



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Agrarias

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

MODALIDAD TESINA

TÍTULO: "Optimización de la brotación *in vitro* de cultivares selectos de *Grevillea robusta*".

ALUMNO: BOGADO, FACUNDO ARIEL.

DIRECTOR: Dra. Claudia Luna.

Año 2017

## **I-RESUMEN:**

*Grevillea spp.* se propagan tradicionalmente a través de esquejes, pero este método sólo puede ser realizado con éxito durante un corto período en el año. Por lo tanto, la propagación *in vitro* podría representar una herramienta útil para acelerar la distribución de estas especies. Por ello en este trabajo se desarrolló un protocolo de establecimiento de segmentos nodales provenientes de plantas de invernadero de cultivares selectos de *G. robusta*, utilizando un procedimiento de desinfección consistente en el empleo de un pre-tratamiento de NaClO 0,25 g. L<sup>-1</sup> y Carbendazim 0,75 g. L<sup>-1</sup> por 15 minutos.

Mediante el establecimiento de los tejidos vegetales libre de patógenos ha sido posible la optimización de la brotación *in vitro*, si bien se obtuvieron resultados preliminares, posibilitando la obtención de un protocolo tentativo de multiplicación utilizando BA como promotor del proceso, son necesarios mayores estudios para lograr un mayor eficiencia en dicha fase de cultivo.

## II - INTRODUCCIÓN:

*Grevillea robusta* (roble sedoso) es una especie originaria de Australia, su velocidad de crecimiento acompañada de un manejo adecuado, permite lograr incrementos superiores a los obtenidos con *Pinus taeda* y *P. elliottii* en similares sitios ecológicos del Noreste de Argentina (López, 2005); además manifiesta una plasticidad climática marcada, sobre todo en regiones tropicales y subtropicales (Zárate Morales *et al.*, 2001) y la posibilidad de producir un producto de mayor valor, tanto alternativo como complementarios a las actualmente cultivadas, considerando el importante rol que podrían jugar en el país otras especies por su interés potencial (Moscovich *et al.*, 2005) Desde el punto de vista técnico, proporciona una madera con pocos defectos, lográndose una agradable apariencia de las superficies resultantes del cepillado y lijado (Zárate Morales *et al.*, 2001), lo que la hace atractiva por su veteado sedoso para la fabricación de muebles de buena calidad, paneles y recubrimientos de interiores (Fassola *et al.*, 2004).

Las semillas frescas si bien germinan fácilmente, no requiriendo tratamiento alguno, pierden su viabilidad en pocos meses si no se almacenan de manera correcta (Loewe, 1993); por ello en general se propaga tradicionalmente de forma asexual por enraizado de estacas, injertos y cultivo de tejidos; pero el primer método sólo se puede realizar con éxito por un corto período en el año debido a que se utilizan estacas no lignificadas; sin embargo la propagación *in vitro*, es un método confiable y es más deseable que la reproducción sexual; amén que las semillas de procedencias superiores e identificadas es costosa su recolección y las cantidades son insuficientes para satisfacer las necesidades actuales demanda (Salvatierra *et al.*, 2011); las plantas propagadas por estacas florecerían más pronto que las producidas por semilla; y ello representaría una herramienta útil para la instalación de Huertos Semilleros Clonales conformados por material élite, para ser incluidos en programas de mejoramiento o para acelerar el escalado de la producción (López, 2005). Si bien es una especie que a pesar de ser leñosa no es considerada recalcitrante para el cultivo de tejidos; en la mayoría de los estudios relacionados con ella existe poca información disponible sobre los efectos de los reguladores de crecimiento para desarrollar un protocolo de propagación (Leonardi *et al.*, 2001).

Por todo lo expuesto anteriormente resulta inminente la necesidad de diversificar el abanico productivo nacional, es por ello que su empleo cumpliría objetivos económicos, estéticos y ambientales, pudiendo generar productos múltiples que además de la valorización del ambiente sean una opción de real interés aún para pequeñas superficies; con lo cual, el ajuste de protocolos de macro y micropropagación resultarán imprescindibles.

## III- OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es optimizar la brotación *in vitro* de cultivares selectos de *Grevillea robusta*.

## IV- ANTECEDENTES

*Grevillea* spp. se propagan tradicionalmente a través de esquejes, pero este método sólo puede ser realizado con éxito durante un corto período en el año. Por lo tanto, la propagación *in vitro* podría representar una herramienta útil para acelerar la distribución de estas especies (Pierik, 1988).

Algunos cultivares de *Grevillea* spp., Gorst *et al.* (1978) fueron propagados a través de cultivo de tejidos con la adición de NOA (ácido 2-naftiloxiacético) y 2iP (N6- (2-isopentilo) adenina) al medio de crecimiento.

En este sentido, se han realizado algunas investigaciones en el género, sobre todo en *Grevillea rosmarinifolia*; donde Ben-Jaacov y Dax (1981) han logrado aumentar la producción de brotes con el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 6-bencil-aminopurina (BA) y ácido naphthalenacético (NAA).

Watad *et al.* (1992) utilizaron la técnica de propagación *in vitro* con el fin de lograr una producción a gran escala de seis especies y cultivares de *Grevillea*; empleando BA para la proliferación de brotes de segmentos nodales y además estudiaron los efectos de diferentes auxinas sobre el enraizamiento de algunas especies de *Grevillea*, demostrado que NAA es más eficaz que el ácido indol-acético (IAA) y el ácido indol butírico (IBA). Sin embargo, la escasez de información requiere un estudio más profundo de los efectos de diferentes hormonas y su concentración en la micropagación de especies *Grevillea*. Por otra parte, Bunn y Dixon (1992) observaron que el aumento de la concentración de citoquininas aumentaba el número brotes por explante en *Grevillea scapigera*.

Rajasekaran (1994) micropagó *Grevillea robusta* utilizando explantes de árboles maduros cultivados en Woody Plant Medium (WPM) adicionado con BA y NAA para la proliferación de brotes; si bien mostró resultados interesantes, los subcultivos que requiere dicho protocolo son numerosos (10 a 12 semanas en tres transferencias sucesivas).

Leonardi *et al.* (2001) describen el papel que tanto el tipo de hormona y la concentración tiene en la multiplicación de brotes y el enraizamiento de dos especies de *Grevillea*; aunque también se necesita más investigación para comprender mejor la interacción entre el tipo y la concentración de la hormona en subcultivos sucesivos y si estas condiciones afectan el establecimiento de plantas en el campo después de la aclimatación.

Por su parte Sukamto (2003) ha utilizado el cultivo de tejidos para propagar *Grevillea papuana* especie amenazada por la sobreexplotación de madera, por su interés ornamental y/o medicinal. Obteniendo buenos resultados a partir de hipocotilos, cotiledones y nudos de plántulas crecidas *in vitro*; optimizando la brotación de múltiples yemas la combinación de BA y NAA.

## V- MATERIALES Y METODOS

**Lugar de realización:** Laboratorio de Biotecnología aplicada y Genómica Funcional IBONE-CCT NORDESTE- Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE.

**Material vegetal:** Se trabajó con individuos selectos injertados de *Grevillea robusta* los que crecieron en macetas bajo condiciones de invernadero (Fig. 1). El germoplasma se obtuvo mediante el Proyecto PIA 10070: INTA-EEA Bella Vista- Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE)- Pomera Maderas S.A.

### **Metodología:**

- **Establecimiento *in vitro* del material vegetal: Uso de distintos desinfectantes superficiales.**

**Tratamientos de desinfección:** En todos los casos primeramente se realizó un pre-tratamiento consistente en un cepillado fuerte y firme con solución acuosa de hipoclorito de sodio

(NaOCl) al 5 %, para luego ser transferidos a distintos tratamientos con agentes desinfectantes o fungicidas: hipoclorito de sodio (NaOCl), peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), peroxosulfato acido de potasio o persulfato de potasio (KHSO<sub>5</sub>), oxicloruro de cobre (OXI) 50% granulado dispersable y Carbendazim (CBZ) suspensión concentrada 500g. L<sup>-1</sup>; en diferentes concentraciones y tiempos de exposición en agitación constante con agitador orbital (Tabla 1). Una vez finalizado el tratamiento de desinfección, los explantes fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril (Vera Bravo *et al.*, 2015; Bogado *et al.*, 2016).

**Medio de cultivo:** se utilizó un medio de cultivo compuesto por las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), en su concentración original (MS), semisólido (agar SIGMA® A-1296, 0.65 %), enriquecido con sacarosa 30 gr·L<sup>-1</sup> y libre de reguladores del crecimiento. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 con KOH o HCl antes de la adición del agente gelificante; esterilizándose por calor húmedo mediante autoclave a 1.46 kg·cm<sup>-2</sup> durante 20 minutos.

**Siembra de los explantes y condiciones de cultivo:** Los segmentos nodales se colocaron respetando la polaridad de la planta, a razón de un explante por tubo bajo cabina de flujo laminar en condiciones asépticas y fueron incubados durante 28 días en condiciones de luz (fotoperiodo 14 h, 116  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  luz PAR) y temperatura ( $27\pm2^\circ\text{C}$ ) controlados. Se cultivaron 10 explantes por tratamiento en cámara de flujo laminar, efectuándose 3 repeticiones.

- **Brotación *in vitro* en biorreactores de inmersión temporal:** se utilizó un medio de cultivo compuesto por las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), en su concentración original (MS), enriquecido con sacarosa 30 gr·L<sup>-1</sup>, con un tratamiento Control: sin regulador de crecimiento, y distintas dosis de 6-bencil-amino-purina (BA), 1, 2, 5 y 10 mg·L<sup>-1</sup>. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 con soluciones de KOH o HCl; esterilizándose por calor húmedo mediante autoclave a 1,46 kg·cm<sup>-2</sup> durante 20 minutos. El experimento se llevó a cabo en biorreactores de inmersión temporal. Se cultivaron 5 explantes por recipiente, provenientes del ensayo de establecimiento, realizándose 3 repeticiones por cada tratamiento. Utilizándose una frecuencia de inmersión de 4 h con una duración de inmersión de 1 min. Los cultivos fueron incubados en un cuarto climatizado a  $27\pm2^\circ\text{C}$  y 14 hs. de fotoperíodo ( $116 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , luz PAR) (Figura 2 A, B yC)..

**Análisis estadístico:** Los resultados fueron expresados en porcentaje de contaminación, oxidación y supervivencia/establecimiento de los explantes. Determinándose Análisis de la Varianza Multivariado (ANAVAM) y Test de comparaciones múltiples de Hotelling. Porcentaje de ruptura de dominancia apical, numero de brotes por explante y longitud de los brotes en centímetro. Determinándose Análisis de la Varianza no Paramétrica y Prueba de Kruskal Wallis ( $P \leq 0.05$ ). Se utilizó el programa estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2012).

## VI-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- **Establecimiento *in vitro* del material vegetal: Uso de distintos desinfectantes superficiales.**

Los fungicidas y los bactericidas son agentes químicos usados para la prevención y/o eliminación de agentes patógenos o contaminantes dentro del cultivo de tejidos y es muy común incluirlos en el protocolo de desinfección (Villamar Flores, 2014; Pariani, 2015); en la

Tabla 2 se presentan los resultados de porcentaje de contaminación, oxidación y supervivencia/establecimiento de los explantes; como puede observarse si bien todos los tratamientos ensayados han permitido el establecimiento exitoso de los cultivos entre un  $33,33 \pm 5,77$  y un  $90,00 \pm 10,00$  % (Figura 3 D y E); los mejores resultados se lograron con un pre-tratamiento de NaClO 0,25 g. L<sup>-1</sup> y CBZ 0,75 g. L<sup>-1</sup> por 15 minutos (T 12), que no solo posibilitó el mayor porcentaje de establecimiento presentando diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) con respecto a los demás tratamientos; sino que también registró uno de los menores valores de oxidación en los tejidos ( $6,67 \pm 11,55$  %) y logró controlar más eficazmente la contaminación con solo un  $3,3 \pm 0,58$ %. No así de efectivo han resultado los tratamientos con oxicloruro de cobre, donde se registraron niveles de contaminación de entre  $46,7 \pm 1,15$  y  $56,7 \pm 0,58$ %; aunque existen antecedentes de su uso para la desinfección de yemas axilares con una combinación de fungicidas y bactericidas con posterior sumergimiento de los explantes en hipoclorito de sodio en *Guadua angustifolia* (Jiménez *et al.*, 2006); mientras que en segmentos nodales de la misma especie, fue muy efectiva la inmersión durante 30 y 60 minutos en soluciones de oxicloruro de cobre, registrando los menores índices de contaminación por hongos luego de establecido el material (López, 2012).

En la micropropagación de algunas especies leñosas, se ha comprobado que el empleo de fungicidas con otros agentes desinfectantes como el hipoclorito de sodio, ha permitido lograr niveles de asepsia mayores al 70% (Chung y Carrasco, 2002; Marulanda e Isaza, 2004; Pedroza-Manrique *et al.*, 2007); en *Eucalyptus grandis* existen reportes tanto del uso de oxicloruro de cobre como fungicida preventivo de contacto, pero utilizado en plantas donantes eliminando muy eficazmente los hongos de su microbiota; como de carbendazim (CBZ) en concentraciones variables logró controlar el crecimiento de los contaminantes del cultivo *in vitro* más frecuentes (Hernández y González, 2010); y sobre todo en la fase de establecimiento de varias especies el empleo de este fungicida para el control de la contaminación fungosa está muy bien documentado (Vieira *et al.*, 1988 ; Danby *et al.*, 1994; Carrazana *et al.*, 1997, Cruz Martín *et al.*, 2003).

Si bien a nivel local, uno de los protocolos utilizados para el establecimiento de material de campo de *G. robusta*, es el propuesto por Vera Bravo (2007) que incluye como agente desinfectante en distintas concentraciones al hipoclorito de sodio (NaOCl); el cual presenta una serie de ventajas como germicida (bacterias y hongos) (Mateos, 2005; Flores García *et al.* 2008) y agente oxidante para la desinfección de explantes, que se enjuaga fácilmente, se consigue en presentación comercial de uso doméstico y es muy económico (Suárez, 1997; Borges García *et al.*, 2009); en este caso fue necesario ajustarlo al genotipo con el que se trabajó; ya que si bien ha sido complementario al incluirlo en el pre-tratamiento no así como tratamiento desinfectante presentando entre un  $50,0 \pm 1,00$  y  $53,3 \pm 0,58$  % de cultivos contaminados (T 1 y T2 respectivamente) (Tabla 2, Figura 3 A).

En cuanto a la utilización del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como agente desinfectante; si bien ha sido empleado exitosamente en especies del género *Pinus* como antimicrobiano previniendo la proliferación de algunos hongos (Muñoz López *et al.*, 2009; Mas I Gisbert *et al.*, 2011); su acción desinfectante se centraría en su capacidad de actuar como un agente oxidante energético, disociándose en agua y oxígeno molecular, sin dejar residuos tóxicos (Iáñez, 1998); a la vez que favorecería la absorción en los tejidos del hipoclorito de sodio

desinfectantes que se utilicen en combinación (Mas I Gisbert *et al.*, 2011); en el ensayo este compuesto (T3) no ha demostrado una alta eficiencia en su acción, ya que se observó un  $36,7 \pm 0,58\%$  de cultivo contaminado y un  $46,67 \pm 5,77\%$  de establecimiento exitoso (Tabla 2).

El peroxosulfato acido de potasio o persulfato de potasio ( $\text{KHSO}_5$ ) es un agente oxidante del grupo químico de los peróxidos, utilizado para la limpieza y desinfección por vía química de barricas de roble empleadas en la elaboración y crianza de los vinos para evitar contaminaciones microbiológicas o químicas (Remírez y Palacios, 2012; Palacios *et al.*, 2011). Este producto demuestra un alto poder oxidativo, se han informado múltiples aplicaciones como ser: bactericida, fungicida, esporicida y viricida muy usado en limpieza profunda de áreas críticas y semicríticas de hospitales (instrumental odontológico, quirúrgico, dispositivos médicos, tubuladuras, cánulas, material de vidrio, endoscopios) y ámbitos sanitarios; manufactura de jabones, reductora en fotografía, reactivo analítico, promotor de polimerización, productos farmacéuticos, modificación de almidón, agente de maduración de harinas, desfibrilador de papel resistente a la humedad, desaprestado textil (Palacios *et al.*, 2011); pero no existen registros de su utilización en el cultivo de tejidos como agentes desinfectante; si bien no ha resultado exitoso su uso en el control de la contaminación; entre un  $43,3 \pm 1,53\%$  (T5) y  $56,7 \pm 0,58\%$  (T4) de cultivo contaminado (Figura 3 B), se logró valores de establecimiento del cultivo del  $36,67 \pm 5,77\%$  (T4), similares sino mejores que otros agentes desinfectantes habitualmente utilizados en el cultivo de tejidos vegetales, como ser el hipoclorito de sodio; aunque por otra parte también presentó uno de los porcentajes más altos de oxidación de los tejidos (Tabla 2, Figura 3 C).

#### **- Brotación *in vitro* en biorreactores de inmersión temporal:**

Al analizar únicamente la variable porcentaje de ruptura de dominancia apical, se puede apreciar que en todos los casos el porcentaje de ruptura de dominancia apical o explantes con brotes fue mayor que el testigo, pero no se observa diferencias estadísticas entre los tratamientos (Tabla 3).

Entre los procesos en los que las citocininas están implicadas, cabe señalar la división celular, la proliferación de yemas axilares (ruptura de la dominancia apical), la neo formación de órganos *in vitro*, la senescencia foliar, el desarrollo de los cloroplastos y la floración (Azcon-Bieto y Talon (2004).

En *G. robusta*, Rajasekaran (1994) ha logrado con 1 ppm de BA la producción de 3 a 5 brotes por explante; mientras que en otra especie como *Grevillea x semperflorens*, el uso de BA a igual concentración produjo 2,3 brotes por explante, y con de 5 ppm, el número de brotes se redujo notablemente (0,3 brotes por explante); pero en *Grevillea rosmarinifolia* con 5 ppm de BA se obtuvieron 5,9 brotes por explante y con 10 ppm el parámetro en cuestión disminuyó (Leonardi *et al.*, 2001).

Una de la características de los cultivo en biorreactores es que los explantes cambian su posición en cada inmersión; lo que favorece la perdida de la dominancia apical, estimulando inducción y la proliferación de numerosas yemas axilares, además el contacto de los explantes con el medio de cultivo favorece la absorción de nutrientes y estimulación del crecimiento (Takayama y Akita, 1994; Mehrotra *et al.* 2007).

Analizando la variable longitud de los brotes, se observa que aunque no hubo diferencias significativas entre tratamientos, los mayores valores se registraron con 1 y 2 ppm de BA (1,50 cm, en ambos tratamientos), observándose a su vez que con concentraciones elevadas de la citocinina ensayada la longitud se vio afectada negativamente. Rajasekaran (1994) ha observado una inhibición de la elongación de los brotes en la misma especie con dosis mayores a 2 ppm de BA; mientras que (Leonardi *et al.* 2001) en *Grevillea rosmarinifolia* y en *G. x semperflorens* encontró un efecto similar con el aumento de las concentraciones de BA.

De las citocininas disponibles comercialmente, el 6-bencilaminopurina (BA) es en general, la que mejores resultados ha demostrado en la proliferación de múltiples brotes *in vitro* de muchas especies incluidas las forestales, y se refleja al realizar una revisión bibliográfica encontrando que se utiliza en aproximadamente el 60% de los medios de cultivo, seguido de Cinetina, con aproximadamente el 23% (Grattapaglia y Machado, 1998; Pereira Soares 2008)

#### VII-CONCLUSIÓN:

La contaminación microbiana es un problema constante que compromete el desarrollo de todas la técnicas *in vitro*. Las pérdidas causadas por microorganismos contaminantes principalmente hongos y bacterias constituyen un serio problema a escala mundial en los numerosos laboratorios. Por ello se recomienda para el cultivo *in vitro* de segmentos nodales de *G. robusta*, como procedimiento de desinfección el empleo de un pre-tratamiento de NaClO 0,25 g. L<sup>-1</sup> y Carbendazim 0,75 g. L<sup>-1</sup> por 15 minutos; para un establecimiento exitoso, con un porcentaje de contaminación mínimo y un efecto fitotóxico en cuanto a ennegrecimiento u oxidación de los tejidos, dentro de los parámetros razonables.

Para la optimización de la brotación *in vitro* de cultivares selectos de *Grevillea robusta*, si bien se obtuvieron resultados preliminares, posibilitando la obtención de un protocolo tentativo de multiplicación utilizando BA como promotor del proceso, son necesarios mayores estudios para lograr un mayor eficiencia en dicha fase de cultivo.

## VIII-CUADROS Y GRAFICOS:

**Tabla 1:** Agentes desinfectantes utilizados en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *G. robusta*.

Pre-tratamiento (g. L <sup>-1</sup> )	Tratamientos		Concentración (g. L <sup>-1</sup> )	Tiempo de Exposición (min.)
	Nº	Agente		
NaOCl 0,25	T1	NaOCl	1,5	30
	T2	NaOCl	3	30
	T3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9	30
	T4	KHSO <sub>5</sub>	10	30
	T5	KHSO <sub>5</sub>	5	30
	T6	OXI	0,5	15
	T7	OXI	0,5	30
	T8	OXI	0,5	60
	T9	CBZ	0,5	15
	T10	CBZ	0,5	30
	T11	CBZ	0,5	60
	T12	CBZ	0,75	15

Referencias: NaOCl: Hipoclorito de Sodio; KHSO<sub>5</sub>: Peroxosulfato acido de Potasio; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrogeno; CBZ: Carbendazim; OXI: Oxicloruro de cobre.

**Tabla 2:** Porcentaje de contaminación, oxidación y supervivencia/establecimiento de los explantes de *G. robusta*.

Tratamientos	Contaminación (%)	Oxidación (%)	Supervivencia/ Establecimiento (%)
T1	50,0±10,00	3,33±5,77	46,67± 11,55 c
T2	53,3±5,77	10 ± 10,00	36,67± 5,77 bc
T3	36,7±5,77	16,67±5,77	46,67± 5,77 bc
T4	56,7±5,77	6,67± 5,77	36,67± 5,77 b
T5	43,3±15,28	20,0±10,00	40,00± 0,00 bc
T6	56,7±5,77	6,67± 5,77	36,67± 5,77 bc
T7	46,7±11,55	13,33±5,77	40,00± 10,00 bc
T8	43,3±5,77	10 ± 0,00	46,67± 5,77 bc
T9	50,0±10,00	3,33± 5,77	46,67±11,55 c
T10	20,0±1,00	0,00± 0,00	80,00 ±10,00 a
T11	40,0±20,00	6,67± 5,77	53,33± 15,28 c
T12	3,33± 5,77	6,67±11,55	90,00±10,00 a

Los valores expresan el promedio de tres repeticiones ± SD (n= 30). Análisis de la Varianza Multivariado (ANAVAM), letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ , Test de comparaciones múltiples de Hotelling).

**Tabla 3:** Parámetros de crecimiento evaluados en la brotación *in vitro* de *G. robusta* en biorreactores de inmersión temporal.

Tratamientos	Explantes con brotes (%)	Nº Br/explantes	Longitud de brotes en (cm)
1- Control	60,00 a	4,66 a	1,00 a
2- BA 1ppm	80,00 a	2,97 a	1,50 a
3- BA 2ppm	70,00 a	6,15 a	1,50 a
4- BA 5ppm	60,00 a	2,33 a	1,00 a
5- BA 10ppm	80,00 a	3,13 a	1,00 a

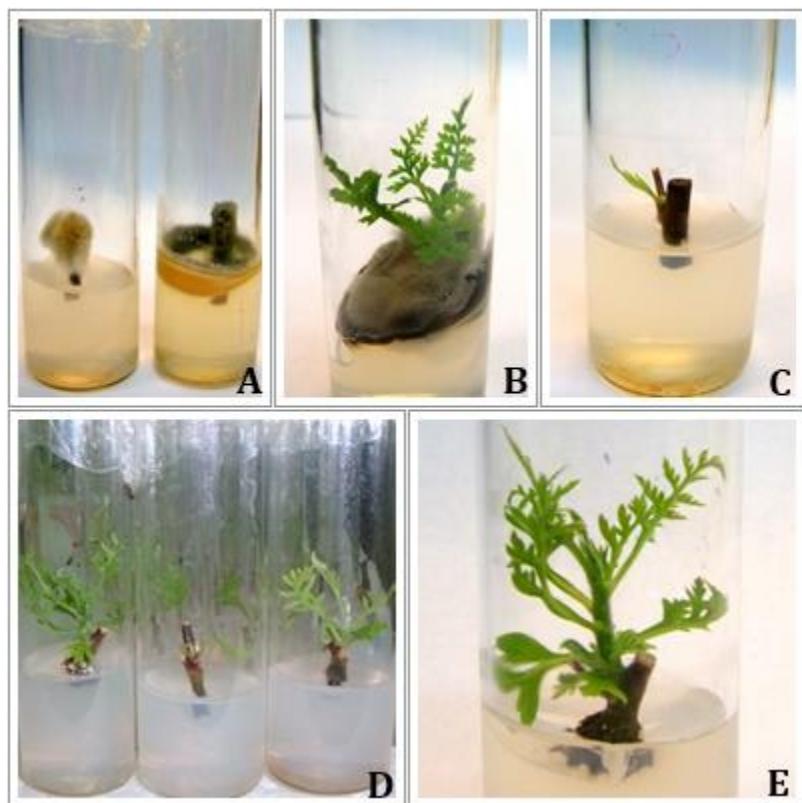
Medianas con letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0,05$ ).



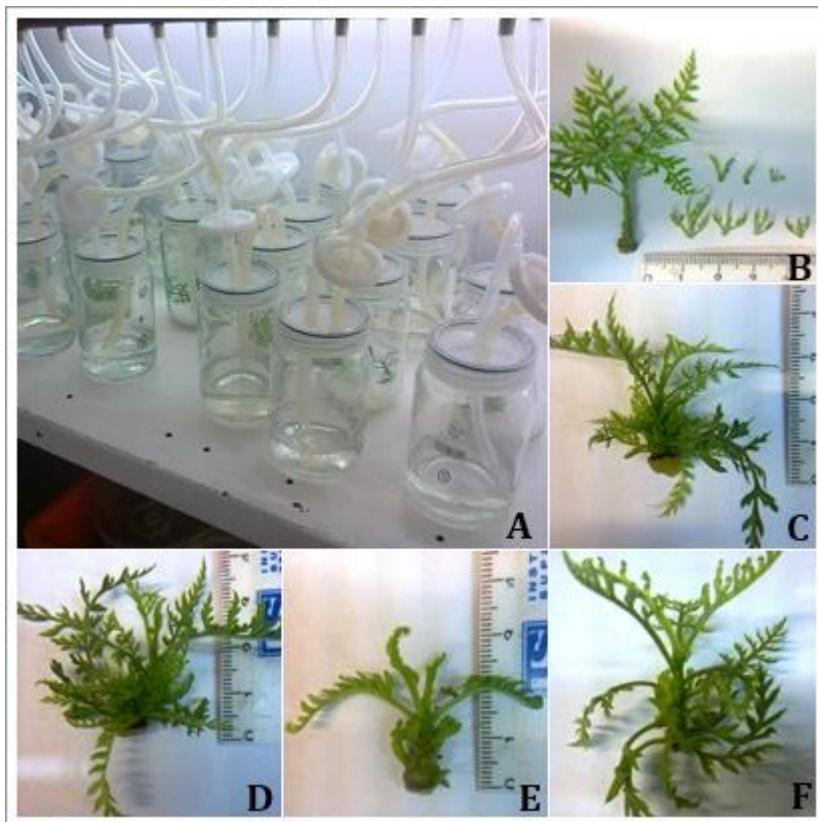
**Figura 1:** Individuos selectos injertados de *G. robusta* en macetas bajo condiciones de invernadero.



**Figura 2:** Explantes de *G. robusta* provenientes del ensayo de establecimiento (A), repicados a biorreactores de inmersión temporal (B y C).



**Figura 3:** Segmentos nodales de *G. robusta* contaminados (A y B); oxidados (C) y establecidos exitosamente (D y E).



**Figura 4:** Brotación *in vitro* en biorreactores de inmersión temporal (A). Detalle de los brotes obtenidos: T1 (B), T2 (C), T3 (D), T4 (E) y T5 (F).

## IX-BIBLIOGRAFIA:

- AZCON-BIETO J., TALON M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Madrid, España. Editorial McGraw-Hill. (2.<sup>da</sup> Ed): 421-441.
- BEN-JAACOV J.; DAX E (1981) *In vitro* propagation of *Grevillea rosmarinifolia*. HortScience 16: 309–310.
- BOGADO F., VERA BRAVO C., AYALA P., SANSBERRO P., LUNA C. (2016). Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento *in vitro* de segmentos natales de *Grevillea robusta*. Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. Revista XXVII - 011 – 016.
- BORGES GARCÍA M., ESTRADA ABEAL E., PÉREZ RODRÍGUEZ I., MENESES RODRÍGUEZ S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. Revista Colombiana de Biotecnología. 11 (2): 127-135.
- BUNN E., DIXON K. (1992). *In Vitro* Propagation of the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). Hortscience 27(3):261-262.
- CARRAZANA D., LEÓN A., HERRERA L., ALVARADO Y., QUIÑONES R. (1997) Efecto de diversos fungicidas comerciales sobre hongos contaminantes en biofábricas. Centro Agrícola. 1: 61-66.
- CHUNG P., CARRASCO B. (2002). Micropropagación de *Salix* spp a través de meristemos foliares. Ciencia e Investigación Forestal – Instituto Forestal /Chile. 12 (l): 63-77.
- CRUZ MARTÍN M., ACOSTA SUÁREZ M., CAPOTE A., LEIVA M., ALVARADO Y. (2003). Efecto del carbendazim para el control de *Colletotrichum* sp., contaminante del establecimiento *in vitro* de callos de café. Biotecnología vegetal 3(2): 111 - 113,
- DANBY S., BERGER F., HOWTT D., WILSON A (1994) Fungal contaminants in *Primula*, *Coffea*, *Musa* and *Iris* tissue culture. En: Lumdsen, P, Nicholas J y Davies B (Eds) Physiology growth and development of plant in culture. pp 397-403.Dordrecht.
- DI RIENZO J., CASANOVES F., BALZARINI M., GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C. (2012). InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- FASSOLA H., MOSCOVICH F., DOMEcq C., FERRERE P., LACORTE S., HAMPEL H., MALETTI C., ALEGRAÑA D. (2004) Regulación de la densidad en rodales de *Grevillea robusta* a. Cunn. para la producción de madera de calidad y forraje en el sur de la provincia de misiones. INTA, Argentina. RIA, 33 (1): 15-38.
- FLORES GARCÍA A., ÁLVAREZ MOCTEZUMA J., RODRÍGUEZ DE LA OJ, CORONA AMBRIS A. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. Foresta Veracruzana 10: 27-33.
- GORST, J.; BOURNE, R.; HARDAKER, S.; RICHARDS, A.; DIRCKS, S.; FOSSARD, R. A. DE.(1978): Tissue culture propagation of two *Grevillea* hybrids. Combined Proceedings of the International Plant Propagators' Society 28: 435-446

GRATTAPAGLIA D., MACHADO M. (1998). Micropropagação (Micropropagation). In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasilia: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1: 183-260.

HERNÁNDEZ Y., GONZÁLEZ M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales* 31(4). pp. 00-00 [citado 2016-07-15] Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362010000400015&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015&lng=es&nrm=iso).

IÁÑES P. (1998). Metabolismo energético. In: Curso de microbiología general. Facultad de Ciencia Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Corriente República, Arg. [Fecha de consulta: 12 de julio 2016]. Disponible en: [http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/15\\_micro.htm](http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/15_micro.htm)

JIMÉNEZ V., CASTILLO J., TAVARES E., GUEVARA E., MONTIE M. (2006). *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86: 389 - 395.

LEONARDI C., RUGGERI A., LA MALFA S. (2001). Hormone effects on *in vitro* proliferation and rooting of *Grevillea* explants. *Scientia Horticulturae* 90: 335–341.

LOEWE V. 1993. Apuntes sobre algunas latifoliadas de maderas valiosas; 4: *Grevillea robusta* A. Cunn. Ciencia e Investigación Forestal- Santiago de Chile. Chile. 85-104.

LÓPEZ J. (2005). Mejoramiento genético de *Grevillea robusta*. En: Mejores árboles para más forestadores: El programa de producción de material de propagación mejorado y el mejoramiento genético en el Proyecto Forestal de Desarrollo. Eds. Carlos Alejandro Norverto, Proyecto Forestal de Desarrollo (Argentina) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca, y Alimentos, ISBN.9879184475, 9789879184479. 241 págs.

LÓPEZ R. (2012). Efecto predesinfectante del oxicloruro de cobre sobre hongos contaminantes en segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth, para su establecimiento *in vitro*. *Revista de Investigaciones - Universidad del Quindío*. 23(2): 120-126.

MARULANDA M.L., ISAZA L.V. (2004). Establecimiento *in vitro* de heliconias con fines de producción masiva. *Scientia et Technica*.26: 193-197.

MAS I GISBERT H., PÉREZ-LAORGA ARIAS E., PITXER M., VEINTIMILA P., CAMPOS E. (2011). Influencia del tratamiento por inmersión en peróxido de hidrógeno para el control químico de *Fusarium circinatum* en la viabilidad y el almacenamiento de las semillas del género *Pinus*. *Acta de II Reunión de Sanidad Forestal de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*. 20 p.

MATEOS P. (2005). Control de las poblaciones microbianas: Esterilización y desinfección. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Salamanca. Boletín Biolene (13): 7-10.

MEHROTRA S., GOEL M., KUKREJA A., MISHRA B. (2007). Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization”, *African Journal of Biotechnology*, vol. 6 (13) 1484-1492.

MOSCOVICH F., FASSOLA H., CRECHI E., COLCOMBET L., LACORTE S. (2005). La *Grevillea robusta*: Otra Alternativa para la Producción Forestal. *IDIA XXI*: 114-119.

MUCHIRI M. (2004). *Grevillea robusta* in agroforestry systems in Kenya. Journal of Tropical Forest Science, 16(4), 396–401.

MUÑOZ LÓPEZ C., CUERVO SÁNCHEZ E., AMPUDIA DÍAZ M., GASTÓN GONZÁLEZ A., PEÑUELAS RUBIRA J., IGLESIAS SAUCE S., HERRERO SIERRA N. (2009). Control químico de *Fusarium circinatum* Niremberg & O'Donnell en semillas del género *Pinus*. 5º Congreso Forestal Español. Ref: 5CFE01-503. 12 p.

MURASHIGE T., SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 475-497.

PALACIOS A., CHATONNET P., GHEZZI G. (2011). Higiene de recipientes de madera para el envejecimiento del vino. La Semana Vitivinícola. SeVi (3.345): 438-443.

PARIANI S. (2015). La incubadora: Condiciones ambientales de cultivo-Asepsia. En: Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro* / Marianelen Cedrés Gazo ... [et al.] ; coordinación general de Sandra Sharry ; Marina Adema ; Walter Abedini. - 1a ed. adaptada. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata.241 pp.

PEDROZA MANRIQUE J., GONZALEZ MOLINA S., TELLEZ ORTIZ D. (2007). Micropropagacion de *Dodonea viscosa* (L) Jacq: una especie en vías de extinción. Revista Colombiana de Biotecnología IX (2): 33-44.

PEREIRA SOARES F. (2008). Influência das citocininas nos aspectos anatômicos, bioquímicos e fisiológicos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor. Brasil. 90 pp.

PIERIK R. (1988) *In Vitro* Cultures of Higher Plants as a Tool in the propagation of Horticultural crops .In: Plant propagation by tissue culture ISHA Acta Horticulturae, pp. 24-28.

RAJASEKARAN P. (1994). Production of clonal plantlets of *Grevillea robusta* in *in vitro* culture via axillary bud activation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39(3): 277-279.

REMÍREZ E., PALACIOS A. (2012). Limpieza y desinfección de barricas a través de microondas de alta frecuencia. INNERBARREL. Revista "Enólogos" Suplemento "Investigación y Ciencia" XIV (75):34-38.

SALVATIERRA G., KOWALYZYN D.E., DE LOS SANTOS C.E., LÓPEZ C.O., KOLLN R.F. (2011). Desarrollo genético y tecnología aplicada a la producción de madera para usos sólidos en Pomera maderas. Revista de la Sociedad Argentina de Genética / Journal of the Argentine Society of Genetics. Actas XL Congreso Argentino de Genética iii simposio latinoamericano de citogenética y evolución i jornadas sag-nea. 44p.

SUÁREZ A. (1997). Métodos de asepsia y esterilización. In: M. Perea y J. Cedeño (Eds.). Cultivo de Tejidos Vegetales y sus Aplicaciones en la Agricultura. Curso: UDO-OIEA, Maturín, Venezuela. p. 33-40.

SUKAMTO A. (2003). Perbanyak tanaman wiewp (*Grevillea papuana*) secara kultur jaringan. Edisi Khusus Kebun Biologi Wamena dan Biodiversitas Papua Berita Biologi 6(5): 685-689.

TAKAYAMA S., AKITA M. (1994). The types of bioreactors used for shoots and embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture 39: 147-159

VERA BRAVO C. (2007). Establecimiento *in vitro* de *Grevillea robusta* Cunn. Resumen ejecutivo PE1203 E.E.A. Bella Vista. Corrientes. Resultados proyectos específicos 2006-2007. Pág. 20.

VERA BRAVO C., SANBERRO P., LUNA C., JARA M. 2015. "Propagación vegetativa de *Grevillea robusta*". Por: En: INVESTIGACIÓN FORESTAL 2011-2015. Los Proyectos de Investigación Aplicada. PIA: 10070. 401-403. Ed: Carolina Isabel Llavallol. - 1a ed. ISBN 978-987-1873-41-8. 428 pp.

VIEIRA S., PEREIRA T., LUZ E. (1988) Propagação do Guaraná *in vitro*. I. Seleção de fungicidas. Fitopatología brasiliense 13(3): 183-185.

VILLAMAR FLORES L. (2014). Estandarización de las etapas de micropropagación *in vitro* de la Guaba (*Inga insignis*) endémica de la provincia de Imbabura. Tesis para optar al grado de Ingeniera en Biotecnología. Sangolqui. Ecuador. 145 pp.

WATAD, A., BEN-JAACOV, J., TAL, E., SOLOMON, H. (1992). *In vitro* propagation of *Grevillea* species. Acta Hortic. 316, 51-54.

ZÁRATE MORALES R., ORDÓÑEZ CANDELARIA V., MARTÍNEZ CASTILLO J. (2001). Determinación de algunas propiedades físicas y mecánicas de *Grevillea robusta* a. Cunn. Madera y Bosques, primavera, Instituto de Ecología A.C. Xalapa, México. 7(00): 57-69.