta como moderadamente tolerante al frío (Carvalho, 1994). Constituye una especie de clase emergente de la cubierta superior en el bosque primario. Se regenera de forma natural en áreas abiertas pudiendo formar parte de los bosques secundarios (Lorenzi, 1998).

La estructura poblacional de *M. frondosus* en la Selva Misionera indica una entrada continua de nuevos individuos; con un patrón de distribución agregado y alta densidad de individuos, con presencia en diversas clases de tamaños, variando desde 2 cm hasta 50 cm de diámetro; considerándose al bosque en galería como área productora de semillas de incienso (Caldato y Pezzutti, 2010).

Su madera presenta buenas características industriales. No ofrece resistencia al aserrado, maquinado, encolado y recubrimiento superficial. Posee bajos riesgos de deformaciones y rajado durante el secado natural. Es utilizada en la fabricación de pisos, durmientes, postes, construcción al aire libre, marcos de puertas y ventanas, muebles, escaleras, cabos de herramientas y altamente recomendada para la producción de energía (Salazar *et al.*, 2000; Paula y Alves, 1997; Martinuzzi, 2010). Es apreciada en el mercado de pisos debido a sus valores de dureza, densidad, contracciones y durabilidad, entre otras características que abarcan desde el color, diseño y olor (Galván, 2007).

El incienso es además utilizado con fines ornamentales en parque y avenidas, en la recuperación de ecosistemas degradados y producción de miel (Salazar *et al.*, 2000).

Estado de conservación

Se encuentra incluida en la lista de especies Argentinas en peligro o vulnerables (Chebez, 1994). Si bien, son insuficiente los datos existentes que indican su estado de conservación, el Ecosistema que lo alberga se halla fuertemente alterado como consecuencia de la actividad maderera expoliativa e incontrolada (Navarro, 1997).

En la Facultad de Ciencias Forestales (UNAM), el laboratorio de Propagación Vegetativa, desarrolla técnicas de conservación *ex situ*, basadas en el uso del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, para especies nativas de la Selva Paranaense que se encuentran amenazadas, entre las que se incluyen *M. frondosus* (Escobar, 2006).

Por su parte la Universidad del Salvador (Gdor. Virasoro, Corrientes), ejecuta un proyecto de investigación basado en la conservación *ex situ* de cinco especies nativas de importancia en el NE de Corrientes; en el cual se incluye al incienso. A tal fin, en el año 2013 se instaló un ensayo para evaluar los aspectos ecológicos y productivos en condiciones de cultivo comercial (Pezzutti y Caldato, 2014).

Manejo del cultivo

Presenta alta capacidad de rebrote después del corte; registrándose un promedio de 3,4 brotes/tocón. Este método de regeneración es aconsejable solo a edad temprana y debe ser acompañado de un manejo silvícola adecuado (Carvalho, 1994; Calegari *et al.*, 2009).

Debido a su elevada sensibilidad a heladas, Mangieri (1965) y Cozzo (1969) recomendaron su implantación consociada con especies pioneras o secundarias iniciales o en cultivo matricial en faja libre en el bosque de tal manera que reciban protección contra el flagelo ambiental.

Producción de plantines

En la literatura no existen antecedentes relacionados con la fenología de la especie, manejo y germinación de sus semillas. Su poder germinativo varía entre 75 y 85% inmediatamente después de cosechadas; perdiendo vigor y viabilidad rápidamente debido a su carácter recalcitrante (Salazar *et al.*, 2000; Eibl *et al.*, 2009).

OBJETIVO GENERAL

Precedentemente se puso de manifiesto la necesidad de contar con un método eficiente que permita la multiplicación vegetativa de especies nativas necesarias para la restauración de áreas degradadas de la Selva Misionera. El objetivo general de este trabajo fue desarrollar procedimientos de propagación combinándose el empleo de técnicas tradicionales de organogénesis en medios semisólidos y micropropagación en sistemas de inmersión temporal.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Desarrollar un protocolo que permita el establecimiento y germinación *in vitro* de semillas.
2. Inducir la neoformación de yemas adventicias mediante cultivo *in vitro* de distintos explantes.
3. A partir de la obtención de yemas adventicias y/o segmentos nodales de explantes establecidos *in vitro*, optimizar la fase de multiplicación de la micropropagación promoviendo el crecimiento y diferenciación de los brotes resultantes mediante el uso de biorreactores de inmersión temporal automática.
4. Inducir rizogénesis adventicia y obtener plantas que se adapten al periodo de aclimatación.

HIPÓTESIS GENERAL

Se presume que el empleo combinado de sistemas tradicionales de cultivo en medio semisólidos e inmersión temporal permitirán el desarrollo de procedimientos exitosos de propagación de especies nativas de la Selva Misionera con riesgos de extinción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se trabajó con ejemplares de *Balfourodendron riedelianum*, *Cedrela fissilis*, *Cordia trichotoma*, *Handroanthus heptaphyllus* y *Myrocarpus frondosus* que crecen en la Reserva de Usos Múltiples de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de Misiones (26°54'-59'S y 54°12'-18' W), ubicada en el Departamento Guaraní (Misiones). El predio forma parte de la Reserva de Biosfera Yabotí; pertenece a la provincia biogeográfica Paranaense estando la mayor parte de su superficie ocupada por selva primaria con algunas pequeñas áreas de selva secundaria. Los testigos de las especies estudiadas se encuentran en el Herbario del Instituto de Botánica del Nordeste (CTES) identificados como ED 1, ED 2, ED 3, ED 4 y ED 5, respectivamente. Se cosecharon frutos en los meses de junio (*C. trichotoma*, *C. fissilis*), septiembre (*B. riedelianum*), noviembre (*H. heptaphyllus*) y diciembre (*M. frondosus*) de 2011 y 2012. Los frutos (*C. trichotoma*, *C. fissilis*, *B. riedelianum*, *M. frondosus*) y/o semillas (*H. heptaphyllus*) fueron almacenados a 4°C hasta su utilización con fines experimentales.

Establecimiento y germinación *in vitro* de semillas

Las semillas fueron extraídas de los frutos y tratadas con distintas soluciones desinfectantes consistentes en: **1**, inmersión de las semillas en etanol 70% durante 1 min y transferencia a una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) 0,27 – 2,75% adicionado con detergente neutro 0,2% durante 15 o 20 min; **2**, inmersión en una solución acuosa 30% y 50% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 30 volúmenes durante un tiempo variable según la especie y **3**, una combinación de los tratamientos anteriores mediante inmersión de las semillas en H₂O₂ 30 volúmenes durante tiempos variables, transferencia a una solución de alcohol 70% durante un min y traspaso a NaClO 1,65 y 2,75% adicionado con detergente neutro 0,2% durante 20 min. En todos los casos, al finalizar el tratamiento desinfectante, las semillas fueron enjuagadas varias veces con agua destilada estéril. Seguidamente, éstas fueron cultivadas individualmente en tubos de 15 mL de capacidad que contenían 4 mL del medio semisólido (agar SIGMA® A-1296 6,5 gr·L⁻¹) de Murashige y Skoog (1962), en su concentración original (MS) o diluido al 50% (MS/2), adicionado con sacarosa 30 gr·L⁻¹ y desprovisto de reguladores del crecimiento. En el caso de *Myrocarpus frondosus*, debido al tamaño de sus semillas, éstas se cultivaron en frascos de 190 cc de capacidad conteniendo 30 mL de MS. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8; esterilizándose por calor húmedo mediante

autoclave (1,46 kg·cm⁻² durante 20 min). Los cultivos fueron incubados durante 30 días en condiciones de luz (fotoperíodo 14 hs, 116 μmol·m⁻²·s⁻¹ PAR) y temperatura (27±2 °C) controladas. Al finalizar el experimento se determinó número de semillas/plántulas sin contaminación visible y número de semillas germinadas acumuladas para cada uno de los tratamientos, evaluándose algunos indicadores indirectos de vigor tales como día inicio de germinación, índice de velocidad de germinación (IVG) y tiempo medio de germinación en días (TMG), registrándose diariamente el índice de germinación fisiológica durante 30 días. A los fines prácticos, se consideró una semilla germinada a aquella que presentaba una raíz de no menos de 2 mm de longitud. IVG se determinó a partir del empleo de la fórmula desarrollada por Maguire (1962), $IVG = \sum_{n=1}^n \frac{Gi}{Ni}$, donde Gi representa el número de semillas germinadas por día y Ni el número de días transcurridos desde el inicio del ensayo. TMG se calculó a partir del IVG mediante la ecuación $TMG = \frac{\sum Ci * Ti}{\sum Ci}$, donde Ci representa el número de semillas germinadas por día y Ti número de días transcurridos desde el inicio del ensayo en que germinan Ci semillas.

Inducción de organogénesis

Segmentos de hipocótilo (3 mm longitud) y cotiledón (2x3 mm) extraídos de plántulas de 30 días de edad, obtenidas por germinación *in vitro* de semillas, fueron cultivados en tubos de 10 mL de capacidad conteniendo 4 mL MS, adicionado con sacarosa 30 gr·L⁻¹, semisólido (Phytigel® 3,5 gr·L⁻¹), adicionado con ácido naftalenacético (ANA) 0,01 mg·L⁻¹, 6-bencil-aminopurina (BAP) 0,1 mg·L⁻¹ y thidiazuron (TDZ) 0,001-0,1 mg·L⁻¹. El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5,8 antes de la adición del agente gelificante y esterilizado en autoclave.

Los cultivos fueron incubados en las condiciones ambientales antes mencionadas durante 60 días. Al finalizar el experimento, se cuantificó el número de explantes que brindaron yemas y el número de yemas adventicias neoformadas por explante.

Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales

A partir de las plántulas obtenidas por germinación *in vitro* de semillas, se extrajeron segmentos caulinares conteniendo las yemas axilares próximas a los cotiledones (SCC) y primer fitómero por encima de éstas (SCF) conteniendo 1 a 2 yemas axilares, los que fueron cultivados individualmente en tubos de vidrio de 15 cc de capacidad conteniendo 4 mL de MS, semisólido (agar 0,65%) con sacarosa 30 gr·L⁻¹

y adicionado con ácido indolbutírico (IBA, 0,1 – 0,2 mg·L⁻¹), ANA (0,001 – 0,1 mg·L⁻¹) y/o BAP (1 - 10 mg·L⁻¹). Los cultivos fueron incubados en condiciones de luz y temperatura controlada durante 60 días. Al finalizar el experimento se cuantificaron los números promedios de explantes sin síntomas de contaminación visible, ennegrecidos, brotes por explante y longitud promedio de los mismos.

Crecimiento de los brotes obtenidos por organogénesis y/o establecimiento *in vitro* de segmentos caulinares

Con el propósito de promover el crecimiento caulinar de las yemas obtenidas mediante organogénesis en medios basales que contenían ANA 0,01 mg·L⁻¹ y TDZ 0,01 mg·L⁻¹ fueron transferidos a frascos de vidrio de 300 mL de capacidad (10 explantes/frasco) conteniendo 100 mL del medio basal de idéntica formulación al utilizado durante la fase de inducción, adicionado con BAP 0–0,4 mg·L⁻¹ y/o giberelina A₃ (GA₃) 0–0,4 mg·L⁻¹, semisólido (agar 6,5 gr·L⁻¹) o líquido (inmersión temporal), provistos de una tapa de polipropileno con dos filtros Millipore® (0,22 µm) que permitía el intercambio gaseoso por difusión o asistencia neumática. En el caso de inmersión temporal, se utilizó un tiempo de inmersión de 1 min cada 4 hs. Idéntico programa fue utilizado en el tratamiento de ventilación asistida. Transcurridos 60 días de incubación en las condiciones de luz y temperatura antes descritas, se cuantificó el porcentaje de explantes que brindaron brotes con más de 5 mm de longitud, número total de brotes por explante, número de brotes con más de 5 mm de longitud por explante y longitud promedio de los mismos.

De igual modo, los explantes que brindaron brotes en medios de cultivo que contenían ANA 0,001 mg·L⁻¹ y BAP 3 mg·L⁻¹, BAP 5 mg·L⁻¹ e IBA con BAP 0,2 mg·L⁻¹ fueron transferidos a idénticos sistemas de cultivos conteniendo medios de similar composición química.

Enraizamiento y aclimatación

Se utilizaron brotes con más de 15 mm de longitud provenientes de la fase anterior. Éstos fueron cultivados en un medio de inducción semisólido (agar 6,5 gr·L⁻¹) compuesto por MS con sacarosa 30 gr·L⁻¹ y adicionado con ANA (0–0,5 mg·L⁻¹) o ácido indolbutírico (IBA 0–1,5 mg·L⁻¹). Transcurridos 7 días de incubación en condiciones de luz y temperatura controladas, los brotes fueron transferidos a un medio de expresión compuesto por el medio basal desprovisto de reguladores del crecimiento empleándose los sistemas de cultivos descritos en la etapa de elongación, incluyéndose

un cuarto tratamiento consistente en el cultivo individual de los brotes en tubos de 15 mL de capacidad conteniendo 4 mL de medio de cultivo y obturados con Resinite[®]. A los 60 días de incubación se evaluaron el porcentaje de brotes que brindaron raíces, número promedio de raíces por brote, longitud promedio de raíces y relación parte aérea/parte radical calculada a partir de los pesos secos respectivos.

Posteriormente, las vitroplantas fueron transferidas a macetas plásticas de 200 cm³ de capacidad conteniendo perlita como sustrato. Para mantener el ambiente húmedo, las plantas fueron cubiertas individualmente con bolsas plásticas transparentes y colocadas a en cámara con luz y temperatura controlada, permaneciendo bajo estas condiciones durante dos meses. Seguidamente, las plantas fueron transferidas a macetas de 800 cm³ con suelo rojo adicionado con fertilizante de liberación lenta (Osmocote[®] 18-5-9; 0,6 mg/cc sustrato) bajo condiciones de invernáculo.

Análisis histológico

Transcurridos 60 días de cultivo se colectaron segmentos de hipocótilos y cotiledones que brindaron yemas adventicias en un medio de cultivo compuesto por MS adicionado con ANA 0,01 mg·L⁻¹ y TDZ 0,01 mg·L⁻¹ con el propósito de realizar preparados permanentes fijándose inmediatamente en FAA (formol, ácido acético, alcohol etílico 70°, 5:5:90 v/v). Seguidamente, las muestras fueron deshidratadas siguiendo la metodología desarrollada por Gonzalez y Cristóbal (1997), pre-infiltradas con alcohol butílico terciario (Johansen, 1940) e incluidas en parafina. Finalmente, los preparados fueron seccionados con ayuda de un micrótopo rotativo efectuándose cortes de 10 µm de espesor y coloreados con safranina - Astra Blue (Luque *et al.*, 1996). A fin de corroborar el enraizamiento, se fijaron en FAA (formol, ácido acético, Etanol 70°, 5:5:90), estacas cultivadas en ambos sistemas en un medio MS libre de regulador de crecimiento desde el día 0 al 7 inclusive, para realizar el análisis con microscopía óptica.

A fin de realizar el análisis ontogénico del crecimiento de las raíces adventicias, se colectaron diariamente muestras de la zona basal del brote durante la primera semana de incubación, procediéndose a la deshidratación, tinción y montaje siguiendo la metodología descripta anteriormente.

Detección y clasificación de daños producidos por *Amblycerus longesuturalis* en *Cordia trichotoma*.

A partir de la escisión de los frutos y observación microscópica de las semillas de *Cordia trichotoma*, se elaboró una escala de daños basada en la proporción de tejido lesionado en posición opuesta al embrión. La escala se confeccionó a partir de la observación de tres lotes de 100 semillas cada uno, empleándose un microscopio estereoscópico marca Leica, modelo S6E, equipada con luz de fibra óptica. Con el objeto de establecer un método de clasificación de frutos no destructivo, el análisis microscópico fue complementado con el uso de rayos X. Las semillas se pegaron a una placa de plástico autoadhesiva de polipropileno, la que se colocó sobre una placa de acrílico transparente en la cámara de irradiación no digital (Faxitron X-Ray modelo MX-20; Specimen Radiography System®, Illinois, USA) y se sometió a exposiciones a 18 kV por 10 s. Posteriormente, las placas se revelaron en una impresora digital para rayos X (procesador Hope X Ray; Micro-Max modelo 319®). A continuación, para dar precisión al método de Rayos X respecto de un método destructivo; se realizó la Prueba Topográfica por Tetrazolio, la cual se basa en un cambio de coloración de los tejidos vivos en presencia de una solución de la sal de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio debido a la actividad de enzimas deshidrogenasas que participan en el proceso de respiración de los tejidos vivos. Éstas catalizan la reacción de los iones H^+ , liberados por la respiración de los tejidos vivos (complejos I, III y IV de la cadena de transporte de electrones) con la sal de tetrazolio, formando una sustancia estable, no difusible, de coloración rosada –rojiza, denominada trifenil formazan que permite distinguir las áreas vivas que toman una coloración roja respecto a las zonas muertas que no poseen coloración. Las evaluaciones de vigor pueden hacerse en base a la identificación, localización, y observación de los tejidos de la semilla (Hampton y Tekrony, 1995). A tal fin, se realizaron tres repeticiones de 100 semillas cada una, las que fueron embebidas durante 48 hs. y posteriormente sumergidas en la solución de tetrazolio para su tinción, utilizando frascos de vidrio de 100 mL con tapa hermética. Los frascos se incubaron en estufa a 28°C y en oscuridad durante 24 hs. Una vez completada la tinción, las semillas se enjuagaron con abundante agua corriente y se realizaron las observaciones sobre cada semilla individualmente. Los resultados de ambas pruebas se expresaron aplicando los criterios sugeridos por Mendonça *et al.*, (2001) para cuantificar la relación sin daño/con daño.

Diseño experimental y análisis estadístico

El tamaño de n para cada experimento se detalla en los resultados correspondientes representados por tablas y/o figuras. En todos los casos, se realizaron tres repeticiones independientes. Las variables fueron evaluadas con diseños factoriales y transformada mediante las fórmulas, $\arcseno \sqrt{x}/100$ y $\log \sqrt{x}+0,5$ para proceder a hacer el análisis de varianza y prueba de comparación de medias por el método de Tukey $P \leq 0,05$; utilizándose el software INFOSTAT (2012).

RESULTADOS

Balfourodendron riedelianum (Engl.) Engl.

Establecimiento y germinación *in vitro* de semillas

La proliferación de hongos y bacterias incidieron notablemente en el establecimiento *in vitro* de semillas de *Balfourodendron riedelianum* y su control dependió del agente desinfectante utilizado. En este sentido, el pre-tratamiento con hipoclorito de sodio, en la concentración y tiempo de exposición estudiado, no fue efectivo en el control de tales microorganismos siendo la contaminación del 100%. Contrariamente, el pre-tratamiento con peróxido de hidrógeno, sólo o en combinación con NaClO, mostró una alta efectividad permitiendo que el $96,2\pm 1,3\%$ y $97,7\pm 2,3\%$ de los cultivos no presentaran síntomas de contaminación visible; a la vez que más del 85% de las semillas germinaron brindando plántulas de aspecto normal (Fig. 10).

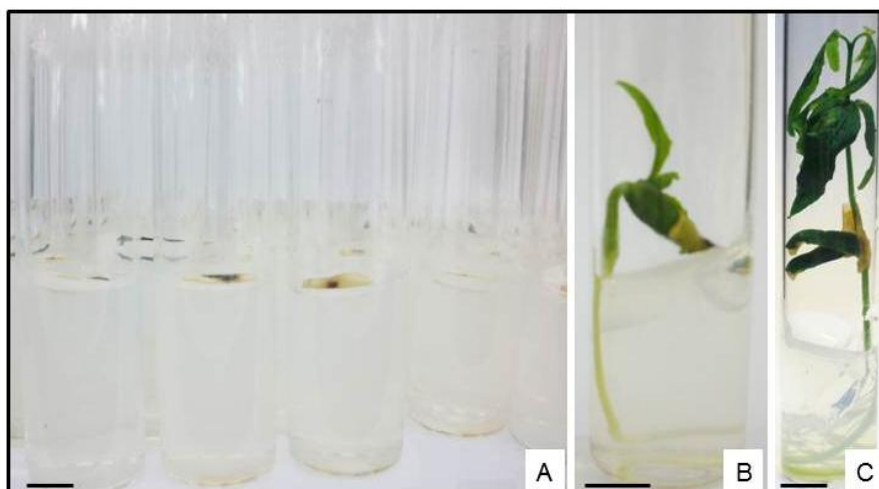


Fig. 10: Establecimiento y germinación *in vitro* de semillas de *B. riedelianum*. **A**, Cultivos sin síntomas de contaminación visible. **B** y **C**, Crecimiento de las plántulas transcurrido 10 y 30 días de incubación, respectivamente. En todos los casos, la barra indica 5 mm.

El proceso de germinación en semillas tratadas con H_2O_2 inició a los 9 días de incubación en condiciones de luz, siendo máxima a los 14 días de cultivo y finalizó transcurridos los 20 días (Fig. 11 A-B). Llamativamente, cuando el tratamiento desinfectante incluyó además NaClO, se produjo un adelanto del proceso morfológico, iniciando éste a los 4 días de incubación, manifestando un pico máximo de germinación entre los 5 y 7 días y finalizando a los 16 días. Consecuentemente se ha observado que la combinación de ambos agentes desinfectantes estimuló la velocidad de germinación (IVG= $5,2\pm 0,6$ semillas/día) y disminuyó el tiempo medio de germinación (TMG=

8,2±0,2 días), respecto al pre-tratamiento con H₂O₂ (IVG= 2,9±0,1 semillas/día; TMG= 13,8±0,5 días).

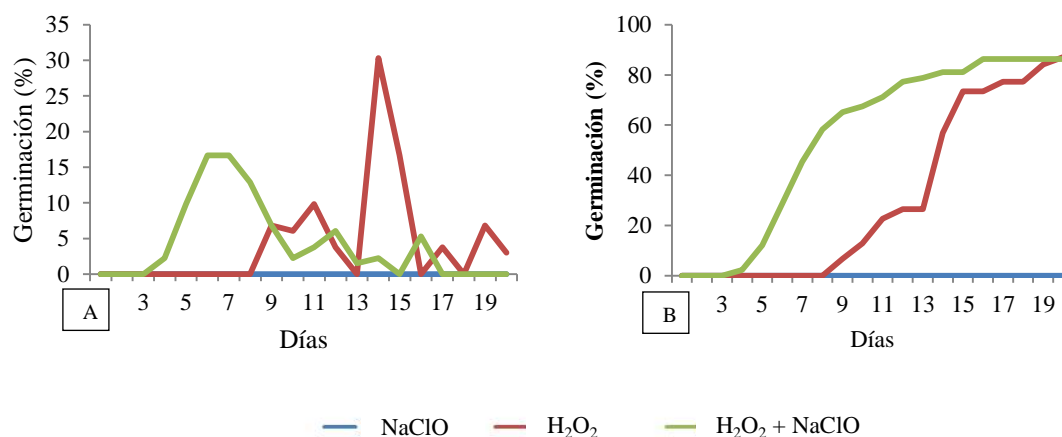


Fig. 11: Efecto del pre-tratamiento de las semillas con hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno, sólo o combinados, sobre la tasa de germinación diaria (A) y acumulada (B).

Inducción de organogénesis y obtención de plantas

Transcurridos 60 días de incubación en las condiciones descritas pudo observarse la formación de *novo* de yemas adventicias en la mayoría de los tratamientos evaluados (Tabla 2). La proporción de explantes que brindaron yemas varió entre 0 y 40±10%; siendo mayor cuando se utilizó como fuente de explante segmentos cotiledonares. No obstante, el número promedio de yemas neoformadas por explante varió entre 2±1 y 28,3±7,6 siendo principalmente promovido por el uso de segmentos de hipocótilo. Los mejores resultados se obtuvieron en medios suplementados con ANA y TDZ (0,01 mg·L⁻¹) en donde el 40±10% de los segmentos cotiledonares cultivados brindaron 10,7±6,4 yemas/explante. La ausencia de una auxina en el medio de cultivo afectó negativamente ambos parámetros evaluados.

Tanto la observación visual como el análisis histológico efectuado indican que, en todos los casos, la neoformación de las yemas adventicias ocurre a través de un sistema indirecto de regeneración (Fig. 12). En ambos explantes, a partir del tejido epidérmico se produce una masa de tejido indiferenciado (callo), el que dará origen a las yemas vegetativas.

Tabla 2: Efecto de la adición de ANA, BAP y TDZ sobre la formación de yemas adventicias a partir del cultivo *in vitro* de segmentos de hipocótilos y cotiledones.

Reguladores del crecimiento (mg·L ⁻¹)			Explantos que brindan yemas (%)		Número de yemas neoformadas por explante	
ANA	BAP	TDZ	Hipocótilos	Cotiledones	Hipocótilos	Cotiledones
0	0	0	0 ^a	0 ^c	-	-
0,01	0,1	0,001	10,0±1,0 ^a	0 ^c	14,5±6,5 ^{ab}	-
0,01	0,1	0,01	10,0±1,0 ^a	23,3±11,3 ^{ab}	17,3±11,0 ^{ab}	6,6±1,9 ^{ab}
0,01	0,1	0,1	6,7±5,8 ^a	26,7±11,6 ^{ab}	28,3±7,6 ^a	6,8±3,9 ^{ab}
0,01	0,1	-	6,7±5,8 ^a	6,7±5,8 ^{bc}	6,3±0,6 ^{abc}	3,5±1,3 ^b
0,01	-	0,001	6,7±5,8 ^a	0 ^c	3,0±2,6 ^{cd}	-
0,01	-	0,01	16,7±11,6 ^a	40,0±10,0 ^a	9,2±4,1 ^{abc}	10,7±6,4 ^{ab}
0,01	-	0,1	6,7±5,8 ^a	36,7±5,8 ^a	2,3±0,5 ^c	6,2±2,9 ^{ab}
-	0,1	0,001	0 ^a	0 ^c	-	-
-	0,1	0,01	13,3±5,8 ^a	16,7±5,8 ^{ab}	2,7±1,5 ^c	13,5±5,9 ^a
-	0,1	0,1	10,0±0 ^a	30,0±10,0 ^a	2,0±1,0 ^{cd}	6,5±2,8 ^{ab}

Los valores expresan el promedio de tres repeticiones ± SD (n= 10). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$ Test de Comparaciones Múltiples de Tukey).

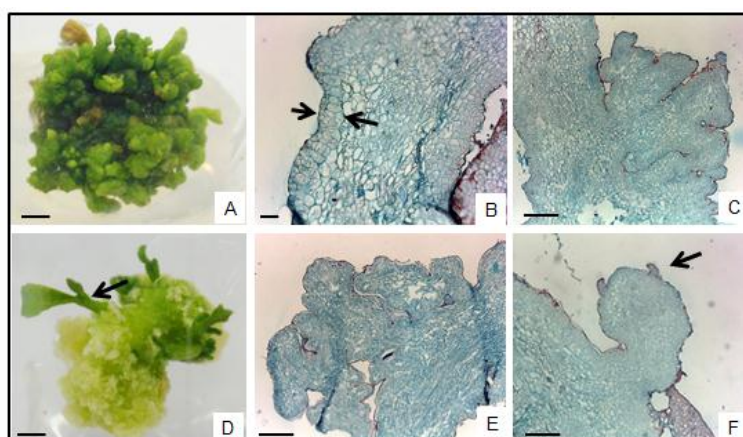


Fig. 12: Organogénesis indirecta de *B. riedelianum* a partir del cultivo *in vitro* de cotiledones (A-C) y de hipocótilos (D-F). **A y D**, Explantes con yemas adventicias. **B**, Sección transversal del segmento de cotiledón. La flecha indica división celular en el tejido epidérmico. **C y E**, Proliferación de tejido indiferenciado. **F**, Formación de la yema adventicia. La flecha indica el domo meristemático y los primordios. Referencias: A, D: 1 mm; B: 100 µm; C, E, F: 200 µm.

Cuando los explantes con yemas adventicias fueron subcultivados a medios frescos con el propósito de promover su crecimiento para lograr un tamaño óptimo de brotes para la subsiguiente fase de enraizamiento; pudo observarse que, independientemente del sistema de ventilación provisto, el empleo de medios semisólidos restringió fuertemente el proceso morfogénico. En tales circunstancias, los explantes se tornaron de color marrón evidenciando síntomas de envejecimiento prematuro (Fig. 13 A). Por su parte, el uso de medios líquidos basado en sistemas de

inmersión temporal (IT), distinguió un efecto promotor de la brotación en todos los tratamientos ensayados (Fig. 13 B).

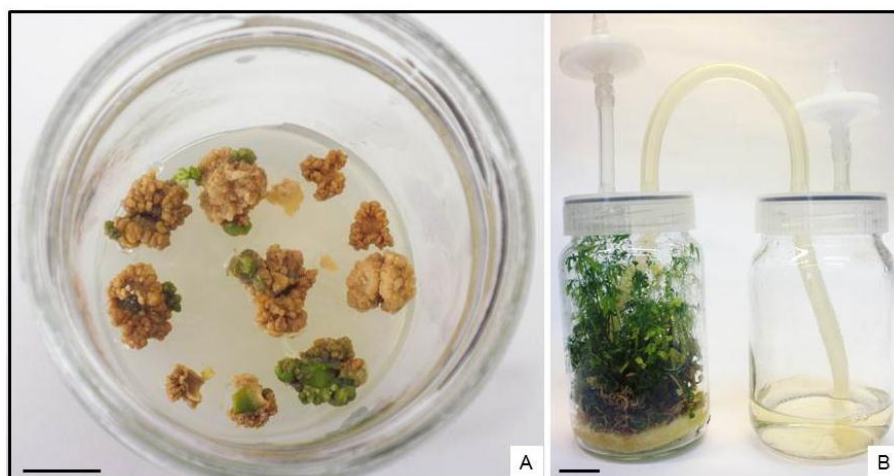


Fig. 13: Crecimiento de las yemas adventicias en medios semisólidos (A) y líquidos (B) basado en el uso de sistemas de inmersión temporal automática. En ambos casos, la barra indica 2 cm.

En este contexto, tanto el crecimiento de los tallos como la calidad de los brotes resultantes dependieron de un adecuado balance hormonal. Si bien, la adición al medio de cultivo, ya sea con bajas concentraciones de auxina, citocinina o giberelina, no afectó el número de brotes por explante; es decir que no estimuló organogénesis secundaria, como así tampoco la longitud promedio de los mismos, aunque sí incidió en el porcentaje de explantes regenerandos con brotes mayores a 5 mm de longitud (Tabla 3, Fig. 14). Los mejores resultados se obtuvieron cuando el medio de cultivo se suplementó con BAP $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ en donde el $53 \pm 5,8\%$ de los explantes evidenciaron brotes con más de 5 mm de longitud. En general, la suplementación de GA_3 al medio de cultivo provocó alteraciones morfo-fisiológicas que determinaron una alta ocurrencia de vitrificación.

Tabla 3: Efecto de la adición al medio de cultivo con BAP y GA_3 sobre el crecimiento de brotes en un sistema de inmersión temporal.

BAP ¹	GA_3	Número promedio de brotes/explante	Explantos con brotes ≥ 5 mm longitud (%)	Brotes con más de 5 mm de longitud (%)	Longitud del brote (mm)
-	-	$12,5 \pm 1,7^a$	$33,3 \pm 5,8^{bc}$	$64,4 \pm 36,5^a$	$8,3 \pm 1,0^a$
0,2	-	$18,0 \pm 3,7^a$	$53,3 \pm 5,8^a$	$48,8 \pm 4,1^a$	$12,6 \pm 3,0^a$
0,4	-	$16,6 \pm 7,3^a$	$23,3 \pm 5,8^c$	$29,4 \pm 10,6^a$	$9,1 \pm 3,0^a$
-	0,2	$16,7 \pm 3,2^a$	$40,0 \pm 0,0^{ab}$	$45,7 \pm 20,2^a$	$8,7 \pm 2,0^a$
-	0,4	$19,1 \pm 3,9^a$	$33,3 \pm 5,8^{bc}$	$53,8 \pm 26,6^a$	$9,6 \pm 2,0^a$

¹ Reguladores del crecimiento en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Los valores expresan el promedio de tres repeticiones \pm SD (n= 15). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$ Test de comparaciones múltiples de Tukey).

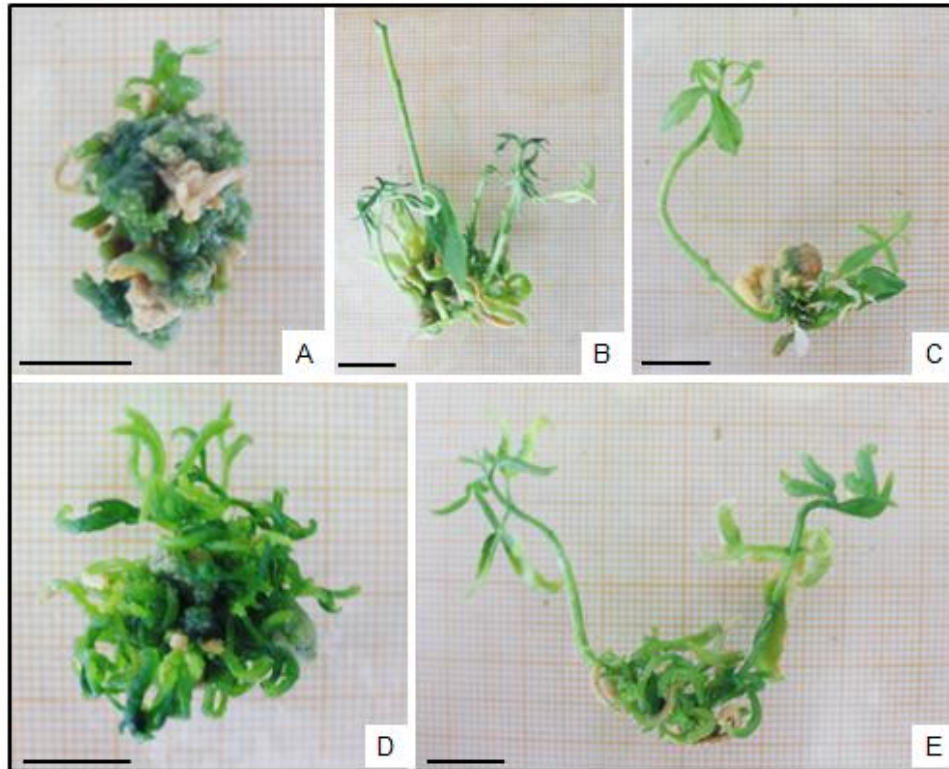


Fig. 14: Crecimiento de las yemas adventicias en biorreactores de inmersión temporal conteniendo MS desprovisto de hormonas (A) o suplementado con BAP 0,2-0,4 mg·L⁻¹ (B, C) o GA₃ 0,2-0,4 mg·L⁻¹ (D, E) bajo un sistema de inmersión temporal automática. En todos los casos, la barra indica 1 cm.

Cuando los brotes obtenidos en un medio líquido compuesto por MS adicionado con BAP 0,2 mg·L⁻¹ alcanzaron 15 mm de longitud, fueron transferidos a la fase de enraizamiento; y también pudo observarse una elevada proliferación de bacterias endófitas que ocasionaron la muerte prematura de los explantes que crecieron en medios semisólidos, excepto aquellos que fueron cultivados individualmente en tubos de vidrio obturados con Resinite[®] en donde la mortandad varió entre 7±5,8 y 20±10%. El uso de biorreactores permitió que se cultivaran varios brotes por recipiente, estableciéndose una tasa de mortalidad entre 23±15,3 y 66±28,9%. Si bien, el 19±5,6% de los brotes cultivados individualmente en medios semisólidos brindaron raíces en un medio de cultivo desprovisto de hormonas, la suplementación con ANA 0,25 mg·L⁻¹ favoreció la inducción del proceso morfogénico posibilitando que el 54±9,1% de los brotes diferenciaron raíces. El uso de biorreactores en la inducción de rizogénesis adventicia permitió que el 36±11,9% de los brotes enraizaran cuando se adicionó ANA 0,1 mg·L⁻¹ al medio de cultivo. La utilización de IBA en las dosis ensayadas no estimuló el crecimiento de raíces adventicias. En todos los casos, se diferenció 1 raíz por brote a través de un sistema directo de regeneración, sin formación de callos (Fig. 15). Las

plantas provenientes de medios semisólidos se caracterizaron por presentar una mayor longitud promedio de las raíces evidenciando una relación parte aérea/parte radicular menor ($1,6\pm 0,1$) que le permitió el 100% de sobrevivencia durante la fase de aclimatación. En cambio, aquellas derivadas de medios líquidos, presentaron raíces más cortas de aspecto anormal y con una mayor relación parte aérea/parte radicular ($2,3\pm 0,6$) que afectaron la sobrevivencia de las plantas.



Fig. 15: Rizogénesis adventicia de *Balfourodendron riedelianum* a partir de brotes obtenidos por regeneración de yemas vegetativas y cultivados en medios líquidos (A, B) o semisólidos (C) y obtención de plantas (D). La barra indica 1 cm (A-C) y 5 cm (D).

Cedreia fissilis Velloso

Establecimiento y germinación *in vitro* de semillas

La presencia de hongos endófitos afectó negativamente el establecimiento *in vitro* de semillas de *C. fissilis*; siendo el pre-tratamiento con etanol e hipoclorito de sodio en las dosis y tiempo de inmersión ensayadas, insuficiente para controlarlos y permitir el establecimiento *in vitro*. En tales circunstancias, únicamente el $2,4\pm 2,1\%$ de los cultivos no manifestaron síntomas de contaminación. Sin embargo cuando las semillas fueron tratadas con peróxido de hidrógeno sólo o en combinación con NaClO, el 100% de los cultivos no presentaron indicios de contaminación y no se detectaron daños en las semillas por fitotoxicidad, lo que permitió una germinación del $95,2\pm 2,1$ (H_2O_2) y $96,4\pm 3,8\%$ ($H_2O_2 + NaClO$), obteniéndose así plántulas de aspecto normal (Fig. 16).

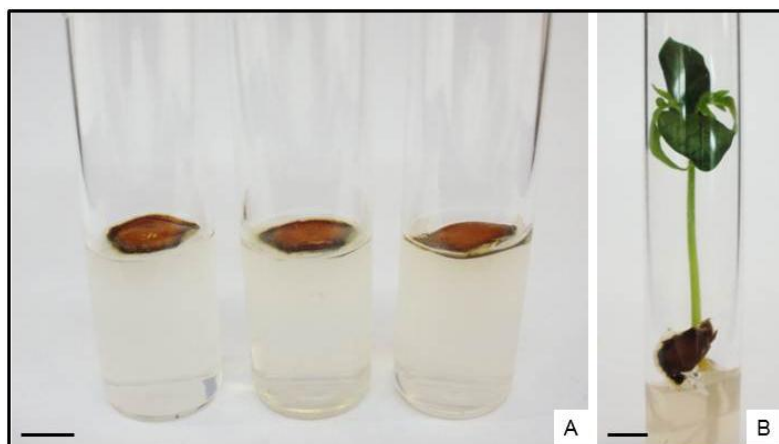


Fig. 16: Establecimiento y germinación *in vitro* de semillas de *C. fissilis*. **A**, Cultivos sin síntomas de contaminación visible. **B**, Crecimiento de una plántula transcurridos 30 días de incubación en las condiciones ambientales descritas en materiales y métodos. En ambos casos, la barra indica 5 mm.

Del mismo modo, pudo observarse que en las semillas provenientes del tratamiento con H_2O_2 , el inicio de la germinación requirió de 7 de incubación en condiciones de luz, con tasas máximas entre los días 10 y 13, finalizando el proceso luego de 19 días cultivo (Fig. 17 A, B). La combinación de ambos agentes desinfectantes promovió el proceso morfogénico, iniciando éste a los 5 días de incubación, siendo máxima a los 9 días y finalizando en igual periodo de tiempo que el tratamiento con H_2O_2 . De esta manera, el uso combinado de ambas soluciones incrementó la velocidad de germinación ($IVG= 2,7\pm 0,3$ semillas/día) y redujo el tiempo medio de germinación ($TMG= 10,5\pm 0,8$ días) respecto del tratamiento que contenía únicamente H_2O_2 ($IVG= 2,4\pm 0,04$ semillas/día; $TMG= 11,7\pm 0,4$ días).

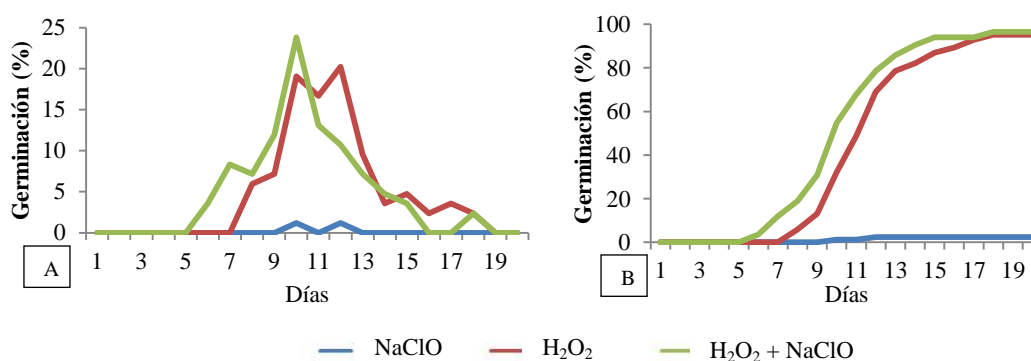


Fig. 17: Efecto del pre-tratamiento de las semillas con hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno y su combinación sobre la tasa de germinación diaria (**A**) y acumulada (**B**) de semillas de *C. fissilis* cultivadas en MS desprovisto de reguladores de crecimiento y bajo condiciones de luz.

Establecimiento, multiplicación y obtención de plantas a partir del cultivo *in vitro* de segmentos caulinares.

Al cabo de 60 días de cultivo pudo observarse que entre el 90 y 100% de los explantes (SCC y SCF) se establecieron exitosamente y brotaron en todos los tratamientos evaluados, brindando de 1 a $4,9 \pm 0,6$ brotes/explante que alcanzaron de $3 \pm,8$ a $15,1 \pm 3,1$ mm de longitud (Tabla 4).

En general, el número de brotes neoformados por explante fue mayor cuando éstos provenían de SCC; siendo máxima cuando el medio de cultivo contenía ANA $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y BAP $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, en donde el 100% de los explantes brotaron produciendo $4,9 \pm 0,6$ brotes por explantes con $8 \pm 0,1$ mm de longitud promedio (Fig. 18 A).

Cuando se emplearon SCF como fuente de explantes, los mejores resultados se obtuvieron en medios que contenían ANA $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y BAP $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; observándose que el $93 \pm 11,5\%$ de los mismos brotaron produciendo $3,8 \pm 0,9$ brotes/explante con una longitud promedio de $6,6 \pm 0,6$ mm (Fig. 18 B).

La elevada proliferación de callos en la base del explante afectó negativamente el crecimiento de los brotes resultantes.

Tabla 4: Efecto de la adición al medio de cultivo con ANA y BAP sobre la brotación de segmentos caulinares cultivados en medios semisólidos.

Reguladores del crecimiento ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		Explantes con brotes (%)		Número de brotes/explante		Longitud promedio de los brotes (mm)	
ANA	BAP	SCC	SCF	SCC	SCF	SCC	SCF
-	-	100 ^a	100 ^a	$2,1 \pm 0,1^e$	$1,0 \pm 0,0^c$	$14,0 \pm 2,8^{ab}$	$10,7 \pm 2,2^a$
0,1	1	100 ^a	90 ± 10^a	$2,7 \pm 0,2^{cde}$	$1,7 \pm 0,2^{cde}$	$9,1 \pm 2,3^{bc}$	$8,5 \pm 2,5^{ab}$
0,1	3	$97 \pm 5,7^a$	100 ^a	$4,0 \pm 0,2^{ab}$	$3,3 \pm 0,7^{ab}$	$6,8 \pm 0,8^{cd}$	$7,0 \pm 1,2^{abc}$
0,1	5	$93 \pm 5,7^a$	$93 \pm 5,7^a$	$3,7 \pm 0,4^{abc}$	$2,1 \pm 0,2^{bcd}$	$6,0 \pm 1,2^{cd}$	$5,1 \pm 1,2^{bc}$
0,1	10	$97 \pm 5,7^a$	$97 \pm 5,7^a$	$2,6 \pm 0,4^{de}$	$1,5 \pm 0,6^{de}$	$3,9 \pm 0,7^d$	$3,0 \pm 0,8^c$
0,001	1	$97 \pm 5,7^a$	100 ^a	$3,2 \pm 0,2^{bcd}$	$1,6 \pm 0,1^{de}$	$15,1 \pm 3,1^a$	$11,0 \pm 0,4^a$
0,001	3	$97 \pm 5,7^a$	$93 \pm 11,5^a$	$4,2 \pm 0,7^{ab}$	$3,8 \pm 0,9^a$	$8,5 \pm 2,1^{bc}$	$6,6 \pm 0,6^{abc}$
0,001	5	100 ^a	$97 \pm 5,7^a$	$4,9 \pm 0,6^a$	$2,3 \pm 0,5^{bcd}$	$8,0 \pm 0,1^{bc}$	$6,0 \pm 0,6^{abc}$
0,001	10	100 ^a	90 ^a	$3,3 \pm 0,5^{bcd}$	$2,7 \pm 0,7^{abc}$	$5,4 \pm 1,8^{cd}$	$5,0 \pm 1,7^{bc}$

Los valores expresan el promedio de tres repeticiones \pm SD (n= 10). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$ Test de Comparaciones Múltiples de Tukey). **SCC**, segmento caulinar a la altura de inserción de los cotiledones; **SCF** segmento caulinar correspondiente al primer nudo por encima de los cotiledones.

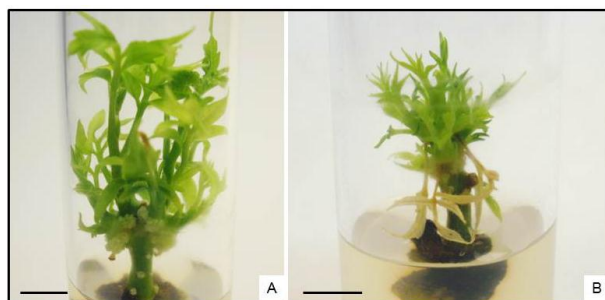


Fig. 18: Formación de múltiples brotes a partir del cultivo *in vitro* de segmentos nodales provenientes de la inserción de los cotiledones (A) y del primer fitómero por encima de los mismos (B). La barra indica 5 mm

Cuando los brotes fueron subcultivados a medios frescos, con el propósito de alcanzar un crecimiento adecuado que favorezca el enraizamiento *in vitro* de los mismos, pudo observarse que, independientemente del sistema de cultivo empleado, la adición de GA₃ al medio nutritivo en las dosis ensayadas, no estimuló el alargamiento caulinar resultando en una disminución del porcentaje de brotes que superaron 5 mm de longitud promedio (Tabla 5). Si bien, el uso de medio líquido por IT no incrementó la tasa del parámetro mencionado, la longitud promedio de los brotes fue significativamente superior al resto de los tratamientos (Fig. 19). La provisión de un sistema de ventilación por difusión o asistencia neumática no afectó los parámetros evaluados.

Tabla 5: Efecto de la adición al medio de cultivo semisólido o líquido con GA₃ sobre el crecimiento de brotes provenientes del establecimiento *in vitro* de segmentos caulinares de *Cedrela fissilis*.

Sistema de cultivo	GA ₃ (mg·L ⁻¹)	Brotes con más de 5mm de longitud (%)	Longitud promedio (mm)
Medio semisólido <i>Ventilación por difusión</i>	0	75±8,8 ^b	9,4±0,4 ^b
	0,5	76±6,2 ^b	9,5±1,5 ^b
	1,0	71±4,6 ^b	9,1±0,6 ^b
	1,5	75±11,8 ^b	9,2±1,4 ^b
Medio semisólido <i>Ventilación asistida</i>	0	76±12,6 ^b	6,9±1,3 ^b
	0,5	68±6,3 ^b	6,9±0,2 ^b
	1,0	71±6,9 ^b	7,4±1,0 ^b
	1,5	72±9,3 ^b	8,6±0,9 ^b
Medio líquido <i>Ventilación asistida (IT)</i>	0	93±5,8 ^a	31,4±4,9 ^a
	0,5	83±2,8 ^{ab}	9,2±2,5 ^b
	1,0	68±7,8 ^b	8,7±1,4 ^b
	1,5	73±2,1 ^b	9,2±1,3 ^b

Los valores expresan el promedio de tres repeticiones ± SD (n= 10). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$ Test de Comparaciones Múltiples de Tukey).

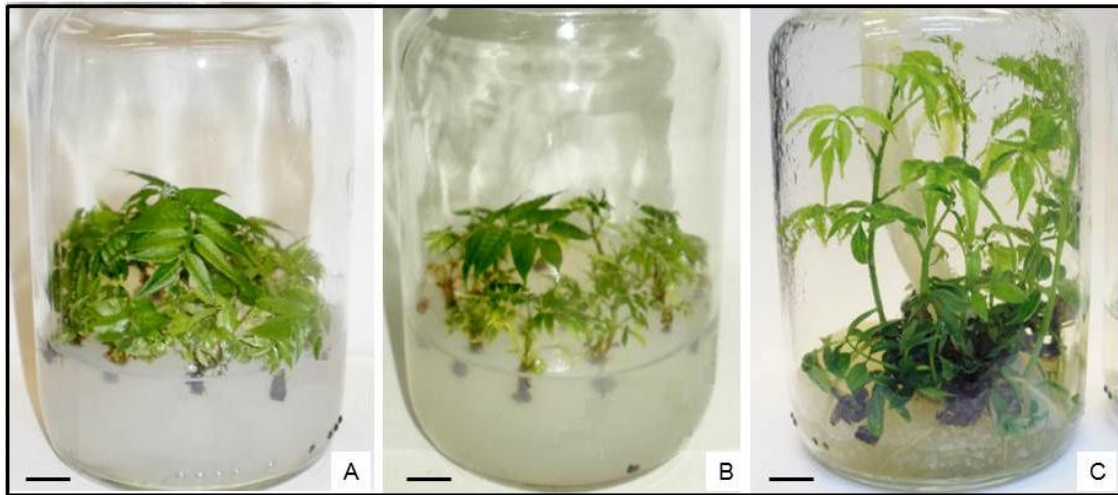


Fig. 19: Crecimiento de los brotes en medios semisólidos provistos con ventilación por difusión (A) o asistida (B) y medios líquidos basados en el principio de inmersión temporal (C), transcurridos 60 días de incubación en las condiciones ambientales descritas en Materiales y Métodos. En todos los casos, la barra indica 1 cm.

Una vez que los brotes superaron los 15 mm de longitud fueron transferidos a la fase de enraizamiento, observándose que en general, la formación de raíces fue mayor en medios semisólidos (Tabla 6). Si bien, el enriquecimiento del MS con auxinas no incrementó significativamente el parámetro en estudio, la adición de IBA $1,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el medio de inducción semisólido permitió que el 100% de los brotes enraizaran y brindaran $4,9\pm 0,8$ raíces por brote con una longitud promedio de $28,1\pm 3,1$ mm; hecho por el cual, la relación entre el peso seco de la parte aérea y radical descendió a $1,2\pm 0,5$ en favor del crecimiento de las raíces. La tasa de enraizamiento en medios desprovistos de reguladores del crecimiento fue $73,3\pm 5,8$ y $63,3\pm 11,6\%$ cuando los brotes crecieron en medios semisólidos y líquidos, respectivamente.

Tabla 6: Efecto del pre-tratamiento con ANA e IBA sobre la inducción de rizogénesis adventicia en brotes cultivados en medios semisólidos y líquidos.

Sistema de cultivo	ANA	IBA	Enraizamiento (%)	Número de raíces por brote	Longitud (mm)	Relación PSA/PSR
Medio semisólido <i>Ventilación por difusión</i>	-	-	73±5,8 ^{ab}	2,3±0,4 ^{abc}	26,5±3,5 ^{abc}	2,9±0,5 ^{ab}
	0,1	-	83±5,8 ^{ab}	3,1±0,9 ^{abc}	26,4±3,3 ^{abc}	1,9±0,5 ^{ab}
	0,25	-	63±37,9 ^{ab}	3,2±1,0 ^{abc}	28,1±3,1 ^{ab}	1,8±0,2 ^{ab}
	0,5	-	47±11,5 ^b	3,7±1,5 ^{abc}	22,6±3,1 ^{abc}	1,2±6,6 ^a
	-	0,5	93±5,8 ^{ab}	3,1±0,4 ^{abc}	36,8±3,5 ^a	1,7±0,1 ^{ab}
	-	1,0	70±10,0 ^{ab}	3,9±0,9 ^{ab}	23,9±6,1 ^{abc}	1,4±0,2 ^{ab}
	-	1,5	100 ^a	4,9±0,8 ^a	28,1±3,1 ^{ab}	1,2±0,5 ^a
Medio líquido <i>Ventilación asistida (IT)</i>	-	-	63±11,6 ^{ab}	1,5±0,3 ^c	23,7±6,1 ^{abc}	2,9±0,5 ^{ab}
	0,1	-	47±15,3 ^b	2,3±0,8 ^{bc}	19,8±7,9 ^{bc}	1,6±0,1 ^{ab}
	0,25	-	57±20,8 ^{ab}	2,1±0,8 ^{bc}	16,7±1,1 ^{bc}	2,5±1,2 ^{ab}
	0,5	-	60±26,5 ^{ab}	2,4±1,1 ^{bc}	13,1±4,5 ^c	2,2±0,8 ^{ab}
	-	0,5	47±15,3 ^b	1,7±0,6 ^{bc}	24,3±6,0 ^{abc}	1,9±0,4 ^{ab}
	-	1,0	43±20,3 ^b	2,1±0,1 ^{bc}	22,8±6,5 ^{abc}	3,3±1,6 ^b
	-	1,5	77±15,3 ^{ab}	2,0±0,5 ^{bc}	24,3±4,8 ^{abc}	2,1±0,1 ^{ab}

Los valores expresan el promedio de tres repeticiones ± SD (n= 10). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$ Test de Comparaciones Múltiples de Tukey). PSA/PSR: relación entre el peso seco de la parte aérea y radical. Fitohormonas expresadas en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

El análisis histológico de la ontogenia del órgano indicó que en medios semisólidos ésta inicia el día 5 y finaliza el día 9; mientras que en brotes sujetos a inmersión temporal, los primeros indicios del proceso morfogénico ocurre el día 3 y las raíces atraviesan la epidermis transcurridos 7 días (Fig. 20). En ambos casos, las primeras divisiones celulares del floema y del parénquima interfascicular darán origen al primordio radical. El proceso morfogénico ocurre de manera directa, sin formación de callo.

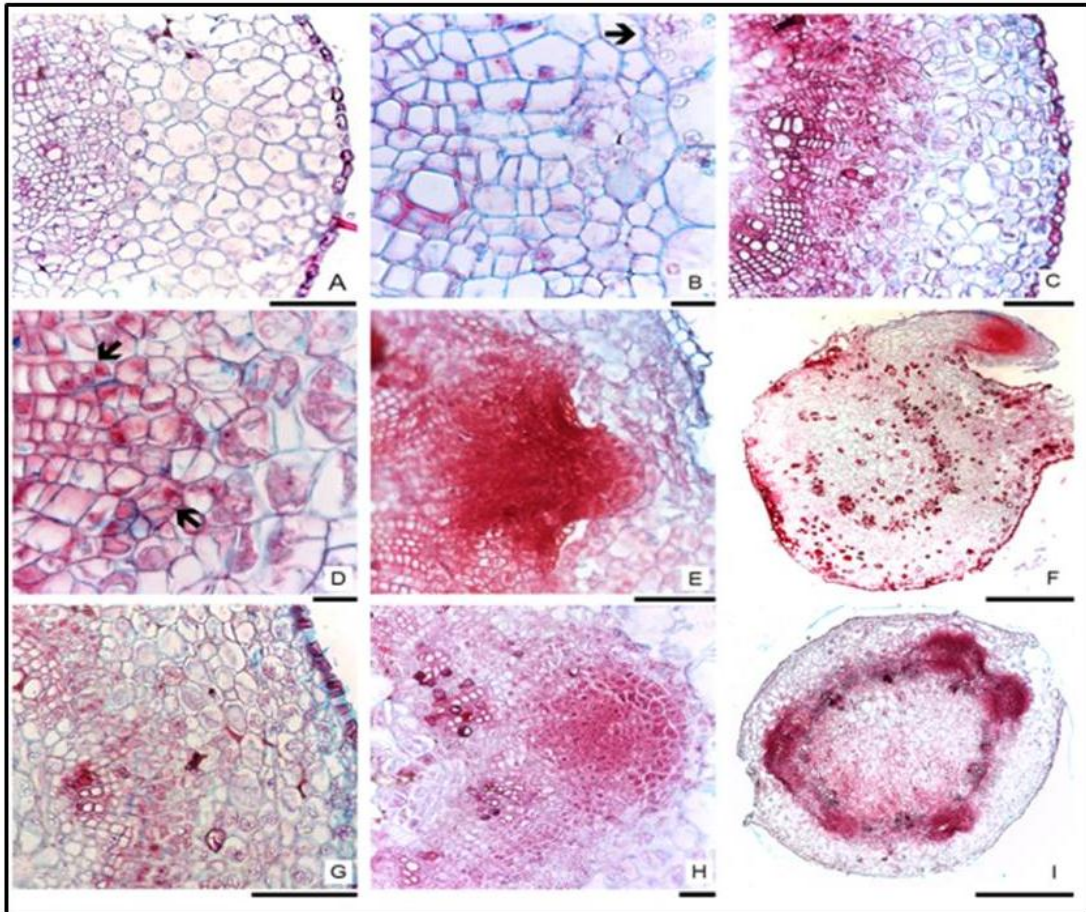


Fig. 20: Ontogenia de la rizogénesis en brotes de *Cedrela fissilis* cultivados en medios líquidos y semisólidos. **A**, Corte transversal del tallo al inicio del experimento muestra la estructura primaria formada por una estela de haces colaterales abiertos. **B**, Detalle de la zona cambial y floema primario. La flecha indica la acumulación de granos de almidón en el córtex. **C-F**, *Inmersión temporal*. Vista general (**C**) y divisiones celulares en parénquima floemático señalizadas con la flecha (**D**) transcurridos 3 días de incubación **E**, Primordio radical formado (día 5). **F**, Corte transversal del tallo con dos raíces laterales completamente formadas (día 7). **G-I**, *Medio semisólido*. **G**, inicio de divisiones celulares del parénquima floemático (día 5). **H**, primordio radical en formación (día 6). **I**, primordios radicales sin emerger del córtex (día 7), este estado es equivalente al día 5 del cultivo en inmersión temporal (**E**). Las barras indican: 20 (D, B), 100 (A, C, E, G, H) y 500 μm (F, I), respectivamente.

Independientemente del sistema de cultivo empleado, el 100% de las plantas sobrevivieron durante el periodo de aclimatación. Sin embargo, aquellas provenientes de los biorreactores de inmersión temporal se caracterizaron por evidenciar un mayor tamaño respecto a las vitroplantas producidas por sistema convencional en medios semisólidos, alcanzando una altura promedio $27,6 \pm 2,6$ y $17,4 \pm 3,2$ cm respectivamente (Fig. 21).



Fig. 21: Enraizamiento *in vitro* y producción de plantas de *Cedrela fissilis* a partir de brotes obtenidos por multiplicación de yemas preexistentes y cultivados en medios semisólido (A-C) o líquidos (D-F). La barra indica 1 cm (B, E), 2 cm (A, D) y 5 cm (C, F).

***Cordia trichotoma* [Vell.] Arrab. ex Steudel.**

Establecimiento y germinación *in vitro* de semillas

Detección e incidencia del daño producido por A. longesuturalis.

Las semillas de *C. trichotoma* son intensamente afectadas por el ataque del coleóptero *Amblycerus longesuturalis*, cuya hembra ovipone los frutos verdes que alcanzaron su completo desarrollo. Una vez que las larvas eclosionan se desplazan hacia el interior del fruto por uno de sus lados, provocando daños variables a la semilla, por la ingesta de los cotiledones que al ocasionar una germinación lenta e irregular, dificulta la producción masiva de plantines. Tomando en consideración que en el contexto de este trabajo de tesis, se detectó una acentuada incidencia de *A. longesuturalis* (Fig. 22) en semillas provenientes de la Reserva de Uso Múltiple Guaraní, en donde más del 80% de las semillas presentaron daños resultantes de su ataque, se desarrolló una clasificación de daños mediante escisión de frutos, determinándose daños moderados a severos en el 50% de las simientes evaluadas (Fig. 23); mientras que solo un $18,7 \pm 3,5\%$ de éstas no presentaron daños visibles, detectándose la presencia del insecto en todos sus estadios de desarrollo.



Fig. 22: Ejemplar adulto de *A. longesuturalis* en semillas de *Cordia trichotoma*. Barra indica 1 mm

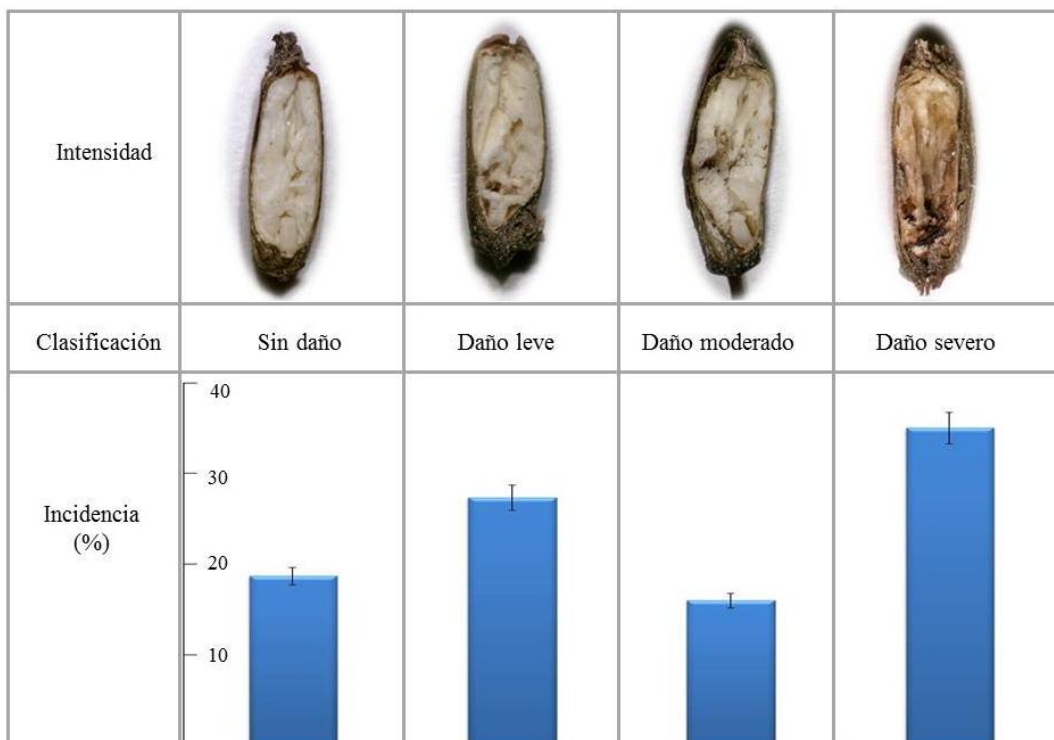


Fig. 23: Intensidad, clasificación e incidencia de daños producidos por *A. longesuturalis* en frutos de *C. trichotoma*. **Sin daño**, ausencia de lesiones visibles; **Daño leve**, 25% del tejido dañado en posición opuesta al embrión; **Daño moderado**, 50% del tejido dañado en posición opuesta al embrión; **Daño severo**, mayor al 50% del tejido dañado en posición opuesta al embrión.

En una segunda etapa, con el propósito de establecer un método no destructivo que facilitara la separación de las semillas sin daño visible para ser utilizadas en los ensayos de germinación, se realizó una prueba de rayos X donde fue posible detectar la presencia/ausencia de daños producidos por el insecto (Fig. 24).

En Tabla 7 se presenta la evaluación de la clasificación final de los frutos con la matriz de confusión; los resultados obtenidos muestran que la coincidencia en ambas técnicas es del 100% en frutos sin daños, lo que es considerado como excelente ya que

la importancia de esta categorización radica en la aceptación de frutos totalmente sanos para su siembra; mientras que para frutos con daños fue solo del 46%. Si bien no existen antecedentes en la fiabilidad del sistema de diagnóstico por imágenes para frutos y/o semillas de la especie en cuestión; los resultados de esta tesis indican la factibilidad de utilizar la misma en frutos drupáceos favorecidos por el tamaño de sus semillas y el escaso espesor de los cotiledones que permitieron una óptima penetración de la radiación, lo que si bien actuó en desmedro de la calidad de la imagen, posibilitó la obtención de un patrón radiográfico claro y apto para detectar semillas sanas; no así para las que presentaban distintos niveles de daño, lo que hizo que la disponibilidad de germoplasma para la obtención de plantas fuera menor que utilizando la técnica de escisión de frutos.

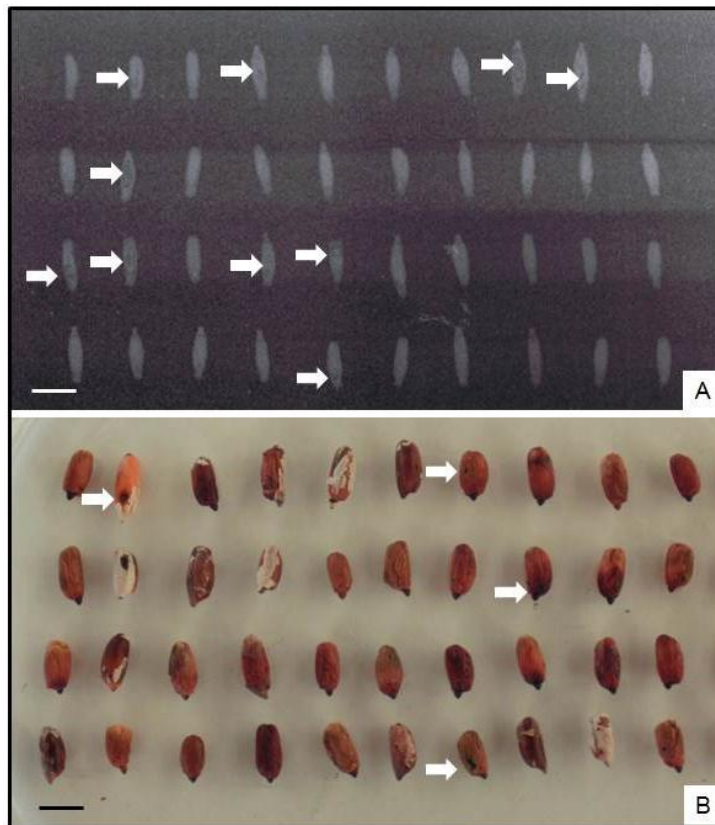


Fig. 24: Imagen por rayos X (A) y Prueba Topográfica por Tetrazolio (B) de frutos y semillas de *C. trichotoma*. Las flechas muestran el daño en semillas. La barra indica 1 cm.

Tabla 7: Evaluación de la clasificación final del sistema semillas de *C. trichotoma* sin daño/con daño.

Test de Tetrazolio		Rayos X		Coincidencia %
		Sin daño	Con daño	
Sin daño	24	24	0	100
Con daño	76	41	35	46

Escarificación, desinfección y germinación in vitro de semillas

En Tabla 8 se observa la tasa de germinación *in vitro* acumulada de semillas de *C. trichotoma* transcurridos 30 días de incubación en las condiciones químicas y físicas descritas en materiales y métodos. Se pudo observar que la persistencia del fruto restringió el proceso de germinación, el cual únicamente pudo ser revertido mediante el empleo de una correcta combinación de los agentes químicos evaluados. En presencia de una concentración baja de NaClO, el proceso germinativo solo fue escasamente promovido mediante la aplicación de un pre-tratamiento prolongado en una solución de H₂O₂; mientras que el incremento en la concentración de NaClO sólo fue efectivo cuando se combinó con un tiempo mínimo de exposición (3 días) en una solución acuosa de H₂O₂, en donde el 66,7±5,8% de las semillas que conservaban el pericarpio germinaron brindando una plántula normal (Fig. 25). La remoción del fruto favoreció fuertemente el proceso de germinación como así también los parámetros de vigor evaluados. En general, el tiempo transcurrido desde la siembra hasta el inicio de la germinación, el porcentaje de germinación acumulado diario obtenido al momento en que la tasa de germinación alcanza su valor máximo y el tiempo medio de germinación, disminuyeron notablemente al utilizar semillas desprovistas del pericarpio, incrementando en consecuencia el índice de velocidad de germinación (IVG).

En este sentido el test de comparaciones múltiples de Tukey reveló diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en todos los tratamientos ensayados, pudiendo observarse que el pre-tratamiento de los frutos en una solución acuosa de H₂O₂ 50% durante 10 días, independientemente de la concentración de NaClO utilizada, permitió que más del 90% de los explantes no presentaran indicios de contaminación visible.

Tabla 8: Efecto de distintos tratamientos de escarificación y desinfección sobre los parámetros de vigor de semillas de *Cordia trichotoma* cultivadas *in vitro*.

Tratamiento		Cultivos sin contaminación visible (%)		Germinación (%)		TMG (50%)		IVG (semilla/día)	
H ₂ O ₂ [%] x días	NaClO (%)	Pericarpio							
		+	-	+	-	+	-	+	-
30 x 3 d	1,65	0 ^c	3±5,8 ^e	0 ^c	20±17,3 ^{bcd}	0 ^b	5,2±1,4 ^b	0 ^c	1,7±0,9 ^{cd}
	2,75	3±5,8 ^c	33±11,6 ^{cde}	0 ^c	60±10 ^{abc}	0 ^b	4,5±0,2 ^b	0 ^c	2,1±0,7 ^{bcd}
50 x 3 d	1,65	97±5,8 ^a	100 ^a	67±5,8 ^a	90±0 ^a	19,3±0,5 ^a	5,6±0,1 ^b	0,4±0,03 ^a	2,1±0,2 ^{bcd}
	2,75	83±11,8 ^a	100 ^a	40±10 ^b	93±11,6 ^a	23,1±3,7 ^a	7,0±0,6 ^b	0,2±0,06 ^b	1,7±0,7 ^{bcd}
30 x 5 d	1,65	0 ^c	40±30,0 ^{bcde}	0 ^c	60±17,3 ^{abc}	0 ^b	3,9±0,6 ^{ab}	0 ^c	2,4±0,3 ^{bcd}
	2,75	3±5,8 ^c	13±3,1 ^{de}	0 ^c	70±20 ^a	0 ^b	3,7±0,5 ^{ab}	0 ^c	3,2±0,9 ^{abc}
50 x 5 d	1,65	83±15,3 ^a	57±41,6 ^{abcd}	20±0 ^{bc}	50±40 ^{abcd}	17,3±15 ^a	5,8±2,3 ^b	0,1±0,01 ^b	0,9±0,6 ^{cd}
	2,75	100 ^a	100 ^a	20±0 ^{bc}	77±15,3 ^a	26,3±3,2 ^a	4,8±0,4 ^b	0,1±0,05 ^b	2,7±0,1 ^{abcd}
30 x 10 d	1,65	47±30,6 ^b	87±5,8 ^{ab}	10±0 ^c	87±11,6 ^a	22,3±3,5 ^a	3,8±1,8 ^{ab}	0,05±0,01 ^{bc}	5,1±2,9 ^a
	2,75	20±17,5 ^{bc}	83±11,6 ^{abc}	3±5,8 ^c	80±10 ^a	23±13,3 ^a	4,4±1,1 ^b	0,04±0,03 ^c	3,9±0,5 ^{ab}
50 x 10 d	1,65	100 ^a	97±5,8 ^a	0 ^c	17±5,8 ^{cd}	0 ^b	3,5±2,3 ^{ab}	0 ^c	1,1±0,9 ^{cd}
	2,75	100 ^a	93±11,6 ^a	0 ^c	7±5,8 ^d	0 ^b	0,7±0,6 ^a	0 ^c	0,7±0,6 ^d

TMG, tiempo medio de germinación. **IVG**, índice de velocidad de germinación. Los valores expresan el promedio de tres repeticiones ± SD (n= 10). Signos +/- indican presencia/ausencia del pericarpio.

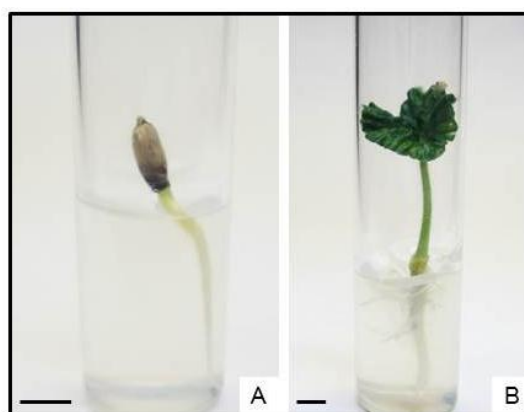


Fig. 25: Germinación *in vitro* de semillas de *C. trichotoma* transcurridos 15 días de cultivo. **A** con pericarpio, **B** sin pericarpio. Barra indica 5 mm.

Establecimiento, multiplicación y obtención de plantas a partir del cultivo *in vitro* de segmentos caulinares.

No se observaron síntomas de contaminación en ninguno de los tratamientos ensayados; a la vez que la incidencia del ennegrecimiento tisular fue leve, variando entre 3,3±5,8 y 6,7±5,8%; hecho por el cual, el establecimiento *in vitro* de los cultivos fue superior al 90%. Transcurridos 60 días de incubación, el 100% de los segmentos caulinares cotiledonares brotaron brindando 2 a 4±0,5 brotes/explante con más de 7 mm

de longitud (Tabla 9). En tanto que entre un $67\pm 5,8$ y $93\pm 5,8\%$ de los segmentos caulinares foliares formaron de 1 a $2,4\pm 0,4$ brotes por explante que alcanzaron de $4,5\pm 0,7$ a $6,1\pm 2,2$ mm de longitud. La suplementación del MS con BAP ya sea combinado con ANA o IBA incrementó el número de brotes diferenciados por explante (Fig. 26).

Tabla 9: Efecto de la adición de ANA, IBA y BAP sobre la inducción de brotes en segmentos caulinares cotiledonares y foliares.

Fitoreguladores ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)			Explantes que brindan brotes (%)		Brotes/explantes		Longitud promedio (mm)	
ANA	IBA	BAP	SCC	SCF	SCC	SCF	SCC	SCF
-	-	-	100	$67\pm 5,8^b$	$2,0\pm 0^c$	$1,0\pm 0,0^b$	$7,0\pm 0,3^a$	$6,1\pm 2,2^a$
0,01	-	0,2	100	$93\pm 5,8^a$	$3,5\pm 0,5^{ab}$	$2,1\pm 0,2^a$	$8,3\pm 1,7^a$	$4,7\pm 0,6^a$
0,1	-	0,2	100	$87\pm 11,6^a$	$2,7\pm 0,6^{bc}$	$1,9\pm 0,4^a$	$7,5\pm 2,2^a$	$4,6\pm 0,5^a$
-	0,1	0,2	100	$93\pm 5,8^a$	$3,7\pm 0,2^{ab}$	$2,4\pm 0,4^a$	$7,7\pm 0,7^a$	$4,5\pm 0,7^a$
-	0,2	0,2	100	$93\pm 5,8^a$	$4,0\pm 0,5^a$	$2,3\pm 0,3^a$	$8,7\pm 0,7^a$	$4,8\pm 0,6^a$

Los valores expresan el promedio de tres repeticiones \pm SD ($n=10$). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P\leq 0,05$ Test de Comparaciones Múltiples de Tukey). **SCC**, segmento caular a la altura de inserción de los cotiledones; **SCF** segmento caular correspondiente al primer nudo por encima de los cotiledones.

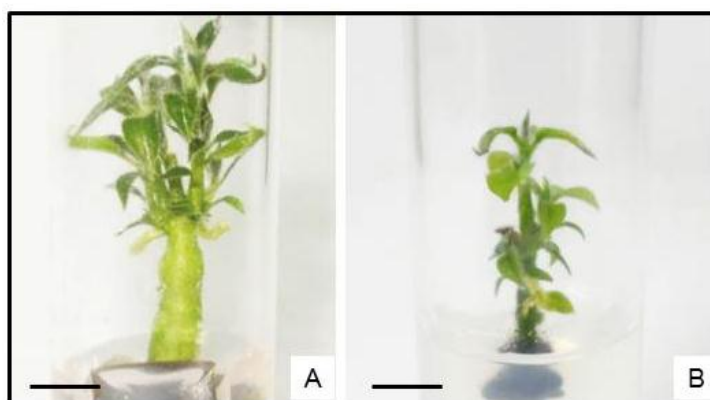


Fig. 26: Formación de múltiples brotes a partir del cultivo *in vitro* de segmentos nodales a la altura de inserción de los cotiledones (A) y primer nudo por encima de los cotiledones (B). La barra indica 5 mm.

Seguidamente, segmentos caulinares con múltiples brotes cultivados en un medio MS adicionado con IBA $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y BAP $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fueron transferidos a medios fresco constituido por una solución, semisólida o líquida, de MS/2, con o sin el agregado de GA_3 , con el propósito de estimular su crecimiento. Al finalizar el experimento pudo observarse que, independientemente de la condición física de la solución, la suplementación al medio de cultivo con GA_3 no tuvo un efecto positivo sobre el alargamiento caular (Tabla 10). Si bien, no existieron diferencias

significativas entre tratamientos, los brotes cultivados en medios semisólidos denotaron un menor crecimiento comparado con aquellos provenientes de inmersión temporal; a la vez que entre un 10 y 27±15,3% de los tallos presentaron síntomas de necrosis distal. El uso de medios líquidos produjo desordenes fisiológicos atribuibles a un alto grado de vitrificación de los brotes resultantes, que impidieron su transferencia a la fase de enraizamiento (Fig. 27).

Tabla 10: Efecto de la adición al medio de cultivo semisólido y líquido con GA₃ sobre el crecimiento de brotes de *Cordia trichotoma*.

Sistema de cultivo	GA ₃ (mg·L ⁻¹)	Brotes con más de 5 mm de longitud (%)	Longitud promedio (mm)	Explantos ennegrecidos (%)	Explantos con hiperhidricidad (%)
Medio semisólido <i>Ventilación por difusión</i>	0	65±18,2 ^a	9,7±1,0 ^b	10±0 ^b	0 ^a
	0,5	67±16,4 ^a	9,6±1,8 ^b	10±0 ^b	0 ^a
	1,0	69±0,9 ^a	9,0±2,2 ^b	27±15,3 ^b	0 ^a
	1,5	66±2,3 ^a	9,8±1,4 ^b	23±15,3 ^b	0 ^a
Medio líquido <i>Ventilación asistida (IT)</i>	0	75±8,9 ^a	26,4±14,3 ^a	0 ^a	100 ^b
	0,5	74±12,1 ^a	16,3±5,2 ^{ab}	0 ^a	100 ^b
	1,0	75±4,8 ^a	15,6±4,3 ^{ab}	0 ^a	100 ^b
	1,5	76±9,2 ^a	19,8±1,4 ^{ab}	0 ^a	100 ^b

Los valores expresan el promedio de tres repeticiones ± SD (n= 10). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$ Test de Comparaciones Múltiples de Tukey).

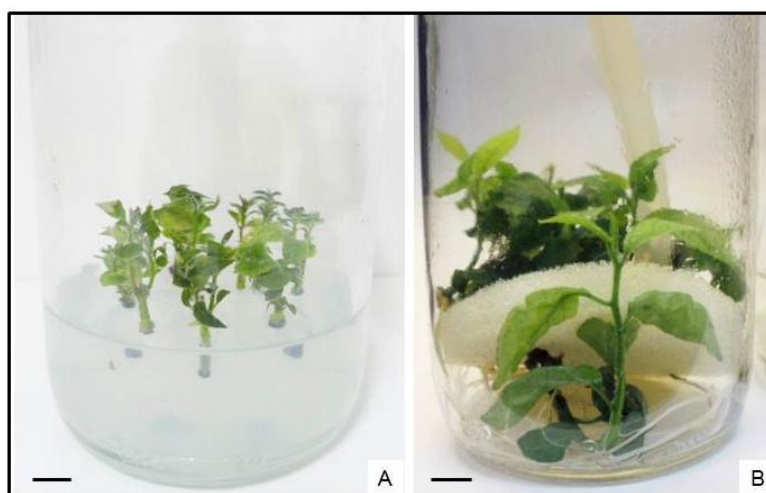


Fig. 27: Crecimiento de brotes cultivados en MS semisólido (A) o líquido (B) basado en el principio de inmersión temporal. En A y B, la barra indica 1 cm.

Entre el 50 y 80% de los brotes provenientes de medios semisólidos formaron raíces a través de un sistema directo de regeneración (Tabla 11). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ensayados en ninguno de los parámetros

evaluados, comprobándose una sobrevivencia de $87\pm 11,6\%$ al finalizar el periodo de aclimatación (Fig. 28).

Tabla 11: Efectos de la adición al medio de cultivo con ANA e IBA sobre la formación de raíces adventicias en brotes cultivados en MS/2 semisólido.

ANA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	IBA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Enraizamiento (%)	Raíces/brote	Longitud promedio (mm)	Relación PSA/PSR
-	-	$50\pm 10,0^a$	$1,3\pm 0,2^a$	$20,7\pm 0,6^a$	$1,3\pm 0,1^a$
0,1	-	$60\pm 0,0^a$	$1,6\pm 0,1^a$	$23,5\pm 5,4^a$	$1,1\pm 0,3^a$
0,25	-	$63\pm 30,6^a$	$1,7\pm 0,6^a$	$25,0\pm 2,5^a$	$1,1\pm 0,1^a$
0,5	-	$60\pm 20,0^a$	$1,1\pm 0,4^a$	$19,0\pm 3,4^a$	$1,7\pm 0,4^a$
-	0,5	$80\pm 10,0^a$	$1,5\pm 0,2^a$	$26,8\pm 3,1^a$	$1,3\pm 0,5^a$
-	1,0	$77\pm 25,2^a$	$1,5\pm 0,4^a$	$28,9\pm 0,5^a$	$1,0\pm 0,1^a$
-	1,5	$67\pm 15,5^a$	$1,4\pm 0,1^a$	$25,8\pm 3,8^a$	$1,1\pm 0,2^a$

Los valores expresan el promedio de tres repeticiones \pm SD ($n=10$). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (Test de Comparaciones Múltiples de Tukey, $P\leq 0,05$).

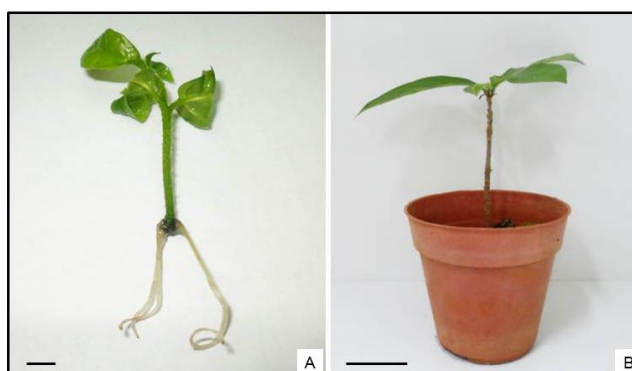


Fig. 28: Formación de raíces adventicias (A) y obtención de plantas (B) de *Cordia trichotoma* a partir del cultivo de segmentos nodales en medios semisólidos. La barra indica 5 mm (A) y 5 cm (B).

Handroanthus heptaphyllus (Vell.) Mattos

Establecimiento y germinación *in vitro* de semillas

Con el propósito de desarrollar un procedimiento que permita el establecimiento *in vitro* exitoso de semillas de *H. heptaphyllus* y una elevada tasa de germinación que brinde plantas normales sin daños por fitotoxicidad, a partir de un pre-tratamiento mediante inmersión de las semillas en etanol 70° durante 1 min, luego éstas fueron sumergidas durante 20 min en soluciones acuosas que contenían 0,2% del agente tensoactivo no iónico e hipoclorito de sodio en concentraciones variables, combinadas o no con agitación orbital (40 r.p.m.) durante la inmersión.

En todos los casos, el establecimiento *in vitro* de las semillas fue superior al 85% (Tabla 12). Los tratamientos de desinfección sin agitación no revirtieron el proceso de dormición de las mismas por lo que la germinación fue nula. No obstante, la agitación orbital de la solución de NaClO permitió que entre un 23±5,8 y 63±15,3% de las semillas germinaran; siendo máxima cuando éstas fueron sumergidas en una solución con la concentración más alta estudiada; en donde pudo observarse un incremento en la velocidad de germinación (TMG=11,9±2,5 días; IVG= 0,6±0,2), sin provocar daños por fitotoxicidad.

Tabla 12: Efecto de diferentes tratamientos desinfectantes sobre el establecimiento *in vitro* y germinación de semillas de *Handroanthus heptaphyllus*.

NaClO (%)	Agitación	Cultivos sin contaminación visible (%)	Germinación (%)	TMG (días)	IVG (semillas/día)	Plantas normales (%)
0,27	-	87±15,3 ^a	0 ^c	-	-	-
0,55	-	93±5,8 ^a	0 ^c	-	-	-
0,82	-	97±5,8 ^a	0 ^c	-	-	-
1,10	-	93±5,8 ^a	0 ^c	-	-	-
1,37	-	97±5,8 ^a	0 ^c	-	-	-
0,27	+	90±0,0 ^a	30±10,0 ^b	15,0±1,7 ^a	0,2±0,0 ^b	100 ^a
0,55	+	87±5,8 ^a	23±5,8 ^b	13,8±0,3 ^a	0,2±0,0 ^b	100 ^a
0,82	+	87±5,8 ^a	43±11,5 ^{ab}	15,2±1,8 ^a	0,3±0,1 ^b	100 ^a
1,10	+	90±0,0 ^a	33±5,8 ^b	13,6±2,2 ^a	0,3±0,1 ^b	100 ^a
1,37	+	93±5,8 ^a	63±15,3 ^a	11,9±2,5 ^a	0,6±0,2 ^a	100 ^a

Los valores expresan el promedio de tres repeticiones ± SD (n= 10). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$ Test de Comparaciones Múltiples de Tukey).

Tomando en consideración que el efecto benéfico de la agitación orbital podría atribuirse a la inactivación o remoción de eventuales sustancias inhibitoras de la germinación, se evaluó el experimento en semillas desprovistas del tegumento. Todos los tratamientos fueron altamente efectivos en el control de la contaminación causada por hongos (Tabla 13). Sin embargo, se observaron daños severos por fitotoxicidad en el ámbito de las raíces, tallos y hojas en plántulas provenientes de los tratamientos con agitación.

La tasa de germinación varió entre 80,0±1,0 y 96,7±0,6%. Las concentraciones de NaClO evaluadas no afectaron significativamente TMG e IVG. Las semillas desprovistas de tegumentos comenzaron a germinar el día 2 y continuaron durante 1

semana. Las plántulas alcanzaron el estado de dos hojas transcurridos 15 días de incubación (Fig. 29).

El uso de un tratamiento de desinfección consistente en la inmersión de semillas desprovistas de tegumentos en una solución de etanol 70% durante 1 min y transferencia a NaClO 0,82 % durante 15 min, sin agitación, resultó altamente efectivo en el control de la contaminación fúngica y germinación. Mediante el uso del mencionado tratamiento, $93,3\pm 1,1\%$ de los cultivos no presentaron síntomas de contaminación visible, permitiendo que el 100% de las semillas cultivadas germinaran.

Tabla 13: Efecto de diferentes tratamientos desinfectantes sobre el establecimiento *in vitro* y germinación de semillas de *Handroanthus heptaphyllus* desprovistas del tegumento.

NaClO (%)	Agitación	Cultivos sin contaminación visible (%)	Germinación (%)	TMG (días)	IVG (semillas/día)	Plantas normales (%)
0,27	-	$97\pm 0,6^a$	$93\pm 0,6^a$	$3,4\pm 0,2^a$	$3,0\pm 0,4^a$	100 ^a
0,55	-	$97\pm 0,6^a$	$97\pm 0,6^a$	$3,1\pm 0,5^a$	$3,4\pm 0,6^a$	100 ^a
0,82	-	$93\pm 1,1^a$	100 ^a	$3,3\pm 0,5^a$	$3,6\pm 0,3^a$	$96\pm 6,4^a$
1,10	-	$97\pm 0,6^a$	$90\pm 1,7^a$	$3,1\pm 0,4^a$	$3,2\pm 0,8^a$	$97\pm 2,8^a$
1,37	-	$93\pm 0,6^a$	$90\pm 1,0^a$	$2,9\pm 0,2^a$	$3,2\pm 0,5^a$	$89\pm 10,0^{ab}$
0,27	+	$87\pm 1,5^a$	$80\pm 1,0^a$	$3,1\pm 0,4^a$	$2,9\pm 0,1^a$	$44\pm 29,5^b$
0,55	+	$97\pm 0,6^a$	$87\pm 0,6^a$	$3,7\pm 0,5^a$	$2,9\pm 0,6^a$	$60\pm 37,7^{ab}$
0,82	+	100 ^a	$93\pm 0,6^a$	$3,0\pm 0,1^a$	$3,2\pm 0,2^a$	$79\pm 9,5^{ab}$
1,10	+	$87\pm 1,5^a$	$87\pm 1,5^a$	$3,1\pm 0,1^a$	$2,9\pm 0,5^a$	$79\pm 21,4^{ab}$
1,37	+	100 ^a	$90\pm 1,0^a$	$2,9\pm 0,1^a$	$3,1\pm 0,4^a$	$90\pm 10,0^{ab}$

Los valores expresan el promedio de tres repeticiones \pm SD (n= 10). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P\leq 0,05$ Test de Comparaciones Múltiples de Tukey).

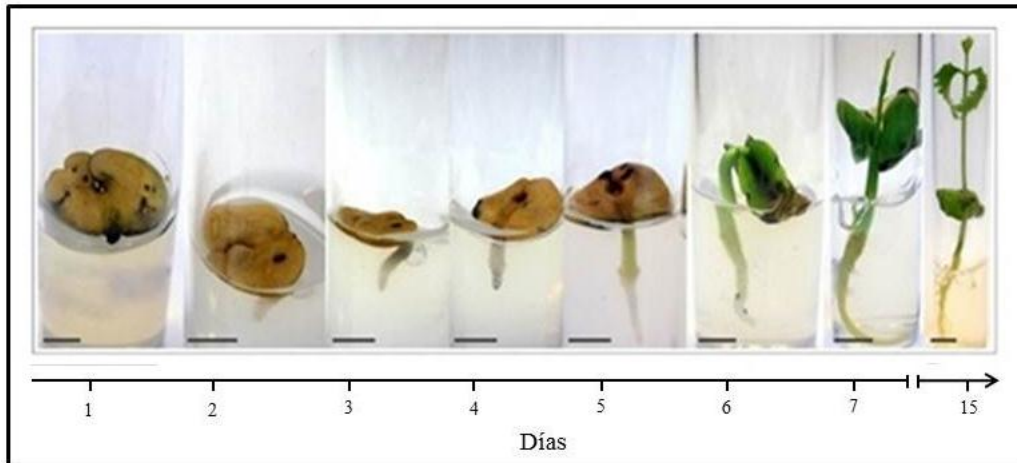


Fig. 29: Germinación *in vitro* de semillas desprovistas de tegumento y crecimiento de plántulas de *H. heptaphyllus* cultivadas en MS bajo condiciones de luz. En todos los casos, la barra indica 5 mm.

Establecimiento, multiplicación y obtención de plantas a partir del cultivo *in vitro* de segmentos caulinares.

Los experimentos preliminares indicaron que más del 90% de los segmentos caulinares cotiledonares y foliares cultivados en MS con $30 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$ sacarosa brotaron transcurridos 15 días de incubación en las condiciones ambientales descritas en materiales y métodos (Tabla 14). La adición de BAP al medio de cultivo promovió la formación de nuevos brotes sin afectar su elongación. Sin embargo, el agregado de $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA restringió el crecimiento de los brotes debido a la excesiva proliferación de callos en la base de los explantes. Los mejores resultados se obtuvieron cuando los explantes fueron cultivados en MS con $30 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$ sacarosa suplementado con $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP; en el cual, $97\pm 5,8\%$ de SCC y SCF brotaron y produjeron $5,6\pm 0,6$ y $4,2\pm 0,5$ brotes por explante con $10,8\pm 0,9$ and $7,4\pm 1,1$ mm de longitud, respectivamente.

En una segunda etapa, a fin de promover el crecimiento de los brotes resultantes, SCC y SCF establecidos en MS suplementado con $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP fueron transferidos a medios frescos, semisólidos o líquidos, compuestos por MS/2 con 15 g L^{-1} sacarosa y $0-1,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃ y sujetos ya sea a ventilación por difusión o asistida. Transcurridos 30 días de incubación pudo observarse que el alargamiento de los tallos no fue promovido por la adición al medio de cultivo con GA₃ o el uso de ventilación asistida (Tabla 15). Sin embargo, la longitud promedio de los brotes fue variable entre $9,3\pm 2,0$ y $25,8\pm 5,8$ mm; mientras que la necrosis distal suscitadas en el ámbito de los ápices, desde $1,0\pm 0,1$ a $20,5\pm 3,7\%$, fue mínima cuando ambos explantes fueron cultivados en biorreactores de inmersión temporal (Fig. 30).

Tabla 14: Efecto de la suplementación al medio basal con IBA y BAP sobre el crecimiento de brotes provenientes de segmentos caulinares cotiledonares y foliares.

Fitohormonas (mg·L ⁻¹)		Explantos con brotes (%)		Número promedio de brotes por explantes		Longitud promedio (mm)	
IBA	BAP	SCC	SCF	SCC	SCF	SCC	SCF
-	-	100 ^a	100 ^a	3,3±0,1 ^b	2,0±0,2 ^c	16,8±2,1 ^b	8,8±1,5 ^b
-	1	100 ^a	100 ^a	3,1±0,4 ^b	3,1±0,3 ^b	25,2±0,4 ^a	13,6±1,3 ^a
-	2	97±5,8 ^a	97±5,8 ^a	4,5±0,5 ^a	3,1±0,4 ^b	16,5±6,1 ^{bc}	8,7±2,3 ^b
-	3	93±5,8 ^a	93±5,8 ^a	4,5±0,8 ^a	3,3±0,2 ^{ab}	11,4±2,5 ^{bcd}	5,1±0,4 ^c
-	4	97±5,8 ^a	100 ^a	4,8±0,0 ^a	3,8±0,3 ^{ab}	9,6±1,1 ^d	6,7±0,2 ^{bc}
-	5	97±5,8 ^a	97±5,8 ^a	5,6±0,6 ^a	4,2±0,5 ^a	10,8±0,9 ^{bcd}	7,4±1,1 ^{bc}
0,2	1	97±5,8 ^a	90±10,0 ^a	4,7±0,3 ^a	3,5±0,3 ^{ab}	13,6±1,4 ^{bcd}	9,3±0,7 ^{ab}
0,2	2	100 ^a	100 ^a	4,9±0,6 ^a	4,1±0,1 ^a	10,5±0,9 ^{cd}	8,4±0,4 ^b
0,2	3	100 ^a	100 ^a	5,7±0,4 ^a	4,0±0,4 ^{ab}	10,0±0,2 ^d	8,5±1,5 ^b
0,2	4	100 ^a	100 ^a	5,2±0,4 ^a	3,5±0,1 ^{ab}	8,8±0,8 ^d	7,1±0,9 ^{bc}
0,2	5	97±5,8 ^a	97±5,8 ^a	5,3±0,4 ^a	4,1±0,3 ^a	10,9±0,3 ^{bcd}	7,6±0,3 ^{bc}

Los valores expresan el promedio de tres repeticiones ± SD (n= 10). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$ Test de comparaciones múltiples de Tukey). **SCC** y **SCF** segmentos caulinares cotiledonares y foliares, respectivamente.

Tabla 15: Efecto de diferentes sistemas de cultivos y giberelina A₃ sobre el crecimiento de brotes cultivados en MS/2.

Sistema de cultivo	GA ₃ (mg·L ⁻¹)	Brotes con más de 5 mm de longitud (%)		Longitud promedio de los brotes (mm)		Brotes con necrosis distal (%)	
		SCC	SCF	SCC	SCF	SCC	SCF
Medio semisólido. <i>Ventilación por difusión.</i>	0	57±2,0 ^a	41±4,8 ^a	15,3±0,8 ^{bcd}	14,5±0,9 ^{bcd}	13,1±1,5 ^{bc}	13,7±0,8 ^b
	0,5	47±6,3 ^a	50±11,7 ^a	11,5±0,8 ^{cd}	11,5±0,9 ^{de}	10,7±2,3 ^{bc}	14,9±2,6 ^b
	1,0	51±1,4 ^a	52±3,8 ^a	12,8±1,0 ^{bcd}	12,3±1,8 ^{cde}	10,3±0,4 ^{bc}	13,7±0,5 ^b
	1,5	45±4,7 ^a	45±7,9 ^a	12,2±2,6 ^{bcd}	11,9±1,1 ^{cde}	9,6±2,6 ^b	12,9±1,8 ^b
Medio semisólido. <i>Ventilación asistida</i>	0	54±4,9 ^a	45±9,9 ^a	16,9±3,3 ^{bcd}	16,6±1,4 ^{bc}	14,4±2,2 ^c	20,5±3,7 ^c
	0,5	45±3,9 ^a	44±6,8 ^a	13,2±1,0 ^{bcd}	11,0±1,1 ^{de}	11,0±1,5 ^{bc}	15,1±1,2 ^b
	1,0	47±4,4 ^a	45±1,6 ^a	10,2±2,1 ^{cd}	9,5±1,2 ^e	11,6±1,1 ^{bc}	12,4±1,9 ^b
	1,5	49±5,5 ^a	43±5,2 ^a	9,3±2,0 ^d	12,0±1,0 ^{cde}	11,1±0,9 ^{bc}	15,1±0,7 ^b
Medio líquido. <i>Ventilación asistida (IT)</i>	0	54±6,3 ^a	41±6,1 ^a	25,8±5,8 ^a	22,3±2,6 ^a	1,8±0,3 ^a	1,3±0,3 ^a
	0,5	52±5,8 ^a	40±1,4 ^a	18,8±4,8 ^{abc}	14,7±0,9 ^{bcd}	1,0±0,1 ^a	1,4±0,6 ^a
	1,0	51±6,5 ^a	45±5,1 ^a	19,5±2,9 ^{ab}	17,9±2,7 ^{ab}	1,3±0,5 ^a	1,3±1,1 ^a
	1,5	56±1,8 ^a	47±8,9 ^a	16,5±3,3 ^{bcd}	15,3±3,0 ^{bcd}	1,4±0,4 ^a	1,0±0,1 ^a

Los valores expresan el promedio de tres repeticiones ± SD (n= 10). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$ Test de Comparaciones Múltiples de Tukey). **SCC** y **SCF** segmentos caulinares cotiledonares y foliares, respectivamente.

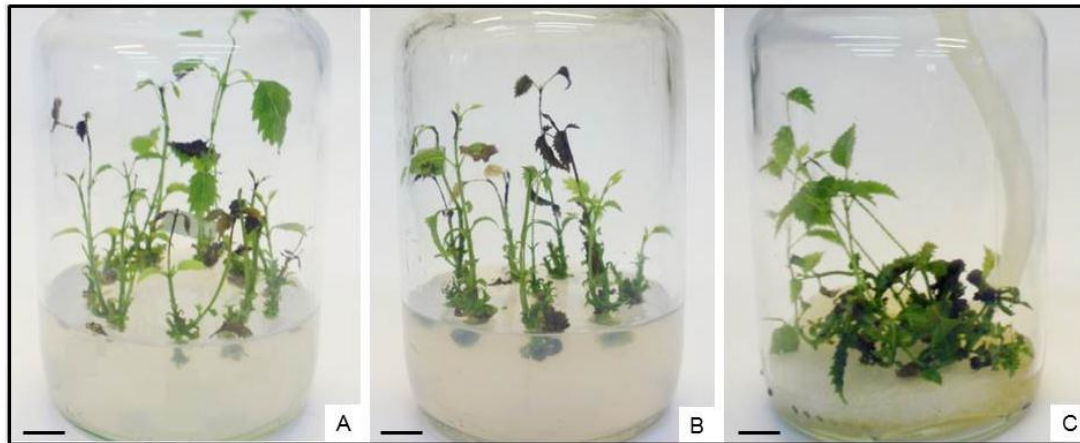


Fig. 30: Crecimiento, diferenciación y necrosis distal en brotes cultivados en medios semisólido con ventilación por difusión (A), semisólido con ventilación asistida (B) y líquidos basado en el uso de sistemas de inmersión temporal automática (C). En todos los casos, la barra indica 1 cm.

El proceso rizogénico de los brotes resultantes fue afectado por la consistencia del medio de cultivo (Tabla 16). Los resultados obtenidos demuestran que $73 \pm 5,8\%$ de los brotes cultivados provenientes de SCF enraizaron en un medio de cultivo simple, compuesto por las sales y vitaminas del MS reducido a la mitad (MS/2) y desprovisto de reguladores del crecimiento. La adición de IBA al medio de cultivo promovió débilmente el proceso morfogénico sin observarse diferencias significativas respecto al tratamiento control. A pesar de que el uso de IT estimuló el crecimiento de tallos de la parte aérea en desmedro del crecimiento radical incrementado la relación PSA/PSR, el crecimiento y diferenciación de las plantas durante la fase de aclimatación fue notablemente mayor en aquellas provenientes de los biorreactores (Fig. 31). En todos los casos, las raíces se originaron mediante un proceso morfogénico directo, sin formación de callos. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó un tratamiento de inducción compuesto por MS/2 con $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA durante 3 días y transferencia a medios frescos de idéntica composición química pero sin reguladores del crecimiento en donde el $97 \pm 5,5\%$ de los brotes formaron 2,4 raíces/explante con una relación PSA/PSR de $4 \pm 1,4$, sin presentar síntomas de fitotoxicidad.

Tabla 16: Efecto de diferentes sistemas de cultivo e IBA sobre el enraizamiento *in vitro* de *H. heptaphyllus*.

Sistema de cultivo	IBA (mg.L ⁻¹)	Enraizamiento (%)	Raíces por brote	Longitud promedio raíces (mm)	Relación PSA/PSR	Brotos con necrosis distal (%)
Medio semisólido <i>Ventilación por difusión</i>	0	30±20,0 ^{bcd}	1,2±0,3 ^a	22,6±2,3 ^{ab}	4,9±1,8 ^{bc}	33±15,3 ^{bcd}
	5	73±11,5 ^{abc}	2,2±0,2 ^a	46,1±7,1 ^a	1,2±0,5 ^{ab}	27±11,6 ^{bcd}
	10	90±17,3 ^{ab}	2,2±0,1 ^a	38,0±7,3 ^{ab}	1,4±0,5 ^{ab}	57±5,8 ^d
	15	70±30,0 ^{abc}	2,5±0,2 ^a	44,9±11,6 ^a	1,2±0,2 ^{ab}	50±10,0 ^d
Medio semisólido <i>Ventilación asistida</i>	0	0 ^d	-	-	-	43±5,8 ^{cd}
	5	30±30,0 ^{cd}	1,7±1,0 ^a	24,1±20,9 ^{ab}	0,6±0,5 ^a	47±15,3 ^d
	10	43±20,8 ^{bcd}	1,5±0,1 ^a	41,9±18,0 ^{ab}	0,7±0,4 ^a	37±20,8 ^{bcd}
	15	27±15,3 ^{cd}	2,3±0,9 ^a	30,7±5,2 ^{ab}	0,6±0,2 ^a	47±11,6 ^d
Medio líquido <i>Ventilación asistida (IT)</i>	0	73±5,8 ^{abc}	2,0±0,5 ^a	16,1±2,5 ^{bc}	8,9±1,1 ^c	13±11,6 ^{abc}
	5	37±32,1 ^{bcd}	1,2±0,7 ^a	11,0±10,1 ^c	3,5±3,2 ^{abc}	7±5,8 ^{ab}
	10	63±11,5 ^{abc}	1,3±0,0 ^a	13,2±3,7 ^c	6,3±0,9 ^{bc}	7±5,8 ^{ab}
	15	97±5,8 ^a	2,4±0,2 ^a	15,4±4,3 ^{bc}	4,0±1,4 ^{abc}	0 ^a

Los valores expresan el promedio de tres repeticiones ± SD (n= 10). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0,05$ Test de Comparaciones Múltiples de Tukey). **PSA:** peso seco de la parte aérea, **PSR:** peso seco radicular

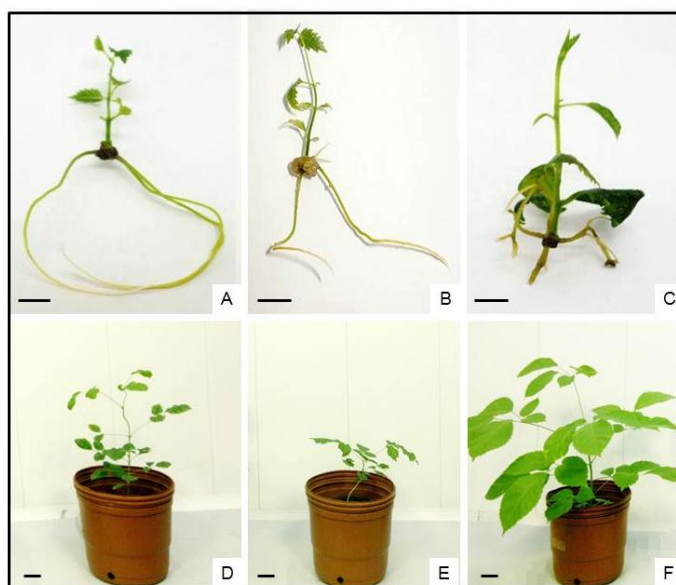


Fig. 31: Rizogénesis adventicia y obtención de plantas de *H. heptaphyllus* a partir de brotes obtenidos por multiplicación de yemas preexistentes y cultivados en medios semisólido (A, B, D, E) o líquidos (C, F). La barra indica 5 mm (A, C y D) y 5 cm (D, E y F).

Myrocarpus frondosus Allemão

Establecimiento y germinación *in vitro* de semillas

La presencia de hongos y bacterias endógenas afectó el establecimiento *in vitro* de semillas de *Myrocarpus frondosus* (Fig. 32). Únicamente la combinación de periodos largos (10 días) de permanencia de las semillas en una solución acuosa de peróxido de hidrógeno y transferencia a hipoclorito de sodio permitió que entre 67±5,8 y 100% de los cultivos no evidenciaran síntomas de contaminación (Tabla 17). Sin embargo, ninguno de los tratamientos evaluados promovió el proceso de germinación.

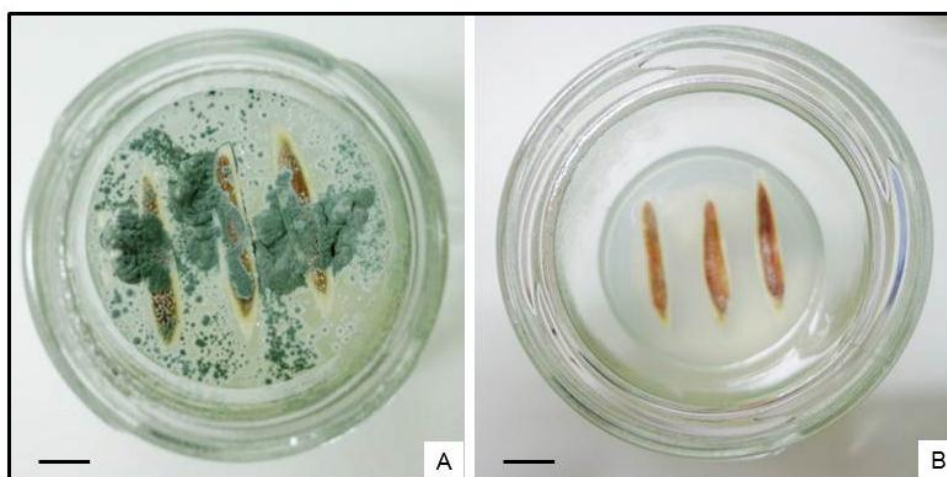


Fig. 32: Establecimiento *in vitro* de semillas de *Myrocarpus frondosus*. **A** semillas infectadas por hongos transcurridos 7 días de cultivo. **B** semillas sin síntomas de contaminación visible luego de 30 días de incubación. En ambos casos, la barra indica 1 cm.

Tabla 17: Efecto de distintos tratamientos de escarificación y desinfección sobre el establecimiento *in vitro*, germinación y vigor de semillas de *Myrocarpus frondosus*.

H ₂ O ₂ [%] x días	NaClO (%)	Cultivo sin contaminación visible (%)	Germinación (%)	TMG (50%)	IVG (semilla/día)
30 x 3 d	1,65	0 ^c	0	-	-
	2,75	0 ^c	0	-	-
50 x 3 d	1,65	0 ^c	0	-	-
	2,75	0 ^c	0	-	-
30 x 5 d	1,65	0 ^c	0	-	-
	2,75	0 ^c	0	-	-
50 x 5 d	1,65	0 ^c	0	-	-
	2,75	0 ^c	0	-	-
30 x 10 d	1,65	67±5,8 ^b	0	-	-
	2,75	73±5,8 ^b	0	-	-
50 x 10 d	1,65	100 ^a	0	-	-
	2,75	100 ^a	0	-	-

TMG, tiempo medio de germinación. **IVG**, índice de velocidad de germinación. Los valores expresan el promedio de tres repeticiones ± SD (n= 10). Signos +/- indican presencia/ausencia del pericarpio.

DISCUSIÓN

Establecimiento y germinación *in vitro* de semillas

La contaminación producida por hongos, bacterias y/o levaduras limitan el establecimiento *in vitro* de semillas colectadas de plantas que crecen en ambientes naturales, debido a que compiten con éstas por las nutrientes presentes en el medio de cultivo, debiéndose establecer un protocolo apropiado para su desinfección (Villalobos y Thorpe, 1991; Ocampo y Núñez, 2007). Un compuesto químico con actividad desinfectante es considerado eficaz cuando, además de ser efectivo en el control de la proliferación del agente contaminante, no afecta el crecimiento y diferenciación del explante. En este sentido, el hipoclorito de sodio, por su reducida toxicidad y bajo costo, ha sido ampliamente utilizado como agente desinfectante en el establecimiento *in vitro* de semillas de numerosas especies (Ocampo y Núñez, 2007; Hernández Jerez *et al.*, 2013). La acción del cloro sobre las proteínas que componen las membranas celulares provee un método de control seguro en microorganismos resistentes (Flores García *et al.*, 2008). El pre-tratamiento de las semillas de *Handroanthus heptaphyllus* en una solución de etanol 70° durante 1 min y posterior transferencia a una solución de NaClO 0,82 g·L⁻¹ durante 15 min, sin agitación, resultó un método eficaz para controlar el crecimiento de hongos y promover la germinación sin causar daños a los tejidos de la plántula por fitotoxicidad. Resultados similares han sido recientemente informados por Larraburu *et al.*, (2012) para el establecimiento *in vitro* de semillas de *H. impetiginosus*. Si bien, la eliminación del tegumento permitió un óptimo establecimiento de las semillas, los resultados obtenidos demuestran la factibilidad de utilizar un tratamiento de inmersión en solución acuosa de NaClO con agitación constante, obteniéndose una tasa de germinación superior al 60% en semillas provistas del tegumento. Estos resultados concuerdan con aquellos informados por Moreira de Carvalho *et al.*, (2008), y más recientemente, por Bewley *et al.*, (2013), basados en el principio de que en solución acuosa, el NaClO desprende oxígeno en su forma molecular (O₂), provocando la oxidación de ciertos compuestos fenólicos (ácido clorogénico, cumarina, etc.) que actúan como inhibidores de la germinación y se encuentran usualmente presentes en el tegumento de las semillas del género *Handroanthus*.

En algunos casos, el uso de NaClO requiere de la combinación sinérgica con otros compuestos químicos que le permitan maximizar su poder germicida. En tal sentido, el uso de un pre-tratamiento con peróxido de hidrógeno favoreció el

establecimiento *in vitro* y germinación de las semillas de *B. riedelianum*, *C. fissilis* y *C. trichotoma*, mejorando a su vez el tiempo de germinación por incremento del IVG y contracción del TMG. Este efecto inductor del proceso morfogénico ha sido previamente informado en semillas de otras especies forestales tales como *Pinus ponderosa* (James y Genz, 1981), *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Dumroese *et al.*, 1988), *Diospyros riojae* (Coello *et al.*, 2002), *Nolina parviflora* (García *et al.*, 2008), *Pinus maximartinezii* (Robledo Paz *et al.*, 2009) y *Abies guatemalensis* (Pérez Gómez y Demeterio Ramos, 2012), cuya acción antiséptica se atribuiría principalmente a la oxidación que sufren los compuestos orgánicos constituyentes de las células microbianas debido al desprendimiento de oxígeno que se suscita cuando el H₂O₂ se pone en contacto con el agua (Rosa y González, 2009). Si bien, su manipulación no reviste complejidad, es necesario ajustar concentración y tiempo de exposición a fin de evitar daños tisulares por fitotoxicidad (Fick, 2007; Santamaría Jiménez *et al.*, 2012).

La proliferación acentuada de hongos y bacterias en semillas de *Myrocarpus frondosus* dificultó su establecimiento *in vitro* requiriendo de altas concentraciones y tiempos prolongados de exposición en los agentes desinfectantes antes mencionados, afectando la germinación. Este hecho sumado al corto periodo de viabilidad natural que presentan las semillas de esta especie (Noguera *et al.*, 2012) impidió el desarrollo de un procedimiento de germinación *in vitro* adecuado durante el transcurso del trabajo de Tesis.

Detección de *Amblycerus longesuturalis* en *C. trichotoma*

El género *Amblycerus* (Coleóptero) produce daños en semillas de muchas especies forestales (Herzog Viana *et al.*, 2007), cuya intensidad puede ocasionar la destrucción completa del fruto por aborto de las semillas (Cordero *et al.*, 2003). Sus larvas se alimentan de las semillas de 32 familias vegetales registradas que incluyen distintas especies de *Prosopis* (Johnson, 1983); *Geoffroea decorticans* (Baldini y Alvarado, 2008), *Cordia alliodora*, *C. gerascanthus*, *Tabebuia crysantha*, *T. rosea* (Salazar *et al.*, 2000), *Guazuma ulmifolia*, *Luehea speciosa* (Arguedas, 1997), *Senna occidentales*, *S. bicapsularis*, *Albizia lebbbeck* (De la Cruz Pérez, 2009), *Sclerobium sp.* (Araujo Pinto, 2007); detectándose además en flores de *Helianthus annuus* donde se alimenta a partir de granos de polen, tejidos florales y receptáculo (Torretta *et al.*, 2009). En el contexto de esta tesis y con el propósito de establecer un método no destructivo que facilitara la separación de las semillas sin daños para ser utilizadas en

los ensayos de germinación, se realizó una prueba de rayos X donde fue posible detectar la presencia/ausencia de daños producidos por el insecto. Este método ha sido previamente aceptado por ISTA (International Seed Testing Association), como una alternativa válida al ensayo de corte para detectar las semillas vacías y/o dañadas por insectos (Willan, 1991). Asimismo, a través del uso de imágenes radiográficas es posible identificar propiedades estrechamente relacionadas con la viabilidad, el vigor y las características estructurales de la semilla (Pérez García y Pita Villamil, 2001; Alzugaray *et al.*, 2007). Su empleo resultó adecuado para la selección de las simientes de la especie en estudio, pues reveló claramente la incidencia de daño por *A. longesuturalis*, principal factor que afecta la calidad y/o viabilidad de las semillas de *C. trichotoma*. Esta prueba, en general, es efectiva en aquellas semillas forestales que presentan cotiledones voluminosos o frutos como aquenios, sámaras o cariopses (Ottone, 1993; Pérez García, 2001; Alzugaray *et al.*, 2007). Los resultados de esta tesis indican la factibilidad de utilizar esta técnica en frutos drupáceos favorecidos por el tamaño de sus semillas y el escaso espesor de los cotiledones que permitieron una óptima penetración de la radiación, lo que si bien actuó en desmedro de la calidad de la imagen, posibilitó la obtención de un patrón radiográfico claro y apto para detectar semillas sanas.

Inducción de organogénesis

En el contexto del cultivo de tejidos, el término “organogénesis” comprende la formación de *novo* de órganos tanto a partir de tejidos meristemáticos como no meristemáticos (Schwartz *et al.*, 2005). Ésta puede ocurrir de manera directa, en la cual a partir de los tejidos primarios se forman meristemoides que darán lugar al primordio del órgano; o bien, de manera indirecta, mediante la cual células parenquimáticas del tejido primario por sucesivas divisiones darán lugar a un tejido indiferenciado (callo) a partir del cual se originarán los meristemoides (Hicks, 1980). Independientemente de la vía que dará origen al primordio, el proceso consta de las fases de des-diferenciación, inducción y diferenciación que se concatenan en la neoformación del primordio.

La des-diferenciación celular implica la reversión a un estado de desarrollo menos especializado y más flexible que podrá dar lugar o no a la formación de un callo. En un proceso de organogénesis directa, las células competentes que experimentan des-diferenciación, solas o en grupos, formarán un nuevo primordio (Schwartz *et al.*, 2005). Explantes foliares de *Lysionotus serratus* producen yemas adventicias mediante un

proceso directo de regeneración (Li *et al.*, 2013); los segmentos foliares de *Melia azedarach* (Vila *et al.*, 2003), lo hacen indirectamente a partir de la formación de tejidos indiferenciados que originarán las yemas; mientras que, porciones de hojas de *Populus deltoides* podrían brindar organogénesis por ambas vías (Cavusoglu *et al.*, 2011). La fase finaliza con la adquisición del estado de competencia por parte de las células primarias, el cual es definido por su habilidad para adquirir los estímulos organogénicos.

La fase de inducción sobreviene al proceso de des-diferenciación celular y resulta de la expresión de un grupo de genes que precede a la diferenciación morfológica. Ésta dependerá del tipo de explante, genotipo, fitohormonas relacionadas, condiciones nutricionales y ambientales, entre otras (Zhang y Lemaux, 2005; Soares *et al.*, 2011; Rodríguez Beraud *et al.*, 2014).

Por último, la fase de diferenciación, es quizás la más documentada y comprende la diferenciación morfológica del nuevo órgano. Su ontogenia puede ser determinada a través del análisis histológico en función del tiempo que transcurre hasta su formación (George *et al.*, 2008; Olmos *et al.*, 2010).

En el contexto de este trabajo de tesis fue posible desarrollar un procedimiento que permite obtener yemas adventicias a partir del cultivo *in vitro* de segmentos de hipocótilos y cotiledones de *Balfourodendron riedelianum* a través de un sistema indirecto de regeneración, confirmándose por microscopía óptica que las células del tejido epidérmico forman un tejido indiferenciado a partir del cual se originarán las estructuras vegetativas; siendo el proceso organogénico estimulado por una correcta relación auxina/citocinina (ANA/TDZ); en donde, el uso de una citocinina derivada de la fenilúrea promovió la neoformación de yemas adventicias tal como ocurre en otras especies leñosas (Guo *et al.*, 2005; Annapurna y Rathore, 2010; Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). Éste a su vez dependió de la fuente de explante; siendo máxima cuando se utilizaron segmentos de cotiledones en desmedro del uso de hipocótilos. Estos resultados concuerdan con aquellos informados por Hossain y *et al.*, (1994) mediante el uso de cotiledones de *Aegle marmelos* y Yang *et al.*, (2006, 2011) a través del cultivo de segmentos de hipocótilos de *Fortunella crassifolia* y *Phellodendron amurense*.

Micropropagación a partir del cultivo *in vitro* de segmentos caulinares.

En un sistema de micropropagación basado en la utilización de segmentos nodales, la brotación de las yemas axilares y el ulterior crecimiento y diferenciación de sus fitómeros resultantes da lugar a la fase de multiplicación que continúa al establecimiento *in vitro* de los cultivos y precede a las fase de enraizamiento y aclimatación de las plantas resultantes (Murashige, 1974).

La proliferación de brotes impulsado por la multiplicación de yemas axilares constituye un paso relevante en la micropropagación; a través del cual, se determina en gran medida la eficiencia del procedimiento. Durante esta fase, se induce la brotación de los explantes establecidos favoreciendo la ruptura de la dominancia apical a fin de producir múltiples brotes que serán separados y utilizados como base para nuevos ciclos a través de sucesivos subcultivos que incrementarán su número rápidamente (George y Davies, 2008). El uso de esta técnica trae consigo la ventaja de que al emplear órganos preformados, disminuye las posibilidades de causar variaciones somaclonales, permitiendo una alta fidelidad genética del material clonado (Xavier *et al.*, 2007).

Si bien, en el contexto de la micropropagación, se trabaja con órganos aislados de la planta madre sujetos a condiciones ambientales muy diferentes respecto al ambiente externo, el proceso de captación y traducción de la señal es modulado a través de un proceso similar al que utiliza la planta en su hábitat natural (Chriqui, 2008). Las condiciones ambientales dentro del recipiente de cultivo están determinadas por la interacción del medioambiente aéreo y de la zona radicular (ambiente originado por encima y debajo de la superficie del medio de cultivo, respectivamente). El medioambiente aéreo es la resultante de la interacción de componentes físicos tales como: temperatura, luz (fotoperiodo, intensidad y calidad espectral), radiación térmica, composición gaseosa, velocidad del flujo de aire (“aireación”) y presión. Por su parte, la conjunción de elementos físicos (temperatura, potencial agua, difusión gaseosa y líquida, consistencia del medio de cultivo), químicos (compuestos orgánicos e inorgánicos, pH, oxígeno disuelto, dióxido de carbono disuelto) y biológicos (microorganismos simbióticos, microorganismos competitivos) determinan las condiciones ambientales que suceden en el ámbito de la zona radicular (Kozai, *et al.*, 1992; George y Davies, 2008). El control de estas variables ambientales estará dado por el sistema de micropropagación que se utilice, pudiéndose ser éstos clasificados en heterotróficos, mixotróficos y autotróficos según la relación entre el suministro de carbohidratos en el medio de cultivo y las condiciones lumínicas que se provean para

estimular fotosíntesis. En tales condiciones, el uso de las hormonas vegetales con el propósito de modular el crecimiento y diferenciación constituye una herramienta valiosa y es utilizada habitualmente en los procedimientos de micropropagación. Asimismo, el éxito del procedimiento es fuertemente influenciado por la composición del medio de cultivo; siendo necesario un adecuado balance entre macronutrientes, micronutrientes y compuestos orgánicos que brinden un crecimiento óptimo de los explantes (George y De Klerk, 2008; Thorpe *et al.*, 2008). Sin embargo, éste no depende únicamente de la composición del medio nutritivo sino que además es fuertemente influenciado por la composición de la atmósfera gaseosa (Blazkova *et al.*, 1989). Tradicionalmente, con el propósito de proteger a los explantes de la contaminación biótica y evitar la deshidratación de los tejidos y/o desecación del medio de cultivo, se emplearon sistemas de cierre que limitan el intercambio gaseoso entre la atmósfera interna del recipiente de cultivo y el ambiente externo (Huang y Chen, 2005). En tales condiciones, el ambiente interno se caracteriza por presentar: alta humedad relativa, temperatura constante, baja intensidad luminosa y alta fluctuación diurna del contenido de CO₂ (Kozai *et al.*, 1992; 1997). El ambiente interno es afectado de manera directa e indirecta por las condiciones externas y dado que la fase gaseosa *in vitro* está en contacto inmediato con el ambiente externo (por ejemplo a través del intercambio gaseoso), ésta es influenciada de un modo más directo que la zona radicular. El grado de influencia del entorno sobre el ambiente interno depende principalmente del intercambio gaseoso que se suscite entre ambos ambientes; hecho por el cual, es de esperarse que a través del control del ambiente externo, se pudiera controlar de manera directa o indirecta el ambiente interno. Esta interacción dependerá a su vez de las características físicas del recipiente de cultivo y del sistema de cierre empleado (Huang y Chen, 2005).

El intercambio de agua en las fases líquidas y gaseosas entre el medio de cultivo, el explante y el aire dentro del recipiente; como así también, las características del aire del ambiente externo, juegan un papel importante en el crecimiento y diferenciación. La dirección y volumen del flujo de agua está determinado por la distribución espacial del potencial agua dentro y fuera del recipiente (Sallanon y Coudret, 1990; Kozai *et al.*, 1997). Sin embargo, la excesiva humedad relativa del ambiente en los sistemas cerrados puede provocar desórdenes fisiológicos y anatómicos que afectan negativamente el crecimiento de los explantes (Ghasgghaie *et al.*, 1992), induciendo anormalidades morfo-fisiológicas en hojas, hiperhidricidad en tallos y supresión de la transpiración (Debergh *et al.*, 1992). Asimismo, dado que la velocidad del flujo de aire dentro del

recipiente es muy lenta (varía entre 0 y 25 mm s⁻¹), ésta reduce el coeficiente de difusión de CO₂ y vapor de agua limitando la fotosíntesis y transpiración del vegetal (Kozai *et al.*, 1997). Una tasa de intercambio gaseoso (“ventilación”) insuficiente afecta la composición gaseosa dentro del recipiente; en consecuencia, el contenido de CO₂ durante el período luminoso se encuentra por debajo del punto de compensación (Fujiwara y Kozai, 1995). Al mismo tiempo, la concentración de etileno y otros compuestos tóxicos (productos de la oxidación de fenoles) tienden a incrementarse (Nguyen y Kozai, 1998), produciendo serios desordenes fisiológicos tales como la hiperhidratación de los tejidos (Jackson, 2005; Santamaría *et al.*, 2000).

Tomando en consideración el efecto que tendría el microclima dentro del recipiente sobre los caracteres morfológicos que determinan la sobrevivencia del material en la etapa de aclimatación, durante la fase de multiplicación y enraizamiento se ensayaron tres sistemas de cultivos basados en la capacidad de intercambio gaseoso, a través de ventilación por difusión o asistida por un proceso neumático, y en la disponibilidad de nutrientes mediante el uso de medios semisólidos y líquidos, fundamentado en el principio de inmersión temporal.

Los resultados obtenidos en la mayoría de las especies estudiadas en el marco de esta Tesis avalan el efecto promisorio que tendría el uso de la inmersión temporal sobre la formación de brotes y raíces adventicias promoviendo una mayor tasa de crecimiento durante la fase de aclimatación y concuerdan con aquellos informados en la micropropagación de otras especies leñosas tales como *Ilex dumosa*, *I. paraguariensis* (Luna, 2010) e híbridos de *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* (Fortes, 2011).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el marco del trabajo de Tesis desarrollado ponen a disposición de la comunidad científica una serie de procedimientos que podrían ser aplicados en la propagación de las especies que se encuentran en situación de vulnerabilidad, ya sea en el marco de programas de enriquecimiento de bosques; o bien, en el contexto de la aplicación de planes de mejoramiento para monocultivos y conservación del germoplasma.

En este sentido, se puso a punto una técnica que permite separar las semillas de *Cordia trichotoma* dañadas por el ataque de *Amblycerus longesuturalis* mediante el uso de rayos X, se elaboraron protocolos de desinfección y/o escarificación que posibilitan la germinación de semillas y el establecimiento *in vitro* de la mayoría de las especies estudiadas, se desarrollaron procedimientos que permitieron la obtención de plantas por organogénesis indirecta (*Balfourodendron riedelianum*) y micropropagación (*B. riedelianum*, *Cedrela fissilis*, *Cordia trichotoma* y *Handroanthus heptaphyllus*).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcántara, J.; Vera, N.; Szczipanski, L.; Eibl, B.; Ríos, R. 1997. Análisis de la dispersión de semillas de *Cedrela fissilis* en el bosque nativo de Misiones. *Yvyrareta*. 8: 16-21.
- Alcobé, F. 2009. *Los Bosques Nativos de Argentina en el marco del proceso de Reducción de Emisiones derivadas de la Deforestación y la Degradación (REDD)*. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. PNUD. Buenos Aires. Argentina. Pp. 1-6.
- Alonso, J. 2000. El lapacho. *Revista de Fitoterapia*. 1(2): 107-117.
- Al-Shehbaz, I. 1991. The genera of Boraginaceae, the southeastern United States. *J. Arnold Arboretum*. 1: 1-169.
- Alzugaray, C.; Carnevale, N.; Salinas, A. 2007. Evaluación de la calidad de las semillas de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht. y *Schinopsis balansae* Engl. mediante la prueba de rayos X. *Revista de Investigación, Facultad de Ciencias Agrarias UNR*. 11: 51-59.
- Annapurna, D.; Rathore, T. 2010. Direct adventitious shoot induction and plant regeneration of *Embelia ribes* Burm F. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 101: 269-277.
- Araujo Pinto, A. 2007. Avaliação de danos causados por insetos em sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e andirobinha (*C. procera* DC.) (Meliaceae) na Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus, AM. Brasil. Pp. 60.
- Arbo, M. 1999. *Tabebuia*. Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II. En: F. Zuloaga; O. Morrone (Eds). St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. Pp. 371-372.
- Arcos-Roa, J.; Méndez-Montiel, J.; Campos-Bolaños, R. 1999. Efecto del aceite de nim *Azadirachta indica* a. juss., sobre la termita de madera seca *Incisitermes marginipennis* (latreille) (Isoptera: Kalotermitidae). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 17(3): 373-377.
- Arguedas, M. 1997. Plagas de semillas forestales en América Central y el Caribe. Turrialba, C.R: CATIE. (Serie técnica. Manual técnico N° 25). Pp. 120.
- Ariza Espinar, L.; Calviño, A.; Di Fulvio, E.; Dottori, N. 2006. Boraginaceae, parte I. En: Anton, A. y Zuloaga, F. *Flora Fanerogámica Argentina*. 97: 1-55.
- Atlas de los Bosques Nativos Argentinos. 2003. Proyecto Bosques Nativos y Áreas Protegidas BIRF 4085-AR, Dirección de Bosques Secretaría de Ambiente y Desarrollo sustentable. Argentina. Pp. 38-53

- Augspurger, C. 1984. Seedling survival of tropical tree species: Interactions of dispersal distance, light-gaps and pathogens. *Ecology*. 65: 1705-1712.
- Baldini, A.; Alvarado, A. 2008. Manual de plagas y enfermedades del bosque nativo en Chile. Asistencia para la recuperación y revitalización de los bosques templados de Chile, con énfasis en los *Nothofagus* caducifolios. FAO/CONAF, Santiago, Chile. Pp. 224.
- Barrance, A.; Beer, J.; Dh Boshier; Chamberlain, J.; Cordero, J.; Detlefsen, G.; Finegan, B.; Galloway, G.; Gómez, M.; Gordon, J.; Hands, M.; Hellin, J.; Hughes, C.; Ibrahim, M.; Kass, D.; Leakey, R.; Mesén, F.; Montero, M.; Rivas, C.; Somarriba, E.; Stewart, J.; Pennington, T. 2003. Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas. En: Cordero, T. J.; Boshier, D.H. (Eds). Oxford (RU). OFI/CATIE. Pp. 1079.
- Barth, O. 1982. Variações Polínicas em espécies brasileiras da família Rutaceae. *Boletim do Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo*. 13: 129-134
- Barth, S.; Eibl, B.; Montagnini, F. 2008. Adaptabilidad y crecimiento de especies nativas en áreas en recuperación del noroeste de la provincia de misiones. XIII Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Facultad de Ciencias Forestales, UNaM – EEA Montecarlo, INTA. Eldorado. Misiones. Argentina. Pp. 16.
- Bertonatti, C. 2009. Naturaleza de la patria. Valor y cuidado de la biodiversidad argentina. Fundación de historia natural-Feliz de Azara. Ministerio de Educación de la presidencia de la nación. Buenos Aires. Argentina. Pp. 40-49.
- Bewley, J.; Bradford, K.; Hilhorst, H.; Nonogaki, H. 2013. Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd ed. (New York: Springer)
- Bewley, J.; Black, M. 1994. Seeds. Physiology of Development and Germination, 2nd Ed, Plenum Press, New York, NY. Pp. 197.
- Biernaski, F. A. 2010. Eficiência da amostragem de matrizes de *Cedrela fissilis* Vell. para melhoramento e conservação genética baseado em caracteres juvenis. Curitiba. Tesis de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Universidade Federal Do Paraná. Pp. 87.
- Biloni, J. S. 1990. Árboles Autóctonos Argentinos. Tipografía Editora Argentina. Buenos Aires. Argentina. Pp.335.
- Blazková, A.; Ullmann, J.; Josefusová, Z.; Machácková, I.; Krekule, J. 1989. The influence of gaseous phase on growth of plants *in vitro* the effect of different types of stoppers. *Acta Horticulturae*. 251: 209-214.
- Bocchese R.; Morbeck de Oliveira A.; Melotto A.; Fernandes, V.; Laura V. 2007. Efeito de diferentes tipos de solos na germinação de sementes de *Tabebuia heptaphylla*, em casa telada. *Revista Cerne, Lavras*. 14(1): 62-67.
- Borges V. 2012. Ecofisiologia de *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo em Ambientes Contrastantes De Luz. Tese (Mestrado). Cruz Das Almas. Bahia. Brasil. Pp. 73.

- Brack, P.; Grings, M.; Kinupp, V.; Lisboa, G.; Barros, I. 2011. Espécies arbóreas de uso estratégico para agricultura familiar. Pp. 38.
- Brea, M.; Zucol, A. 2006. Leños fósiles de Boraginaceae de la Formación Peñas Coloradas (Paleoceno superior), Puerto Visser, Chubut, Argentina. *Ameghiniana*. 43(1): 139-146.
- Britos Paniagua, G.; Quinteros Doldán, M.; Enciso, M. 2006. Crecimiento de especies forestales nativas en una plantación mixta, en el Alto Paraná. *Investigacion Agraria* 8 (2): 50-57.
- Brown, A. 2009. Bosques Nativos de Argentina. ¿Seguimos lamentando lo perdido o vemos que hacemos con lo que tenemos? Fundación ProYungas. In Congreso Forestal Mundial. Buenos Aires, Argentina. Pp. 8.
- Broz, D.; Niella, F.; Rocha, P. 2010. Estudio de la variación geográfica en la morfología del fruto y germinación de *Balfourodendron riedelianum* (Engl.) Engl. (Guatambú Blanco) en la provincia de Misiones. Actas de resumen XIV Jornada Técnicas Forestales y Ambientales. Eldorado. Misiones. Argentina. Pp. 66.
- Burnham, R.; Johnson, K. 2004. South American palaeobotany and the origins of neotropical rain forests. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B*. 359: 1595-1610.
- Cabrera, A. 1983. Flora de la Provincia de Jujuy. Colección Científica del INTA. Parte VIII – Clethraceas a Solanaceas. Buenos Aires. Argentina. Pp. 508.
- Cabrera, A. 1994. Regiones fitogeográficas argentinas. En Kugler WF (Ed.) Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería. Tomo 2. 2ª edición. 1a reimpression. Acme. Buenos Aires. Argentina. Fascículo 1. Pp. 1-85.
- Caldato, S.; Pezzutti, R. 2010. Estructura poblacional de *Myrocarpus frondosus* Allemão en un bosque en galería de la selva paranaense en Misiones, Argentina. *Ciencia Florestal*. Santa Maria. 20(3): 411-418.
- Calegari, L.; Gatto, D.; Stangerlin, D.; Martins, S.; Agnes, C.; Durlo, M. 2009. Caracterização de povoamentos de *Myrocarpus frondosus* M. Allemão na região central do Rio Grande do Sul. *Revista científica eletrônica de engenharia florestal*. 14: 18-28.
- Campanello, P.; Garibaldi, J.; Gatti, M.; Goldstein, G. 2007 a. Lianas in a subtropical Atlantic Forest: Host preference a tree growth. *Forest Ecology and Management*. (242): 250-259.
- Campanello, P.; Gatti, M.; Ares, A.; Montti, L.; Goldstein G. 2007 b. Tree regeneration and microclimate in a liana and bamboo-dominated semideciduous Atlantic Forest. *Forest Ecology and Management*. (252):108-117.
- Campanello, P.; Montti, L.; Mac Donagh, P; Goldstein, G. 2009. Reduced-Impact Logging and Post-Harvest Management in the Atlantic Forest of Argentina: Alternative approaches to enhance regeneration and growth of canopy trees. In:

S. P. Grossberg (ed.). *Forest Management*. Nova Science Publishers. New York. USA. Pp. 39-59.

- Carpinetti, B.; Chaves, H.; Sánchez, I.; Ferrero, B.; Roberg, J.; Garciarena, M.; Almiron, M.; Albornoz, A.; Autorino, V.; Altamira, M.; Martín, G.; Srur, M.; Gatti, F.; Benesovsky, V.; Herrera, J.; Melzew, R.; Camposano, M.; Chediack, S. E.; Baqueiro, M. F.; Riegelhaupt, E.; Bacalini, P.; Arias Chalico, T.; Mora Ardila, F.; Burkart, R.; Dummel, C.; Montti, L.; Campanello, P.; Gatti, M.; Villagra, M.; Goldstein, G.; Di Bitetti, M.; Gómez, S.; González Naya, M.; Ramírez, L.; Giraudó, A.; Arzamendia, V.; Méndez, G.; Acosta, S.; Paviolo, A.; De Angelo, C.; Di Blanco, Y.; Agostini, I.; Pizzio, E.; Melzew, R.; Ferrari, C.; Palacio, L.; Baldovino, M.; Chavasse, D.; Seoane, R. 2009. Parque Nacional Iguazú Conservación y desarrollo en la Selva Paranaense de Argentina. En: Carpinetti, B. Garciarena M. y Almirón M. (Eds). Buenos Aires. Argentina. Pp.303.
- Carvalho, P. 1988. Louro-pardo. *Boletim de Pesquisa Florestal*. Colombo. 17: 63-66.
- Carvalho, P. 1994. “Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira” / Paulo Ernani Ramalho Carvalho; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Centro Nacional de Pesquisa de Florestas – Colombo: EMBRAPA – CNPF; Brasília: EMBRAPA – SPI. Pp. 640.
- Carvalho, P. 2002. Louro Pardo. EMBRAPA. Circular técnica 66. Pp. 16.
- Carvalho, P. 2003. Espécies arbóreas brasileiras. *Embrapa Informação Tecnológica*. Brasília. 1: 1039.
- Castroviejo, S.; Aedo, C.; Herrero, A. 2005. Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. XXI. *Smilacaceae -Orchidaceae*. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid. España. Pp. 150.
- Cavusoglu, A.; Ipekci-Altas, Z.; Bajrovic, K.; Gozukirmizi, N.; Zehir, N. 2011. Direct and indirect plant regeneration from various explants of eastern cottonwood clones (*Populus deltoides* Bartram. ex Marsh.) with tissue culture. *African Journal of Biotechnology*. 10: 3216-3221.
- Celestino, C.; Hernández, I.; Carneros, E.; López-Vela, D.; Toribio, M. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*. 14: 345-357.
- Chebez, J. 1994. Los que se van: especies argentinas en peligro. 1. ed. Buenos Aires. Argentina. Pp. 606.
- Chriqui, D. 2008. Developmental biology. In: E. F. George, M.A. Hall, G-J. De Klerck (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3ra Edición. Springer. The Hetherlands. Pp. 283-333.
- Ciarlante, T. 2008. FABACEAE Lindley. Instituto de Botánica Darwinion, Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales-CONICET. Buenos Aires. Argentina. Pp. 24.

- Coello, N.; Rebolledo-Camacho, V.; Rosas, M. 2002. Inducción de brotación múltiple en *Diospyros riojae* Gómez-Pompa por medio de cultivo de tejidos vegetales. *Foresta Veracruzana*. 4(1): 41-46.
- Condit, R.; Ashton, P.; Baker, P.; Bunyavejchewin, S.; Gunatilleke, S. 2000. Spatial pattern in the distribution of tropical tree species. *Science*. 288: 1414-1418.
- Connell, J. 1971. On the role of natural enemies in preventing competitive exclusion in some marine animals and rain forest trees. In: P.J. Den Boer y A. Gradwell (Eds.). *Dynamics of populations*. Pudoc. Wageningen. Holanda. Pp. 298-312.
- Cordero, J.; Mesen., F.; Montero, M.; Stewart, J.; Boshier, D.; Chamberlain, J.; Pennington, T.; Hands, M.; Huges C.; Detlefsen, G.. 2003. *Chamaedorea tepejilote* Liebm. Ex Mart. In: J. Cordero y D. Boshier (Eds.). Árboles de Centroamérica: Un manual para extensionistas OFI/CATIE. Costa Rica. Pp. 457-460.
- Correira de Mello, M.; Souza da Eira, M. 1995. Coservacao de sementes de Ipês (*Tabebuia* sp). *Revista Arvore*. 19(4): 427-432.
- Corvello, W.; Villela, F.; Nedel, J.; Teichert Peske. S. 1999 a. Época de colheita e armazenamento de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.). *Revista Brasileira de Sementes*. 21(2): 28-34.
- Corvello, W.; Villela, F.; Nedel, J.; Teichert Peske. S. 1999 b. Maturação Fisiológica de sementes se Cedro (*Cedrela fissilis* Vell.). *Revista Brasileira de Sementes*. 21(2): 23-27.
- Cozzo, D. 1969. Siete años de un ensayo de enriquecimiento del bosque subtropical utilizando *Cordia trichotoma*. *Revista Forestal Argentina*. (2): 44-45.
- Crechi, E. 2004. Silvicultura inicial de 3 especies latifoliadas nativas de interés económico en Misiones (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex Steudel., *Balfourodendron riedelianum* (Engl.) Engl., *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.) PIA: 28/97. En: Investigación forestal al servicio de la producción II. Proyecto Forestal de Desarrollo, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Pp. 260.
- Crechi, E.; Hennig, A.; Keller, A.; Hampel, H.; Domecq, C.; Eibl, B. 2010. Crecimiento de 3 especies latifoliadas nativas a cielo abierto y bajo dosel de pino hasta los 12 años de edad, en Misiones Argentina: *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex Steudel, *Balfourodendron riedelianum* (Engl.) Engl. y *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.). 14^{as} Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Facultad de Ciencias Forestales, UNaM - EEA Montecarlo, INTA. Eldorado. Misiones. Argentina. Pp. 8.
- Da Costa Nunes, E.; Volkmer de Castilho, C.; Moreno, F.; Viana, A. 2002. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 70: 259-268.

- Damasceno Ribeiro, C.; do Prado Costa, M.; de Senna, D.; Caliman, J. 2010. Fatores que afetam a germinação das sementes ea biomassa de plântulas de *Tabebuia heptaphylla*. *Floresta*. 42(1): 161-168.
- De la Cruz Pérez, A. 2009. Estudio faunístico de Bruquinidos (Coleoptera: Bechidae) en el Estado de Tabasco, México. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias. Montecillo. Texcoco. México. Pp. 89.
- de Lima Tresena, N.; Mata, M.; Martins, M.; Duarte, A.; Dias, V. 2009. Qualidade fisiológica da semente de Ipê Rosa (*Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo) submetidas À criopreservação. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande. 11(1): 87-93.
- de Souza, L. 2008. Morphology and Anatomy of the *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex I. M. Johnst diaspore (Boraginaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51: 761-768.
- de Souza Carvalho, E. 2009. Espécies arbóreas ameaçadas de extinção em um fragmento de mata atlântica no norte do Paraná. Tese (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. Bandeirantes. Brasil. Pp. 139.
- de Souza Laudano, W. 2005. Cultura de calos e criopreservação de sementes de *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). Tesis (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. Brasil. Pp. 148.
- de Souza Ribeiro, Y.; Santa Catarina, C.; Aragão, V.; Silveira, V. 2013. Enraizamento *ex vitro* de plântulas micropropagadas de *Cedrela fissilis*, uma espécie arbórea ameaçada de extinção. CONFLICT. V congreso fluminense de iniciación científica y tecnológica.
- 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: 135-140.
- Degen de Arrúa, R.; Britez Ojeda, L.; González de García, M.; Lopez Grau, E. 2008. Colección de frutos (FCQ) Del departamento de botánica, dirección e investigación de la Facultad de Ciencias Químicas-UMA. *Rojasiana*. 8(1): 68-76.
- del Castillo, E.; Tarnowski, C. 2005. El riego localizado como alternativa silvícola para plantaciones de especies de alto valor. In 3° Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano. Corrientes. Argentina. Pp: 11.
- del Castillo, E.; Zapater, M.; Gil, M.; Saravia Toledo, C. 2005. Estudio autoecológico en especies de maderas preciosas de la Selva Subtropical del Noroeste Argentino. Informe INTA Yuto. Jujuy. Argentina. Pp: 6.
- del Castillo, E.; Zapater, M.; Gil, M. 2006. Resultados comparativos de plantaciones experimentales de *Cedrela balansae* en INTA - Yuto, Jujuy. Ecología y producción de cedro (género *Cedrela*) en las Yungas australes. Capítulo 15. Ediciones del Subtrópico. Tucumán. Argentina. Pp. 179-192.

- Di Bitetti, M.; Placci, G.; Dietz, L. 2003. Una Visión de Biodiversidad para la Ecorregión del Bosque Atlántico del Alto Paraná: Diseño de un Paisaje para la Conservación de la Biodiversidad y prioridades para las acciones de conservación. World Wildlife Fund. Pp. 154.
- Dimitri, M. 1975. Árboles Forestales, Madera y Silvicultura de la Argentina. Breve Reseña Forestal de la Argentina. Buenos Aires. Argentina. Pp. 6-7.
- Dimitri, M. 1987. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo I Descripción de las plantas cultivadas. Fascículo I. Tercera edición. ACME-SACI. Buenos Aires, Argentina. Pp. 456.
- Dimitri, M. 1998. El nuevo libro del árbol: especies forestales de la Argentina oriental. En: Milan Jorge Dimitri, Rosario F. Julio Leonardis y José Santos Biloni (Eds). Tomo II. 2ª edición. El Ateneo. Buenos. Aires. Argentina. Pp. 124.
- do Amaral, J.; Martins, L.; Forti, V.; Cícero, S.; Filho, J. 2011. Teste de raios x para avaliação do potencial fisiológico de sementes de ipê-roxo. *Revista Brasileira de Sementes*. 33(4):601-67.
- Drozd, A.; Arturi, M.; Torrusio, S. 2010. Distribución de remanentes (1985-2006) de la Selva Atlántica Interior (SAI) en el centro de Misiones, Argentina en función de variables topográficas y edafológicas. Cambios de uso de la tierra. Causas, consecuencias y mitigación. RASADEP. Número Especial. *Asociación Argentina de Ecología de Paisajes*. Pp. 51-66.
- Dumroese, R.; James, R.; Wenny, D.; Gilligan, C. 1988. Douglas-fir seed treatments: Effects on seed germination and seedborne organisms. In: Proceedings: Combined Meeting of the Western Forest Nursey Council, Intermountain Nursery Association and Forest Association of British Columbia. Pp. 155-160.
- Durigan, G.; Nogueira, J. 1990. Recomposição de matas ciliares. São Paulo: Instituto Florestal, (IF. Série Registros, 4). Pp. 14.
- Eibl, B.; Montagnini, F.; Fernández Kozarik, J.; Nozzi, D.; Luppi, A. 1997. Sistemas agroforestales con *Ilex paraguariensis* (yerba mate) y árboles maderables nativos en pequeñas propiedades en Misiones, Argentina. Actas del Segundo Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano. Pp. 12.
- Eibl, B.; Fernandez, R.; Kozarik, J.; Lupi, A.; Montagnini, F.; Nozzi, D. 2000. Agroforestry systems with *Ilex paraguariensis* (American holly or yerba mate) and native timber trees on small farms in Misiones, Argentina. *Agroforestry Systems*. 48(1):1-8.
- Eibl, B.; Otegui, M.; González, C.; Mattes, L. 2009. Viabilidad durante el almacén en semillas de *Myrocarpus frondosus* Freire Allemao, para diferentes envases y ambientes. *Revista Análisis de Semillas*. 3(9): 1-1678
- Eibl, B.; González, C.; Otegui, M.; Dreyer, N. 2012. Protocolos tentativos para la propagación de 20 especies nativas de interés productivo de la selva misionera. XV Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Facultad de Ciencias

- Forestales, UNaM - EEA Montecarlo, INTA. Eldorado. Misiones. Argentina. Pp. 10.
- Escobar, P. 2006. Las biotecnologías como instrumento para la conservación de la biodiversidad. (Revisado: Septiembre 2014. Disponible on line en: <http://www.argentinaforestal.com/actualidad/ambiente/27-general/1619-las-biotecnolog-como-instrumento-para-la-conservaci-e-la-biodiversidad.>)
- FAO, 1986. Databook on Endangered Tree and Shrub Species and Provenances. Food and Agriculture Org. Pp. 524.
- FAO. 2006. Evaluación de Recursos Forestales Mundiales 2005. Hacia la ordenación forestal sostenible. FAO. Roma. Italia. Pp. 320.
- FAO. 2009. Situación de los Bosques del Mundo 2009. FAO. Roma. Italia. Pp. 176.
- FAO. 2010. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010. Roma. Italia. Pp 11-52; 89-112; 113-122.
- FAO. 2011. Situacion de los bosques del mundo 2011. America Latina y el Caribe. Roma. Italia. Pp. 16-22.
- FAO. 2012. Estado de los bosques del mundo 2012. Roma. Italia. Pp. 52.
- Felippi, M.; Maffra, C.; Cantarelli, E.; Araújo, M.; Longhi, S. 2012. Fenología, morfología e análise de sementes de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. ex Steud. *Ciência Florestal*. 22(3): 631-641.
- Ferrari Marques, A. 2006. Estudo fitoquímico de três espécies de Rutaceae e avaliação biológica de produtos naturais em modelos celulares e bioquímicos de tripanosomatídeos. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos. San Carlos. Brasil. Pp 315.
- Ferreira Lima, V.; Vieira, D.; Sevilha, A.; Salomão, A. 2008. Germinação de espécies arbóreas de floresta estacional decidual do vale do rio Paranã em Goiás após três tipos de armazenamento por até 15 meses. *Biota Neotropica*. 8(3): 89-97.
- Fick, T. 2007. Establecimiento *in vitro* e propagação de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (louro-pardo). Tese (Mestrado). Universidad Federal de Santa María. Santa Maria. Brasil. Pp. 63.
- Fick, T.; Bisognin, D.; de Quadros, K.; Horbach, M.; Reiniger, L. 2007. Establecimiento e crescimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo. *Ciência Florestal*. 17(4): 343-349.
- Fiori, A.; Bassegio, C.; Ferreti, E.; Fogaça, L. 2014. Establecimiento *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex. DC Mattos). XI Congresso Nacional De Meio Ambiente De Poços De Caldas. Poços De Caldas. Minas Gerais. Brasil.
- Flores García, A.; Álvarez Moctezuma, J.; Rodríguez de la O, J.; Corona Ambris, A. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. *Foresta Veracruzana*. 10: 27-33.

- Floriano, E. 2004. Germinação e dormência de sementes florestais. Caderno Didático nº 2, 1ª ed., Santa Rosa, Santa Rosa: ANORGS. Pp. 19.
- Fortes, N. 2011. Clonación de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* mediante el uso de biorreactores de inmersión temporal. Tesis para optar al grado de Magister en Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE). Pp. 62.
- Fujiwara, K.; Kozai, T. 1995. Physical microenvironment and its effects. In: Aitken-Christie J., Kozai T., Smith M. A. L. (Eds.). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publ. The Netherlands. Pp. 319-369.
- Galindo -Leal, C.; Gusmão Câmara, I. 2003. Atlantic Forest Hotspot Status: An Overview. In: C. Galindo-Leal y I. Gusmão Câmara (Eds.). *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats and outlook*, Island Press. Washington. USA. Pp. 3-11.
- Galván, H. 2007. "Pisos Ingeniería de Madera". Master of business administration. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Instituto Eurotechnology Empresas. Corrientes. Argentina. Pp. 321.
- Gandara, F. 1995. Diversidades genética e taxa de cruzamento em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. Meliaceae. Tese (Mestrado). Campinas. Brasil. Pp. 69.
- García, A.; Moctezuma, J.; Ambris, A. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (HBK) Hemsl. *Foresta Veracruzana*. 10(2): 27-33.
- Gartland, M.; Bohren, A. 2008. Consideraciones sobre la Biodiversidad Forestal a Nivel de Especies, en la Selva Paranaense de Misiones, Argentina. *Yvyrareta*. (15): 39-49.
- Gartland, H.; Miranda, D.; Grance, L.; Bohren, A.; Keller, H. 2001. Estructura anatómica de la corteza y diseño del ritidoma de *Cedrela fissilis* Vell. y *Cabralea canjerana* subsp. *Canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae), Misiones, Argentina. *Quebracho*. 9: 43-53.
- Gentry, A. 1992. Bignoniaceae. Part II (Tribe Tecomeae). *Flora Neotropica Monography* 25(2): 1-370.
- George, E.; Davies, W. 2008. Effects of the physical environment. In: E. F. George, M.A. Hall, G-J. De Klerk (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3ra Edición, Springer. The Netherlands. Pp: 283-333.
- George, E.; De Klerk, G. 2008. The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrientes. In: E. F. George, M.A. Hall, G-J. De Klerck (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3ra Edición, Springer. The Netherlands. Pp: 65-114.
- George, E.; Hall, M.; de Klerk, G. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Volumen 1: The background. Springer. Pp. 504.

- German-Ramírez, M. 2005. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Meliaceae. En: Novelo Retana, A.; Medina Lemos, R.; Ochoterena Booth, H.; Salazar Chávez, G.; Alvarado-Cárdenas, L. (Eds.). Universidad Nacional Autónoma de México. 42: 1-15.
- Ghashghaie, J.; Brenckmann, F.; Saugier, B. 1992. Water relations and growth of rose plants cultured *in vitro* under various relative humidities. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 30: 51-57.
- Gonzalez, A.; Cristóbal, C. 1997. Anatomía y ontogenia de semillas de *Helicteres lhotzkyana* (Sterculiaceae). *Bonplandia*. 9: 287-294.
- González, P.; Barth, S. R. 2013. Estudio ecológico y silvicultural de *Cordia trichotoma*, *Cabralea canjerana* y *Picrasma crenata*. Su potencialidad en la diversificación productiva. Proyecto PIA N° 10047. Pp. 10.
- González Morenghi, J. 2006. Enriquecimiento forestal con cedro rosado y cedro misionero en Tucumán, Argentina. En Pacheco, S.; Brown, A. D. (Eds.). Ecología y producción de cedro (género *Cedrela*) en las Yungas australes. Ediciones del Subtrópico la editorial. LIEY-Pro Yungas. Tucumán. Argentina. Pp. 193-198.
- Grau, A.; Zapater, M.; Neumann, R. 2006. Botánica y distribución del género *Cedrela* en el noroeste de Argentina. Ecología y producción de cedro (género *Cedrela*) en las Yungas australes. LIEY-ProYungas. Tucumán. Argentina. Pp: 19-30.
- Grings, M.; Brack, P. 2011. *Cedrela fissilis*. En: espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro—Região sul. En: Coradin, L.; Siminski, A.; Reis, A. (Eds). Brasília. Brasil. Pp. 934.
- Groppo, M.; Pirani, J.; Salatino, M.; Blanco, S.; Kallunki, J. 2008. Phylogeny of rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. *American Journal of Botany*. 95(8): 985–1005.
- Guo, D.; Zhu, Z.; Hu, X.; Zheng, S. 2005. Effect of cytokinins on shoot regeneration from cotyledon and leaf segment of stem mustard (*Brassica juncea* var. tsatsai). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 83: 123- 127.
- Hampton, J.; Tekrony, D. 1995. Handbook of vigour test methods. International Seed Testing Association. Zürich. Pp. 117.
- Heberle, M. 2010. Propagação *in vitro* e *ex vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel). Tese (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. Brasil. Pp. 76.
- Hernández Jerez, Y.; Silva Pupo, J.; Borges García, M. 2013. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Citrus aurantifolia* Christm. Swing. var. ‘Mexicana’ a partir de semillas. *Biotecnología Vegetal*. 13(3): 181-187.
- Herzog Viana, J.; Grenha, V.; Valverde de Macedo, M.; Ferreira Monteiro, R. 2007. Predação de sementes de *Senna neglecta* (Leguminosae: Caesalpinoideae) no

- Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PNSO). Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Caxambu. Brasil. Pp. 1-2.
- Hicks, G. 1980. Patterns of organ development in tissue culture and the problem of organ determination. In: A. Cronquist (Ed.). *The Botanical Review*. New York Botanical Garden, New York. 46: 1-23.
- Higa, T. 2006. Morfogênese e Conservação *in vitro* para *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo (Bignoniaceae). Tese (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. Brasil. Pp. 154.
- Higa, T.; Paulilo, M.; Benson, E.; Pedrotti, E.; Viana, A. 2011. Developing seed cryobanking strategies for *Tabebuia heptaphylla* (Bignoniaceae), a hardwood tree of the Brazilian South Atlantic Forest. *CryoLetters*. 32:329-338.
- Hossain, M.; Islam, R.; Karim, M.; Joarder, O.; Biswas, B. 1994. Regeneration of plantlets from *in vitro* cultured cotyledons of *Aegle marmelos* Corr. (Rutaceae). *Scientia horticultrae*. 57(4): 315-321.
- Huang, C.; Chen, C. 2005. Physical properties of culture vessels for plant tissue culture. *Biosystems Engineering*. 91: 501-511.
- Hunziker, A. 1984. Los géneros de Fanerógamas de Argentina. Clave para su identificación. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 13(1-4):385.
- Hurrell, J.; Cabanillas, P.; Buet Costantino, F.; Delucchi, G. 2012. Bignoniaceae adventicias en la Argentina: primera cita de *Podranea ricasoliana* y nuevos registros de *Campsis radicans*. *Revista Museo Argentino Ciencias Naturales*. 14(1): 15-22.
- IBIF (Instituto de Botánica e Investigación Forestal). 2007. Dinámica del bosque en la TCO Bajo Paragua en respuesta a la aplicación de tratamientos silviculturales. Informe técnico. IBIF/WWF. Santa Cruz. Bolivia. Pp. 54.
- InfoStat software estadístico InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina.
- IPEC (Instituto Provincial de Estadística y Censo). 2012. Gran Atlas de Misiones. Instituto Provincial de Estadísticas y Censos, Gobierno de la Provincia de Misiones. Posadas, Misiones. Ecología. Posadas, Misiones, Argentina. Pp. 35-64.
- IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación). 1998. Norma IRAM 9.600: Preservación de maderas. Maderas preservadas mediante procesos con presión en autoclave. Pp. 2.
- Itonan, M.; Siqueira, A.; Cavassan, O. 1992. Descrição de quinze espécies arbóreas de mata mesófila do estado de São Paulo ameaçadas de extinção. *Salusvita*. Bauru. 11 (1): 1-38.

- IUCN (International Union for Conservation of Nature). 1998. *Cedrela fissilis*. Red List of Threatened Species. Version 1998.1 (Revisado: Junio 2012. Disponible on line en: www.iucnredlist.org.)
- IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2004. Americas Regional Workshop (Conservation and Sustainable Management of Trees. Costa Rica) 1998. *Balfourodendron riedelianum*. En: 2004 IUCN Red List of Threatened Species. (Revisado: Mayo 2013. Disponible on line en: <http://www.iucnredlist.org>.)
- IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2008. World Conservation Monitoring Centre. 1998. *Cordia trichotoma*. En: IUCN, 2008. Red List of Threatened Species. (Revisado: Octubre, 2012. Disponible on line en: <http://www.iucnredlist.org>)
- Izoko, X.; Burneo, D. 2003. Herramientas para la valoración y manejo forestal sostenible de los bosques sudamericanos. Unión Mundial para la Naturaleza (IUCN). Antecedentes y perspectivas de la valoración económica para el manejo forestal sostenible. Quito. Ecuador. Pp 1-10.
- Izquierdo, A.; Clark, M. 2012. Spatial Analysis of Conservation Priorities Based on Ecosystem Services in the Atlantic Forest Region of Misiones, Argentina. *Forests*. 3(3): 764-786.
- Izquierdo, A.; De Angelo, C.; Aide, T. 2008. Thirty years of human demography and land-use change in the Atlantic Forest of Misiones, Argentina: an evaluation of the forest transition model. *Ecology and Society*. 13(2): 3.
- Jackson, M. 2005. Aeration stress in plant tissue cultures. En: Hvoslef-Eide, A.; Preil, W. (Eds.). *Liquid cultura systems for in vitro plant propagation*. Springer. The Netherlands. 459-473.
- James, R.; Genz, D. 1981. Ponderosa pine seed treatments: effects on seed germination and disease incidence. USDA Forest Service, Missoula, MT. *Northern Region Report* 81:16-13.
- Janzen, D. 1970. Herbivores and the number of tree species in tropical forest. *American Nature*. 104: 501-528.
- Jerke, G.; Horianski, M.; Bargardi, S.; Salvatierra, K.; Kramer, F.; Jordá, G.; Amer, L.; Guida, A. 2008. Actividad antifúngica de extractos de *Myrocarpus frondosus* fr. allem sobre hongos aislados de yerba mate y té comercial. *Revista Ciencia y Tecnología*. (10a): 24-29.
- Johansen, D. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y. USA. Pp. 551.
- Johnson, C. D. 1983. Ecología, control e identificación de insectos del nuevo mundo que infestan las semillas de *Prosopis* (Leguminosae). Manual sobre insectos que infestan la semilla de *Prosopis*. FAO. Roma. Pp. 59.

- Johnson, C.; Romero, J.; Raimúndez-Urrutia, E. 2001. Ecology of *Amblycerus crassipunctatus* Ribeiro-Costa (Coleoptera: Bruchidae) in seeds of Humiriaceae, a new host family for Bruchids, with an ecological comparison to other species of *Amblycerus*. *The Coleopterists Bulletin*. 55: 37-48.
- Justiniano, M.; Fredericksen, T.; Nash, D. 2000. Ecología y silvicultura de especies menos conocidas Tajibos o Lapachos *Tabebuia* spp. Gomes ex AP de Candolle Bignoniaceae. Editorial El País. Santa Cruz, Bolivia. Pp. 65.
- Kageyama, P. 1996. Recursos genéticos de especies de la familia Meliaceae en los neotrópicos: prioridades para acción coordinada, Brasil y sur de Suramérica. Departamento de Montes. FAO. Roma. Italia. Pp. 34.
- Kageyama, P; Gandara, F. 1993. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. III Simposio de Ecosistemas da Costa Brasileira. Publicação. ACIESP. (87-II): 1-9.
- Keller, H. 2010. Plantas usadas por los guaraníes de Misiones (Argentina) para la fabricación y el acondicionamiento de instrumentos musicales. *Darwiniana*. 48(1): 7-16.
- Khurana-Kaul, V.; Kachhwaha, S.; Kothari, S. 2010. Direct shootregeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. *Biologia Plantarum*. 54: 369-372.
- Kozai, T.; Fujiwara, M.; Hayashi, M.; Aitken-Christie, J. 1992. The *in vitro* environment and its control in micropropagation. In: K. Kurata y T. Kozai. *Transplant Production Systems*. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. Pp. 247-282.
- Kozai, T.; Nguyen, Q.; Kubota, C. 1997. Environmental control and its effects in transplant production under artificial light. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*. 38: 194-199.
- Kuniyoshi, Y. 1983. Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária. Dissertação, como requisito parcial para a obtenção do Título de "Mestre em Ciências M.Sc." Universidade Federal do Paraná. Curitiba. Brasil. Pp. 245.
- Lacerda Da Silva, L.; Sartori Paoli A. 2006. Morfologia e Anatomia da Semente de *Balfourodendron riedelianum* (Engler) Engler – Rutaceae. *Revista Brasileira de Sementes*. 28(1): 16-20.
- Lago, J.; de Avila, P.; de Aquino, E.; Moreno, P.; Ohara, M.; Limberger, R.; Apel, M.; Henriques, A. 2004. Volatile oils from leaves and stems barks of *Cedrela fissilis* (Meliaceae): chemicals composition and antibacterial activities. *Flavour and fragrance journal*. 19(5): 448-451.
- Larraburu, E.; Apóstolo, N.; Llorente, B. 2012. *In vitro* propagation of pink lapacho: response surface methodology and factorial analysis for optimisation of medium components. *International Journal of Forestry Research*. Pp. 9.

- Lazarotto, M.; Muniz, M.; Beltrame, R.; dos Santos, A.; Mezzomo, R.; Piveta, G.; Blume, E. 2013. Qualidade fisiológica e tratamentos de sementes de *Cedrela fissilis* procedentes do sul do brasil. *Revista Árvore*, Viçosa-MG. 37(2): 201-210.
- Ley 13.273. 1948. Honorable Cámara de Diputados y Senadores de la Nación. Diario de Sesiones, sanción.
- Ley 26.331. 2007. Honorable Cámara de Diputados y Senadores de la Nación. Diario de Sesiones, sanción.
- Li, Q.; Deng, M.; Zhang, J.; Zhao, W.; Song, Y.; Li, Q.; Huang, Q. 2013. Shoot organogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Lysionotus serratus* D. Don. *The Scientific Word Journal* 2013. Pp. 7.
- Lino, C.; Dias, H.; Albuquerque, J. 2011. The Mata Atlântica Biosphere Reserve: review and uptade of the limits and the zoning of the Mata Atlântica Biosphere Reserve in digital cartographic base: phase VI. Documentos de Trabajo No 40, UNESCO (Programa de Cooperación Sur-Sur). París. Francia. Pp. 161.
- Longhi, R 1995. Livro das arvores. Arvores e arvoretas do Sul. 2 ed. Porto Alegre. Brasil. L&PM. Pp. 176.
- López, J.; Little, E.; Ritz, G.; Rombold, J.; Hahn, W. 1987. Árboles comunes del Paraguay: Ñande yvyrá mata kuera. Cuerpo de Paz. Paraguay. Pp. 425.
- Lorenzi, H. 1998. Árvores Brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. PLANTARUM S.A. Nova Odessa. S.P. Brasil. Pp. 352.
- Lozano, E.; Zapater, M. 2008. Delimitación y estatus de *Handroanthus heptaphyllus* y *H. impetiginosus*. (Bignoniaceae, Tecomeae). *Darwiniana*. 46(2): 304-317.
- Luna, C. V. 2010. Automatización de la micropropagación de *Ilex paraguriensis* e *Ilex dumosa*: estudios de intercambio gaseoso, estado hídrico y fotosíntesis durante las etapas de aclimatación y post-aclimatación. Tesis para optar al grado de doctor en Recursos Naturales de la Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes. Argentina. Pp. 160.
- Luque R., Sousa H.C.; Kraus J.E. 1996. Métodos de coloracao de Roeser (1972)-modificado- e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alciano 8 GS ou 8 GX. *Acta Botanica Brasileira*. 10:199–212.
- Mabberley, D. 1997. The Plant-Book, a portable dictionary of the vascular plants. Cambridge University Press, UK. Pp. 300.
- Mac Donagh, P.; Rivero L. 2006. ¿Es posible el uso sustentable de los bosques de la Selva Misionera? Situación ambiental en la ecorregión del Bosque Atlántico del Alto Paraná (Selva Paranaense). En: A. Brown, U. Martínez Ortiz, M. Acerbi, and J. Corcuera (Eds). La situación ambiental Argentina 2005. Fundación Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires. Argentina. Pp. 211-217.

- Maffra, C.; Cherubin, M.; Fortes, F.; Cantarelli, E.; Turchetto, F.; Sheibner, G. 2010. Aspectos físicos e de emergência de sementes de Louro-Pardo (*Cordia trichotoma* (VELL.) Arrab. ex Steud) armazenadas em condição ambiente. 14^{as} Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Facultad de Ciencias Forestales, UNaM - EEA Montecarlo, INTA. Eldorado. Misiones. Argentina. Pp. 6.
- Maguire, J. 1962. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*. 2: 176-177.
- Maiocco, C.; Stehr, A.; Agostini, J.; Heck, J.; Mendoza Padilla, M. 2008. Ensayos de control cultural y químico del barrenador (*Hypsipyla grandella*) en plantaciones de cedro misionero (*Cedrela fissilis*). XIII Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Facultad de Ciencias Forestales, UNaM - EEA Montecarlo, INTA. Eldorado. Misiones. Argentina. Pp. 5.
- Mangieri, H. 1965. Reconstitucion de los misionero y características biologicas de las principales especies. En; Primeras Jornadas de trabajo del CEBS. Eldorado-Misiones. Argentina. Pp.141-145.
- Mantovani, N.; Henz F.; Vestena S. 2001. Regeneração in vitro de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). *Ciência Florestal*. Santa Maria. 11(2): 93-101.
- Martínez, E.; Ramos, C. 2012. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán: Bignoniaceae. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Fascículo 104: 1-58.
- Martínez, M. E., Niella, F., Rocha, P., Rodríguez, R. B. 2008. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Cedrela fissilis* Velloso. XIII Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Facultad de Ciencias Forestales, UNaM-EEA Montecarlo, INTA. Eldorado. Misiones. Argentina. Pp 12.
- Martínez, M.; Mancuello, C.; Brítez, F.; Pereira, C.; Arrúa, J.; Franco, G.; Conteiro, M.; Iañez, V.; González, F.; Benítez, B.; López, T.; Pérez, S.; Ferreira, F. 2012. Caracterización química y actividades biológicas de lapachol aislado de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos. *Steviana*. 4: 47-64.
- Martins, L.; do Lago, A.; Cicero, S. 2011. Qualidade fisiológica de sementes de *Tabebuia avellanadae* e *Tabebuia impetiginosa* submetidas à ultra-secagem. *Revista Brasileira de Sementes*. 33 (4): 626-634.
- Martinuzzi, 2010. Ficha técnica de maderas: Guatambú blanco. Centro INTI-Maderas y Muebles. (Revisado: Septiembre 2013. Disponible on line en: www.inti.gob.ar/maderas/caracterizacion.htm)
- Marto T. 2005. Ficha técnica de *Tabebuia heptaphylla* (Ipê-Roxo). IPEF - Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais, 2005. Pp. 5.
- Masetto, T.; Rocha Faria, J.; Queiroz, S. 2008. Avaliação da qualidade de sementes de Cedro (*Cedrela fissilis* - Meliaceae) pelo teste de raios X. *Ciência agrotecnica*, Lavras. 32 (6): 1708-1712.

- Mendonça, E.; Ramos, N.; Paula, R. 2001. Viabilidade de sementes de *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (Louro-pardo) pelo teste de Tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*. 23(2):64-71.
- Meneghello, G.; Mattei V. 2004. Semeadura direta de timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*), canafístula (*Peltophorum dubium*) e cedro (*Cedrela fissilis*) em campos abandonados. *Ciência Florestal*, Santa Maria. 14 (2): 21-27.
- Miranda, D.; Bohren, A.; Keller, H.; Grance, L.; Gartland, H. 2000. Clave de reconocimiento de especies leñosas de *Rutaceae* presentes en la Selva Paranaense Argentina), mediante el uso de caracteres dendrológicos. *Quebracho* 8: 47-55.
- Montagnini, F.; Fernández, R.; Hamilton, H. 1995. Relaciones entre especies nativas y la fertilidad de los suelos. Parte 1: Contenido de elementos en la biomasa. *Yvyrareta* 6: 5- 12.
- Montagnini, F., Eibl, B., Fernández, R., Brewer, M. 2006 a. Estrategias para la restauración de paisajes forestales. Experiencias en Misiones, Argentina. Congreso forestal latinoamericano IUFRO. Talca, Chile.
- Montagnini, F.; Eibl, B.; Fernández, R. 2006 b. Adaptabilidad y crecimiento de especies forestales nativas de bosque húmedo subtropical en sitios degradados de Misiones, Argentina. *Yvyrareta*. 13: 10-16.
- Morales Ortiz, E.; Herrera Tuz, L. 2009. Cedro: Protocolo para su Colecta, Beneficio y Almacenaje. Comisión nacional forestal- Región XII Península de Yucatán. Departamento de conservación y restauración de ecosistemas forestales. Programa de germoplasma forestal. Estado de Yucatán. Pp. 23.
- Moreira de Carvalho, M.; Nery M.; de Oliveira L.; Hilhorst, H.; Mendes Guimarães, R. 2008. Morphophysiological development of *Tabeluia serratifolia* Vahl Nich. seeds. *Sciencia Agricola* (Piracicaba, Brazil.). 65(6):643-651.
- Mori, N. 2010. Variabilidade genética entre e dentro de Subpopulações de Ipê-roxo *Handroanthus heptaphyllus* (vell.) Mattos e seu sistema reprodutivo. Teses (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho. Botucatu. Brasil. Pp: 57.
- Mori, N.; Teixeira de Moraes M.; Midori Morita, C.; Mori E. 2012. Genetic diversity between and within populations of *Handroanthus heptaphyllus* (vell.) Mattos using microsatellite markers. *Cerne*, Lavras. 18(1): 9-15.
- Mostacedo, B.; Justiniano, J.; Toledo, M.; Fredericksen, T. 2003. Guía dendrológica de especies forestales de Bolivia. 2º Edición. Santa Cruz de la Sierra. Bolivia. Pp. 46-49.
- Muellner, A.; Samuel, R.; Johnson, S.; Cheek, M.; Pennington, T.; Chase, M. 2003. Molecular phylogenetics of Meliaceae (Sapindales) based on nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany*. 90: 471-480.

- Muellner, A.; Pennington, T.; Koecke, A.; Renner, S. 2010. Biogeography of *Cedrela* (Meliaceae, Sapindales) in Central and South America. *American Journal of Botany*. 97(3): 511-518.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*. 25: 135-166.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Muruaga, S. 1983. Observaciones sobre Bruchidae (Coleoptera) del noroeste argentino. V. Estudios morfológicos y biológicos de *Amblyeerus longesuturalis* (Pic). *Acta Zoologica Lilloana*. 37 (1):91-100.
- Navarro, G. 1997. Contribución a la clasificación ecológica y florística de los bosques de Bolivia. *Revista boliviana de ecología y conservación del ambiente*. 2: 3-37.
- Nguyen, Q.; Kozai, T. 1998. Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. *Environment Control in Biology*. 36: 59-75.
- Niella, S.; Noguera, A.; Vera, J.; Niella, F. 1996. Cultivo *in vitro* de guatambú blanco (*Balfourodendron riedelianum*) y cedro misionero (*Cedrela fissilis*). *Yvyrareta* 7(7): 43-46.
- Niella, F.; Rocha, P. 2007. Efecto del tratamiento inductivo en el enraizamiento de estacas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, *Myrocarpus frondosus* fr. AH, y *Balfourodendron riedelianum* (Engl). *Yvyrareta*. 14: 41-46.
- Niella, F.; Rocha, P.; Eibl, B.; Bohren, A.; Ayala, L.; Conti, P.; Franco, M.; Radins, M. 2013. Desarrollo de técnicas de propagación clonal para la utilización sostenible de especies forestales nativas multipropósito y/o fijadoras de nitrógeno y productos forestales no madereros. Jornadas PIAs. PIA 10031. Proyectos de Investigación Aplicada - Componente Plantaciones Forestales Sustentables BIRF 7520. Pp. 12.
- Noguera, A.; Martínez, M.; Padilla, C.; Duarte, P. 2012. Multiplicación *in vitro* de *Myrocarpus frondosus* allemão (incienso) a partir del establecimiento de semillas. 15as Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Facultad de Ciencias Forestales, UNaM - EEA Montecarlo, INTA. Eldorado. Misiones. Argentina. Pp. 6.
- Nunes, E.; Benson, E.; Oltramari, A.; Araujo, P.; Moser, J.; Viana, A. 2003. *In vitro* conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and conservation journal*. 12:837-848.
- Nunes, E.; Laudano, W.; Moreno, F.; Castilho, C.; Mito, P.; Sampaio, F.; Bortoluzi, J.; Benson, E.; Pizolatti, M.; Carasek, E.; Viana, A. 2007. Micropropagation of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). In: Jain, S.M.; Häggmann, H. (Eds) Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Springer. Dordrecht. Pp 221-235.

- Ocampo, F.; Nuñez, V. 2007. Propagación *in vitro* de *Psidium guajaba* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 8(1): 22-27.
- Olmos, S.; Luciani, G.; Galdeano, E. 2010. Biotecnología y Mejoramiento vegetal II. En: Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., y Mroginski, L (Eds.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. Pp: 163-172.
- Ortiz Domínguez, R. 1993, Morfología de plántulas de 20 especies forestales nativas del Paraguay, San Lorenzo, Facultad de Ingeniería Agronómica. Pp. 76.
- Ottone, J. 1993. Árboles forestales. Prácticas de cultivo. Edición Agro Veterinaria S.A. Buenos Aires. Argentina. Pp. 573.
- Ovando, G.; Enciso, M.; Ovelar, G.; Villalba, N. 2013. Propagación vegetativa de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (lapacho negro), mediante esquejes de raíz. *Investigación Agraria*. 9(1), 73-79.
- Patiño Valera F. 1997. Recursos genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los neotropicos: propuestas par acciones coordinadas. FAO. Viale Delle Terme di Caracalla, 00100, Roma, Italia. Pp. 123.
- Paula, J., Alves J. 2003. Madeiras nativas: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção, uso. Brasília: Fundação Mokiti Okada. Pp. 541.
- Peixoto, M.; Piña-Rodrigues, F.; Freire, J.; Breier, T.; Reis, L.; Nogueira, E.; Kunz, V.; Santos, A.; Neto, S.; Oliveira, P. 2008. 1ª nota técnica de sementes florestais: *Cedrella fissilis* Vellozo. RIOESBA, Rio de Janeiro. (01): 4.
- Pennington, T.; Edwards, K. 2001. Meliaceae. In: J. Steyermark, P. Berry, K. Yatskievych, N; Holst, B. (Eds). Flora of the Venezuelan Guayana. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis. 6: 528-549
- Pennington, T.; Styles, B. 1975. A generic monograph of the Meliaceae. *Blumea*. 22:419-540.
- Pennington, T.; Styles, B.; Taylor, D. 1981. Meliaceae. Monograph N° 28. Flora Neotropica. The New York Botanical Garden. New York. USA. Pp. 470.
- Pérez García, F.; Pita Villamil, J. 2001. Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Eds: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. España. ISBN: 84-491-0503-X. Pp. 16.
- Pérez Gómez, J.; Demetrio Ramos, S. 2012. Establecimiento *in vitro* de *Abies guatemalensis* (Pinabete) a partir de embriones cigóticos. Tesina para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Zamorano. Zamorano. Honduras. Pp. 29.
- Pérez-Moreau, R. 1994. Boraginaceae. En: R.L. Pérez-Moreau (Ed.). Flora Chaqueña. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires. Argentina. 8: 3-11.

- Pezzutti, R.; Caldato, S. 2014. Conservación *ex situ* de cinco especies nativas de importancia en el NE de Corrientes. *Anuario de Investigación USAL*. (1): 159-160.
- Pilatti, F. 2011. Crescimento, perfil metabólico e citoquímica de calos de *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). Tese (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. Brasil. Pp. 132.
- Pilatti, F.; Aguiar, T.; Simões, T. 2011. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 47:82–98.
- Pinazo, M.; Moscovich, F.; Dummel, C.; Knebel O. 2008. Patrón espacial de *Cedrela fissilis* vell. En un bosque sometido a aprovechamiento selectivo en el norte de la provincia de Misiones. (XIII Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales - Facultad de Ciencias Forestales, UNAM - EEA Montecarlo, INTA Eldorado, Misiones, Argentina. Pp. 8.
- Pinazo, M.; Moscovich, F.; Dummel, C.; Knebel O. 2009. Patrón espacial de la regeneración de dos especies leñosas en un sector aprovechado de la Selva Paranaense. *Ecologia austral*. 19 (2)139-148.
- Pires de Freitas, T. 2012. Propagação de ipê-roxo (*Handroanthus heptaphyllus* Mattos) por miniestaquia. Tese (Mestrado). Universidade Estadual do Norte Fluminense- Darcy Ribeiro. Brasil. Pp. 88.
- Póvoa de Mattos P.; Seitz, R.; Maria de Salis, S. 2005. Bol. *Pesquisa Florestal*. Colombo-Brasil. (50): 60-80.
- Ramalho Carvalho, P. 2004. *Balfourodendron riedelianum*. Circular técnica 93. EMBRAPA. Pp. 12.
- Ramalho Carvalho, P. 2005. Cedro. Circular técnica 113. EMBRAPA. Pp. 17.
- Reitz, R.; Klein, R. M.; Reis, A. 1988. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Sudesul. Pp. 525.
- Ríos, R.; Galvão, F.; Ribas Curcio, G. 2008. Variaciones estructurales de la vegetación arbórea en tres ambientes de una selva con Araucaria en Misiones, Argentina. *Floresta*, Curitiba, PR. 38(4): 743-756.
- Ríos, R.; Galvão, F.; Ribas Curcio, G. 2010. Estructura de las principales especies arbóreas en el Parque Cruce Caballero y su similitud florística con áreas de Argentina y de Brasil. *Ciência Florestal*, Santa Maria. 20(2): 193-206.
- Robledo Paz, A.; Villalobos Arámbula, V.; Santacruz Varela, A. 2009. Inducción eficiente de brotes adventicios en cotiledones de *Pinus maximartinezii* Rzedowski. *Acta botánica mexicana*. (89): 47-62.
- Rocha, F.; Saggin Júnior, O.; Ribeiro da Silva, E.; de Lima W. 2006. Dependência e resposta de mudas de cedro a fungos micorrízicos arbusculares. *Pesquisa agropecuaria brasileira*, Brasília. 41(1): 77-84.

- Rodrigues, R.; Gandolfi, S.; Nave, A.; Brancalion, P. 2007. Informações sobre coleta, beneficiamento, Armazenamento e quebra de dormência de espécies florestais nativas. Capacitação para viveiros fornecedores do Clickárvore - SOS – Mata Atlântica. Pp. 36.
- Rodríguez B.; Mauri, R.; Gomes da Silva, A.; da Silva Oliveira, J. 2009. Caracterização dendrológica e anatômica de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. Pp. 4.
- Rodríguez, M.; Cardozo, A.; Ruíz Dias, M.; Prado D. 2005. Los Bosques Nativos Misioneros: Estado Actual de su conocimiento y perspectivas. Pp. 34.
- Rodríguez Beraud, M.; Latsague Vidal, M.; Chacón Fuentes, M.; Astorga Brevis, P. 2014. Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque* (Valdivia). 35(1): 111-118.
- Roman, M.; Bressan, D.; Durlo, M. 2009. Variáveis morfométricas e relações interdimensionais para *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex Steud. *Ciência Florestal*. 19(4): 473-480.
- Rosa, A.; González, M. 2009. Agentes químicos antisépticos y desinfectantes. Capítulo 11. Microbiología Estomatológica. (21):107-122.
- Rother, D.; Rodrigues, R.; Pizo, M. 2009. Effects of bamboo stands on seed rain limitation in a rainforest. *Forest Ecology and Management*. 257:885-892.
- Rzedowski, J.; de Rzedowski, G. 1993. Meliaceae. En: Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski (eds.). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 16. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México. Pp. 44.
- Salazar, R.; Soihet, C.; Méndez, J. 2000. Manejo de semillas de 100 especies forestales de América Latina. Turrialba, Costa Rica: CATIE. Proyecto de Semillas forestales: Danida Forest *Seed Centre*. ISBN: 1(9977):57-349.
- Saldias, M.; Quevedo, R.; García, B.; Lawrence, A.; Johnson, J. 1994. Guía para uso de árboles en sistemas agroforestales para Santa Cruz, Bolivia. Pp. 112.
- Sallanon, H.; Coudret, A. 1990. Water fluxes between *in vitro* plants and atmosphere in micropropagation. *Comptes Rendus de l'Académie des sciences Paris* 310: 607-613.
- Salusso, M. 2008. Regulación Ambiental: Los Bosques Nativos. Una Visión Económica. Universidad de Belgrano. Buenos Aires, Argentina. Pp. 92.
- Sánchez de Lorenzo-Cáceres, J. 2008. Flora Ornamental Española. Pp. 20.
- Santamaría Jiménez, A.; Páez, T.; Soria, N.; Reyes, C. 2012. Establecimiento de un protocolo para la germinación *in vitro* e inducción a callo embriogénico de

- cedro (*Cedrela montana*) a partir de embriones zigóticos. *Propagación Vegetal*. 8(5): 20-38.
- Santamaría, J.; Murphy, K.; Leifert, C.; Lumsden, P. 2000. Ventilation of cultured vessels: I. Increased water movement rather than reduced concentrations of ethylene and CO₂ is responsible for improved growth and development of *Delphinium in vitro*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 75: 320-327.
- Santos, D.; Rakocevic, M.; Takaki, M.; Ribaski, J. 2006. Morphological and physiological responses of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae) seedlings to light. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49(1): 171-182.
- Sartori, A.; Azevedo Tozzi, A. 2004. Revisão taxonômica de *Myrocarpus* Allemão (Leguminosae, Papilionoideae, Sophoreae). *Acta botánica brasileira*. 18(3): 521-535.
- SAyDS (Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable). 2001. Informe Regional: Selva Misionera. Primer Inventario Nacional de Bosque Nativo. Pp. 132.
- SAyDS (Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable). 2003. Algunas especies forestales autóctonas de la Argentina. Pp. 36.
- SAyDS (Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable). 2005. Primer Inventario Nacional de Bosque Nativo. Informe Nacional. Proyecto Bosques Nativos y Áreas Protegidas Préstamo BIRF 4085-AR. Pp: 126.
- SAyDS (Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable). 2012. Informe sobre el estado del ambiente. Pp. 72-99.
- SAyDS (Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable). 2013. Ley N 26.331 de Presupuestos Mínimos de Protección Ambiental de los Bosques Nativos. Informe resumen de estado de implementación. Consejo Federal de Medioambiente. Pp 19.
- SAyDS (Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable). 2014. Indicadores de desarrollo sostenido. Superficie de bosque nativo. (Revisado: Junio 2014. Disponible on line en: <http://www.ambiente.gov.ar>)
- Schendelbek, A.; Niella, F.; Rocha, P.; Barbón, R. 2008. Establecimiento *in vitro* de *Cordia trichotoma* V. a partir de segmentos nodales. XIII Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Facultad de Ciencias Forestales, UNaM – EEA Montecarlo, INTA. Eldorado. Misiones. Argentina. Pp. 9
- Schneider, P.; Scheeren, L.; Fleig, F.; Schneider, P.; Finger, C. 2005. Crescimento da *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. Ex Steud., na depressão central do Estado do Rio Grande do Sul. *Revista Floresta e Ambientev.* (13): 26-33.
- Schrepel, J. 2010. Analysis of enrichment plantings in native forests of small-scale farmers in eastern Paraguay. Bachelor Thesis. Tharandt, AL. Pp. 44.

- Schwartz, O.; Sharma, A.; Beaty, R. 2005. Propagation from non-meristematic tissues: organogenesis. In: Trigiano, R. N. y Gray, D. J. (Eds.). *Plant Development and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton. Florida. USA. Pp: 159-172.
- Scordo Mateo, P. 2013. Plantaciones forestales con propósito de secuestrar CO2 para agroecosistemas sustentables. Tesina para optar el grado de Ingeniero Agronomo. Universidad Católica Argentina. Buenos Aires. Argentina. Pp. 58.
- Seidler, T.; Plotkin, J. 2006. Seed dispersal and spatial pattern in tropical trees. *Plos Biology*. 4: 2132-2137.
- SIB (Sistema de Información de la Biodiversidad). 2004. *Balfourodendron riedelianum* (Revisado: Octubre 2014. Disponible on line en: http://www.sib.gov.ar/ficha/PLANTAE*balfourodendron*riedelianum#_lguazú)
- SINASIP (Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas). 2009. Plan estratégico 2010-2015. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo Global Environmental Facility- Proyecto Paraguay Silvestre. Pp. 155.
- Siqueira, J.; Saggin-Júnior, O. 2001. Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. *Mycorrhiza*. 11(5): 245-255.
- Smith, C. 1960. A revision of *Cedrela* (Meliaceae). *Fieldiana*. 29: 295-341.
- Soares, F.; Paiva, R.; Alvarenga, A.; Nery, F.; Vargas, D.; Silva, D. 2011. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. *Ciência e Agrotecnologia*. 35(1): 152-157.
- Solís, S. 2002. Domacios foliares en plantas del nordeste Argentino. Revista de divulgación Científica y Tecnológica SeCyT (Revisado: Noviembre 2013. Disponible on line en: <http://www.revistacyt.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2002/06-Biologicas/B-010.pdf>)
- Soltis, D.; Smith, S.; Cellinese, N.; Wurdack, K.; Tank, D.; Brockington, S.; Refulio-Rodriguez, N.; Walker, J.; Moore, M.; Carlsward, B.; Bell, C.; Latvis, M.; Crawley, S.; Black, C.; Diouf, D.; Xi, Z.; Rushworth, C.; Gitzendanner, M.; Sytsma, K.; Qiu, Y.; Hilu, K.; Davis, C.; Sanderson, M.; Beaman, R.; Olmstead, R.; Judd, W.; Donoghue, M.; Soltis, P. 2011. Angiosperm phylogeny: 17 genes, 640 taxa. *American Journal of Botany*. 98(4): 704-730.
- Stevens, P. 2001. Angiosperm phylogeny website. Version 9. (Revisado: Noviembre 2013. Disponible on line en: [http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/.](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/))
- Styles, B. 1981. Meliaceae, En: Pennington, T. D., Styles, B. T.; Taylor, D. H. (Eds.). *Flora Neotropica monograph*. 28: 1-470.
- Tabarelli, M.; Mantovani, W. 2000. Gap-phase regeneration in a tropical montane forest: the effects of gap structure and bamboo species. *Plant Ecology*. 148:149-155.

- Thorpe, T.; Stasolla, C.; Yeung, E.; De Klerk, G-J.; Roberts, A.; George, E. 2008. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and supports systems. In: E. F. George, M.A. Hall, G-J. De Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3ra Edición, Springer, The Netherlands. Pp: 115-174.
- Toledo, M.; Salick, J.; Loiselle, B.; Jorgensen, P. 2005. Composición florística y usos de bosques secundarios en la provincia Guarayos. Santa Cruz. Bolivia. *Revista Boliviana de Ecología y Conservación*. 18: 1-16.
- Toledo, M.; Chevallier, B.; Villarroel, D.; Mostacedo, B. 2008. Ecología y silvicultura de especies menos conocidas de Cedro, *Cedrela* ssp. Primera edición. Imprenta Sirena. Bolivia. Pp. 40.
- Torretta, J.; Cerino, M. 2013. Biología reproductiva de tres especies simpátricas de Bignoniaceae en Argentina. *Boletín Sociedad Argentina de Botánica*. 48 (1): 73-89.
- Torretta, J.; Navarro, F.; Medán, D. 2009. Visitantes florales nocturnos del girasol (*Helianthus annuus*, Asterales: Asteraceae) en la Argentina. *Revista Sociedad Entomológica Argentina*. 68 (3-4): 339-350.
- Tortorelli, L. 1956. Maderas y Bosques Argentinos. Buenos Aires: Acme S. A. Pp. 910.
- Tourinho Salamoni, A.; Bisognin Cantarelli, E.; Müller, G.; Weiler, E. 2012. Germinação e desenvolvimento inicial de *Cedrela fissilis* Vell. em diferentes substratos. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, *Goiânia*. 8 (15): 978-985.
- UMSEF (Unidad de Manejo del Sistema de Evaluación Forestal). 2002. Primer Inventario Nacional de Bosques Nativos. Proyecto Bosques Nativos y Áreas Protegidas Préstamo BIRF 4085 – AR. Cartografía y Superficie de Bosque Nativo de Argentina. Dirección de Bosque. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable (SAyDS). Pp 25.
- UMSEF (Unidad de Manejo del Sistema de Evaluación Forestal). 2007. Informe sobre la deforestación en la Argentina. Dirección de Bosque. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable (SAyDS). Pp 10.
- UMSEF (Unidad de Manejo del Sistema de Evaluación Forestal). 2012. Monitoreo de la superficie de bosque nativo de la República Argentina periodo 2006-2011. Regiones forestales Parque Chaqueño, Selva Misionera y Selva Tucumano Boliviana. Dirección de Bosque. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable (SAyDS). Pp 61.
- Valdés Castrillón, B.; Talavera Lozano, S.; Fernández-Galiano Fernández, E. 1987. Flora vascular de Andalucía Occidental. Ketres Editora S.A. Barcelona. Pp. 543.

- Valério, A.; Farinha Watzlawick, L.; Silvestre, R.; Soares Koehler, H. 2008. Determinação da densidade básica da madeira de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) ao longo do fuste. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia*. 1 (1): 23-28.
- Varela, C.; El Souki, M. 2013. Relaciones fenéticas y clave taxonómica para diferenciar las especies del género *Cedrela* (Meliaceae) en Venezuela. *Caldasia*. 35(2) 281-292.
- Vila, S.; Gonzalez, A.; Rey, H.; Mroginski, L. 2003. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Melia azedarach* (Meliaceae). *In Vitro celular and development. Biology Plant*. 39: 283-289.
- Vila S., Gonzalez A., Rey H., Mroginski L. 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Cedrela fissilis*. *Biologia Plantarum*. 53: 383-386.
- Villalobos, A.; Thorpe, T. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca, W. M., Mroginski, L. A. (Eds). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT, Cali-Colombia. Pp. 127-141.
- Watson, L.; Dallwitz, J. 1992. The families of flowering plants, Leguminosae Juss. (Revisado: Agosto 2010. Disponible on line en: <http://deltaintkey.com/angio/www/legumino.htm>.)
- Willan, R. 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales con especial referencia a los trópicos. Estudio FAO Montes 20/2. DANIDA, FAO. Roma. Pp. 502.
- Wills, C.; Condit, R.; Foster, R.; Hubbell, S. 1997. Strong density and diversity related effects help to maintain tree species diversity in a neotropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. 94:1252-1257.
- Xavier, A.; dos Santos, G. A.; de Oliveira, M. L. 2003. Enraizamento de miniestaca caular e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). *Revista Árvore*, Viçosa. 27(3): 351-356.
- Xavier, A.; Otoni, W.; Penchel, R. 2007. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: Borém, A. (Org.). *Biotecnologia florestal*. Viçosa: UFV. 3:55-74.
- Xifreda, C. 1999. Rutaceae en Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II: 1015-1017. Ed. Fernando Zuloaga y Osvaldo Morrone.
- Yang, L.; Xu, C.; Hu, G.; Chen, K. 2006. Direct shoot organogenesis and plant regeneration in *Fortunella crassifolia*. *Biologia Plantarum*. 50(4): 729-732.
- Yang, J.; Zhou, C.; Zhao, B.; Zhang, C.; Li, C. 2011. Rapid direct adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from mature seed explants of *Phellodendron amurense* Rupr. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 (18): 4560-4565.
- Zamora, N. 2006. Flora de la Selva. Organización para estudios tropicales. Pp. 1-4

- Zapater, M.; del Castillo, E.; Pennington, T. 2004. El género *Cedrela* en la Argentina. *Darwiniana*. 42: 347-356.
- Zapater, M.; Califano, L.; del Castillo, E. 2005. Avances en el estudio de las especies de *Tabebuia* (Bignoniaceae) y su cultivo en la selva subtropical del noroeste argentino. En Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano. Corrientes. Argentina.
- Zarrilli, A. 2008. Bosques y Agricultura: Una Mirada a los Límites Históricos de Sustentabilidad de los Bosques Argentinos en un Contexto de la Explotación Capitalista en el Siglo XX. *Revista. Luna Azul*. (26): 87-106.
- Zhang, S.; Lemaux, P. 2005. Molecular aspects of *in vitro* shoot organogenesis. In: R. N. Trigiano y D. J. Gray (Eds.). *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton. Florida. USA. Pp: 178-185.
- Zumkeller Sabonaro, D.; Galbiatti, J.; de Paula, R.; Soto Gonzales, J. 2009. Producción de plantas de *Tabebuia heptaphylla* en diferentes sustratos y niveles de irrigación, en condiciones de invernadero. *Bosque* (Valdivia). 30(1): 27-35.