



Universidad Nacional del Comahue
Asentamiento Universitario San Martín De Los Andes
Neuquén – Patagonia Argentina

Carrera: Técnico Universitario Forestal
PRACTICA LABORAL



**“Establecimiento y multiplicación “in vitro” de
Nothofagus nervosa (Phil.) Dim. et. Mil. y *Nothofagus
obliqua* (Mirb.) Blume.”**



Ramas de *Nothofagus obliqua* obtenidas de las plantas
donantes, para la realización del ensayo.



Explantos de *Nothofagus obliqua*, obtenidos a
partir de yemas.

Profesor Supervisor: Ing. Agr. Mattes Fernández Hernán
Alumno: Galván Darío Gabriel
Legajo: 86.621

BIBLIOTECA "Mario G. Gentili"	
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE	
SUBJ.	PL
TOMO	G.182
Nº DE INV.	TF_0088
AUS. SAN MARTIN DE LOS ANDES	



Índice:

<i>Carátula de presentación</i>	Página 01
A - INTRODUCCIÓN	Página 02
<i>A1 - Generalidades de la técnica de cultivo "in vitro"</i>	Página 02
<i>A2 -Fundamentación de la práctica realizada. Antecedentes</i>	Página 03
B - OBJETIVOS	Página 04
<i>B1 - Objetivo General</i>	Página 04
<i>B2 - Objetivo particular</i>	Página 04
C - MATERIALES Y METODOS	Página 04
C.1 - MATERIALES	Página 04
<i>C.1.a - Espacio físico en el cual se realizo el ensayo</i>	Página 04
<i>C.1.b - Material Vegetal</i>	Página 04
<i>C.1.c - Material de Laboratorio</i>	Página 05
<i>C.1.c.1 - Instrumental</i>	Página 05
<i>C.1.d - Medio de cultivo</i>	Página 06
C.2 - METODO	Página 06
<i>C.2.a - Tratamiento del material vegetal</i>	Página 06
<i>C.2.b - Preparación del sustrato para retrasar la brotación del material</i>	Página 07
<i>C.2.c - Preparación y siembra del material</i>	Página 07
<i>C.2.c.1 - Microestacas</i>	Página 07
<i>C.2.c.1.a - Pasos</i>	Página 07
<i>C.2.c.1.b - Desinfección</i>	Página 08
<i>C.2.c.1.c - Siembra</i>	Página 09
<i>C.2.c.2 - Brotación Forzada</i>	Página 09
<i>C.2.c.2.a - Pasos</i>	Página 09
<i>C.2.c.2.b - Desinfección</i>	Página 10
<i>C.2.c.2.c - Siembra</i>	Página 10
<i>C.2.c.2.d - Repique</i>	Página 11
<i>C.2.c.2.e - Multiplicación</i>	Página 11
<i>C.2.c.2.f - Desinfección y repique de explantos con probabilidad de contaminación</i>	Página 12
D - RESULTADOS (microestacas)	Página 12
D - RESULTADOS (microestacas)	Página 13
D - RESULTADOS (Yemas)	Página 14
D - RESULTADOS (Yemas)	Página 15
D - RESULTADOS (Yemas)	Página 16
D - RESULTADOS (Yemas)	Página 17
E - DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	Página 18
E - DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	Página 19
E - DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	Página 20
ANEXO	Página 21
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES REALIZADAS	Página 22
BIBLIOGRAFIA CONSULTADO	Página 23
GRADO DE APROVECHAMIENTO ALCANZADO	Página 24
AGRADECIMIENTOS	Página 25

A - INTRODUCCIÓN.

A1 - Generalidades de la técnica de cultivo "in vitro"

El cultivo "in vitro" es una técnica utilizada para lograr el crecimiento de nuevas plantas en un medio nutritivo y con condiciones ambientales controladas, a partir de pequeñas porciones de tejidos de plantas, denominadas explantos. Estos son cultivados asépticamente en los medios nutritivos, compuestos por macro- y micronutrientes, vitaminas, aminoácidos y carbohidratos, a los cuales se les adiciona reguladores de crecimiento.

La utilización de esta técnica se basa en la característica de las células vegetales denominada **totipotencia**, definida como la propiedad de las células vegetales de poseer toda la información necesaria para generar un nuevo individuo. El tipo de patrón de crecimiento que se presenta depende del potencial genético de la planta así cultivada y del ambiente químico y físico (los cuales son controlados), al que esta sometida la parte de la planta.

El cultivo "in vitro" tiene ventajas sobre los métodos de macropropagación y de reproducción sexual al posibilitar la obtención de clones en masa, con altas tasas de multiplicación, en espacios reducidos y en períodos de tiempo menores. En material de tipo forestal hasta el momento se ha logrado en pocos géneros una propagación en forma masiva o comercial (*Pinus*, *Picea*, *Populus*, *Eucaliptus*). Mayormente la técnica se aplica a escalas experimentales y en especies endémicas, raras o amenazadas de extinción. Otra ventaja es que puede ser iniciado en cualquier época del año sin esperar temporadas favorables, como ocurre en la producción de semillas.

En especies forestales, este método de reproducción se aplica principalmente para:

- Propagación en masa de clones.
- Obtención, conservación y distribución de clones específicos resistentes a patógenos.

Las características del cultivo "in vitro" se pueden resumir en los 5 puntos que se describen a continuación:

- 1) Ocurre a microescala, sobre una superficie relativamente pequeña.
- 2) Se utilizan condiciones ambientales óptimas en lo que respecta a factores físicos, nutricionales y hormonales.

- 3) Mediante el cultivo de meristemas se excluyen microorganismos patógenos (Bacterias, Hongos y Virus), así como también plagas de plantas superiores (Insectos y Nematodos).
- 4) Es posible cultivar protoplastos o células individuales.
- 5) En algunos casos, no se reproduce el patrón normal de desarrollo de una planta, resultando que un tejido aislado puede dar origen a un callo o puede desarrollarse en otras formas poco usuales. (por ejemplo: formación de órganos, embriogenesis somática, etc.)

A2 -Fundamentación de la práctica realizada. Antecedentes.

El Raulí y el Roble Pellín son especies de alto valor ecológico y forestal de la Región de los Bosques Andino Patagónicos. Por esta razón, varias instituciones están desarrollando trabajos que tienen como objetivo conservar y aumentar la superficie ocupada por estas especies. Tanto su mejoramiento genético como las prácticas silviculturales que promueven la regeneración, requieren de una técnica que permita la clonación de árboles maduros considerados como plus.

Mediante la propagación vegetativa pueden establecerse huertos semilleros y plantaciones clonales, y además puede aplicarse en programas de control de enfermedades. Este tipo de reproducción generalmente no es fácil de aplicar en la mayoría de las Fagáceas, tanto por los métodos tradicionales como por cultivo "in vitro". Sin embargo, hay varios antecedentes de su factibilidad mediante el uso de partes del vegetal con características juveniles. Se logró, por ejemplo, micropropagar *Nothofagus pumilio* (Lenga) a partir de brotes de renovales de 10 – 15 años de edad y de ramas de un ejemplar de 200 años (Martinez Pastur, 1997). En ese trabajo con la desinfección se obtuvo un porcentaje de explantos libres de contaminación del 80 % y se alcanzó una tasa de multiplicación de 1:4.7. También se logró micropropagar *Nothofagus antarctica* (Ñire) de brotes obtenidos de árboles jóvenes de 10 – 15 años y de esferoblastos de árboles maduros de 150 años. En este caso se obtuvo una desinfección del 65 % para los brotes de renovales y 80 % para esferoblastos (Martinez Pastur, 1997). El mismo autor logró la micropropagación de *Nothofagus leoni* (Huala), *Nothofagus nervosa* y *Nothofagus obliqua* de brotes a partir de semillas germinadas en el laboratorio; obteniendo resultados de desinfección del 52 + - 9 % en *Nothofagus leoni* (Martinez Pastur, 1997), 62 % en *Nothofagus nervosa* (Martinez Pastur, 1997) y 90 % en *Nothofagus obliqua*. (Martinez Pastur, 1997).

En esta práctica, por sus características juveniles, se escogió como fuente de material vegetal yemas obtenidas de rebrotes de cepa.

B – OBJETIVOS.

B1 - Objetivo General:

- Obtener experiencia en las actividades de laboratorio relacionadas con el cultivo "in vitro" de especies leñosas

B2 - Objetivo particular:

- Establecer y multiplicar "in vitro" ejemplares adultos de Raulí y Roble Pellín, a partir de yemas de rebrotes de cepa de uno a tres años de edad.

C - MATERIALES Y METODOS.

C.1 - MATERIALES

C.1.a - Espacio físico en el cual se realizó el ensayo.

El trabajo se realizó en el en el Laboratorio de Química del Asentamiento Universitario de San Martín de los Andes.

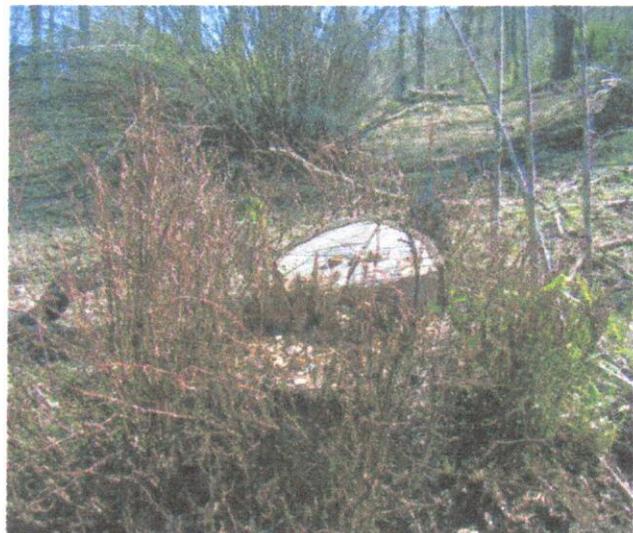
C.1.b - Material Vegetal.

Para realizar la práctica se seleccionaron tocones de árboles de *Nothofagus nervosa* (**figura 1**) y *Nothofagus obliqua* (**figura 2**), de árboles extraídos en el aprovechamiento forestal de Quilanhue, Parque Nacional Lanín. De dichos tocones se extrajeron rebrotes de cepa de uno a tres años de edad, de los cuales se utilizaron las yemas. La recolección del material vegetal se realizó la tercera semana de septiembre del 2005.

Figura 1. Tocón de *N. nervosa*



Figura 2. Tocón de *N. obliqua*



C.1.c. - Material de Laboratorio.

C.1.c.1 - Instrumental

- I. Agitador Magnético**
- II. Estufa Eléctrica**
- III. Cámara de cultivo**
- IV. Autoclave**
- V. Cámara de Flujo Laminar**

I. Se utiliza para realizar los procesos de lavado y enjuague del material, en la etapa de desinfección.

II. Se utiliza para esterilizar en seco el material de vidrio y los materiales metálicos tales como, como pipetas, erlermeyer, pinzas, bisturios, etc.; también se puede esterilizar material de papel como por ejemplo servilletas absorbente. El proceso requiere de 4 horas a 120°C o 12 horas a 90°C.

III. Es una sala con repisas en las que se depositan los explantos para ser propagados. En esta sala se encuentran controladas las condiciones físicas como la temperatura, que se mantiene en un rango de 23 – 25°C, y el fotoperíodo que es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. La humedad ambiente se trata de mantener constante, para ello se utilizan unos recipientes con agua que se depositan en la parte inferior de las repisas.

IV. Se utiliza para esterilizar el agua destilada así como también los medios nutritivos. Este instrumento esteriliza por medio de vapor a alta presión. Siempre que el tiempo de exposición sea suficiente, el vapor a presión puede eliminar todos los microorganismos que puedan estar presentes.

Para su utilización se deben tener en cuenta ciertas precauciones que se detallan a continuación:

- Cuando se trabaja con tubos de ensayo o simples frascos de vidrio nunca se debe llenar mucho los recipientes ya que el líquido que se encuentre dentro va a hervir e intentar destapar el frasco y derramarse.
- Cuando se trabaja con frascos de vidrio, nunca deben quedar muy próximos unos de otros, ya que corren peligro de romperse.
- Se debe verificar que la tapa se encuentre bien cerrada para evitar pérdidas de vapor.

V. Se utiliza para reducir la contaminación prácticamente a un 0 % en todas aquellas operaciones en las cuales se tengan que exponer los explantos al aire, con probabilidades de contaminación.

El funcionamiento de ésta consiste en tomar aire del exterior el cual pasa a través de dos filtros de papel uno de poros medios y de poros muy finos, el primero permite retener las partículas mas gruesas y el segundo la retención de esporas de hongos, partículas pequeñas, etc. antes de que llegar a la mesa, esto permite que ninguna partícula pase desde la habitación en la que se encuentra la cámara hasta la mesa donde se trabaja.

Precauciones a tener en cuenta para su uso:

- Encenderla como mínimo media hora antes de utilizarla, para asegurar el desplazamiento de todo el aire contaminado.
- Limpiar la mesa, techo y laterales de la cámara con alcohol 70 o espadol al 0.5 %; no olvidar limpiar el exterior con regularidad.
- Limpiar el piso de la habitación donde se encuentra la cámara, regularmente con una solución diluida de lavandina.
- Tener la precaución de mantener la puerta entreabierta, para que se genere una corriente de aire, y se renueve el mismo para evitar contaminación.
- Una vez al mes aspirar el filtro de papel que reencuentra en la parte posterior de la cámara.

C.1.d - Medio de cultivo:

El medio que se utilizo en el ensayo fue el Broadleaved Tree Médium (BTM) (Ver Anexo I), y se utilizo con reguladores de crecimiento (medio 63) y sin reguladores de crecimiento (medio 64), en las etapas de siembra y repique.

C.2 – METODO

C.2.a - Tratamiento del material vegetal.

En los rebrotes que se extrajeron las yemas se encontraban cerradas. Una vez llevados al laboratorio, sus bases fueron sumergidas unos 5 centímetros en una solución de KNO₃ (1g/l), para inducir a las yemas a la brotación.

En la presente trabajo se utilizaron dos metodologías diferentes para lograr el objetivo de establecimiento, la primera de ellas consistió en trabajar con pequeñas estacas y la segunda con yemas, llamadas respectivamente **microestacas (figura 3)** y **brotación forzada (figura 4)**.

En la presente trabajo se utilizaron dos metodologías diferentes para lograr el objetivo de establecimiento, la primera de ellas consistió en trabajar con pequeñas estacas y la segunda con yemas, llamadas respectivamente **microestacas** (figura 3) y **brotación forzada** (figura 4).

Figura 3. Microestacas de *N. obliqua*

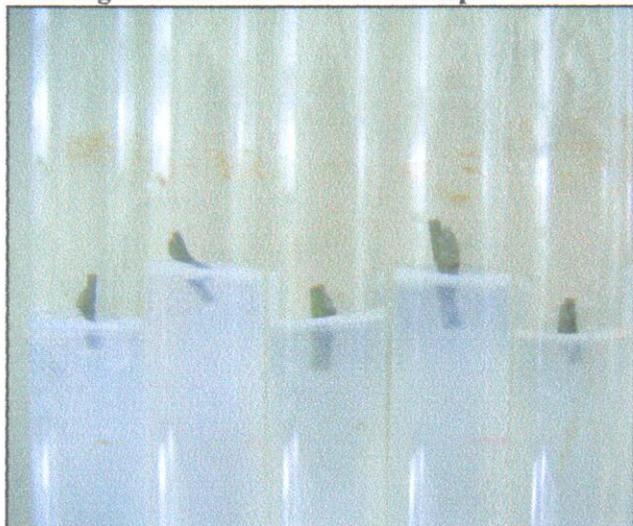


Figura 4. Yemas de *N. nervosa*



C.2.b - Preparación del sustrato para retrasar la brotación del material:

El proceso consiste en colocar en recipientes (de metal o material esterilizable) un sustrato, en este caso arena fina, la cual se debe humedecer para ser esterilizado. Esto se realiza en autoclave a 120°C y una atmósfera de presión, durante 45 minutos. Una vez esterilizado el sustrato, los brotes se entierran y se tapan; posteriormente los recipientes son llevados a heladera en donde se mantienen de 4-6 °C. aproximadamente.

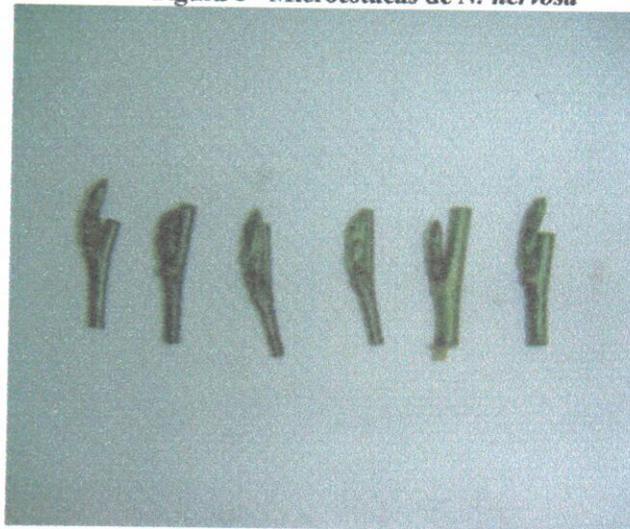
C.2.c - Preparación y siembra del material:

C.2.c.1 - Microestacas

C.2.c.1.a - Pasos:

1. Cortar los rebrotes en secciones con una yema de 3 a 4 cm. (figura 5)
2. Primera desinfección de microestacas, enjuague y secado.
3. Segunda desinfección, enjuague y secado. (CFL).
4. Siembra medio de cultivo (nitrato de potasio 1gr/l y agar - agar).
5. Una vez brotadas las microestacas, extraer brotes con 2 primordios foliares y el meristema y tratarlas con ácido ascórbico.
6. Sembrar en medio de cultivo

Figura 5 Microestacas de *N. nervosa*



C.2.c.1.6 – Desinfección:

Las desinfecciones fueron iguales para ambas especies utilizadas:

Primera desinfección:

Consistió en colocar las microestacas en un Erlenmeyer en una solución con polvo limpiador (tipo Odex), dos gotas de tween 20 (detergente sintético concentrado) y agua; durante 30 minutos con agitación mecánica.

Para el primer enjuague se utilizó agua corriente de red y un cepillo que tenía como función eliminar partículas mayores.

Secado en servilleta de papel.

Segunda desinfección:

Esta se realizó en la CFL y se trataron las microestacas con una solución de **hipoclorito de sodio (lavandina comercial con 55 g/l de cloro activo).**

Concentraciones:

Especie	Concentración de hipoclorito de sodio	Duración de tratamiento de desinfección	Fecha de desinfección
Nothofagus nervosa	40 %	10 minutos	22 de Septiembre
Nothofagus nervosa	60 %	10 minutos	1 de Octubre
Nothofagus obliqua	40 %	10 minutos	23 de Septiembre
Nothofagus obliqua	60 %	10 minutos	30 de Septiembre

Luego se realizaron 3 enjuagues en ADE de 5 minutos cada enjuague.

Posteriormente fueron secadas y sembradas en un medio de cultivo a base de nitrato de potasio (1 g/l) y agar - agar, para inducir a las yemas a la brotación.

Una vez brotadas las microestacas, la técnica consiste en extraer brotes con 2 primordios foliares y el merístema y tratarlos con una solución de ácido ascórbico al

0.2 % y 3 gotas de tween 20 durante una hora en agitación para Raulí. Para Roble Pellin dejar los brotes en ácido ascórbico durante 30 minutos. Secar y sembrar en medio nutritivo BTM . En esta práctica no alcanzó a realizarse este paso.

C.2.c.1.c - Siembra:

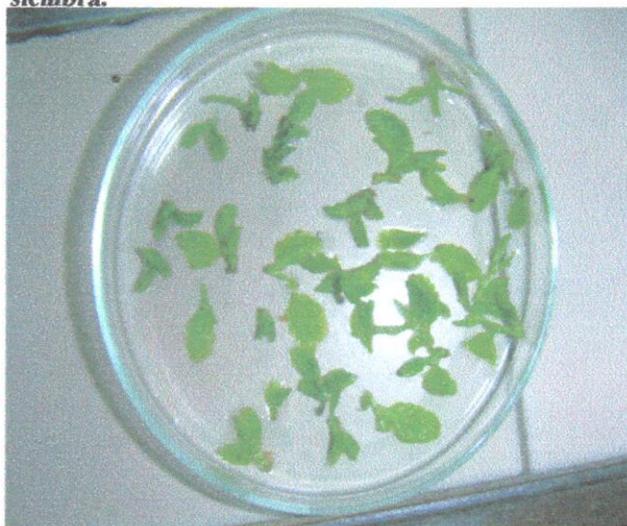
Las microestacas fueron sembradas en tubos de ensayo, una por cada tubo de ensayo, luego de la siembra fueron dejadas 24 horas en oscuridad y luego colocadas en la cámara de cultivo. Para la siembra se utilizó un medio a base de nitrato de potasio al 0.1 % y agar – agar, para forzar a la brotación de las yemas.

C.2.c.2 - Brotación Forzada.

C.2.c.2.a - Pasos:

1. Extraer las yemas (merístema con primordios foliares). (figura 6)
2. Primera desinfección.
3. Enjuague.
4. Secado.
5. Para Raulí, tratar las yemas con solución de ácido ascórbico.
6. Segunda desinfección.
7. Enjuague.
8. Secado.
9. Siembra en medio de cultivo.

Figura 6. Preparación de yemas de *N. obliqua* para la siembra.



C.2.c.2.b - Desinfección:

Las desinfecciones fueron iguales para ambas especies utilizadas:

Primera desinfección:

Consistió en colocar las yemas en un Erlenmeyer con polvo limpiador (tipo Odex) más dos gotas de tween 20 (detergente sintético concentrado) y agua, durante 30 minutos con agitación. (Mecánica)

Enjuague con agua corriente de red. También se utilizó un cepillo para sacar partículas mayores.

Secado, realizado con servilleta de papel.

Segunda desinfección:

Esta se realizó en la CFL, consistió en colocar las yemas en una solución de lavandina, con agitación. (Manual y mecánica)

Concentraciones:

Especie	Concentración de hipoclorito de sodio	Duración de tratamiento de desinfección	Fecha de desinfección
<i>Nothofagus obliqua</i>	14 %	10 minutos	27 de Septiembre
<i>Nothofagus obliqua</i>	14 %	10 minutos	4 de Octubre
<i>Nothofagus obliqua</i>	14 %	10 minutos	19 de Octubre
<i>Nothofagus nervosa</i>	14 %	10 minutos	28 de Septiembre
<i>Nothofagus nervosa</i>	14 % + 1' en alcohol 70 %	10 minutos	5 de Octubre

Se realizaron 3 enjuagues en ADE de 5 minutos cada enjuague. Posteriormente se las secó y sembró en medio de cultivo BTM. Con excepción del segundo tratamiento en Raulí en el que se utiliza alcohol; en este se realizaron 3 enjuagues más con ADE para eliminar el alcohol

C.2.c.2.c - Siembra:

Las yemas fueron sembradas en frascos y tubos de ensayo y colocadas de a 3 por frasco y en unidad por tubo. Luego fueron dejadas 24 horas en oscuridad y luego colocadas en la cámara de cultivo. El medio utilizado fue el BTM con reguladores de crecimiento; Los reguladores de crecimiento, BAP (6-bencil amino purina, giberelina), 0.0005 % y ANA (ácido naftalenacético, auxina), 0.00002 %.

C.2.c.2.d - **Repique:**

Los repiques que se realizaron fueron de yemas de Roble pellín, este se realizó cada 21 días y la función del mismo fue la de brindarle al explanto en forma continua los nutrientes necesarios para su crecimiento. También se realizaron cuando en un frasco había contaminación producida por bacterias. Se repicaban a medio fresco los explantos libres de contaminación. Se utilizó medio de cultivo número 63.

C.2.c.2.e - **Multiplicación:**

El procedimiento de multiplicación se dividió de los siguientes pasos:

- **Selección de los explantos**

Se seleccionaron los explantos que superaban los 2 centímetros de longitud; los brotes eran de distintos tamaños, desde milímetros a unos 3 a 4 cm.

- **Separación de los callos y los brotes nuevos.**

Se sacaron los explantos de los frascos y se colocaron en cajas de petri con ácido ascórbico 0.2 %, para evitar su deshidratación y la oxidación de tejidos (este último provoca que los tejidos segreguen fenoles) y se seccionaron los brotes con un bisturí esterilizado.

- **Siembra en medio de cultivo fresco.**

La siembra se realizó en dos partes, los callos eran sembrados en un medio de cultivo sin hormonas y los brotes en medio de cultivo con hormonas, medio 64 (figura 7) y medio 63 (figura 8) respectivamente.

Figura 7. Repique de callos de *N. obliqua* en medio nutritivo BTM sin hormonas de crecimiento

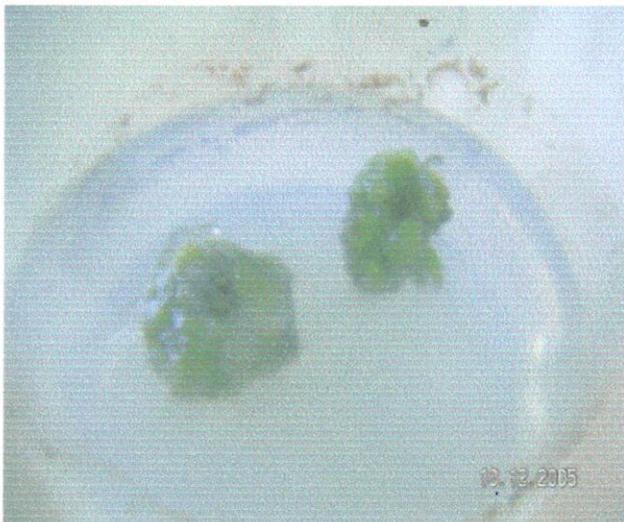
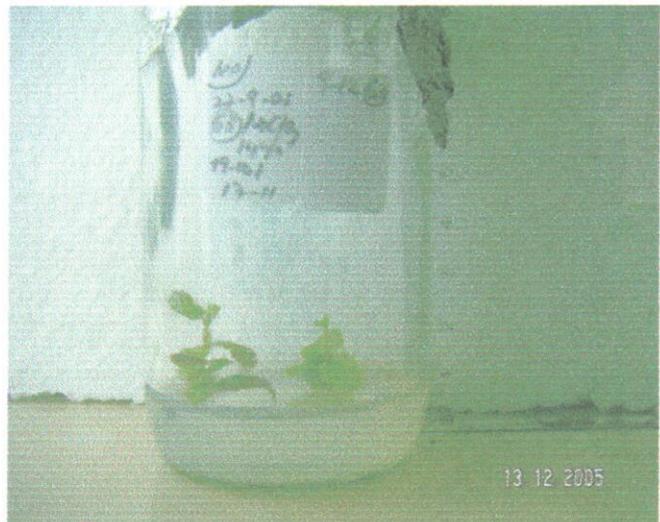


Figura 8. Repique de explantos de *N. obliqua* en medio nutritivo BTM con hormonas de crecimiento



C.2.c.2.f - Desinfección y repique de explantos con probabilidad de contaminación:

Este proceso se realizó para recuperar el material vegetal, debido a la poca cantidad que se disponía. Este consistía en realizar un nuevo proceso de desinfección a explantos que se encontraban en los mismos frascos en donde otros habían resultado contaminados con bacterias. A los explantos con posibilidad de ser recuperados, se les hacía una desinfección con hipoclorito de sodio al 14 % durante 10 minutos seguido de 3 enjuagues con ADE. Posteriormente se sembraban en medio nutritivo fresco.

D – RESULTADOS.

• **Microestacas:**

Los resultados obtenidos en la desinfección de microestacas fueron

Especie: *Nothofagus obliqua*

Tratamiento:

Desinfección con lavandina al 40 % durante 10 minutos.

Fecha de siembra: 23/09/05

Fecha de revisión: 06/10/05

Resultado:

Total de explantos: 22

Contaminados con Hongos: 15 (68.18 %)

Contaminados con Bacterias: (7 – 31.18 %)

Vivos: 0

Efectividad del tratamiento: 0 %

Especie: *Nothofagus obliqua*

Microestacas 1 semana en frío.

Tratamiento:

Desinfección con lavandina al 60 % durante 10 minutos.

Fecha de siembra: 30/09/05

Fecha de revisión: 06/10/05

Resultado:

Total de explantos: 23

Contaminados con Hongos: 12 (52.17 %)

Contaminados con Bacterias: 10 (43.5 %)

Vivos: 1 (4.3 %)

Efectividad del tratamiento: 4.3 %

Especie: *Nothofagus nervosa*

Tratamiento:

Desinfección con lavandina al 40 % durante 10 minutos.

Fecha de siembra: 22/09/05

Fecha de revisión: 06/10/05

Resultado:

Total de explantos: 24

Contaminados con Hongos: 18 (75 %)

Contaminados con Bacterias: 6 (25%)

Vivos: 0

Efectividad del tratamiento: 0%

Especie: *Nothofagus nervosa*

Microestacas 1 semana en frío.

Tratamiento:

Desinfección con lavandina al 60 % durante 10 minutos.

Fecha de siembra: 01/10/05

Fecha de revisión: 06/10/05

Resultado:

Total de explantos: 20

Contaminados con Hongos: 14 (70 %)

Contaminados con Bacterias: 6 (30%)

Vivos: 0

Efectividad del tratamiento: 0%

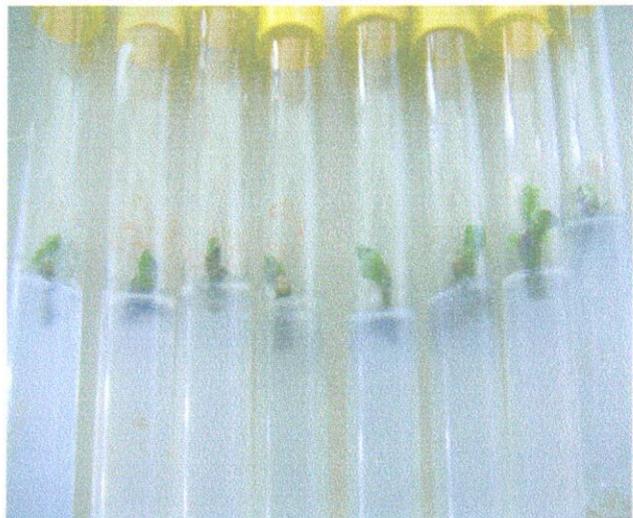
Observaciones generales:

- Un porcentaje importante de las microestacas, presentaron liberación de fenoles (figura 9). El 65 % de las microestacas de raulí y el 32 % de microestacas de Roble Pellin brotaron, independientemente de estar contaminadas (figura 10).

Figura 9. Liberación de fenoles de una microestaca de *N. nervosa*



Figura 10. Microestacas de *N. nervosa* contaminadas, con hongos y bacterias, en estado de brotación.



• **Yemas:**

Los resultados obtenidos en la desinfección de yemas fueron

Especie: *Nothofagus obliqua*

Tratamiento:

Desinfección con lavandina al 14 % durante 10 minutos.

Fecha de siembra: 27/09/05

Fecha de revisión: 06/10/05

Resultado:

Total de explantos: 23

Contaminados con Hongos: 9 (39.13 %)

Contaminados con Bacterias: 4 (17.4 %)

Muertos: 11

Vivos: 12 (52.17 %)

Efectividad del tratamiento: 52.17 %

Especie: *Nothofagus obliqua*

1 semana en frío

Tratamiento:

Desinfección con lavandina al 14 % durante 10 minutos.

Fecha de siembra: 04/10/05

Resultado:

Primera revisión: 17/10/05

Total de explantos: 24

Contaminados con Hongos: 0 (0 %)

Contaminados con Bacterias: 4 (16.66 %)

Muertos: 4 (16.66 %)

Vivos: 20 (83.33%)

Efectividad del tratamiento: 83.33 %

Segunda revisión: 28/10/05 (realizada después del primer repique)

Total de explantos: 20

Contaminados con Hongos: 3 (15 %)

Contaminados con Bacterias: 0 (0 %)

Muertos: 3 (15 %)

Vivos: 17 (85 %)

Especie: *Nothofagus obliqua*

Tratamiento:

Desinfección con lavandina al 14 % durante 10 minutos.

Fecha de siembra: 19/10/05

Fecha de revisión: -----

Resultado:

Total de explantos: 16

Contaminados con Hongos: -----

Contaminados con Bacterias: -----

Muertos: 16

Vivos: 0

Efectividad del tratamiento: -----

Observaciones generales de la especie:

En el segundo tratamiento, las pérdidas debidas a la contaminación con hongos ocurrieron después del repique. Los explantos comenzaron a formar callos la semana del 13 al 19 de octubre (figura 11). Los callos fueron de consistencia dura color verde oscuro y de 1 a 1.5 centímetros, los cuales formaron brotes de distintos tamaños, de unos milímetros hasta 3 a 5 centímetros y de 3 a 10 por cada callo. Los callos que tenían mayor cantidad eran los que tenían los brotes de menor tamaño (figura 12)

Algunos de los brotes al cabo de unos días de ser repicados presentaban amarillamiento y en algunos casos necrosis en algunas de sus hojas (figura 13).

En el tercer tratamiento ninguna de las yemas superó la desinfección. Las yemas se encontraban en un estado de brotación avanzado, habiendo desplegado completamente sus hojas (figura 14).

Figura 11. Brotes de *N. obliqua* iniciando la formación de callos.



Figura 12. Callo de *N. obliqua* con numerosos brotes de poco tamaño.



Figura 13. Brotes de *N. obliqua* con amarillamiento y necrosis en sus hojas.

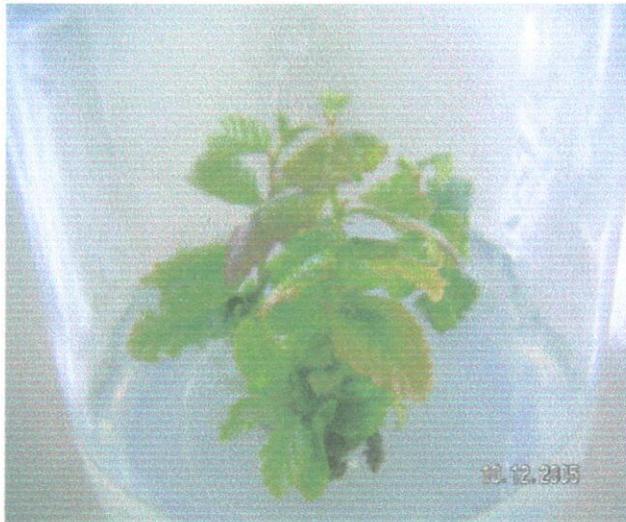


Figura 14. Yemas de *N. obliqua* dañadas por la lavandina en la etapa de desinfección



Especie: *Nothofagus nervosa*

Tratamiento:

Desinfección con lavandina al 14 % durante 10 minutos.

Fecha de siembra: 28/09/05

Resultado:

Fecha de revisión: 06/10/05

Total de explantos: 16

Contaminados con Hongos: 2 (12.5 %)

Contaminados con Bacterias: 4 (25 %)

Muertos: 9 (56,25 %)

Vivos: 1 (6.25 %)

Efectividad del tratamiento: 6.25 %

Observaciones:

Los explantos presentaban manchas de color marrón oscuro en los primordios foliares (figura 15). El único explanto vivo que quedo (figura 16), comenzó a decaer a los 30 días, presentando amarillamiento y necrosis en las hojas, hasta el 7/12 donde dejo de ser viable

Figura 15. Explantos de *N. nervosa* con machas oscuras en los primordios foliares.

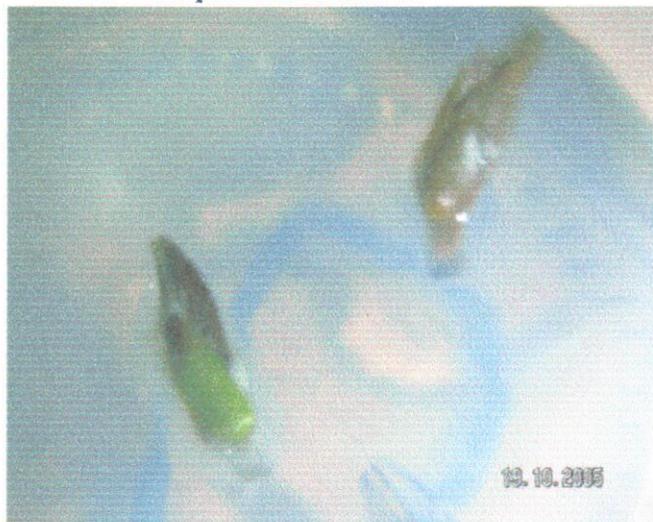
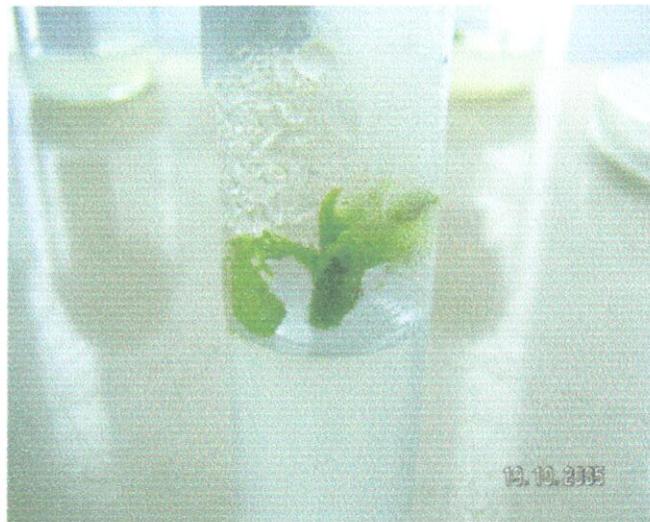


Figura 16. Único explanto de *N. nervosa* que se desarrolla.



Especie: *Nothofagus nervosa*

1 semana en frío

Tratamiento:

Desinfección con lavandina al 14 % durante 10 minutos y un minuto en alcohol al 70 %.

Fecha de siembra: 05/10/05

Resultado:

Primera revisión: 14/10/05

Total de explantos: 26

Contaminados con Hongos: 2 (7.69 %)

Contaminados con Bacterias: 13 (50 %)

Muertos: 15 (57.69)

Vivos: 11 (42.3 %)

Efectividad del tratamiento: 42.3 %

Observaciones:

En los explantos se visualizan áreas necróticas en los primordios foliares.

Segunda revisión: 17/10/05

Total de explantos: 11

Contaminados con Hongos: 0 – 0 %

Contaminados con Bacterias: 0 – 0 %

Muertos: 11 (100 %)

Vivos: 0

Observaciones Generales:

Las contaminaciones producidas por hongos, fueron causados por varias especies de hongos imperfectos. En un caso se determinó un hongo correspondiente al género *Alternaria*, que posee esporas con forma de granada y con tabiques transversales y longitudinales (Figura 17). Sus colonias son de color verde oscuro con zonas grisáceas (Figura 18).

Figura 17. Esporas con tabiques transversales y longitudinales de hongos del genero *Alternaria*.

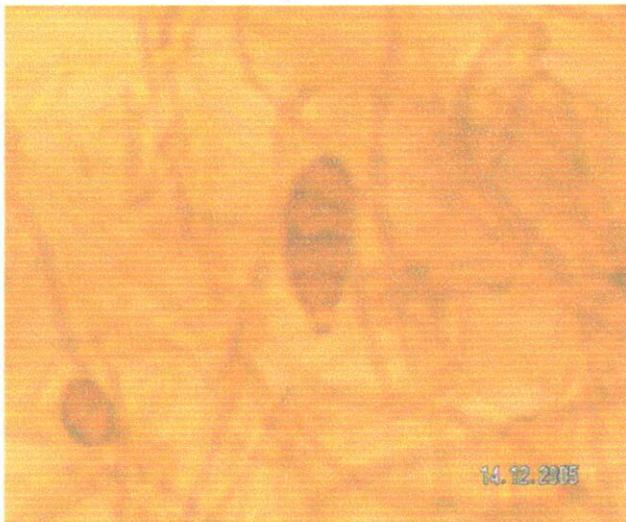
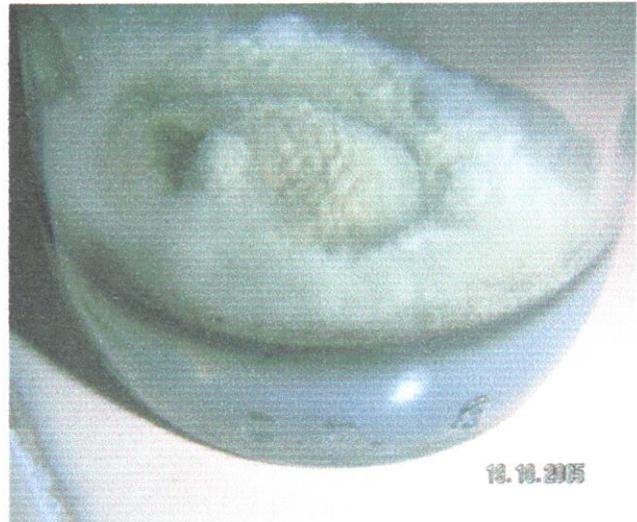


Figura 18. Colonia de hongos del genero *Alternaria*



E – DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Microestacas:

En esta experiencia los tratamientos de desinfección no tuvieron resultados alentadores, con 0 % de efectividad en los tratamientos en Raulí y en el primer tratamiento de Roble Pellín; y un 4.3% de efectividad para el segundo tratamiento de Roble Pellín. Esto pudo deberse a que las concentraciones no fueron suficientes o a que el tiempo de exposición no fue adecuado para lograr porcentajes de desinfección mayores. Algunas recomendaciones para disminuir los porcentajes de contaminación son: utilizar lavandina con una concentración del 60 % por un tiempo mayor (15 minutos), combinar el segundo tratamiento aplicado a las microestacas con una inmersión de las mismas en alcohol 70 %, probar otros productos desinfectantes y/o tratar las estacas con fungicidas luego de su cosecha.. En cuanto a la liberación de fenoles, es aconsejable realizar cortes mas limpios al obtener las microestacas y posteriormente a la desinfección realizar un tratamiento con ácido ascórbico al 0.2 % para evitar la oxidación de los mismos.

Yemas:

Raulí:

En los tratamientos utilizados para raulí se notó una mejoría importante al aplicar alcohol al 70 %; el tratamiento con lavandina tuvo una efectividad de solo un 6.25 % mientras que con el tratamiento con lavandina y alcohol la misma llegó aun 42.3 %.

Estos resultados se pueden mejorar mucho más, ya que la contaminación fue muy alta. La misma se puede deber a la presencia del mucílago que se encuentra en las yemas y que puede albergar microorganismos que producen la contaminación de los explantos. También es importante tener en cuenta que el tejido sufrió un daño importante en la desinfección lo que pudo haber causado las pérdidas de los explantos que pasaron la etapa de desinfección. Esta especie se muestra muy recalcitrante para su establecimiento "in vitro".

Roble Pellin:

En esta especie se comprobó que el mejor momento para la recolección de yemas, es cuando estas se encuentran en un estado incipiente de brotación. Cuando se trabajó con las yemas en estado avanzado de brotación (tratamiento N° 3), no soportan la etapa de desinfección, y el material queda totalmente destruido.

En este ensayo para esta especie se logró una desinfección de yemas muy importante con una eficiencia del 52.17 % para la primera desinfección y 83.33 % para la segunda desinfección; la diferencia entre ambas posiblemente se produjo debido a la poca práctica del personal.

Los explantos alcanzaron la etapa de multiplicación (figura N° 19). En la segunda multiplicación se determinó una tasa promedio de 1:6. Si bien se obtuvieron estos datos, en esta etapa no es conveniente realizar un análisis estadístico debido a la alta variación de los resultados. Normalmente es deseable realizar el análisis a partir de la tercera generación de brotes, donde es posible obtener tasas más uniformes y en el presente trabajo, por cuestiones de tiempo, solo se tomaron los datos correspondientes a la segunda generación.

Otro factor importante para tener en cuenta es evitar pérdidas de explantos por contaminaciones y por la muerte de tejidos debidos al estrés que sufren en el trasplante al deshidratarse. Este estrés puede provocar un debilitamiento del explanto y una mayor susceptibilidad al ataque por patógenos endógenos y exógenos. La recomendación es extremar los cuidados y precauciones básicas para realizar las actividades; y ver alguna posibilidad de lograr una cierta humedad ambiente dentro de la CFL para evitar que el explanto sufra deshidratación.

Figura 19. Callos de *N. obliqua*, en etapa de multiplicación.



Anexo N° 1

MEDIO BÁSICO Broadleaved Tree Medium (BTM) (Chalupa, 1983)	
Sustancia	Concentración (mg/l)
KNO ₃	190
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
NH ₄ NO ₃	165
(NH ₄) ₂ SO ₄	240
K ₂ SO ₄	860
CaCl ₂ · 2H ₂ O	44
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	640
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ · H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.02
KI	0.15
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
Tiamina-HCl	1
Piridoxina-HCl	0.5
Acido nicotínico	0.5
Mio-insitol	100
Glicina	2
Glutamina	2

Sacarosa	20 g/l
Agar - Agar	7 g/l
PH	5.8 (+/- 5)

Cronograma de las Actividades realizadas:

Actividades	Horas
Búsqueda de información bibliográfica	39
Explicación y utilización de los materiales del laboratorio	1
Organización y selección de la metodología a seguir	2
Preparación de soluciones, medios nutritivos e insumos	24
Recolección y preparación del material vegetal	6
Preparación desinfección y siembra de los cultivos (establecimiento)	18
Repique y multiplicación de los cultivos	20
Revisión y evaluación de los cultivos	12
Elaboración del informe final y análisis de los resultados obtenidos	32
Número de horas total dedicadas a la practica	154

Una de las modificaciones con respecto al cronograma tentativo fue que se realizaron repiques de explantos que no estaban programados debido a contaminaciones por bacterias, por lo cual se dedicaron un número mayor de horas a los repiques. Y la segunda fue que la cantidad de horas se fueron modificando de acuerdo a las necesidades de la práctica.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.

- Caldiz Daniel O. 1997. Cultivo "in vitro" y Micropropagación. Apuntes. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.
- Guillaumet, F. 2001. Obtención "in vitro" de callos a partir de plántulas de *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et. Mil. Práctica Laboral. AUSMA, Universidad Nacional del Comahue.
- Muñoz, Marisol V. 1993. Algunos antecedentes sobre propagación de *Nothofagus*. Apuntes. Universidad de Talca.
- Martínez Pastur, G., M. Arena. 1995. In vitro propagation of *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Blume. **Aust. J. Bot.** 43: 601-607
- Martínez Pastur, G., M. Arena. 1996. In vitro propagation of *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et. Mil. **Phyton.** 58 (1/2): 1-7.
- Martínez Pastur, G., M. Arena. 1997. Micropropagación de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. **Bosque.** 18 (2): 43-50
- Martínez Pastur, G., M. Arena. 1997. In vitro propagation of juvenile *Nothofagus leoni* Espinosa.
- Martínez Pastur, G., M. Arena; O. H. Caso. 1997. In vitro propagación of *Nothofagus antarctica* from Shaeroblasts and Saplings. **Biocell.** 21 (3): 231-236
- Mattes Fernández, Hernán. 2002. Micropropagación de Especies Leñosas. Trabajo practico N° 12, Guía Trabajos Prácticos Fisiología Vegetal. A.U.S.M.A.
- Mattes Fernández, H. 1995. Primeros resultados en propagación "in vitro" aplicada a la conservación clonal de *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et. Mil. y *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Blume. Actas IV Jornadas Forestales Patagónicas. AUSMA, Universidad Nacional del Comahue.

GRADO DE APROVECHAMIENTO ALCANZADO.

Esta práctica comenzó con una simple idea de realizar una práctica laboral, para cumplir con los requisitos necesarios para completar la carrera de Técnico Universitario Forestal. Esta idea dio vueltas en mi cabeza durante unos días, la intención de la misma era aprender y reforzar conocimiento que se habían adquirido a lo largo del dictado de las distintas materias que componen dicha carrera. Entonces decidí guiarla hacia micropropagación, clonación de especies forestales y relacionarlo con bosque nativo. Recurrí a una persona con mucha experiencia en el tema, el **Ing. Agr. Mattes Fernández Hernán** y le propuse una idea, que hoy después de 5 meses y con algunas modificaciones se resume en este trabajo.

Cuando comenzamos con los preparativos de la práctica, planteamos como objetivos, **obtener experiencia en las actividades de laboratorio relacionadas con el cultivo "in vitro" de especies leñosas y establecer y multiplicar "in vitro" ejemplares adultos de Raulí y Roble Pellín, a partir de yemas de rebrotes de cepa.**

Hoy puedo decir que los objetivos se lograron con una eficiencia del 95 % dado que el objetivo de mayor importancia se logró con mucho esfuerzo y voluntad, tanto de mi parte como por parte de mi profesor supervisor; esto dio como resultado que pueda tener mayores conocimientos sobre determinados temas que me llevan a perfeccionarme como futuro profesional, a pesar de que en los objetivos particulares se llegó a lograr y multiplicar una de las especies, fue suficiente para alcanzar el 95 % de aprovechamiento; de esta oportunidad que hoy por hoy nos da la educación pública; el 5 % restante corresponde a no poder alcanzar los resultados esperados, con Raulí, pero que en realidad igualmente brindo resultados importantes para futuros trabajos o futuras prácticas.

En mi opinión personal me gustaría mencionar que en este tipo de trabajos como tantos otros se buscan distintos objetivos, como de producción, repoblación de zonas degradadas y mejoramiento genético, logrando así posibilidades de alcanzar nuevos conocimientos que en un futuro podrán ser utilizadas por las nuevas generaciones.

Agradecimientos:

Los agradecimientos en realidad son para muchísimas personas que me ayudaron directa o indirectamente en la realización de esta práctica. Mi familia quienes me dieron su apoyo y la fuerza necesaria para seguir adelante, mi hijo, mi novia, mis padres, mis hermanos y mis abuelos, aunque alguno no este con migo físicamente, esta presente en mis mejores recuerdos y en mi corazón.

Mi profesor, Hernán Mattes que me guió durante toda la práctica con total disponibilidad de tiempo para la realización. Al los directivos del A.U.S.M.A. por permitirme utilizar el espacio físico.

Las demás personas a quienes les debo agradecer, al señor Javier Gómez, Nicolás Pinchulef, Oscar Muños, Juan Carlos Mardones, Alejandro Gonzáles, Leandro Colombo, el personal del departamento de alumnos y biblioteca, a los docentes de la cátedra de química por compartir el laboratorio y los señores Ismael Andía, y David Barrientos docentes de la cátedra de Tecnología de la madera. No se realizan aclaraciones sobre el porque de los agradecimientos debido a que cada uno de ellos sabe el porque.

Para las personas anteriormente mencionada, muchas gracias, y pido disculpas si me olvido de alguien.