

# Estudios preliminares del cultivo de tejidos *in-vitro* de *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R. Br.



Modalidad elegida: "Investigación en cualquiera de los campos de las Ciencias Agrarias y Forestales."

Área temática: Dasonomía-Propagación de especies forestales.

Nombre y Apellido: Tatiana Cinquetti

Legajo: 28192/4

DNI: 36936393

Mail: [tatianacinquetti@gmail.com](mailto:tatianacinquetti@gmail.com)

Teléfono: 2214946581

Directora: Sandra Sharry

Co-Director: no corresponde

Fecha de entrega: 15/9/2021



## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y METODOS	11
RESULTADOS	17
DISCUSION	22
CONCLUSION	25
ANEXO 1	26
BILBIOGRAFIA	26

## **Título: Estudios preliminares del cultivo de tejidos *in-vitro* de *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R. Br.**

### **Resumen**

En este trabajo se logró desarrollar un protocolo para el establecimiento *in vitro* de braquiquito. Se ajustó un protocolo de desinfección de semillas y se obtuvieron plántulas germinadas *in vitro* que se utilizaron como fuente de explantes para la fase de multiplicación. Se evaluó el cultivo de diferentes explantes (tallo, cotiledones, hojas, raíces) en medios de cultivo con sales y vitaminas de M & S (Murashige & Skoog, 1962) al 50%, suplementados con los siguientes reguladores de crecimiento: IBA (Ácido indol butírico) y BAP (Bencil amino purina) en diferentes concentraciones. Los mejores resultados en la inducción de brotes fueron obtenidos en el tallo con 2/3 brotes promedio por explante en el medio con las sales y vitaminas M&S reducidas al 50% de su concentración y con reguladores de crecimiento.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Descripción de la especie**

*Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R.BR es una especie arbórea siempreverde, que pertenece a la familia Sterculiaceae del orden Malvales (Figura 1). Es conocido tanto por sus nombres vulgares braquiquito, brachichito, árbol botella y en Australia como kurrajong. *Brachychiton* deriva del griego *brachys* = corto y *chiton* = túnica o cubierta, en alusión al corto tomento que recubre a las semillas o la cubierta externa persistente de las semillas. El epíteto específico *populneus* hace referencia al género *Populus* L. (familia Salicáceas), del latín *populus-i* = chopo, álamo, con el sufijo *-eus-a-um*, que indica semejanza, por el parecido de sus hojas con el dicho género. Es un árbol de rápido crecimiento, de hasta 10-12 metros de altura, con hojas perennes o semicaducas. El tronco es recto con forma de cono y su corteza lisa, verde azulado, salpicada de cortos surcos longitudinales más pálidos. Presenta una copa densa, piramidal cuando joven y redondeada en los ejemplares adultos; las ramas exteriores son colgantes, con ramillas glabras (Martínez Carretero, 2018).



Figura 1: *Brachychiton populneus*. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Fuente: Propia

Las hojas presentan disposición alterna, de forma lanceolada a ovado-lanceoladas, a veces cordiformes, rara vez rómbicas, de 6 a 12 cm de longitud, con un largo pecíolo glabro de 3 a 8 cm de largo. A su vez, son de color verde oscuro brillantes arriba, más pálidas o glaucescentes debajo, enteras o con 1 o 2 lóbulos laterales cortos, o profundamente 3 (-5) lobulados en subespecie *trilobus* (Guymer, 1988); las estípulas son caducas, estrechamente triangulares, acuminadas, escasamente puberulentas, de 4 a 7 mm de largo y 0.7 a 1.2 mm de ancho.

Las inflorescencias son densas panículas axilares, con flores unisexuales por aborto de uno de los sexos, acampanadas, de 1-1,5 cm de diámetro, de color crema o verde pálido en el exterior y verde pálido o blanco amarillento y manchado o moteado de rojo por dentro, rara vez rojo por dentro (Guymer, 1988). Las flores masculinas son de color blanco y glabras arriba, rojas y glandulares puberulentas en la base; las femeninas son de color crema o verde pálido y glabras en la parte superior y rojas y glandulares puberulentas en la base. Ambas flores tienen alrededor de 20 estambres (Guymer, 1988).

Los folículos son glabros por fuera, elipsoide-ovoides a anchamente ovoides, estipitadas, rostradas, de 2-7 cm de largo, 1,5-3 cm de ancho; pericarpio de 1-2 mm de espesor; estípites retorcidos, 12-50 mm de largo, 1-5 mm de diámetro; ápices aristados, deltoides o poco profundos triangulares, acuminados u obtusos, erectos o curvados, 5-15 mm de largo; pericarpio estrellado hirsuto en el interior (pelos ocasionalmente con 2 ramificaciones); exotestas estrellado-hirsuto debajo de la mitad (pelos ocasionalmente con 2 ramificaciones), glabras en la parte superior (Guymer, 1988).

Las semillas 4-18 por folículo, ovoides, lisas, 6,5-8 mm de largo, 4,5-5 mm de diámetro (Guymer, 1988)

### Distribución

*Brachychiton populneus* (Sterculiaceae) (Schott & Endl.) R. Br. crece naturalmente desde las zonas costeras más húmedas hasta el interior semiárido de Victoria, Nueva Gales del Sur y Queensland (Australia) entre las latitudes 37°30'S y 19°40'S. Se ha plantado ampliamente como un árbol ornamental en el suroeste de Australia (Figura 2). En Victoria, se limita principalmente al área del río Nevado, pero tiene una amplia distribución en Nueva Gales del Sur, desde la costa hasta las mesetas (hasta 1000 m) y las laderas occidentales, con ocurrencias aisladas de las llanuras occidentales. En Queensland, está restringido a los distritos de Moreton, Darling Downs (este), Wide Bay y Burnett, con casos aislados en el distrito de Leichhardt, (Guymer, 1988). En Argentina, así como en su lugar de origen, suele encontrarse asociado a bosques del género *Eucalyptus* sp.



Figura 2: Mapa de distribución del Género *Brachychiton* en Australia. Fuente: Guymer, G. (1988).

### Usos

A lo largo de su historia, se han encontrado diferentes aprovechamientos de especies del género *Brachychiton*. Los antiguos aborígenes, se alimentaban de sus semillas al tostarlas. La madera, suave al tacto y elástica, se utilizaba como escudo protector, y con las fibras de la corteza se hacían sandalias y ropajes. <sup>1</sup>

Las poblaciones nativas en tierras agrícolas, a menudo los retienen para proporcionar sombra densa y forraje de sequía. Las hojas cortadas de las ramas son nutritivas y deseables para almacenar, sin embargo, el consumo de la fruta puede causar

<sup>1</sup><https://www.antestodoestoeracampo.net/brachichito/>

enfermedades. Los árboles de raíces profundas tienen un impacto mínimo en el cultivo y también apoyan la producción de miel. Las semillas molidas se pueden preparar en un sustituto del café o agregarse al pan. La raíz primaria hinchada, parecida a la zanahoria, es nutritiva y agradable y el exudado de la goma también es comestible. La fibra extraída del tallo se ha utilizado en la fabricación de cordeles y redes (Taverner, 2000).

Recientes estudios han demostrado que el aceite de las fibras de las semillas es más rico en tocoles, clorofilas y carotenoides que el aceite de las semillas. Estos compuestos poseen propiedades antioxidantes. También se demostró una correlación positiva entre el ácido oléico en el aceite de semilla de fibra y linolénico y ácido estercúlico en el aceite de semilla (Mokbli *et al*, 2017). El ácido linoleico conjugado (ALC), un ácido graso de la serie omega-6 puede influir positivamente sobre el exceso de grasa corporal (Baddini *et al*, 2009). Los primeros informes sobre los efectos positivos del ALC fueron publicados hace más de 20 años. Los resultados atribuían al ALC un papel reductor de la grasa corporal (Pariza & Ha, 1990) y también un efecto anticarcinogénico. Además de otros efectos benéficos tales como son la reducción de la grasa corporal acumulada, el aumento de la masa magra, la reducción de los síntomas de arteriosclerosis e hipertensión, la mejora del sistema inmunológico, la reducción de la inflamación y efecto favorecedor de la mineralización ósea, así como su utilidad en la prevención y tratamiento de alergias alimentarias (Forga *et al*, 2006; Valeille *et al*, 2005; Gómez Ayala, 2009).

Alia *et al* (2019) realizaron investigaciones en hojas frescas y secas y también en ramas frondosas molidas secadas al aire. Por medio de metanol 70% obtuvieron extracto de *B. populneus* y dieron como resultado el aislamiento e identificación de diecisiete flavonoides mediante diferentes técnicas cromatográficas y espectroscópicas; once de ellos reportados por primera vez desde esta planta. También investigaron la actividad potencial del extracto de *B. populneus* contra aloxano que induce estrés oxidativo y diabetes en ratas macho. El extracto revirtió los valores de peso corporal de las ratas diabéticas inducidas por aloxano a los de los animales de control después de 24 h. Además, el extracto de *B. populneus* contrarrestó el efecto del estrés oxidativo inducido por el aloxano provocando un aumento significativo en el nivel de contenido de glutatión y una disminución relativa del nivel de malondialdehído y contenido de óxido nítrico en suero después de 24 h de tratamiento en comparación con ratas diabéticas inducidas por aloxano y con control normoglucémico.

### **Propagación del braquiquito**

La propagación de braquiquito en viveros se puede realizar mediante semillas (propagación sexual) o esquejes apicales (propagación vegetativa).

Según el sitio web del **Centre for Australian National Biodiversity Research** (CANBR) (<https://www.anbg.gov.au/gnp/interns-2002/brachychiton-populneus.html>) las semillas germinan fácilmente; la inmersión en agua tibia durante 12 horas mejora el porcentaje de germinación. Los esquejes de plantas con características deseables pueden injertarse en portainjertos de plántulas. Las plantas de hasta 2 m responden bien al trasplante si se conserva la raíz principal y se recortan las ramas para reducir la

pérdida de agua. No se han encontrado otros reportes sobre la propagación sexual o asexual, incluida la propagación *in vitro* de esta especie.

### **Cultivo *in vitro* de especies leñosas**

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento y/o crecimiento de células o tejidos en un medio nutritivo y en condiciones ambientales controladas. Involucra diferentes técnicas y uno de los objetivos de la aplicación de estas es regenerar plantas a partir de explantos o explantes (ápices de raíces o de tallos, primordios de hojas, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo o de hojas, ovarios, óvulos, anteras y polen) cultivados en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica (Sharry et al, 2015).

El cultivo *in vitro* se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl & Paul, 2000). El término cultivo *in vitro* de plantas, se refiere a cultivar plantas dentro de frascos de vidrio en un ambiente artificial (Castillo, 2004). La división y desdiferenciación de las células se puede inducir colocando porciones de tejido (explantes) en un medio de cultivo adecuado que contenga los nutrientes y los aditivos necesarios (Pierik, 1988). En la actualidad, el cultivo *in vitro* tiene amplios usos, por ejemplo realizar estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica general; para la obtención de plantas libres de patógenos; para la conservación de germoplasma; producir metabolitos secundarios; mejorar la genética mediante la inducción de mutaciones, la selección *in vitro* o la hibridación somática; introducir nuevas características en las plantas mediante ingeniería genética y propagar de manera masiva las plantas (micropropagación) (Roca & Mroginski, 1991).

La micropropagación es una alternativa importante a la propagación de plantas convencionales. Implica la producción de plantas completas utilizando explantes (como yemas apicales o laterales, segmentos de hoja, segmentos de raíz o flores, protoplastos), en condiciones asépticas, controlando las condiciones ambientales de cultivo y los nutrientes. La misma, puede abordarse cuando los métodos convencionales no son posibles debido a dificultades técnicas, tiempo de multiplicación muy largo, y/o costo de producción (Pérez Ponce, 1998).

El proceso de micropropagación de plantas incluye 5 etapas bien definidas (Ianicelli & Escandon, 2015):

Etapla 0: el precultivo, que se refiere al tratamiento de la planta madre.

Etapla 1: introducción *in vitro*, incluye al proceso de desinfección y establecimiento del cultivo.

Etapla 2: multiplicación, implica el incremento de la masa de material vegetal.

Etapla 3: enraizamiento en donde se induce el desarrollo de raíces

Etapa 4: aclimatación, en la que se adapta a la planta a vivir fuera de la condición *in vitro*.

#### Etapa 0: Preparación de la planta madre.

Para que el cultivo *in vitro* sea exitoso y mantenga condiciones asépticas, se deben utilizar explantes con un nivel nutricional y grado de desarrollo adecuado. Para lo mismo, se recomienda mantener una planta madre (planta donadora), bajo condiciones controladas como por ejemplo un invernadero. De esta manera, se podrá controlar la nutrición y riego que permitirán un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades. Otra opción es introducir semillas desinfectadas *in vitro*, para obtener plántulas libres de microorganismos, y a partir de ellas, obtener los explantes para iniciar la etapa de multiplicación.

#### Etapa 1: Desinfección del material vegetal.

Una vez elegida la planta madre, se seleccionarán los explantes a partir de los cuales se llevará adelante el cultivo que puede ser cualquier tejido u órgano de la planta. Antes de extraer los explantes se desinfectan los fragmentos de la planta madre para eliminar los contaminantes externos. En el caso de la utilización de semillas, las mismas pasan por un proceso de desinfección que debe ajustarse para cada planta. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia, por eso se trabaja en cabinas de flujo laminar con materiales esterilizados. Los explantes esterilizados se introducen en recipientes adecuados a su tamaño y tipo que varían en función del cultivo *in vitro* al que están destinados. Se pueden utilizar botellas de cristal de borosilicato, tubos de ensayo, matraces Erlenmeyer y los propios biorreactores (Jaiswal et al, 2017).

#### Etapa 2: Introducción del material *in vitro*.

Luego de la desinfección superficial, las semillas, las yemas, u otro tipo de explante, se colocan en medio de cultivo estéril, los que contienen nutrientes esenciales para el crecimiento *in vitro* de células y tejidos vegetales. Una selección correcta es importante para obtener un cultivo celular productivo y exitoso. El medio de cultivo más empleado para la micropropagación y el cultivo de meristemas apicales es el MS (Murashige & Skoog) (Merillon, 2007).

#### Etapa 3: Multiplicación de los brotes.

En esta fase, se espera que los explantes que sobrevivieron las etapas anteriores, originen brotes, callos y raíces, iniciando la morfogénesis. Estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas (Rodríguez Amaro, 2018).

#### Etapa 4: Elección de un medio de enraizamiento de los explantes.

Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Las auxinas participan en la división celular, en la elongación y en la diferenciación

radicular. Algunas son el Ácido Indol-3-Acético (AIA), el Ácido Indol-3- Butírico (AIB), el Ácido 1-Naftalenacético (ANA) y el Ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4,-D)(Uribe et al, 2012). En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en las leñosas es complicado por la limitada capacidad rizogénica, que se relaciona a su vez, con el genotipo y la edad del material a propagar. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro* bajo condiciones de invernáculo.

#### Etapas 5: Aclimatación y rusticación de las plantas.

Se busca una transición entre las condiciones de cultivo *in vitro* y las condiciones naturales del medio externo donde se incorporará la planta. El estrés asociado a la evapotranspiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por ello, es conveniente contar con instalaciones de invernadero o cámaras de crecimiento adecuadas para brindar temperatura y humedad relativa moderadas, que permitan lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva. Bajo condiciones *ex vitro*, se utilizan diferentes sustratos, mezclas de tierra y arena y/o abonos, los cuales conviene que estén debidamente esterilizados. En cambio, bajo condiciones *in vitro*, se induce el enraizamiento y posteriormente los brotes son establecidos en las condiciones de adaptación, usando una humedad relativa alta durante el período de aclimatación, la cual se va reduciendo gradualmente hasta alcanzar el nivel normal en invernadero o campo (Pierik, 1990).

El material vegetal y las condiciones físicas y químicas que se crean, determinan el crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta. En el caso del material vegetal, influye la constitución genética y la edad de la planta, la edad del órgano o tejido, el estado fisiológico, el estado sanitario, la posición del explante dentro de la planta, el tamaño, el ambiente y las condiciones en el que se ha desarrollado la planta madre, el tipo de corte que se realice y la forma en la que se coloque el explante en el medio (Roca & Mroginski, 1991).

Los factores físicos que influyen en el establecimiento *in vitro* de los explantes son principalmente la luz (intensidad y fotoperiodo), la temperatura, el pH, la humedad relativa y la concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Las condiciones de luz y temperatura que se eligen para el cultivo *in vitro* generalmente son las que constituyen un óptimo para el crecimiento y el desarrollo del material experimental *in vivo* (Pérez Ponce, 1998). En cuanto a las condiciones químicas, quedan establecidas por los componentes nutritivos del medio de cultivo, agua, azúcar, macro y microelementos, reguladores de crecimiento, vitaminas y agar. El medio nutritivo cumple con dos funciones principales: proporcionar soporte físico y todos los nutrientes necesarios para el desarrollo del explante, es por eso que su investigación es de crucial relevancia (Roca & Mroginski, 1991).

En lo que concierne a la nutrición mineral, se compone de macro y micronutrientes. Se han formulado muchas soluciones nutritivas. La más utilizada es la formulación MS (Murashige & Skoog, 1962), otros medios de cultivo son LS (Linsmaier & Skoog, 1965) que es una revisión del medio MS donde se modifica la composición de las vitaminas; White (White, 1963); B5 (Gamborg et al., 1968); Nitsch (Nitsch & Nitsch, 1969) desarrollado para el cultivo de anteras; WPM (Lloyd & McCown, 1980) para el cultivo

de plantas leñosas. La planta con la que se trabaja y la etapa de micropropagación determinan la elección de la solución nutritiva. El pH suele estar entre 5,0 y 6,5 ya que pH más bajo o más alto frenan el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Con respecto a los reguladores de crecimiento, pueden dividirse en hormonas, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores y otros productos sintéticos que actúan de forma semejante. Éstos son responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza y que determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta (George, 2008).

Las especies leñosas ornamentales, constituyen cultivos de gran importancia ambiental y económica en el arbolado urbano y parqueizado. Para su propagación, se utilizan diferentes vías. Estas se relacionan con la especie, los recursos y las tecnologías disponibles. Una alternativa para multiplicar especies arbóreas es el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

Con el cultivo de tejidos vegetales, utilizando partes aisladas de la planta (semillas, embriones, hojas, tallos, raíces, flores, frutos, anteras, microsporas, células, protoplastos, etc.) se puede llevar a cabo la clonación de árboles con el fin de obtener su mejoramiento genético, propagación masiva o simplemente recuperarlo si éste se encuentra dentro de alguna categoría de extinción (Roca & Mroginski, 1993; Pierik, 1997). Varias especies forestales se propagan por esta vía, géneros como *Pinus*, *Thuja*, *Quercus*, *Picea*, *Abies*, *Sequoia*, *Pawlonia*, *Ulmus*, *Eucalyptus*, entre otros ya sea por medio de la regeneración de brotes (organogénesis) o por la formación de embriones somáticos (embriogénesis somática) (Nehra *et al.*, 2005).

Sin embargo, la micropropagación de especies arbóreas está limitada debido a los problemas de contaminación, oxidación y recalcitrancia, por lo que se requiere implementar los protocolos para la desinfección y multiplicación para cada especie (Orellana, 1998).

Por ello, uno de los cuellos de botella para la propagación *in vitro* de especies leñosas, es establecer cultivos libres de contaminantes ya que el éxito de las primeras etapas del cultivo *in vitro* puede verse reducido por la presencia de microorganismos. La etapa 2, de introducción *in vitro* de explantes, es dificultosa cuando el material a utilizar proviene de plantas que crecen a campo. Esta situación se genera por las condiciones físicas del cultivo que conforman un ambiente propicio para su desarrollo. La principal fuente de contaminación en el cultivo de tejidos vegetales se produce por la presencia de microorganismos superficiales y sistémicos de la planta donadora. Se deben descartar los individuos que estén en mal estado fitosanitario, realizar procedimientos de desinfección adecuados, utilizando desinfectantes superficiales y fungicidas, para poder controlar la contaminación superficial. A pesar de esto, el material puede no quedar completamente estéril, debido a que es probable que se presenten microorganismos sistémicos como virus, bacterias y hongos. Algunos de estos contaminantes se pueden tratar con el uso de antibióticos o de tratamientos de quimioterapia y termoterapia (Razdan, 2003). A su vez, es necesario trabajar en ambientes adecuados, esterilizar los medios de cultivo y realizar los cultivos siguiendo ciertas normas de asepsia (Roca & Mroginski, 1991). Una de las opciones para obtener un material de partida libre de contaminantes, es utilizar plántulas germinadas

*in vitro*, de las cuales se obtendrán los explantes para iniciar el proceso de micropropagación.

La oxidación y oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como la oxidación de compuestos fenólicos catalizada por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot et al. 1996, Bray et al. 2000). El explante, durante su cultivo *in vitro*, sufre siempre en mayor o menor medida situaciones de estrés, ocasionadas por daños mecánicos o por las condiciones del cultivo (como la composición del medio). Estas situaciones estimulan el metabolismo de los compuestos fenólicos. Se producirán reacciones de hipersensibilidad por la síntesis de fenoles, como la exudación al medio del contenido de las células deterioradas. Las células vecinas de las que inicialmente fueron lesionadas serán afectadas, llevando finalmente a una muerte prematura (George, 2008). Como los fenoles pueden alterar eventos morfogénicos y/o de crecimiento y desarrollo, se hace necesario controlar el efecto de la oxidación en el cultivo de tejidos.

Las especies leñosas en general son caracterizadas como recalcitrantes al CTV. Una planta o una fase de su desarrollo, puede ser calificada como recalcitrante al cultivo de tejidos, cuando a pesar de manipular las condiciones del cultivo (concentración de sales, nitrógeno, reguladores de crecimiento, entre otros) no produce la respuesta deseada (Bonga & Klimaszewska, 2010; Benson, 2000).

Resulta necesario optimizar las condiciones de cultivo de cada especie, con el objetivo de mejorar las características de crecimiento en condiciones *in vitro*.

### **Importancia del estudio**

En la actualidad, no se han encontrado reportes de la propagación *in vitro* de esta especie. Por ello, se propone ajustar las condiciones para establecer explantes de *Brachychiton populneus in vitro*, que permitan avanzar en la micropropagación. Esto permitiría la multiplicación de individuos a gran escala para uso en silvicultura urbana.

### **Objetivo general**

Ajustar las condiciones de cultivo *in vitro* de *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R.BR que permitan avanzar en su micropropagación

### **Objetivos específicos.**

- Establecer las condiciones y medios de cultivo para la germinación *in vitro* de semillas de *B. populneus*
- Introducir *in vitro* diferentes explantes provenientes de las vitroplántulas
- Evaluar las respuestas de los explantes cultivados *in vitro*.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Ubicación del lugar de estudio y obtención de material vegetal**

Los ensayos se desarrollaron en el laboratorio de cultivos de tejidos (ex Ceprove, hoy parte del LIMAD) de la FCAyF-UNLP en el periodo 2017 a 2018.

## Colecta de semillas

Las semillas de *B. populneus* se recolectaron de un árbol en fructificación (mes de febrero) situado en el Parque Saavedra, localidad de La Plata, Provincia de Buenos Aires ( $34^{\circ}55'50''$  S  $57^{\circ}56'31''$  O), República Argentina. El árbol se seleccionó en función de su fenotipo que presentó características tales como: estado fisiológico activo, crecimiento vigoroso, sin enfermedades visibles.



Figura 3: Imagen satelital del Parque Saavedra, Ciudad de La Plata, en donde se observa en color azul, la ubicación del árbol semillero de *Brachychiton populneus* del cual se recolectaron los frutos. Fuente: Google Earth



Figura 4: Planta madre de *Brachychiton populneus* en Parque Saavedra, La Plata. Fuente: Propia.

## Germinación *in vitro*

### Acondicionamiento de las semillas

El pericarpio de los frutos se retiró para obtener las semillas. Las mismas se lavaron con agua y detergente. Posteriormente, se escarificaron con agua corriente

sumergiéndolas en agua por 24 horas, con la finalidad de remover los inhibidores químicos presentes en la cubierta y ablandar la testa (Patiño et al., 1983; Hartmann & Kester, 1988; FAO, 1991).

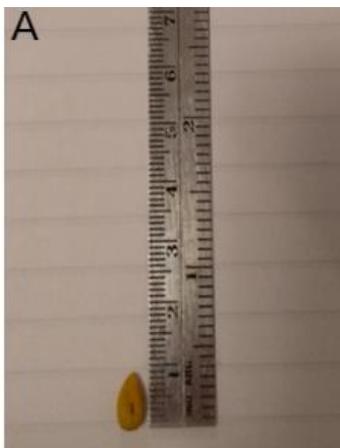


Figura 5: A: semilla de *Brachycton populneus*, 1 cm de longitud. Fuente: Propia

### Desinfección de las semillas

#### Materiales

1. Desinfección: Funguicida: Funguicap (Kasumin y Captan); Etanol; hipoclorito de sodio; tween 80; agua corriente esterilizada; agua destilada esterilizada.
2. Equipamiento e instrumental: destilador de agua; balanza; autoclave; flujo laminar; tijeras, pinzas y bisturí; botellas de vidrio; frascos de vidrio (55 mm diámetro, 72 mm altura), film y Parafilm®; cámara de cría.

Se procedió a esterilizar el material, los envases de vidrio, pinzas y medio de cultivo a utilizar por autoclavado, durante 20 min a 0,1 MPa de presión.

### **Procedimiento**

Las semillas acondicionadas se desinfectaron como se detalla a continuación:

1. Remoción de la cubierta de las semillas con pinzas.
2. Tratamiento de las semillas con funguicida por 1 hora, agitando cada 15 minutos.
3. Lavado con agua corriente.
4. Inmersión de las semillas en etanol 70%, luego inmersión de las mismas en hipoclorito de sodio con gotas de tween 80.
5. Lavado de las semillas con agua destilada estéril, bajo campana flujo laminar (3 veces)

Se ensayaron tres tratamientos que combinan agentes, concentración de los mismos y tiempos de inmersión, tal como se detalla en la tabla 1.

Tabla 1

*Tipos de tratamientos empleados para la desinfección de semillas de *Brachycthon populneus*.*

Tratamiento		Concentración	Tiempo (minutos)
1	Fungicida	1 cápsula/litro	60
	Etanol	70%	1
	Hipoclorito de sodio	10%	30
	Tween 80	3 gotas	30
2	Fungicida	1 cápsula/litro	60
	Etanol	70%	1
	Hipoclorito de sodio	50%	30
	Tween 80	2 gotas	30
3	Fungicida	1 cápsula/litro	60
	Etanol	70%	1
	Hipoclorito de sodio	30	30
	Tween 80	3 gotas	30

**Nota.** El Tween 80 se utilizó junto con el hipoclorito de sodio, agitando 3 veces cada 10 minutos.

En cada tratamiento se desinfectaron 40 semillas.

### **Introducción *in vitro* de las semillas desinfectadas**

Las semillas desinfectadas se sembraron bajo campana de flujo laminar, en envases con un medio de aislamiento conformado por agar 7 g/L, sacarosa y agua destilada. Las condiciones de cultivo que se tuvieron en cuenta fueron: temperatura 25 °C con fotoperiodo de 16 horas luz, durante 45 días.

Se realizaron dos ensayos diferentes. El primero consistió en analizar la influencia de la presencia de sacarosa en el medio de aislamiento. Se realizaron dos tratamientos uno con sacarosa 30 g/L y otro sin sacarosa, ajustando el pH a 5,7. El segundo ensayo consistió en la utilización de recipientes diferentes, frascos de vidrio de 150 ml y tubos de ensayo de 50 ml, con el fin de poder determinar las condiciones óptimas para la germinación y desarrollo de la plántula.

Se sembraron las semillas en frascos de vidrio (6 por frasco) y en tubos de ensayo (1 semilla por tubo), sellando los recipientes con Parafilm.

Durante el proceso, se realizaron observaciones semanales, para evaluar la presencia de contaminación, la germinación y el aspecto de las plántulas.

### **Multiplicación de brotes**

Las plantas axénicas obtenidas por la germinación de semillas *in vitro* se utilizaron como fuente de explantes (Figura 6).



Figura 6: Planta madre de *Brachychiton populneus*, en tubo de ensayo con medio de cultivo de aislamiento conformado por agar 7 g/L, sacarosa y agua destilada. Fuente: Propia

Se probó la respuesta de diferentes tipos de explantes (Tabla 2) al medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), con diferentes concentraciones de ácido indol butírico (IBA) y bencil amino purina (BAP) para estimular la multiplicación (Anexo 1). Se cultivaron cotiledones, hojas, tallo y raíz en placas de Petri selladas con Parafilm.

Tabla 2

*Tipos de explantes de Brachycton populneus utilizados para la multiplicación de plantas.*

Explante	Medio de cultivo Anexo 1	
Cotiledones		A
Hojas		B
Tallo		A
Raíz		B

**Nota.** Explantes en cajas de Petri con medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), Anexo 1.

### Enraizado de brotes y desarrollo de plántulas

Los brotes obtenidos de la etapa multiplicación, se separaron bajo campana de flujo laminar y cultivados uno por frasco, en medio de cultivo Gamborg (1968) adicionado con carbón activado 1 g/L (Anexo 1, C) para poder superar problemas de oxidación (Roca & Mroginski, 1991).

## RESULTADOS

### Germinación de las semillas *in vitro*

Se observó que en el tratamiento 1 (Tabla 1) el cual posee una menor concentración de hipoclorito de sodio, las semillas se contaminaron al cabo de 7 días. Por otro lado, las semillas sometidas a los tratamientos 2 y 3 no se contaminaron y tuvieron un porcentaje de germinación del 80%.

Tabla 3

*Resultados de los tratamientos realizados a las semillas de Brachycton populneus.*

Tratamiento	Resultado
1	
2	
3	

**Nota.** Tratamiento 1: semillas tratadas con fungicida (1 cápsula/litro) 60 minutos, etanol 70% 1 minuto, hipoclorito de sodio al 10 % 30 minutos y 3 gotas de tween 80; se contaminaron al cabo de 7 días. Tratamiento 2: semillas tratadas con fungicida (1 cápsula/litro) 60 minutos, etanol 70% 1 minuto, hipoclorito de sodio al 50 % 30 minutos y 3 gotas de tween 80; no sufrieron contaminación y germinaron. Tratamiento 3: semillas tratadas con fungicida (1 cápsula/litro) 60 minutos, etanol 70% 1 minuto, hipoclorito de sodio al 30 % 30 minutos y 3 gotas de tween 80; no se contaminaron y germinaron con mayor vigorosidad.

Con el objeto de obtener plántulas axénicas para fuente de explantes, las semillas desinfectadas con el Tratamiento 3 (Tabla 1) se colocaron en un medio de cultivo con sacarosa.

En los medios de cultivo sin sacarosa, las semillas no germinaron (Figura 7 A). Las semillas sembradas en medio de cultivo con sacarosa, germinaron a los 20 días (Figura 7 B). Por otro lado, el tipo de envase tuvo influencia en la calidad de las plántulas obtenidas (vigor y crecimiento radicular), como se puede observar en las tablas 4 y 5. Las mejores plántulas se obtuvieron en los tubos de ensayo, presentaron mayor vigorosidad y desarrollo de la raíz.

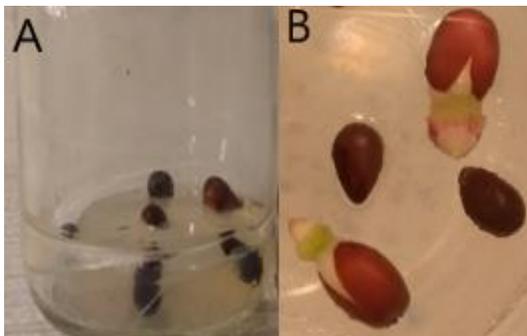


Figura 7: A: semillas de *Brachychiton populneus* sin germinar sembradas en frascos de vidrio con medio cultivo aislamiento sin sacarosa; B: semillas de *Brachychiton populneus* germinadas sembradas en medio de cultivo con sacarosa. Fuente: Propia

Tabla 4

*Semillas y plántulas de Brachychiton populneus en medio de cultivo con sacarosa en frasco de vidrio*

Semana

1



2



3



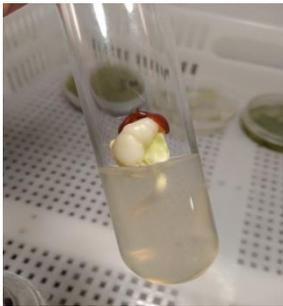
4



5



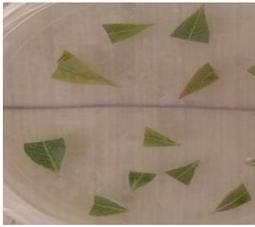
Tabla 5  
*Semillas y plántulas de Brachychiton populneus en medio de cultivo con sacarosa en tubo de ensayo*

Semana	
1	
2	
3	
4	
5	

## Multiplicación de brotes

Tabla 6

Respuestas de los explantes de *Brachychiton populneus* luego de 21 días de cultivo *in vitro* en medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962)

	Explante			
	Cotiledón	Hoja	Tallo	Raíz
Inicial				
Final				

**Nota.** Diferentes concentraciones de reguladores. Cotiledones: IBA 1 ml/L y BAP 1.5 ml/L; hojas IBA 1.5 ml/L y BAP 1 ml/L; tallo IBA 1 ml/L y BAP 1.5 ml/L; raíces IBA 1.5 ml/L y BAP 1 ml/L

Los cotiledones, las hojas y las raíces sufrieron oxidación y poca diferenciación en el medio MS (Anexo 1), observándose pequeños callos friables y de coloración verde. Sin embargo, el tallo sufrió un proceso de dediferenciación y, rediferenciación y formación de semejantes a los de las hojas, pero en este caso en color verde o blanquecino, con posterior brotación (Figura 8).

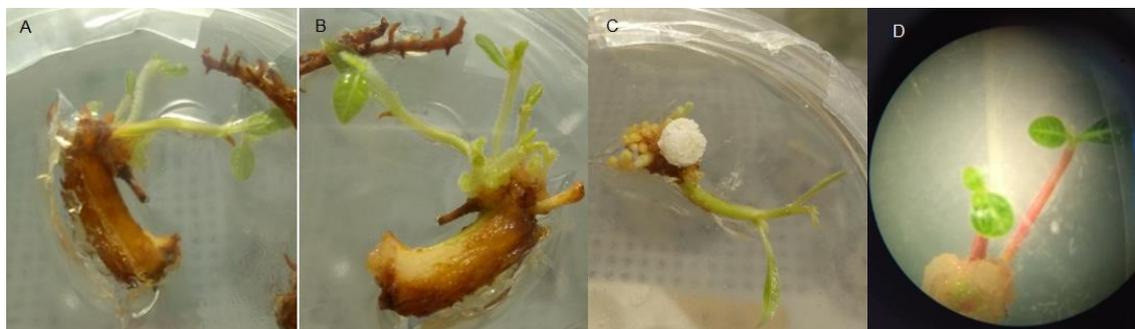


Figura 8: *Brachychiton populneus* A-B tallo con 2/3 brotes por sección de explante; C tallo con callo color blanco y brote; D. visualización del brote y del callo en lupa. Fuente: Propia.

Los brotes que se desarrollaron en el medio con 75 % de sales y 0,75 mg L<sup>-1</sup> de IBA enraizaron en 7 días, y formaron 8,6 raíces y 6,4 hojas, en promedio.

### Enraizado de brotes

Los brotes obtenidos a partir de segmentos de tallo provenientes de la etapa anterior se colocaron en un medio de cultivo construido por las sales completas de Gamborg adicionado con carbón activado, anexo 1. Se obtuvieron plántulas de 4 cm de altura con una raíz principal de 1,5 cm de largo (Figura 9 B-C).

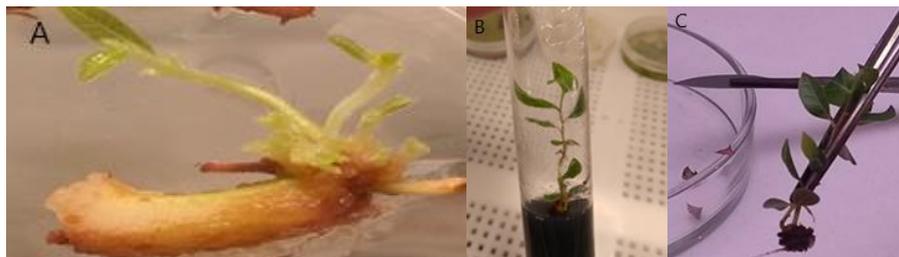


Figura 9: *Brachyhiton populneus*. A momento inicial, previo a la colocación de los brotes en tubos de ensayo con medio de cultivo de Gamborg (1968); B-C momento final en donde se retira la plántula enraizada de braquiquito para su posterior rusticación. Fuente: Propia.

## DISCUSION

Recrear las condiciones ambientales con todos los factores que lo conforman (humedad, temperatura, fotoperiodo, etc) en condiciones de laboratorio es una de las principales adversidades del éxito del cultivo *in vitro*, es por esta razón que la selección del material de partida para dicho cultivo es tan importante. La regeneración de plantas a partir de cultivo *in vitro* de ciertas especies leñosas, exige la búsqueda de técnicas complejas (Perugorría, 2005). Estas deben permitir a las plantas sobrevivir a los problemas de oxidación, heterogeneidad de respuesta y sobre todo a la ambientación cuando son trasplantadas a un sustrato y expuestas a las condiciones naturales. En este trabajo se seleccionó una planta madre ubicada en el Parque Saavedra de la Ciudad de La Plata, que presentaba buenas características fenotípicas en cuanto a crecimiento y vigorosidad, de la cual se recolectaron los frutos para la obtención de las semillas.

El establecimiento de cultivos *in vitro* mediante la siembra de semillas ofrece grandes ventajas para la propagación: 1) proporciona de una manera rápida plántulas que sirven como fuente de explantes para llevar a cabo la micropropagación; 2) es una manera de conservar plántulas con variabilidad genética natural, y 3) es un método que permite la germinación de semillas que de forma natural no lo hacen o es muy difícil de hacer en condiciones normales (Fay, 1992; Pierik, 1993).

La germinación de semillas *in vitro* permite obtener material vegetal para el establecimiento de protocolos de propagación masiva. De esta manera, las plántulas

obtenidas pueden ser empleadas como fuentes de explantes asépticos en el cultivo de tejidos.

Para poder iniciar el cultivo y obtener plantas *in vitro*, es necesario desinfectar los explantes, ya sean hojas, estacas, estaquillas, semillas. En este aspecto, Biasi *et al.* (1994) señalaron que la presencia de microorganismos contaminantes, hongos y bacterias, es uno de los elementos que puede limitar el establecimiento *in vitro* de explantes procedentes de plantas leñosas. En este punto Padilla-Ramírez *et al.* (1999) señala que la presencia de hongos contaminantes en la etapa de establecimiento *in vitro* de explantes de guayabo es uno de los principales problemas que limitan el establecimiento aséptico de segmentos nodales, al igual que en explantes de *Bambusa balcoa*, donde el principal problema encontrado durante el establecimiento, fue la presencia de contaminantes fúngicos visibles (Das & Pal, 2005).

Dentro de las sustancias utilizadas en la desinfección del material vegetal, se encuentran el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) y bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>), donde el hipoclorito de sodio ha sido el compuesto más frecuentemente usado por varios investigadores con buenos resultados para la desinfección y el establecimiento *in vitro* del material vegetal, a concentraciones y tiempos diferentes. Este producto es efectivo, económico y de fácil adquisición (Borges García *et al.*, 2009). Por ello, con el objetivo de determinar el efecto de distintos métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de *Brachychiton populneus*, se ensayaron 3 tratamientos. En el tratamiento 1 que posee una menor concentración de hipoclorito de sodio (10%), las semillas se contaminaron, en cambio en los tratamientos 2 y 3 (50 y 30%) con mayor concentración de hipoclorito de sodio, no hubo contaminación. Aponte (2008) determinó un procedimiento para la esterilización de semillas de Bolaina blanca (*Guazuma crinita*) y Cedro (*Cedrela odorata*), para su germinación *in vitro*. Con hipoclorito de sodio al 2% durante 40 minutos logró cero contaminaciones para las semillas de cedro (*Cedrela odorata*), mientras que para la Bolaina blanca (*Guazuma crinita*) se necesitaron 30 minutos para similares resultados. En este trabajo las concentraciones de hipoclorito de sodio necesarios para desinfectar las semillas de *Brachychiton populneus* fueron mayores y contemplaron un tiempo de inmersión de 30 minutos, similar al estudiado por Aponte (2008).

Según Pierik (1988), el material vegetal, a pesar de ser esterilizado antes del aislamiento, no siempre es completamente estéril y esto sólo se hace visible cuando el centro infeccioso es escindido (durante el repicado) y se pone en contacto con el medio de cultivo.

Con respecto al tipo de envase y su sellado, en este trabajo resultaron más convenientes los tubos de ensayos sellados con Parafilm. En los mismos se observaron plántulas con mayor vigorosidad y desarrollo de raíz. Sin embargo, Sharry *et al.* (2015) indica que durante la etapa de multiplicación el uso de frascos de vidrio de 250-300 ml de capacidad, con boca ancha, que permiten introducir y cultivar varios brotes en cada uno, pueden ser de gran utilidad.

En particular, la respuesta del explante bajo condiciones controladas y asépticas, está influenciada por diferentes factores directos, siendo uno de ellos, la disponibilidad de

nutrientes, tales como la sacarosa y el agua. La sacarosa, es la azúcar más usada *in vitro*, es portadora de carbono e inductora de la morfogénesis, siempre y cuando esté dentro del rango de concentración 1-5 % (Galzy, 1990 & Lees *et al.*, 1991). Rodríguez *et al* (2014), estudiaron la germinación de semillas en condiciones *in vitro* de la especie *Ugni molinae* en medio de cultivo MS en diferentes concentraciones. En dicho estudio determinaron que los medios de cultivo que contenían alguna concentración de MS obtuvieron una germinación más baja que el medio sin MS, como también los medios que contenían algunos de sus componentes. Sin embargo, en lo que respecta a la germinación de semillas de braquiquito, se estudió el comportamiento de la misma en dos medios de cultivo: uno conformado por agar, sacarosa y agua en donde se evidenció una germinación del 80%; y otro conformado por agar y agua, con ausencia total de plántulas. Por lo antes expuesto, se puede inferir que en esta especie no es indispensable la adición de otros nutrientes, con excepción de la sacarosa, para que la germinación sea exitosa y se pueda establecer el cultivo *in vitro*.

La selección de explantes primarios al final de la etapa de establecimiento permitió que la etapa de proliferación fuera todo un éxito, ya que se eliminó un alto grado de infección de multiplicación.

El CTV de leñosas, está limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye un problema serio y frecuente, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (George, 1996; Leukkanen *et al.*, 2000; Murkute, 2003; Tang & Newton, 2004, Cabrera, 2003). Estas especies presentan, en su mayoría, resistencia a ser propagadas *in vitro*. Por esta característica se les conoce como plantas recalcitrantes (Alexander *et al.*, 2000).

Según López, 2010; Mroginski *et al.*, 2002; Roque & Ardisana, 2006; Collado *et al.*, 2004; Marquínez, 1998, los explantes que mejores resultados dan son los tomados de plantas jóvenes, debido a que el desarrollo de la morfogénesis (capacidad de regenerar órganos y tejidos a partir de un explante inicial) es más rápido. La extracción de explantes se debe realizar en cabinas de flujo laminar para garantizar la asepsia. Varios autores, entre ellos Villalobos *et al.*, 1984 y Bonga, 1980, han encontrado que la edad del explante es importante en el desarrollo *in vitro* y crítico para las especies maderables; la micropropagación es más fácil empleando tejidos juveniles, y más difícil, con tejidos adolescentes y maduros. En este caso, se utilizó como planta madre para la etapa de multiplicación, una plántula de braquiquito obtenida en condiciones *in vitro*, por lo que esto redujo la posibilidad de contaminación de los explantes. Los explantes obtenidos fueron cotiledones, hojas, segmentos de tallo y de raíz.

En lo referido a brotes adventicios, los mismos pueden ser producidos a partir del explante directamente, o bien, a partir de callos derivados del explante primario. Para fines de propagación, se prefiere producirlos del explante directamente, ya que a partir de callos su formación es muy difícil y frecuentemente genera anomalías. En la diferenciación de brotes adventicios existe una interrelación entre el explante, el medio y las condiciones ambientales del cultivo (Villalobos & Thorpe, 1991)

En la etapa de multiplicación, se observaron diferentes respuestas. Algunos explantes, como hojas y tallos formaron callos. La formación de callos se atribuye a los mecanismos de acción de los reguladores de crecimiento empleados y se debe

fundamentalmente a la presencia de auxinas que inducen el efecto fisiológico y que deben ser transportadas desde el medio de cultivo hasta las células blanco como mencionan Taiz y Zieger (1998). En este trabajo, se observó la formación de callo, principalmente en los segmentos de tallo en medio de cultivo MS adicionado con IBA y BAP.

El medio de cultivo recomendado por Rossi, (2003); Corredoira *et al.*, (2011), Tapia, (2010), Lopes, *et al.*, (2005), Ocampo & Núñez, (2007), para el desarrollo de explantes de plantas leñosas es: WPM (*Woody Plant Medium*). A su vez, otro medio utilizado con frecuencia en el cultivo *in vitro* de leñosas es el de las sales basales MS con agar y el medio orgánico mínimo (Murashige con agar y sacarosa). El mejor medio analizado en este trabajo para el desarrollo de brotes a partir de explantes de *Brachychiton populneus* fue Murashige & Skoog, (1962), suplementado con IBA 1 ml/L y BAP 1,5 ml/L.

Enríquez del Valle *et al.* (2005) indican que se han utilizado medios de cultivo con bajas concentraciones de sales inorgánicas (MS) y ácido indolbutírico (IBA) para propiciar la formación de raíces adventicias en diferentes especies de agave cultivadas *in vitro*. También mostraron que el número de raíces por brote aumentó en relación a la concentración creciente del IBA y la concentración decreciente de las sales inorgánicas en el medio. Los brotes que se desarrollaron en el medio con 75 % de sales y 0,75 mg L<sup>-1</sup> de IBA enraizaron en 7 días, y formaron 8,6 raíces y 6,4 hojas, en promedio. Por otro lado, el medio de cultivo Gamborg es óptimo para el enraizamiento por presentar baja concentración de sales, favoreciendo notablemente el enraizamiento de los explantes (Pérez, 2001; Aguilar, *et al.*, 2010; Ocampo y Núñez, 2007, Yaya *et al.*, 2005). Es por ello que fue utilizado en la etapa de enraizamiento para la especie en estudio y se pudieron obtener plántulas con un promedio de altura de 4 cm, produciendo 1 raíz/plántula de 1,5 cm de longitud.

## CONCLUSION

En la presente investigación se establecieron cultivos *in vitro* de *Brachychiton populneus*, determinando las condiciones óptimas de la germinación *in vitro* y de la regeneración de plántulas *in vitro* a partir de diferentes explantes.

Para obtener un método eficiente de germinación *in vitro* y la micropropagación de *Brachychiton populneus* se establecieron cultivos *in vitro* con la siembra de semillas recién colectadas en época de fructificación, sometidas a desinfección superficial previo al cultivo *in vitro* en el medio compuesto por agar 7 g/L, sacarosa 30 g/L y agua destilada. Después de 15 días del cultivo, el mayor porcentaje de germinación fue de un 80% en semillas tratadas con hipoclorito de sodio 30% durante 30 minutos, lo que permitió un óptimo desarrollo y mayor número de plántulas. A los 45 días del cultivo, las plántulas alcanzaron 4 cm de altura, con hojas y raíces bien desarrolladas. Las mismas, fueron utilizadas para los protocolos de micropropagación. La multiplicación de brotes se obtuvo mediante la siembra de cotiledones, hojas, tallos y raíces en MS con diferentes concentraciones de auxina/citocinina (IBA/BAP). La mayor diferenciación de tejidos se observó en el tallo, en donde se obtuvieron callos y 2/3

brotos/explante. Lo mismo se logró con la adición de ácido indolbutírico (IBA) (1 ml/L) en combinación con BAP (1,5 ml/L). Los brotes regenerados fueron cultivados en medio Gamborg con carbón activado mostrando una óptima respuesta al enraizamiento. La adición de carbón activado al medio, evitó la oxidación de los brotes. Las plántulas micropropagadas de *B. populneus*, presentaron en promedio una altura de 4 cm, produciendo 1 raíz/plántula de 1,5 cm de longitud, las que fueron trasplantadas y aclimatadas en condiciones de cámara de crecimiento, para posteriormente ser cultivadas en invernadero. Después de 90 días de cultivo en invernadero, se observó un 30% de supervivencia y elongación de los entrenudos.

## ANEXO 1

Tabla 7

*Medios de cultivo utilizados en los ensayos de cultivo in vitro de Brachichyton populneus*

	Medio de cultivo	Adicionado con	Concentración
A	Murashige & Skoog, 1962	IBA BAP	1 ml/L 1,5 ml/L
B	Murashige & Skoog, 1962	IBA BAP	1,5 ml/L 1 ml/L
C	Gamborg, 1968	Carbón Activado	1 g/L

## BILBIOGRAFIA

**Aguilar, M., Villalobos, V., & Salgado, R.** (2010). Cultivo in vitro de Paulownia tomentosa. Instituto Nacional de Investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. Campo experimental Uruapan,

**Alexander, P., Bahret, M., Chaves, J., Courts, G., & D'Alessio, N.** (2000). Biología. Prentice Hall, Englewood Cliffs. New Jersey. Needham, Massachusetts. USA.

**Alia Y. R.; Mona E.S.K.; Moshera M. E.; Mona M. M.k; Salwa A. M.; Nabel A.M. S.** (2019). Morphological, phytochemical and anti-hyperglycemic evaluation of *Brachychiton populneus*. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.05.001>

**Amiot, M.; Forget, F.; Goupy, P.** (1996). Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *Herba Polonica* 42: 237-247.

**Aponte, F.** (2008). Determinación del protocolo de desinfección de semillas de Bolaina blanca (*Guazuma crinita* Matr.) y Cedro (*Cedrela odorata* L.) para germinación in vitro. Universidad Nacional de Ucayali. Facultad de Ciencias Forestales. Pucalca, Perú.

**Azcón, J., & Talón, M.** (2000). Fundamentos de fisiología vegetal. Ediciones Mc GrawHill, Interamericana. Barcelona, España.

**Baddini A.**, (2009) Conjugated linoleic acid (CLA): effect modulation of body composition and lipid profile, *Nutr Hosp.* 24(4):422-428.

**Barba, A.** (2001). Micropropagación de plantas. Editorial Trillas. México

**Benson, E.** (2000). Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance: an introduction. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 36:141-148

**Biasi, L.A.; Koller, O.C.; Kampt, A.L.** (1994). Micropropagacão do abacate 'Ouro Verde' a partir de segmentos nodais. *Pesq. Agrop. Bras.* 29(7): 1051-1058.

**Bonga, J.** (1980). Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. In: plant cell culture: results and perspectives (F. sala, B. parisi, R. cell y O. ciferrieds). Elsevier/North Holland Biomedical.Press.

**Bonga, J. M., Klimaszewska, K. K., & von Aderkas, P.** (2010). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100(3), 241-254. <http://doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2>

**Bray, E; Bailey-Serres, J; Weretilnyk, E.** (2000). Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. p. 1158-1203.

**Borges García M., Estrada Abeal E., Pérez Rodríguez I. & Meneses Rodríguez S.** (2005). Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, Bayamo 85 100 Granma, Cuba. Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño

**Buist, M., Yates, C. J., & - Ladd, P. G.** (2000). Ecological characteristics of *Brachychiton populneus* (Sterculiaceae) (kurrajong) in relation to the invasion of urban bushland in south-western Australia. *Austral Ecology*, 25(5), 487-496. doi:10.1046/j.1442

**Cabrera, A.** (2003). Efecto de antioxidantes, desinfectantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento, en la propagación in vitro del cultivo de yemas axilares de melocotón (*Prunus pérsica* L.) Batsch var. Salcajá. Universidad de San Carlos. Guatemala.

**Castillo, A** (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las brujas, Canelones (Uruguay): INIA 2004

**Collado, R., Bardón, R., Agramonte, E., Jiménez, F., Pérez, M., Gutiérrez, O., & Ramírez, D.** (2004). Establecimiento in vitro de ápices y segmentos nodales de Caoba (*Swietenia macrophylla* King). *Biotecnología Vegetal* Vol. 4, No. 3. Julio-Septiembre.

**Corredoira, E., Janeiro, L., & San José, M.** (2011). Aplicación de técnicas de cultivo in vitro en la propagación del Aliso (*Alnus*, sp) con vistas a su conservación. Instituto de Biodiversidad y desarrollo rural (IBADER). Universidad de Santiago de Compostela. España.

**Das, M., Pal, A.** (2005) *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: Factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 81, 109–112. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-3017-x>

**Dodds, J.H., & Roberts, L.** (1982). Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, Cambridge England, UK

**Enríquez del Valle, J. R.; Carrillo-Castañeda, G. & Rodríguez de la O, J.** (2005). Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Rev. Fitotec. Mex.* 28:175-178.

**Fay F. M.** (1992). Conservation of Rare and Endangered Plants Using *in vitro*. Methods Author(s): *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. Plant, Vol. 28P, No. 1 pp. 1-4 Published by: Society for *In Vitro* Biology Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/20064802> .

**FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT).** (1991). Guía para la manipulación de semillas forestales. Disponible en <http://www.fao.org/DOCREP/006/AD232S/AD232S00.HTM>

**Ferl, R. & Paul, A. L.** (2000). Genome Organization and Expression. En: Buchanan B., Grissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.

**Forga, Ll., A. Martínez & M. A. Zulet,** (2006). Efectos del CLA sobre tumores. Corporación Alimentaria Peñasanta, S.A., España. NATURLínea con TONALÍN Libro Blanco. Cap. 9 pp. 93-103.

**Galzy R.**(1990).Remarques sur la nutrition carbonée de la vigne cultivée *in vitro*

**Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158

**George, E.** (1996). Plant propagation by culture tissue; part 2. *In practice*. 2 ed. Exegetics Limited. England.

**George E, Hall M, De Clerck G.** (2008) Plant propagation by tissue culture. 3rd Edition. Vol 1. The Background. 495pp.

**Gómez Ayala A.,** (2009). CLA un nuevo ingrediente funcional, *Revista OFFARM*, vol. 28, núm. 2.

**González, Y., Reino, J., & Machado, R.** (2009). Dormancia y tratamientos pregerminativos en las semillas de *Leucaena* spp, cosechadas en suelo ácido. *Pastos y forrajes*. Volumen 32, Nº 4. Matanzas, Cuba.

**Gutierrez-Nicolás F., Á.G. Ravelo, R. Zárate.** (2008) Instituto Universitario de Bio- Orgánica A.G. González, University of La Laguna, Ave. Francisco Sánchez 2, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain Seed germination and *in vitro* propagation of *Maytenus canariensis* through regeneration of adventitious shoots from axillary and apical buds

**Guymer, G.** (1988). A taxonomic revision of *Brachychiton* (Sterculiaceae). *Australian Systematic Botany*, 1(3), 199.

**Hartmann, H. & Kester, D.** (1988). *Propagación de Plantas*. México D.F. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. 760 pp. Kemp, 1975

**Hermosillo, Y., Aguirre, J., Rodríguez, R., Ortega, C., Gómez, A., & Magaña, R.** (2008). Métodos inductivos para maximizar la germinación de semilla germoplasma nativo en vivero para sistemas silvo pastoriles en Nayarit, México. *Revista Zootecnia tropical*. Volumen 26 (3). México.

**Ianicelli, J & Escandon, A** (2015). *Plantas en Probeta*. Capítulo 2. Desde un área estéril a las biofábricas de producción masiva Diseño y organización del laboratorio de cultivo in vitro de plantas

**Jaiswal, N., Verma, Y. & Misra, P.** (2017). Micropropagation and in vitro elicitation of licorice (*Glycyrrhiza* spp.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2017(53): 145–166. DOI 10.1007/s11627-017-9832-7.

**Leukkanen, H., Rautiainen, L., Taulavuori, E., & Hohtola, A.** (2000). Changes of celular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology*. England.

**Lees R.P.; Evans E.H; Nicholas J.R.** (1991). Pphotosyntbesis in *Clematis* the President, during growth in vitro and subsequent in vivo aclimatization.

**Linsmaier EM, Skoog F** - *Physiol. plant*, (1965) - sidalc.net. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.18, p.100-127.

**Lloyd, G. & McCown, B.H.** (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Propagators Soc.* 30: 421-427.

**Lopes, L., Zanette, F., Kulchetscki, L & Guerra, M.** (2005). Micropropagación de *Aspidosperma polyneuron* (*Peroba rosa*) a partir de segmentos nodales de material juvenil. *Revista Árvore*, 29 (4). Brasil.

**López, R.** (2009). *Micropropagación vegetal*. Armenia, Quindío. Arte Imagen.

**López, R.** (2010). *Micropropagación in vitro de cultivos de Gulupa (Passiflora edulis Sims) por meristemas y yemas*. Tesis de grado. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia.

**Marquínez, J.** (1998). *Aporte a la recuperación de especies vegetales en extinción por micropropagación: Raque (Vallea stipularis)*. Bogotá. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. CAR.

**Martínez Carretero, Eduardo.** (2018) *Brachychiton* Schott & Endl. (Malvaceae-Sterculioideae) *Multequina*, núm. 27, Enero-Diciembre, pp. 1-3 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas Argentina

**Merillon, J.M.** (2007). Large-scale Production in Bioreactors. In *Biotechnology*, Second Edition: Secondary metabolites (KG Ramawa and Merillon, JM, eds.) Science Publishers pp. 335-362. ISBN: 1578084288.

**Mokbli, S., Sbihi, H. M., Nehdi, I. A., Romdhani-Younes, M., Tan, C. P., & Al-Resayes, S. I.** (2017). A Comparative Study of *Brachychiton populneus* Seed and Seed-Fiber Oils in Tunisia. *Waste and Biomass Valorization*, 9(4), 635–643.

**Mroginski, E., Rey, H., & Mroginski, L.** (2002). Establecimiento in vitro de Explantes y Regeneración de plantas de *Toona ciliata*.

**Murashige T., Skoog F.,** (1962) . A Revised Medium for Rapid Growth and Bio assays with Tobacco Tissue Cultures. Department of Botany, University of Wisconsin, Madison, 6, Wisconsin.

**Murkute, A., & Shanti-patil, M.** (2003). Exudation and browning in tissue culture of pomegranate. *Agricultural Science Digest. India*

**Nitsch, J.P. & Nitsch, C.** (1969) Haploid Plants from Pollen Grains. *Science*, 163, 85-87.

**Nehra, N.S.; M.R. Becwar, W.H. Rottmann, L. Pearson, K. Chowdhury, S. Chang, H.D. Wilde, R.J. Kodrzycki, C. Zhang C., K.C. Gause, D.W. Parks, & M.A. Hinchee,** (2005). "Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities". *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41: 701-717.

**Ocampo, F., & Núñez, V.** (2007). Propagación in vitro de guayaba (*Psidium guajaba*), mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Ciencia y tecnología agropecuaria. Revista ICA. Bogotá.*

**Orellana, P.** (1998). Introducción a la propagación masiva. In: propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas, Santa Clara. Cuba. Pérez-Ponce J. Ed. 125-133 pp.

**Padilla-Ramírez J. S., González-Gaona E., Valadez-Marín C., Esquivel-Villagrana F., Reyes-Muro L.** (1999) Tecnología para aumentar la productividad del guayabo en la región Calvillo-Cañones. In: Avances de Investigación. Publicación Especial 28. Campo Experimental Pabellón, INIFAP-SAGARPA. Pabellón, México. 38 p.

**Patiño, F.; de la Garza, P.; Villagomez, Y.; Talavera, I. & Camacho, F.** (1983). Guía para la recolección y manejo de semillas de especies forestales. México D.F. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Subsecretaría Forestal. Boletín Divulgativo N° 63. 181 pp.

**Pariza M. W., Y. L. Ha** (1990). Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: a new class of anticarcinogens. *Medicine Oncology Tumor Pharmacotherapy* 7, 169-171.

**Pérez, J., Mesén, F., Hilje, L., & Aguilar, M.** (2001). Método de micropropagación aplicable a genotipos selectos de *Cedrela odorata*. Costa Rica.

**Pérez Ponce JN.** (1998) Propagación y mejora de plantas por biotecnología. Ed. Santa Clara. Instituto de Biotecnología de las plantas. Cuba.

**Perugorría, M.** (2005). Desarrollo de una técnica para la micropropagación de especies leñosas en biorreactores. Facultad de Ciencias. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Uruguay.

**Pharmacognosy Communications.** (2019) 9. 27-33. 10.5530/pc.2019.1.6.

**Pierik R.L.M.** (1988) Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3ra edición. Ediciones MundiPrensa, Madrid. 326 pp.

**Pierik, R.L.M.** (1990). Preparación y composición del medio de cultivo. In: Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. 3a. ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 45-86.

**Pierik, R.L.M.,** (1993). "Micropropagation: Technology and Opportunities". En: *Plant biotechnology commercial prospects and problems* (Prakash, J.; Pierik R.L.M., Eds.), Science Publishers, Inc., Lebanon, pp. 9-22.

**Pierik, R.L.M.,** (1997). *In Vitro Culture of Higher Plants.* Department of Horticulture, Wageningen Agricultural University, The Netherlands

**Ramírez, N., Camacho, A., & González, M.** (2004). Guía para la propagación de especies leñosas nativas de los altos y montañas del norte de Chiapas. Colegio de la Frontera Sur. Editorial Fray Bartolomé. México.

**Razdan, M.K.** (2003) Introduction to plant tissue culture. 2ª ed. Enfield. New Hampshire, U.S.A. 375 pp.

**Roca, W., & Mroginski, A.** (1991). Capitulo # 22 Micropropagación de Plátanos y Bananos. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical. CR.

**Roca, W., & L. Mroginski,** (1993). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones.* Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 969 pp.

**Rodríguez Amaro M.** (2018). Cultivo *in vitro*: Alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales.

**Rodríguez M; Chacón M; Carrillo R.** (2014) Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de *Ugni molinae*. *Versión On-line ISSN 0717-9200. Bosque (Valdivia) vol.35 no.1 Valdivia.* <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002014000100012>

**Roque, A., & Ardisana, E.** (2006). Obtención de posturas de papaya (Carioca papaya L) cv. Maradol roja, por cultivo *in vitro* de segmentos nodales de plantas jóvenes. Universidad Agraria de La Habana, Facultad de Ciencias Agrícolas, Departamento de Biología. Las Tunas. Cuba.

**Rossi, L.** (2003). Cultivo *in vitro*. Fotosíntesis reseña histórica. Microsoft PowerPoint.

**Sharry S., Adema M, Abedini W** (2015). Plantas en Probeta, Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. **ISBN:** 978-950-34-1254-1

**Tang, W., & Newton, R.** (2004). Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). Plant Science. USA.

**Taiz, L.; Zieger, E.** (1998). Plant Physiology. 2da ed., Sinauer Associates, Inc. Massachusetts.

**Taverner T.** (2000) *Brachychiton populneus*. <https://www.anbg.gov.au/gnp/interns-2002/brachychiton-populneus.html>

**Tapia, M.** (2010). Evaluación de métodos de micropropagación vegetativa de arándanos (*Vaccinium corymbosum*) *in vitro*. Universidad de Talca. Chile.

**Uribe M. E, Ulloa J, Delaveau C., Saéz K., Muñoz F., Cartes P.** (2012). Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. ISSN 0717-6643. Gayana Bot. vol.69 no.1 Concepción 2012 <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432012000100010>

**Vaille K., J. Férézou, G. Amsler, A. Quignard-Boulangé, M. Parquet, D. Gripois, V. Dorovska-Taran & J. C. Martin.** (2005). A cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid-rich oil reduces the outcome of atherogenic process in hyperlipidemic hamster. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 289, 652-659.

**Villalobos, A., Leung, D.W., & Thorpe, A.** (1984). Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. Universidad Católica de Occidente. República de El Salvador.

**Villalobos, M., & Thorpe, A.** (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis A. Mroginski. Cali, Colombia. CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical). pp127-141.

**White P. R.** (1963) The cultivation of animal and plant cells, 2nd ed. Ronald Press, New York pp 30-44

**Yaya, L; Rodríguez, O; Usaquén, W; Chaparro, A.** (2005). Inducción de organogénesis indirecta de Abarco (*Cariniana pyriformis* Miers.). Revista Agronomía Colombiana. Volumen 23, N° 1. Bogotá, Enero/Julio.