

## PARTE II

### Avances en biología reproductiva de sauces realizados en tramo inferior de los ríos Neuquén y Limay

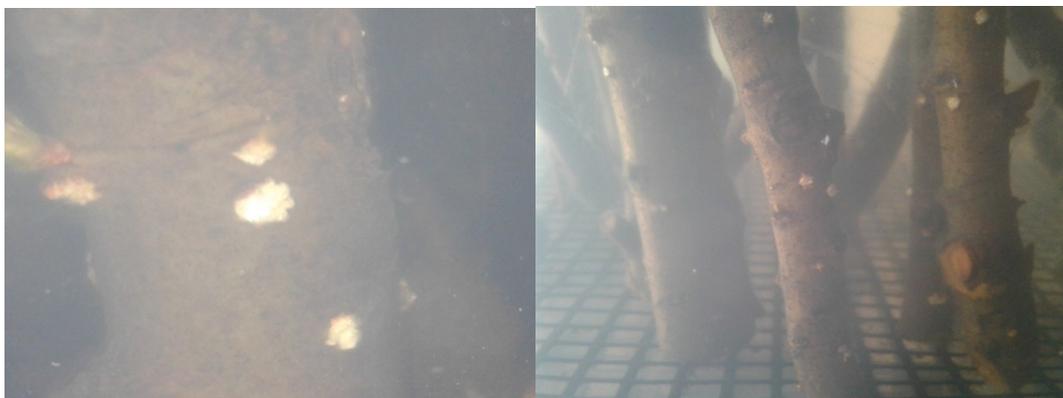
Lic. Hernán Ariel López (UFLO)

Se detallan los avances realizados y tareas emprendidas en este rubro hasta el presente en instalaciones del laboratorio del TIPP – UFLO y los sitios de restauración en Isla Jordán, Jardín Botánico de Plottier y Rincón Limay:

- Se diseñó y construyó un clonador que ha permitido poder obtener con éxito estacas enraizadas y brotadas en cantidad y en menor tiempo para poder satisfacer las demandas de plantas requeridas para los sitios de restauración locales.
- Se implantaron 32 nuevas plantas de sauce criollos en el estaquero localizado en el vivero de la Isla Jordán a partir de estacas producidas por esquejes directo sobre sustrato de procedencia del río Limay y del clonador e implantadas en el sitio posteriormente. Al cierre de este informe se encuentran en condiciones óptimas con un muy buen desarrollo, estando ya adaptadas a las condiciones del sustrato.
- Localmente se han obtenidos muestras para propagar o clonar de 20 árboles de ambos sexos. En las tareas de relevamiento de poblaciones o árboles de Sauces criollos se han hallado varias poblaciones y alrededor de 200 individuos registrados en cuanto a posición, DAP, altura y sexo, quedando individuos de cada población por relevar.
- Se sumó recientemente una población en Isla Santa Mónica (río Limay) de los que se están barrenando sauces nativo y exóticos cuyos nichos ecológicos y hábitats están solapados sobre dos cauces a distintos niveles con respecto al cauce principal.
- Hasta el momento localmente se ha podido producir alrededor de 600 plantas entre clonador y plantación directa, algunas ya implantas, otras en proceso de pasaje al sustrato a medida que se obtiene el elemento limitante que es el sustrato. Se han probado distintos sustratos llegando a seleccionar los óptimos para el establecimiento de las plantas. Las tareas de clonación se han suspendido hasta poder completar el pasaje al sustrato de todas las plantas producidas para perfeccionar la técnica y el protocolo de producción.
- Se han realizado estudios adicionales sobre taxonomía y biología reproductiva cuyos datos son de utilidad para las tareas de reproducción de la especie y en la restauración natural de la misma, se detallan a continuación:
- Se realizó un estudio taxonómico comparativo para reconocer y delimitar las distintas especies o entidades presente en la zona. De este análisis deriva el hallazgo de una posible forma taxonómica de sauces nueva.
- Se determinó un híbrido entre *Salix babylonica* y *Salix x fragilis* f. *vitellina* denominado “Golden Weeping Willow” *Salix x pendulina* f. *salomonii* I. V. Balyaeva
- Se encontraron individuos de una especie aparentemente no citada para la región previamante, la identificación fue consultadas con especialista de Kew Gardens (Reino Unido) y esta a la espera de confirmación.

- Se adecuó la nomenclatura taxonómica de las especies de *Salix* presentes de acuerdo a los más recientes avances en esta materia resultando en el avance taxonómico del género más actualizado realizado en Argentina.
- Se completó el análisis del periodo de fenología floral de todas las especies presentes en la zona, que demostró ser muy informativo para diferenciar a las especies y patrones de solapamiento con *S. humboldtiana*.
- Se determinó que *S. humboldtiana* al igual que *Salix x fragilis f fragilis* no presentan apomixis.
- Se estudió la germinación de *Salix x fragilis f vitellina*, *Salix x fragilis f. fragilis* dado que son candidatos de posible hibridación con *Salix humboldtiana*, debido al solapamiento entre fenología de floración y hábitat.
- Se avanzó en el protocolo de germinación de *Salix humboldtiana* como método futuro de incremento de variabilidad genética de la especie para poder ser implementado en las técnicas de restauración a largo plazo. Se pudieron obtener varias plántulas y se determinó el método y técnica que permite un mayor éxito en esta tarea.
- Se registraron semillas abortadas posiblemente producida por una barrera postcigótica de fecundación incompatible.
- Se detectó una plaga sobre sauces nativos y se la determinó observando su daño y posibilidades de recuperación de la población atacada. La plaga es *Nematus dodesantis* (Hymenoptera). Esta especialmente afectó a una población de sauces criollos en Arroyito, que fue atacando a otras poblaciones aguas abajo hasta fines de diciembre.
- Se completó una base bibliográfica con los trabajos científicos relevantes relacionados a distintos aspectos de *Salix humboldtiana* a así como para otras especies del mismo género.

El dispositivo empleado consiste en un recipiente en donde se encuentra un enrejado para poder sostener las estacas de sauces colectadas de poblaciones de sauces criollos. Se le adiciona un medio líquido que se completa con un elemento que produce un calentamiento del medio líquido de manera constante y un dispositivo de aireación. El clonador se completa con una estructura para poder mantener la humedad ambiente.





Figuras de las estacas sumergidas en agua en el clonador. Se observa la aparición de los callos de las raíces adventicias junto con numerosas burbujas indicando una activa actividad biológica de división celular. Tofos inferiores emergencia y elongación de raíces adventicias. Se observan numerosas (1-4) raíces por callo.



Raíces adventicias de primer orden desarrolladas en el clonador



Foto de estacas enraizadas y brotadas en condiciones para transferencia a sustrato



Foto de desarrollo de raíces adventicias de primer y segundo orden producidas por el clonador

En un periodo de 7-15 días las plantas generan una gran densidad de raíces que poseen ramificaciones de primer orden y segundo orden. Apto para poder ser transferidos a un sustrato acorde para un futuro crecimiento y desarrollo de las plantas.



Fotografías de raíces adventicias de primer y segundo orden reflejando la coloración rosada de los meristemas radiculares, carácter típico y novedoso de *Salix humboldtiana*.

Mediante las observaciones del desarrollo de las raíces adventicias en el clonador de *Salix humboldtiana* se noto que la coloración de los meristemas radiculares tenían una coloración rosada, esta característica no se encontraba registrada con anterioridad siendo una novedad. Se realizo a continuación enraizamiento estacas de distintas especies de sauces introducidos y se evidencio que esta característica es exclusiva de *Salix humboldtiana* siendo un carácter de relevancia a la hora de ayudar a distinguir la naturaleza específica de ejemplare en clonación.



Comparación entre estaca sometida al clonador a la izquierda y estaca bajo tratamiento de inmersión en agua a temperatura ambiente.

Mediante una experiencia de crecimiento comparativo de raíces adventicias sometidas al clonador y otras como control, sin esta experiencia y a temperatura ambiente. Se observó que las estacas sometidas al clonador manifestaban múltiples callos, mayor desarrollo de raíces adventicias y de mayor grosor.

#### **Mecanismo de acción del dispositivo de clonación**

El recipiente tiene una capacidad de 200 estacas de un diámetro de 1 a 2 cm y una longitud de 20 cm de largo.

Una vez colocadas las estacas señalizadas mediante labels, se activa el calentador y el aireador. La temperatura se mantiene constante a 20 ° C. y la humedad se va acumulando en la estructura superior. Periódicamente se va acumulando agua para mantener el nivel del líquido en la parte inferior de manera constante.

Una vez que la estaca brota las hojas realizan evapotranspiración y la estaca absorbe agua de la base. Al estar la parte superior con una atmósfera saturada de humedad se promueve la producción de las raíces adventicias las cuales se producen de manera masiva y rápidamente a partir de callos epidérmicos que se visualizan de color blanco. Las raíces adventicias en los sauces se producen a partir de primordios que surgen de la médula del tallo. El tiempo de aparición de las raíces es el tiempo de reproducción celular del meristema que produce la raíz adventicia.

Según las observaciones realizadas los callos aparecen a los 2 días de activados el mecanismo. A los 3-4 días emergen las raíces adventicias que luego de surgir se alargan de manera considerable.

A los 7-8 días las raíces se han desarrollado de manera óptima y están en condiciones de poder ser trasplantadas a un sustrato adecuado.

Con respecto de la parte aérea a los 3 días se produce la brotación de las yemas axilares y se desarrollan las hojas y posterior elongación de las ramas. Durante el período donde las estacas se encuentran en el clonador es conveniente realizar una aireación periódica de la parte aérea una vez al día a partir del día 5° de permanencia en el clonador para evitar la aparición de raíces adventicias en la parte aérea.

Se han construido dos dispositivos de igual capacidad de manera que la capacidad potencial es de 400 estacas las cuales tiene una potencialidad de producción de 800 estacas mensuales.

Una de las limitantes del métodos es conseguir el sustrato para poder realizar el trasplante de las plantas enraizadas motivo que determino que se pausara las actividades de clonación hasta tanto poder adecuar las plantas enraizadas obtenidas.

Desde la puesta de funcionamiento del mecanismo se han producido 600 estacas enraizadas. Las plantas enraizadas se han pasado a macetas de ellas se han utilizado para realizar las plantaciones en los sitios de restauración de Rincón Limay y Cantera de Isla Jordán a la par que el Estaquero ubicado en el vivero de la isla Jordán.

Es de destacar que las plantas que se han colocada en el estaquero de la isla Jordan fueron enviadas desde el INTA de Bariloche en condición de estacas, estas fueron colocadas en el clonador y una vez enraizadas y brotadas fueron trasplantadas directamente en el suelo del sitio del estaquero.



Foto de las estacas enviadas desde INTA Bariloche y enraizadas y brotadas en el dispositivo clonador.

Parte de las plantas en macetas se han perdido debido a diversos factores entre los cuales puede mencionarse efecto reducido de micorrizas, eventual condiciones de sequedad y pérdidas por estrés hídrico.

Las plantas enraizadas en macetas remanentes se están cultivando para ser utilizadas en reemplazo de plantas plantadas anteriormente en los sitios de restauración, destinadas a plantaciones en el jardín botánico de Plottier y para plantarse en nuevas actividades de restauración ecológica de la especie en los sitios de restauración.

El mecanismo diseñado mostró ser altamente efectivo en comparación con el método utilizado de manera estándar denominado propagación mediante cama caliente. Este método consiste en someter las estacas a una solución con hormonas de enraizamiento sintéticas y posteriormente colocarlas en un sustrato relacionado con una fuente de calor que mantiene una temperatura constante en el sustrato para promover el desarrollo radicular y enraizamiento adventicios de las estacas. La aparición de raíces y brotación con este método es de aproximadamente 30 días. En cambio el método diseñado por nuestro equipo es independiente del uso de hormonas de enraizamiento teniendo resultados en solo 7 días momento que las plantas son pasadas a un sustrato solido.

Actualmente se está en proceso de reanudar las actividades de clonación atendiendo a las experiencia ganadas en los primeros intentos, esperando generar 500 plantas enraizadas mensuales con el fin de generar un stock de ejemplares para ser utilizados en tareas de restauración.

Los resultado obtenidos en esta experiencia de prueba fueron muy positivos pudiéndose generar la totalidad de las plantas utilizadas en el proyecto de Redes de Restauración de *Salix humboldtiana* en los sitios de Rincón Limay (Plottier) e Isla Jordán (Cipolleti) tanto en el estaquero como el sitio de restauración.

### **Recopilación bibliográfica**

Se realizó una recopilación bibliográfica de más de 150 trabajos en pdf relacionados con los siguientes aspectos del género *Salix* en general y de *Salix humboldtiana* en particular:

Biología Reproductiva: 24

Ecología: 16

Filogenia: 22

Genética: 43

Propagación in vitro: 21

Taxonomía: 25

## Fenología floral comparada



*Salix x fragilis* f. *vitellina* masculino (izquierda) y femenino (derecha), cuyo periodo de floración coincide, en parte, con el periodo de floración de *Salix humboldtiana*.



Solapamiento del período de floración entre *Salix humboldtiana* femenino en primer plano y *Salix x fragilis* f. *vitellina* masculino detrás.



*Salix x fragilis* f. *fragilis* femenino, receptivo, y en floración coincidente con *Salix humboldtiana*.



Pseudodioecia en un individuo observado, presunto híbrido entre *Salix alba* y *Salix x fragilis* f. *vitellina*.  
Mostrando amentos con flores masculinas apicales y femeninas basales en el mis amento.



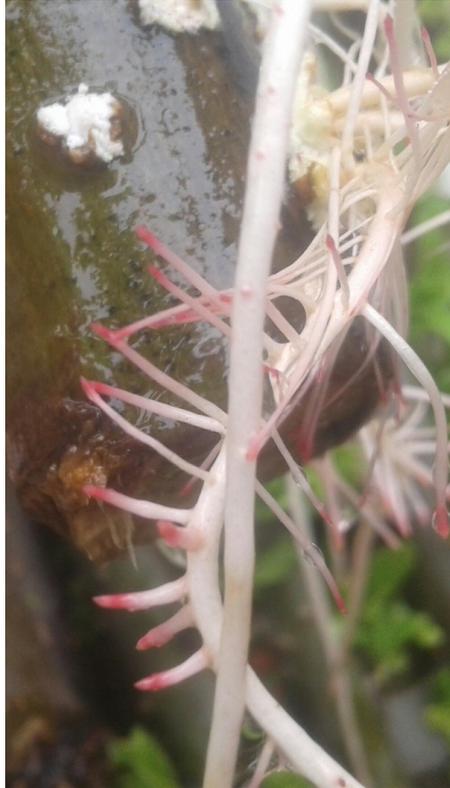
Liberación de óvulos con vilanos (esteriles) en *Salix matsudana* femenino.



Apertura de cápsulas y liberación de semillas en *Salix x fragilis* f. *fragilis* femenino



Colección de cápsulas para extraer semillas de *Salix x fragilis* f. *vitellina*



Meristemas radicales rosados en raíces de 2 ° orden de *Salix humboldtiana*, característica específica hallada.



Plantación de plantas que constituirá el estaquero en el vivero municipal de la Isla Jordán



Ensayo de germinación, plántula recién emergida de *Salix x fragilis* f. *vitellina*.



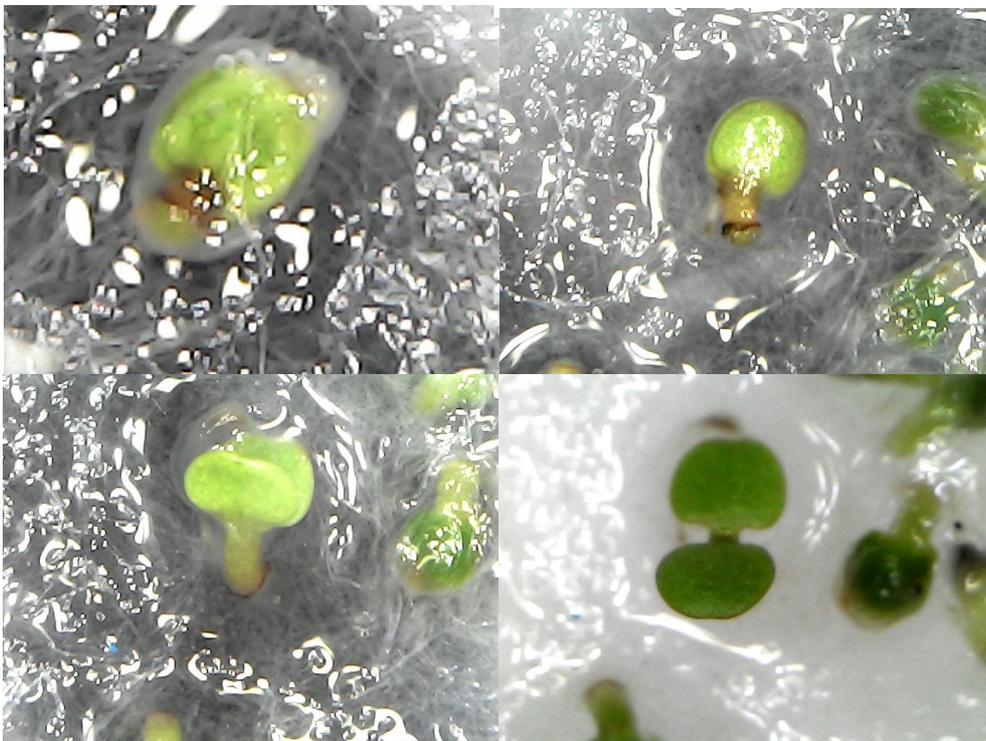
Plantas de *Salix x fragilis* f. *fragilis* posibles híbridos con *Salix x fragilis* f. *vitellina* o *S. humboldtiana*, a determinar.



Obtención de Semillas de *Salix humboldtiana*



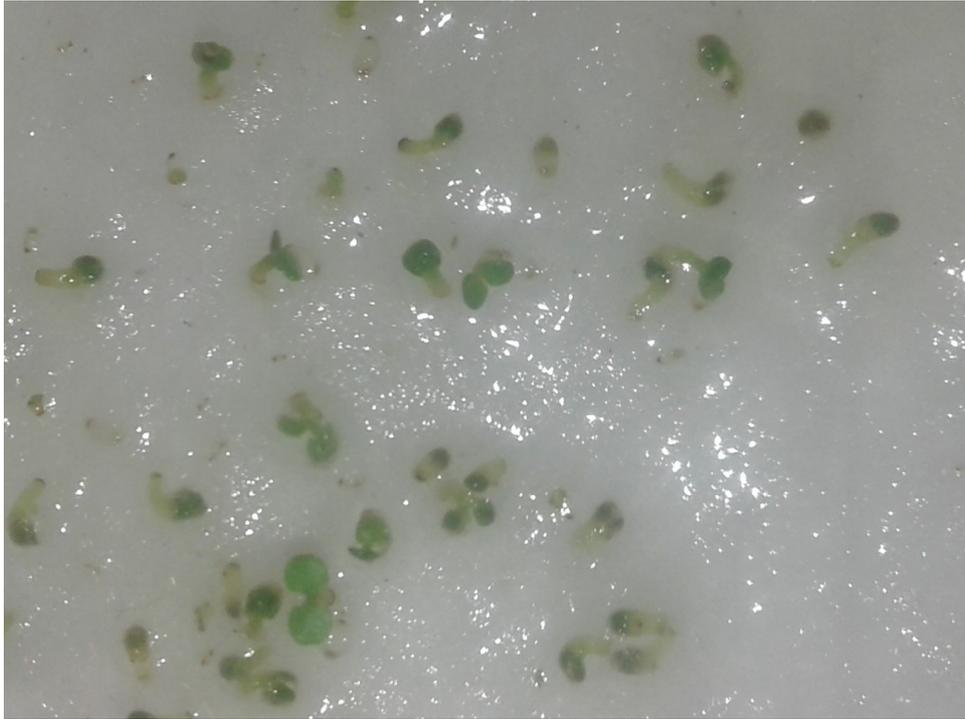
Ensayos de germinación de semillas de *Salix humboldtiana*



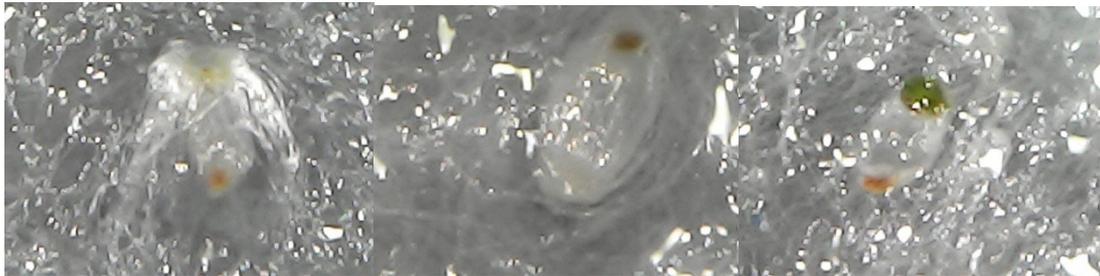
Secuencia de germinación de *Salix humboldtiana*



Plántulas de *Salix humboldtiana* sembradas en sustrato directamente con crecimiento de cianofitas.



Se elaboró un protocolo de germinación con para germinar semillas de *Salix humboldtiana* con éxito.



Semillas abortadas, presumiblemente por un mecanismo postcigóticos causado por fecundación incompatible por distinto nivel de ploidía y genotipo no compatible con la Sección Filogenética (se sospecha fecundación con *Salix x fragilis* f. *vitellina*).



Predación por *Nematus dodesantis* (Hymenoptera) sobre las laminas foliares de *Salix humboldtiana* dejando solo la nervadura central.