



Revista Colombiana de Biotecnología

ISSN: 0123-3475

ISSN: 1909-8758

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia

Graciela, Noguera; Graciela, Castillo; Victoria, Vega María
Conservación *ex situ* y propagación *in vitro* de germoplasma de *Neltuma alba* Griseb
Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XXIV, núm. 2, 2022, Julio-Diciembre, pp. 68-76
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia

DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v24n2.97900>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77674944007>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

UAEH redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Conservación *ex situ* y propagación *in vitro* de germoplasma de *Neltuma alba* Griseb

Germoplasm *ex situ* conservation and *in vitro* propagation of *Neltuma alba* Griseb

Noguera Graciela*, Castillo Graciela**, Vega María Victoria***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v24n2.97900

RESUMEN

Neltuma alba Griseb es una especie emblemática de la Ecorregión Chaqueña, por el valor de su madera y frutos. Los resultados de la presente investigación, dan cuenta de que las semillas de algarrobo blanco pueden ser críoconservadas sin afectar el poder y la energía para germinar.

Las semillas fueron conservadas por tres meses a Temperatura ambiente (24° y 30°C, Congelamiento (-18°C) y Nitrógeno líquido (-196°C). Posteriormente, fueron escarificadas mecánicamente y sembradas en tierra negra y aserrín (3:1). Los resultados fueron sometidos a pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis, analizándose poder, energía y vigor germinativo, y no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos.

Para la regeneración *in vitro* en medio de cultivo MS suplementados con 3 mg L⁻¹ IBA y 0,05 mg L⁻¹ CIN, se utilizaron segmentos nodales de 2 cm de longitud obtenidos de plántulas provenientes de semillas. Los porcentajes de enraizamiento obtenidos fueron elevados (87-90%). No existiendo diferencias significativas entre los tratamientos ensayados. El almacenamiento de semillas a 24°-30°C resulta ser el más apropiado para alcanzar altos porcentajes de germinación

Palabras claves: temperatura ambiente, nitrógeno líquido, normales, anormales, microestacas.

ABSTRACT

Neltuma alba Gris is an emblematic specie of Chaco Ecoregion for its wood and fruits value. This research show that algarrobo blanco's seeds can cryopreserve without affecting germination power and energy.

The seeds were kept for three months at 24°-30°C, (-18°C) and (-196°C). Later, they were mechanically scarified and sown in black soil and sawdust (3: 1). The results were subjected to non-parametric Kruskal-Wallis tests, analyzing germination power, energy and vigor. The test did not detect significant differences between treatments.

* Ingeniera Forestal. Laboratorio de Biotecnología de plantas. Facultad de Recursos Naturales. Secretaria General de Ciencia. <https://orcid.org/0000-0002-2845-4907>

** Magister en Biotecnología de plantas. Laboratorio de Biotecnología de plantas. Facultad de Recursos Naturales. Secretaria General de Ciencia. <https://orcid.org/0000-0002-8398-0678>

*** Magister en Biotecnología de plantas. Laboratorio de Biotecnología de plantas. Facultad de Recursos Naturales. Secretaria General de Ciencia. <https://orcid.org/0000-0002-5046-9689>. mavivega@yahoo.es

The nodal segments (2 cm long) obtained from plants of seeds were used for *in vitro* regeneration in MS culture medium supplemented with 3 mg L⁻¹ IBA and 0.05 mg L⁻¹ CIN. The rooting percentages obtained were high (87-90%). There are no significant differences between treatments tested.

The storage of seeds at 24°-30°C is the most appropriate to reach high percentages of germination.

Keys words: room temperature, liquid nitrogen, germination, normal, abnormal micro cuttings.

Recibido: agosto 23 de 2021

Aprobado: noviembre 15 de 2022

INTRODUCCIÓN

El germoplasma vegetal es esencial para la protección de ecosistemas, pero están sujetos a presiones antrópicas, y ambientales debido al cambio climático (FAO, 2014).

Durante la segunda mitad del siglo XX, la necesidad de conservar los bosques de las regiones tropicales se volvió cada vez más evidente. Se realizaron esfuerzos para prevenir la erosión genética, y fueron dirigidos a conservar las diferentes especies de interés mediante el uso de técnicas biotecnológicas que comprendieron la micropropagación, la criopreservación, el almacenamiento *in vitro* y la selección *in vitro* (FAO, 1980).

En el caso del algarrobo, su acelerada deforestación ha llevado a la disminución de individuos que en muchos casos eran catalogados como excelentes árboles semilleros, originándose una importante erosión genética. A esto debe sumarse el hecho de que según Hunziker *et al.* (1986), las variaciones morfológicas y genéticas observadas en el género incrementadas por el sistema reproductivo, son debidas a fenómenos de hibridación e introgresión por presentar un sistema de fecundación cruzada ya que sus flores son protóginas (Burkart, 1976), y a un sistema de autoincompatibilidad, responsable parcialmente de la alta variabilidad (Neff *et al.*, 1977;

Simpson, 1977; Simpson *et al.*, 1977; Palacios y Bravo, 1981; Genise *et al.*, 1990), causas que originan semillas de menor valor genético.

Estas variaciones, que se producen en forma natural provocan la disminución de la calidad del bosque reforestado naturalmente, obteniéndose ejemplares de mala calidad maderable, con fustes cortos, torcidos y con una ramificación de baja altura (Conny, 1996; Felker *et al.*, 2001; López *et al.*, 2001). En consecuencia, para mejorar la productividad forestal es necesario lograr y conservar material genético que contenga la mejor combinación de genes para satisfacer la demanda de los programas de forestación y reforestación en el establecimiento de bosques productivos.

El género *Neltuma* se distribuye desde el sureste de Asia, África tropical y América. En este último continente abarca desde el suroeste de EE.UU. hasta la Patagonia Argentina y Chile. De un total de 31 especies Sudamericanas, 11 son endémicas de Argentina (Burkart, 1976; Hunziker *et al.*, 1986).

La especie *N. alba* es de elevado interés comercial y ecológico por su importancia como fijadora de nitrógeno, restauradora de suelos y calidad de su madera.

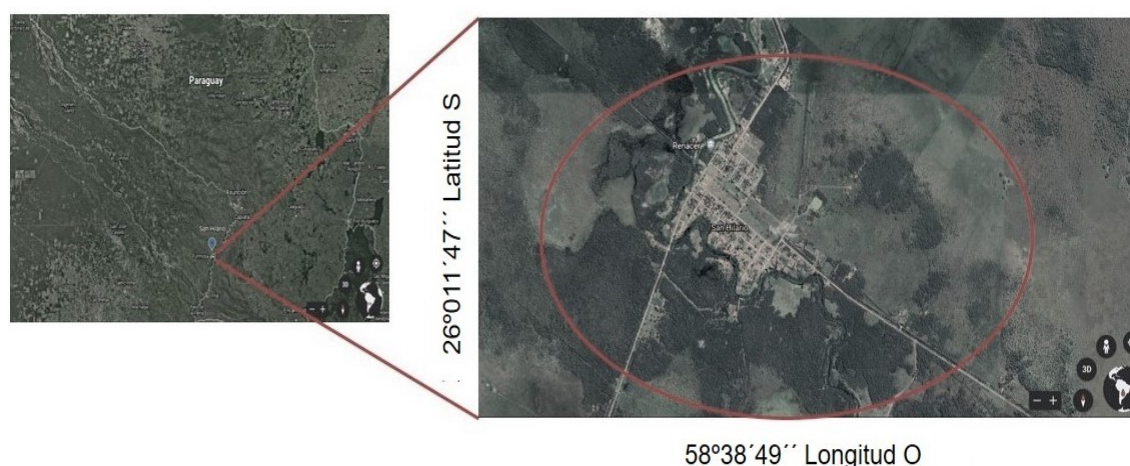


Figura 1. Localización de los ejemplares analizados de *N. alba* Griseb.

El objetivo del presente trabajo fue analizar diferentes métodos para la conservación *ex situ* y la propagación *in vitro* de germoplasma de *N. alba* Griseb.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y selección de los ejemplares: Los ejemplares fueron muestreados en la localidad de San Hilario en el Departamento Formosa de la Provincia de Formosa (26°011'47" Lat S, 58°38'49" Long O), Argentina. Según Morello *et al.* (2012), se localizan en la Ecorregión Chaco Húmedo, Sub-región: Chaco de bosques y cañadas: Complejo Oriental del Bajo Rio Paraguay (Figura 1). Se seleccionaron al azar 10 fenotipos, teniendo en cuenta las características fenotípicas establecidas en FAO (1980): Fuste: Recto, bifurcado en el tercio superior, sin anomalías, altura entre 8 y 10 m, sin evidencia de ataque de agentes patógenos, diámetro a pecho (DAP) ≥ 25 cm. La georreferenciación de los ejemplares se llevó a cabo con un GPS (Garmin Etrex 10) (Figura 1).

Recolección, extracción y secado de semillas: La recolección de frutos frescos maduros del árbol se realizó durante la segunda quincena del mes de diciembre. Las semillas fueron separadas de los frutos en forma manual. Para reducir el contenido de humedad fueron secadas, aplicándose dos métodos: Silica gel (SG) y secado natural durante 24 h (SN) para evitar daños por congelación al ser sometidas a bajas temperaturas.

El procedimiento de secado se realizó con base en las Normas Internacionales para Bancos de Germoplasma (IPGRI/FAO, 1993; ISTA, 2015).

El contenido de humedad de la semilla fue calculado con la fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{PI - PS}{PI}$$

Donde:

PI= Peso Inicial

PS= Peso Seco

Almacenamiento y conservación de germoplasma: Las semillas fueron colocadas en tubos crioviales y sometidas a tres condiciones de temperatura: Nitrógeno Líquido (-196°) (NL) sin crioprotectores; Congelamiento: (-18°) (C) y Temperatura Ambiente (24°-30°) (TA) en oscuridad durante 3 meses.

Ensayos de germinación en vivero: Se partió de un total de 400 semillas, que fueron sometidas a un escarificado

mecánico para ablandar la cubierta seminal utilizando papel de lija#100 (Zeberio y Pérez, 2020).

Posteriormente, se sembraron en sustrato conformado por tierra de monte y aserrín en una relación 3:1 y fueron sometidas a riego por aspersión en invernadero a $27^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Se registró el porcentaje de germinación, energía germinativa, vigor germinativo, número de plántulas normales y anormales.

La energía germinativa se determinó mediante la fórmula:

$$EG = \frac{S_1 + S_2 + \dots + S_f \times F}{S_1 + S_2 + S_3 + \dots + S_f}$$

Donde:

S₁: N° de semillas germinadas el 1er día.

S₂: N° semillas germinadas al 2do día.

S_f: N° semillas germinadas en el día f.

El índice de vigor germinativo se calculó utilizando la fórmula:

$$VG = GDM \times VM$$

Donde:

VG= Índice de Vigor Germinativo

GDM= Germinación Diaria Media.

VM = Valor Máximo de germinación.

La GDM es igual al cociente entre el número total de semillas germinadas y el número total de días que dura el ensayo, y el VM es el cociente máximo que se obtiene dividiendo diariamente la germinación acumulada por el número de días correspondiente (Czabator, 1962).

Evaluación de plántulas provenientes del germoplasma conservado:

Con las especificaciones determinadas para el género *Robinia*, basándose en las definiciones del ISTA (2015), se definieron cinco categorías. 1. Plántulas normales: Sistema radicular y un tallo bien desarrollado, número específico de cotiledones, hojas primarias verdes y extensibles. 2. Plántulas anormales: Raíces defectuosas, con daños, manchas necróticas, grietas. 3. Semillas duras: Las que no absorbieron agua a causa de la impermeabilidad de su tegumento. 4. Semillas frescas no germinadas: Aquellas que permanecieron viables, incluso después de un tratamiento apropiado para interrumpir la latencia y semillas muertas. 5. Semillas que no han produjeron gérmenes al finalizar el periodo de ensayo prescripto.

Regeneración *in vitro* del germoplasma conservado:

Las microestacas obtenidas de plántulas de vivero de 1,5

Tabla 1. Poder, energía y vigor germinativo de semillas de *N. alba* conservadas y deshidratadas según diferentes métodos.

Variable	Condiciones de conservación	Silica gel (SG)	Secado natural (SN)
PG	24°-30°C(TA)	90%	89,50%
	(-18°C) (C)	90%	88,50%
	(-196°) (NL)	85%	88 %
EG	24°-30°C	6,23	6,2
	(-18°C)	6,25	6,2
	(-196°)	6,28	6,2
VG	24°-30°C	25,68	26,8
	(-18°C)	26,2	26,25
	(-196°)	26,6	27,35

PG = Poder Germinativo; EG = Energía Germinativa; VG = Vigor Germinativo

a 2 cm de longitud conteniendo una yema lateral fueron desinfectadas en alcohol 70% durante 3 minutos, hipoclorito de sodio (Na OCl) al 2% durante 30 minutos más dos gotas de Tween, y se enjuagaron 3 veces con agua destilada esterilizada.

Posteriormente, se cultivaron en tubos de 25 x 150 mm que contenían 20 ml de MS suplementado con 3 mg L⁻¹ AIB (ácido indolbutírico) y 0,05 mg L⁻¹ CIN (cinetina) durante 7 días. El pH fue ajustado a 5,8 y los medios de cultivos fueron esterilizados en autoclave a 1 atm de presión y 120°C durante 30 minutos (Castillo de Meier *et al.*, 1999; Sánchez Sotomayor, 2021).

La siembra se llevó a cabo en Cámara de Flujo Laminar. Cuando las yemas elongaron, se seccionaron en segmentos nodales de aproximadamente 2,0 cm de longitud, de acuerdo a la metodología descrita por Castillo de Meier *et al.* (1999); Noguera *et al.* (2013); Rivera Curi (2020), cultivándose posteriormente en medio basal (Murashige y Skoog, 1962) a un 1/3 de concentraciones de sales sin reguladores de crecimiento.

Se emplearon 30 tubos de ensayo (150 x 25 mm) con 10 ml de medio de cultivo y un explante por tubo, los cuales se incubaron en cámara de incubación a 27°C ± 2°C, bajo luz blanca fluorescente continua de 150

mmol.m⁻².s⁻¹ con un fotoperíodo de 16:8 h de luz:oscuridad.

Análisis Estadístico: Ensayos de germinación en vivo:

Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de significación del 5%. Se analizaron las variables independientes: Efecto de los métodos de conservación, y efecto de los métodos de deshidratación.

Las variables dependientes fueron: Poder Germinativo (PG), Energía Germinativa (EG), Vigor Germinativo (VG).

Las variables: número de plantas normales (PN), número de plantas anormales (PA), número de semillas duras (SD), número de semillas frescas (SF) y número de semillas muertas (SM) fueron analizadas a través de un ANOVA paramétrica.

Se aplicó también, un Análisis de Correlación para determinar la relación existente entre las variables estudiadas, para determinar algún tipo de correlación, es decir si ambas se correlacionaban positivamente (aumentando a la par) o negativamente (aumentando una y disminuyendo la otra), dependiendo de los valores numéricos medidos.

Ensayos de regeneración *in vitro*: Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se analizaron las

Tabla 2. Análisis de la varianza (SC tipo III).

F.V.	SC	gL	CM	F	p-valor
Modelo	0,17	1	0,17	0,10	0,7676
Tratamientos	0,17	1	0,17	0,10	0,7676
Error	6,67	4	1,67		
Total	6,83	5			

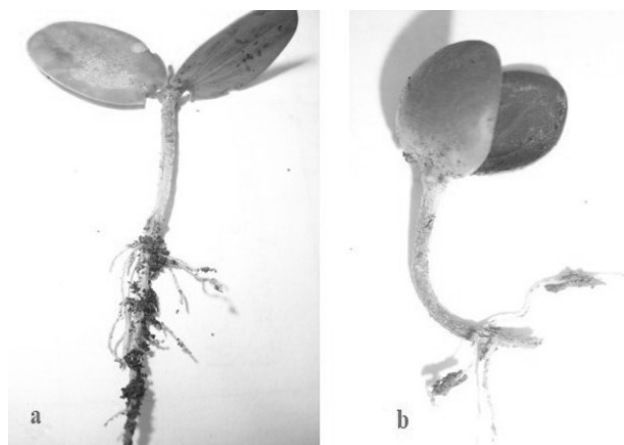


Figura 2. a) Plántula normal, b) Plántula anormal provenientes de semillas de *N. alba* crioconservadas (NL) y secadas en sílica gel.

variables independientes: Efecto de los métodos de conservación, y efecto de los métodos de deshidratación. La variable dependiente considera fue: Porcentaje de microestacas enraizadas.

Los datos obtenidos fueron analizados a través del software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo et al., 2017).

RESULTADOS

Ensayos de parámetros de germinación: Los contenidos de humedad alcanzados por medio de los métodos de desecación empleados oscilaron entre un 4,23% (SG) y 5,79 % (SN).

La germinación inició a partir del 4º día de haberse sembrado las semillas y finalizó al 9º día. El mayor porcentaje de germinación se alcanzó al 6º día de haberse realizado la siembra. Los porcentajes de germinación oscilaron entre un 8,50% en SG-NL y un 90% en SG-TA y SG-C.

La energía germinativa varió de 74,1% en SN-TA y SG-C a 75,45% en SN-NL y SG-NL (Tabla 1). El mayor VG se obtuvo cuando las semillas fueron sometidas al SN y conservadas en NL (27,35). Al finalizar el ensayo (9º día) no se observaron semillas duras en ninguno de los tratamientos, detectándose entre 20 y 23 semillas muertas en todos los tratamientos (Tabla 1).

Los diferentes métodos de deshidratación y conservación aplicados no afectaron de manera significativa a los parámetros de germinación, evidenciándose una buena respuesta a la deshidratación y almacenamiento.

Prueba de Kruskal Wallis: No se registraron diferencias significativas entre las variables evaluadas (PG=0,1875; EG= 0,2721; VG=0,5141) ($p \leq 0,05$).

Evaluación de plántulas provenientes del germoplasma conservado: A los diez días después de la siembra se procedió al recuento final de plántulas normales y anormales (Figura 2a y 2b).

Se observó un elevado número de plántulas normales (174 a 176) en los diferentes tratamientos realizados (174-177), escaso número de plantas anormales (2 a 4), y número de semillas muertas (20 a 23) según el tipo de conservación y temperatura aplicada (Tabla 2).

Prueba de ANOVA paramétrica: No se registraron diferencias significativas entre tratamientos (p (0,7676 > 0,05) (Tabla 2).

En la Tabla 3 se registraron los resultados del Análisis de Correlación entre las variables número de PN, PA, PG, EG y VG.

La matriz de correlaciones indicó que existen correlaciones lineales leves ($|r| > 0,4$), donde la relación predominante es positiva de carácter creciente y a medida que crece una variable, su parámetro correlacionado crece conjuntamente con él, tal como ocurrió con PN y PA (0,53), PN y PG (0,77). PN y EG (0,60), PG y EG (0,58), PG y VG (0,45), EG y VG (0,57).

Paralelamente se halló que existen correlaciones bajas y negativas como, por ejemplo, PN y VG (-0,79) indicando que mayores PN suelen estar asociadas con bajos VG. A la vez, se observó que mayores PA se correlacionaban con bajos PG (-0,59) y bajos VG (-0,77).

Tabla 3. Matriz de correlación de las variables plantas normales (PN), plantas anormales (PA), semillas muertas (SM), poder germinativo (PG), energía germinativa (EG), vigor germinativo (VG).

Variables	PN	PA	PG	EG	VG
PN	1,00				
PA	0,53	1,00			
PG	0,77	-0,59	1,00		
EG	0,60	-0,77	0,58	1,00	
VG	-0,79	-0,20	0,45	0,57	1,00

PN= Plantas Normales, PA= Plantas Anormales, SD= Semillas Duras, SF= Semillas Frescas, SM= Semillas Muertas, PG= Porcentaje de semillas germinadas, EG= Energía Germinativa, VG= Vigor Germinativo. ** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

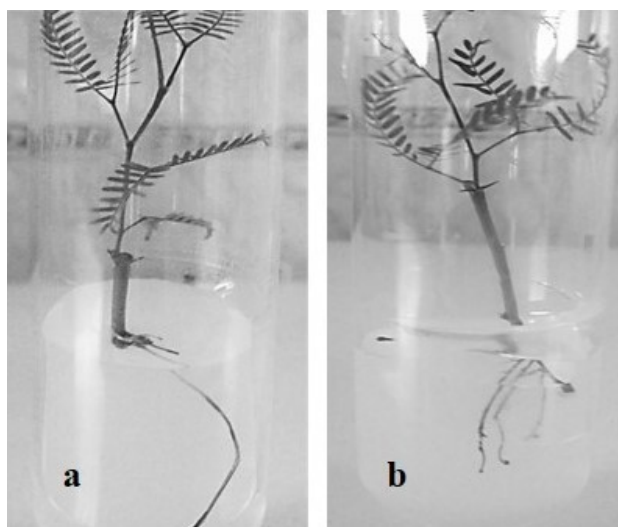


Figura 3. Desarrollo de raíces en microestacas de *N. alba* procedentes de plantas de vivero.

Las correlaciones más significativas, fueron PN con PG (0,77) y PN con EG (0,60).

Regeneración *in vitro* del germoplasma conservado: En la fase de multiplicación se obtuvieron entre 4 a 5 segmentos nodales por tubo dependiendo del crecimiento de cada explante.

Sé observó un elevado porcentaje de microestacas enraizadas (87 y 90%). El análisis estadístico con la Prueba

de Kruskal Wallis no registró diferencias significativas ($p \leq 0,8015$) entre tratamientos (Tabla 4 y Figura 3).

DISCUSIÓN

El almacenamiento del material a conservar en forma de semillas constituye una de las estrategias más importante para preservar y propagar, especies que se hallan amenazadas y/o que su hábitat natural esté ampliamente transformado (Cárdenas *et al.*, 2015).

El entorno, y la temperatura de almacenamiento establece la longevidad máxima para una muestra de semillas. Se recomienda la temperatura de -18°C para el almacenamiento a largo plazo, para ello se deberá mantener la temperatura de almacenamiento dentro de un rango de $\pm 3^{\circ}\text{C}$ respecto de la temperatura fijada (FAO, 2014).

FAO (2014), establece que las condiciones de secado deben determinarse utilizando las isotermas de adsorción de agua que muestran la relación entre la cantidad de agua en las semillas, y su humedad relativa.

Para el almacenamiento a corto plazo, las semillas deben secarse a la temperatura a la que se hayan almacenado (FAO, 2014).

Tabla 4. Segmentos nodales de *N. alba* enraizados *in vitro* a los cuatro meses de conservación.

Deshidratación	Temperaturas de conservación		
	24°- 30°C	- 18°C	-196°C
SG	87 %	90%	90%
SN	87 %	87%	90%

SG = Silica Gel; SN = Secado Natural.

Las condiciones óptimas para el almacenamiento de semilla según el IPGRI (1993) son temperaturas bajas (-18°C) y un rango de humedad de las semillas de 3 a 7%, valores que concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo (4,23 y 5,78%). De igual modo, investigaciones realizadas por Joseau *et al.*, (2021) informan que en el Banco Nacional de Germoplasma de Neltuma, las semillas de *N. alba*, *N. nigra*, *N. flexuosa*, *N. chilensis*, *N. caldenia* Burkart, *N. ferox* Grisebach, *N. hassleri* Harms, *N. kuntzei* Harms, y *N. affinis* Grisebach Sprengel, son almacenadas en envases plásticos herméticos, con una bolsa que contiene sílice gel para mantener la humedad entre 6-9 % en condiciones de congelamiento a (-18°C).

Estos resultados de tolerancia a la desecación confirmaron que las semillas de *N. alba* presentan un comportamiento ortodoxo, confirniéndole la capacidad de tolerar la deshidratación hasta 5% del contenido de humedad.

Los Bancos de Germoplasma tienen por objetivo almacenar semillas para mantenerlas con vida el tiempo suficiente para su distribución a los usuarios. Pero, el aumento de la longevidad mediante el secado tiene un límite, debido a que la máxima longevidad para la temperatura de almacenamiento se alcanza a un nivel crítico de humedad, a partir del cual el secado no incrementa la longevidad de las semillas (FAO, 2014).

En el presente estudio, como en *N. ruscifolia* (79% Abdala *et al.*, 2020), y *N. laevigata* (60% Muñoz Gutiérrez, 2022) se han obtenido elevados porcentajes de germinación de semillas con plántulas normales.

Cuando las semillas fueron almacenadas a (-18°C) se registraron los mismos porcentajes de germinación (95%) que en el tratamiento anterior. Valores diferentes fueron informados por Spoljaric y Ojeda (2009), quienes llevaron a cabo análisis de semillas de *N. alba* conservadas en cámara de frío (-18 °C) por más de diez años, obteniendo una disminución de la Energía y Capacidad Germinativa con el tiempo, sumado al deterioro de las mismas debido al ataque de microorganismos. Sin embargo, Verzino *et al.* (2019), afirmaron que las semillas de *N. chilensis* pueden permanecer viables hasta por 25 años en condiciones óptimas.

Otras leguminosas como *Albizia lebbbeck* (L.) Benth., y *Bauhinia purpurea* L. pierden drásticamente su viabilidad entre los 2 y 9 meses después de almacenadas (Molina y Navarro, 2021).

Además de conservar el material vegetal en Bancos de Germoplasmas, se debe realizar la propagación clonal *in vitro* del mismo, debido a que dicha técnica reviste cada día mayor importancia para propagar especies de interés económico en forma rápida y a gran escala.

En especies del género *Neltuma* la organogénesis directa se puede iniciar con secciones nodales provenientes de semillas germinadas *in vitro* y de plantas silvestres de 5 y 20 años de edad, lográndose el enraizamiento en medio de cultivo MS suplementado con AIB 0,5 mg L⁻¹ o ANA (Ácido 1 naftalenacético) 0,1 mg L⁻¹ (Castillo de Meier y Bovo, 2000).

Por otro lado, Rivera Curi (2018), sostiene que la propagación de *N. pallida* (Willd.) Kunth, se puede lograr en MS sin reguladores de crecimiento, debido a la presencia de auxinas en las yemas apicales, y para evitar que las altas concentraciones de iones amonio, nitrato, cloruro molibdato generan toxicidad en las plántulas por ser una especie recalcitrante.

Los resultados alcanzados en el enraizamiento de microestacas, empleando como material inicial plántulas de semillas provenientes del germoplasma almacenado estuvieron en el orden del 87 y 100%.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras especies: *N. hassleri* (73% Castillo de Meier, 2004; 90-94% Castillo de Meier y Vega, 2008), *N. cineraria* (87% Venkatachalam *et al.*, 2017); *N. pallida* (67% Rivera Curi *et al.*, 2020); *N. limensis* (94,8% Sánchez Sotomayor *et al.*, 2021), quienes lograron obtener elongación y enraizamiento de vástagos provenientes de material juvenil.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo determinaron que el almacenamiento de semillas a 24°-30°C resulta ser el más apropiado para alcanzar altos porcentajes de germinación. Estos resultados resultan de importancia para viveristas, confirmando la posibilidad de almacenamiento de semillas de *N. alba* en medios de baja tecnología.

El alto porcentaje de germinación de semillas almacenados a -196°C indica tolerancia de las mismas a temperaturas bajo cero.

La regeneración de plántulas provenientes de semillas conservadas a mediano (-18 °C), y largo plazo (-196 °C), a través del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es factible partiendo de segmentos nodales indicando la alta calidad fisiológica de las semillas y vigorosidad de las plantas donantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdala, N., Bravo, S., Acosta, M. (2020). Germinación y efectos de almacenamiento de frutos de *N. rusci-foia* (Fabaceae). *BOSQUE*, 41 (2), 103-111. DOI: 10.4067/S0717-92002020000200103.
- Burkart A. (1976). A monograph of the Genus *Neltuma*. *Journal Arn. Arb.* 57, 3-4.
- Cárdenas, D., Castaño, N., Sua, S., y Quintero, L. (2015). *Planes de manejo para la Conservación de Abarco, Caoba, Cedro, Palorosa y Canelo de los Andaquíes* (<https://www.sinchi.org.co/planes-de-manejo-para-la-conservacion-de-abarco-caoba-cedro-palorosa-y-canelo-de-los-andaquies>).
- Castillo de Meier, G., y Bovo, O. (1999). Obtención de plantas a partir del cultivo *in vitro* de ápices y microestacas de *Neltuma alba*, *N. nigra* y *N. hassleri*. *OYTON Revista Internacional de Botánica Experimental*, 65, 179-184.
- Castillo de Meier, G. & Bovo, O. (2000). Plant regeneration from single-nodal-stem explants of legume tree *Neltuma alba* Griseb. *Biocell*, 24, 89-95.
- Castillo de Meier, G.; Vega, M. V. (2004). *Cultivo de microesquejes de algarrobo paraguayo (Neltuma hassleri)*. Facultad de Recursos Naturales. Universidad Nacional de Formosa. VII Jornadas de Ciencia y Técnica. Organizadas por la Secretaría General de Ciencia y Técnica. Universidad Nacional de Formosa.
- Castillo de Meier, G.; Vega, M.V. (2008). *Desarrollo de vástagos in vitro a partir de material de vivero y adulto de algarrobo paraguayo (Neltuma hassleri)*. Facultad de Recursos Naturales. Universidad Nacional de Formosa. XI Jornadas de Ciencia y Técnica. Organizadas por la Secretaría General de Ciencia y Técnica. Universidad Nacional de Formosa.
- Conny, M. (1996). Genetic variability in *Neltuma flexuosa* D. C., a native tree of the Monte phyto-geographic province, Argentina. *Forest Ecology and Management*, 87, 41-49.
- Czabator, F. (1962). *Germination value: And index combining speed and completeness of pine seed germination*.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., González, L., Tablada, M., y Robledo, C. (2017). *InfoStat Software Estadístico*.
- FAO. (1980). *Mejora genética de árboles forestales. Informe sobre el curso de capacitación FAO / Danida sobre mejora genética de árboles forestales*. Mérida, Venezuela. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
- FAO. (2014). *Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*. Edición revisada. Roma. E-ISBN 978-92-5-308262-9.
- Felker, P., López, C., Souir, C., Ochoa, J., Abdala, R., & Ewens, M. (2001). Genetic evaluation of *Neltuma alba* (algarrobo) in Argentina for cloning elite trees. *Agroforestry Systems* 53, 65-76. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Genise, J., Palacios, R., Hoc, P., Carrizo, R., y Moffat, L. (1990). Observaciones sobre la biología floral de *Neltuma* (Leguminosae, Mimosoideae). II. Fases florales y visitantes en el distrito chaqueño serrano. *Darwiniana*, 30 (1-4), 71-85.
- Hunziker, J., Saidman, B., Naranjo, C., Palacios, R., Poggio, L. & Burghardt, A. (1986). Hybridization and genetic variation of Argentina species of *Neltuma*. *Forest. Ecol. Manage*, 16, 301-315.
- IPGRI. (1993). *A report of the forest genetic resources research and information workshop*. IPGRI, Roma, Italia.
- ISTA. (2015). *International Rules for seed testing*. ISSN 2310-3655.
- Joseau, J., Frassoni, J., Verzino, G., Rodríguez Reartes, S., Verga, A., y López Lauenstein, D. (2021). Avances en la conservación y obtención de material selecto del Banco Nacional de Germoplasma de *Neltuma*, Córdoba, Argentina. *Revista FAVE - Ciencias*

- Agrarias*, 20 (1). DOI 10.14409/fa.v20i1.10269. e-ISSN 2346-9129.
- López, C., Maldonado, A., y Salim, V. (2001). Variación genética de progenie de *Neltuma alba*. *Invest. Agr. Sist. Recur. For.*, 10 (1).
- Molina, R., y Navarro, B. (2021) Longevidad de las semillas de árboles leguminosos durante el almacenamiento en condiciones ambientales en Cuba. *Avances de Investigación Agropecuaria*, 25, 21-29.
- Morello, J., Matteuci, S., y Rodríguez, A. (2012). Ecoregiones y complejos ecosistémicos argentinos. *Orientación Gráfica Editora*, 752. 1ra ed. Buenos Aires. ISBN 978-987-1922-00-0.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Muñoz Gutiérrez, L., Ríos Saucedo, J., García García, D., y Hernández Pérez, C. (2022). Efecto del almacenamiento sobre la calidad fisiológica de semillas de *Neltuma laevigata* (H. & B.) Johnst. *Ecosist. Recur. Agropec.* 9 (2), e3165. <https://doi.org/10.19136/era.a9n2.3165>.
- Neff, J., Simpson, B., & Moldenke, A. (1977). *Flowers-flower visitor system*. In: GH Orians and OT Solbrig (Eds). *Convergent evolution in warm deserts. US/IBP synthesis Series Ch 6*, 204-223. Dowden Hutchinson and Ross, Stroudsburg.
- Noguera, G., Noguera, M., Castillo de Meier, G., Vega, M.V. (2013). *Conservación ex situ y propagación de germoplasma de Neltuma alba*. Facultad de Recursos Naturales. Universidad Nacional de Formosa. 4to. Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano. Organizado por Asociación Forestal Argentina (AFOA), Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias (INTA), Consejo Profesional de Ingeniería Agronómica, UNaF, UNSE. Tema: Mejorando Productividad: Innovación Productiva y Tecnológica de los Bosques. Subtema: Genética y Mejoramiento, 108.
- Palacios, R. y Bravo, L. (1981). Hibridación natural en *Neltuma* (Leguminosae) en la región chaqueña argentina. Evidencias morfológicas y cromatográficas. *Darwiniana*, 23 (1), 3-35.
- Rivera, J. (2018). *Micropropagación de Neltuma pallida* (Humb. & Bonpl. Ex Wild.). Kunth a partir de yemas apicales. Tesis pregrado. Universidad Agraria La Molina, p 131.
- Rivera Curi, J., Cabrera Pintado, R., y Bulnes Soriano, F. (2020). Micropropagación de *Neltuma pallida* (Humb. & Bonpl. Ex Willd.) Kunth a partir de yemas apicales. *Rev. Colombiana de Biotecnología*, 22, (1), 18-26 ISSN 0123-3475. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.70949>.
- Simpson, B. (1977). Breeding systems of dominant perennial plant of two disjunct warm desert ecosystems. *Oecologia (Berl)*, 27, 203-226.
- Simpson, B., Neff, J., & Moldenke, A. (1977). *Neltuma* flowers as a resource En: Simpson B.B. (ed). *Mesquite. Its biology in two desert ecosystems. US/IBP. Series 4 Ch.6*.
- Soto Mayor, H., Orellana García, A., Roel Barahona, I., Bravo, M., Peña Rojas, G., Ayme, A., Estrada Jiménez, R. (2021). Conservación *ex situ* mediante el establecimiento de cultivo in vitro de semillas de *Neltuma limensis* "Huarango" de Ica, Perú. *Manglar*, 18 (4), 427-433,
- Spoljaric, M., y Ojeda, A. (2009). *Evaluación de parámetros de calidad en semillas de Neltuma Griseb Leguminosa almacenadas en cámara de frío del Banco de Germoplasma del INTA Sáenz Peña*. INTA Centro Regional Chaco Formosa Estación Experimental Agropecuaria Sáenz Peña. <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-calidadgermoplasma.pdf>
- Venkatachalama, P., Jinua, U., Gomathia, M., Mahendrana, D., Ahmadc, N., Geethad, N., & Vikram Sahi, S. (2017). Role of silver nitrate in plant regeneration from cotyledonary nodal segment explants of *Neltuma cineraria* (L.) Druce.: A recalcitrant medicinal leguminous tree. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 286-291.
- Verzino, G, Frassoni, J., Joseau, M., Clausen, G., y Navarro, C. (2019) Conservación *ex situ*, *cica situ* e *in situ* realizada por el Banco Nacional de Germoplasma de *Neltuma*, Córdoba, Argentina. *Revista Nexa*, 7, 42- 52.
- Zaberio, J., y Pérez, C. (2020). Tratamientos pregerminativos en especies leñosas del monte patagónico para su uso en restauración ecológica. *Foresta Veracruzana*, 22 (1). ISSN 1405-7247. Imendizabal uv.mx. Recursos Genéticos Forestales, México.