

Artículo Original / Original Article

## Introducción a cultivo de vitroplantas de “Peperina de las Lomas” (*Hedeoma multiflora* Benth.) como contribución para su conservación *ex situ*

[Field establishment of vitroplants of “Peperina de las Lomas” (*Hedeoma multiflora* Benth.)  
as a contribution to its *ex situ* conservation]

Patricia Angélica Peralta<sup>1,2</sup>, Julián Guariniello<sup>1</sup> y Hernán Gerónimo Bach<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Recursos Biológicos. Centro de Investigaciones en Recursos Naturales (CIRN), Centro Nacional de Investigación Agronómica (CNIA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires, Argentina

<sup>2</sup>Escuela de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Morón, Buenos Aires, Argentina

<sup>3</sup>Museo de Farmacobotánica “Juan A. Domínguez”, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

**Reviewed by:**

Melina Sgariglia  
Universidad Nacional de Tucumán  
Argentina

Liliana Pila  
Universidad Regional Amazónica Ikiam  
Ecuador

**Correspondence:**

Patricia Angélica PERALTA:  
[peralta.patricia@inta.gob.ar](mailto:peralta.patricia@inta.gob.ar)

**Section Biotechnology**

Received: 10 June 2021  
Accepted: 21 December 2021  
Accepted corrected: 2 April 2022  
Published: 30 May 2023

**Citation:**

Peralta PA, Guariniello J, Bach HG  
Introducción a cultivo de vitroplantas de “Peperina  
de las Lomas” (*Hedeoma multiflora* Benth.) como  
contribución para su conservación *ex situ*  
**Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat**  
22 (3): 339 - 349 (2023).  
<https://doi.org/10.37360/blacpma.23.22.3.25>

**Abstract:** *Hedeoma multiflora* Benth. (Lamiaceae) is an aromatic-medicinal species native to Argentina, Uruguay and southern Brazil that is in a state of vulnerability due to overexploitation. It is used in the preparation of flavored yerba mate and in popular medicine, mainly in abdominal conditions. The objective of this work was to adjust the micropropagation technique, study the field behavior of vitroplants, compare the seeds generated and close their cultivation cycle. Different concentrations of growth regulators were evaluated on Murashige-Skoog medium. The implantation was successful. There are no differences between the evaluated plants. It was possible to efficiently close the complete cycle *in vitro*, with 100% survival, flowering and production of viable seeds. This methodology will serve for its introduction to the field, subsequent domestication, reintroduction into its natural environment and mitigate the process of degradation of the populations.

**Keywords:** Conservation; Culture; Native germplasm; Micropropagation; *Hedeoma multiflora*.

**Resumen:** *Hedeoma multiflora* Benth. (Lamiaceae) es una especie aromático-medicinal nativa de Argentina, Uruguay y sur de Brasil que se encuentra en estado de vulnerabilidad debido a la sobreexplotación. Es utilizada en la elaboración de yerba mate saborizada y en medicina popular, principalmente en afecciones abdominales. El objetivo de este trabajo fue ajustar la técnica de micropropagación, estudiar el comportamiento a campo de vitroplantas, comparar las semillas generadas y cerrar su ciclo de cultivo. Se evaluaron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento sobre medio de cultivo Murashige-Skoog. La implantación se realizó exitosamente, sin deterioro ni muerte de las plantas. No existen diferencias entre las plantas evaluadas. Se logró cerrar eficientemente el ciclo completo *in vitro*, con un 100% de supervivencia, floración y producción de semillas viables. Esta metodología servirá para su introducción a campo, posterior domesticación, reintroducción en su ambiente natural y mitigar el proceso de degradación de las poblaciones.

**Palabras clave:** Conservación; Cultivo; Germoplasma nativo; Micropropagación; *Hedeoma multiflora*.

## INTRODUCCIÓN

El género *Hedeoma* comprende cerca de 43 especies que se distribuyen desde los EEUU hasta Argentina y Uruguay. En el cono sur crecen 5 especies. Mientras que en Argentina está representado por 4 especies: *H. mandoniana*, *H. médium*, *H. teyucuarensis* y *H. multiflora*. Esta última es la que se encuentra mejor representada en todo el territorio. Habita en las zonas serranas de la región biogeográfica Neotropical, en los dominios Chaqueño y Pampeano (Buenos Aires, Mendoza, Catamarca, Entre Ríos Córdoba, La Pampa, Río Negro, Santiago del Estero y San Luis) (Irving, 1980; O'Leary, 2018). *Hedeoma multiflora* es una planta de pequeño porte, tallos múltiples y raíces leñosas, y su crecimiento está confinado a condiciones ambientales restrictivas, debido a la estructura arenosa-rocosa del suelo. Es perenne y muy aromática. Se desarrolla formando matas pequeñas de hasta 30 cm de altura aproximadamente, sus tallos son decumbentes con hojas sésiles, que contienen los aceites esenciales (O'Leary, 2018). Se la conoce popularmente como tomillo, menta del campo, peperina de las lomas, peperina puntana, peperina de la sierra, tomillo serrano, tomillo del campo, cominito del campo, mastuerzo, hierba del pájaro (Elechosa et al., 2009) y tomillito de la sierra (Ordóñez et al., 2006).

Debido a su alto contenido de aceites esenciales es utilizada como materia prima para la elaboración de yerba mate compuesta (Martínez et al., 2021), bebidas “amargos” y aperitivos, y también en productos de la medicina natural. En este sentido, se utiliza en forma de infusión de sus partes aéreas para afecciones estomacales, como la gastritis (Goleniowski et al., 2006) y otras dolencias abdominales, empacho y vómitos. También, en afecciones hepáticas y biliares; infecciones intestinales; infecciones bronquiales y pulmonares, tos, asma; infección bacteriana y micótica, olor en los pies; depresión, desgano, astenia, debilidad y también, trastornos de la memoria (Luján y Martínez, 2019). Además, el alto contenido de fenoles y flavonoides de sus hojas le confiere a la infusión actividad antioxidante por lo que es utilizada para tratar úlceras y hemorroides (Dadé et al., 2009). Se destaca que, a pesar de ser utilizada en la medicina natural, no está presente en la Farmacopea Nacional Argentina (2013). Con respecto a la composición de sus aceites esenciales, van Baren et al., (2010), identificaron pulegona (14,6% - 88,6%), isomentona (3,9% - 37,0%) y mentona (2,5% - 30,2%) como compuestos mayoritarios.

Debido a que en los países subdesarrollados el extractivismo sigue siendo la principal fuente de plantas aromáticas y medicinales, es imperioso encontrar estrategias que hagan ir abandonando estas prácticas. En Argentina, hasta hace unos 10 años aproximadamente, el estilo de desarrollo en las economías regionales se basaba en la recolección de estas plantas para usos tradicionales (Martínez et al., 2021). En la actualidad, la extracción intensiva de sus ambientes naturales (sobreeplotación) coloca a muchas especies en una situación de gran vulnerabilidad ecológica. Más aún, en los últimos años, ha aumentado la presión sobre las poblaciones naturales endémicas con áreas de distribución más restringidas. Este hecho contribuye no sólo a la degradación de los recursos genéticos nativos sino también a la erosión de suelos con pendientes marcadas. Esta degradación del recurso también es ocasionada por factores de origen antrópico como el turismo, la urbanización y la expansión de la frontera agrícola-ganadera, tal como reportan Martínez et al. (2006), Brunetti et al. (2007), y Elechosa et al. (2009), entre otros. Éste es el caso de la “peperina de las lomas” (*Hedeoma multiflora*) que, además, es extraída indiscriminadamente durante la recolección de otras aromáticas (Elechosa et al., 2009). *Hedeoma multiflora* es considerada de poca demanda, pero desde hace años, los recolectores perciben la dificultad para coleccionar un volumen suficiente, hecho advertido hace tiempo por Fester (1961) y por Montes (1964). Este problema persiste en el tiempo y su gravedad fue señalada por diferentes autores en los últimos años (Lagrottería & Lozada, 1993; Goleniowski et al., 2006; Elechosa et al., 2009). Por tal motivo, es necesario establecer estrategias para su protección, como el cultivo *in vitro*.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una herramienta muy utilizada para el mejoramiento y clonación masiva de plantas (Heywood, 2003), tanto para sistemas productivos como en los orientados a la conservación (Cárdenas Burgos, 2019). Esta biotécnica se basa en la totipotencia de las células vegetales y permite la fijación de los caracteres genotípicos, una tasa alta de propagación, la optimización del espacio, la mejora de las condiciones sanitarias de las plantas y también, facilita el intercambio internacional de germoplasma (Mroginski et al., 2010). Existen antecedentes con diferente grado de avance en la micropropagación de esta especie (Koroch et al., 1997; Brunetti et al., 2007; Brunetti, 2008; Díaz et al., 2010; Diaz Gabutti et al., 2016; Diaz Gabutti et al., 2018), pero ninguno

ha llegado a la evaluación de los explantos en condiciones de cultivo a campo.

En este trabajo se muestra el progreso alcanzado en las etapas de micropropagación, aclimatación, transferencia y comportamiento en campo de *H. multiflora* como un primer paso para su introducción a cultivo.

## OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue ajustar el protocolo de micropropagación para un clon seleccionado de *H. multiflora* perteneciente a una población de la provincia de San Luis (Argentina) y evaluar el comportamiento agronómico de plantas *ex vitro* sometidas a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento.

## MATERIALES Y METODOS

### Propagación de estacas *in vivo*

A partir de un lote de semillas silvestres procedente de Carpintería (Provincia de San Luis, Argentina), se obtuvieron plántulas, de las cuales se seleccionó una que presentó mayor tasa de crecimiento, por lo que fue seleccionada como planta madre para su multiplicación. Se conformó un stock de clones, con el propósito de obtener los explantos para la propagación *in vitro*.

Para la macropropagación, se cortaron esquejes herbáceos binodales de aproximadamente 2,5 cm de largo, luego el extremo basal fue impregnado con ácido indol-3-butírico (IBA) 3000 ppm en talco para estimular el enraizamiento. Se distribuyeron 5 esquejes por maceta de 10 cm de diámetro (20 esquejes en total) con sustrato comercial de enraizamiento Tabaco de Grow Mix® humedecido (humedad 55-65%; pH 5,0 - 5,7; densidad sustrato seco: 130-150 Kg/m<sup>3</sup>; porosidad Total: 90 - 95%). Todas las macetas se cubrieron con bolsas de nylon transparentes para crear el efecto de cámara húmeda. Los esquejes se cultivaron bajo condiciones de invernáculo estándar y con irradiancia de luz natural.

Con el objetivo de permitir el intercambio gaseoso y de reducir la humedad en forma paulatina, cada 48 horas se realizaron pequeños tajos en las bolsas hasta no observar condensación en su interior. Luego de 15 días los esquejes enraizados fueron trasladados a macetas individuales, con sustrato específico de trasplante y repique Grow Mix® (humedad 55 - 60%; pH 5,4 - 5,9; densidad sustrato seco: 200-240 Kg/m<sup>3</sup>; porosidad total: 85 - 90%) y cultivados en las mismas condiciones de invernáculo estándar (irradiancia de luz natural).

### Micropropagación *in vitro*

#### Desinfección

Los clones que se utilizaron como plantas madres fueron pretratados con una solución antifúngica de Carbendazim 0,5 g/L (Mamboretá®) en forma semanal, durante 21 días.

Para la introducción *in vitro*, se tomaron como explantos segmentos binodales que fueron desinfectados en forma superficial mediante inmersión y agitación suave en una solución de hipoclorito de sodio (1,2% de Cl<sup>-</sup> activo) por 15 minutos. Inmediatamente y bajo condiciones de cámara de flujo laminar, los explantos fueron lavados tres veces con agua destilada estéril. Se realizaron dos introducciones (dos repeticiones) con un n=20 c/u, con una diferencia de tres días.

#### Introducción y establecimiento

En la introducción del material *in vitro* se probaron dos concentraciones de medio de cultivo para evaluar la respuesta de los brotes (número de brotes, vigor, longitud). El medio basal semisólido MS (Murashige & Skoog, 1962) completo (MS 1X) y el mismo medio con sus macro y micro nutrientes diluidos a la mitad (MS 0,5X). Ambos tratamientos suplementados con 20 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar y libres de reguladores de crecimiento. El pH se ajustó a 5,8 con KOH. Para cada tratamiento (MS 1X y MS 0,5X) se sembraron 10 segmentos binodales en sendos tubos de 110x25 mm, conteniendo 10 mL de medio, tapados con tapones de algodón autoclavados. Se cultivaron a 25 ± 2°C de temperatura y 16:8 h de fotoperíodo (115 μmol x m<sup>-2</sup> x s<sup>-1</sup>), durante 45 días realizando un repique cada 15 días. El procedimiento anterior se repitió otra vez a los tres días, con nuevos explantos provenientes de la misma planta madre, para obtener dos repeticiones para cada tratamiento.

#### Multiplicación

A los 45 días, los explantos provenientes del medio MS 1X fueron transferidos al mismo medio base, pero suplementado con diferentes concentraciones de la citocinina 6-bencilaminopurina (BAP): 0,0; 2,2; 4,4; 8,8; 17,7 y 22,2 μM para generar multibrotación. Se cultivaron 10 explantos provenientes de los callos generados por cada tratamiento, con dos repeticiones, siguiendo un diseño experimental aleatorizado.

#### Enraizamiento

Se transfirieron veinte segmentos binodales de aproximadamente 1,5 cm de longitud, provenientes de cada uno de los tratamientos con BAP a un medio

MS (1X) con y sin el suplemento de 2,4  $\mu\text{M}$  ácido indol-3-butírico (IBA) para promover el enraizamiento, bajo las mismas condiciones de cultivo descriptas anteriormente.

#### ***Aclimatación***

Las raíces de las plántulas *in vitro* se lavaron con abundante agua para retirar remanentes de agar adherido. Luego se sumergieron por 10 segundos en agitación suave, en una solución con fungicida Carbendazim 0,5 g/L (Mamboretá®). Posteriormente las plántulas fueron transferidas a bandejas de germinación de 50 alvéolos conteniendo un sustrato de transplante y repique de Grow Mix® estéril: perlita (1:1) y cubiertas con nylon transparente a manera de cámara húmeda. Los primeros 10 días, permanecieron en la sala de cultivo, para una aclimatación moderada, luego se trasladaron al invernáculo por 10 días más. Pasado el período de 20 días en bandejas de germinación, las plántulas se transfirieron a macetas individuales de 10 cm de diámetro con el mismo sustrato de transplante Grow Mix®. Se mantuvieron bajo condiciones de invernáculo estándar, con irradiancia de luz natural, durante 60 días más.

#### ***Transferencia a campo***

Se transfirieron a campo 48 plantas *ex vitro* (aclimatadas) de 120 días, procedentes de los tratamientos con y sin IBA (24 plantas por tratamiento). La implantación se realizó a una distancia de 25 cm entre plantas dentro del surco (8 plantas) y 50 cm entre surco, intercalando los tratamientos (un tratamiento por surco). Para los bordes se utilizaron plantas control. Se aplicó riego manual según requerimientos y se realizó el desmalezado en forma manual. Periódicamente se midió el diámetro y la altura de la mata.

#### ***Producción de biomasa***

Al momento de la cosecha (postfloración) de las partes aéreas, se estimó la producción de biomasa aérea en bulk, para cada tratamiento, por pesada del material fresco y material oreado.

#### ***Rendimiento de aceite esencial***

Los aceites esenciales de los tratamientos con y sin IBA se obtuvieron por el método de hidrodestilación a partir de material vegetal oreado, utilizando una trampa Clevenger aproximadamente por 2 horas, según van Baren *et al.*, (2010). Se analizaron las partes aéreas de 20 plantas en bulk de cada

tratamiento.

#### ***Evaluación de semillas silvestres y semillas ex vitro***

Se realizó una comparación de semillas obtenidas de plantas silvestres y semillas provenientes de plantas *ex vitro*. Para el análisis exomorfológico (longitud, ancho, simetría, color, aspecto de la superficie y longitud hilo-micropilar) las semillas fueron fotografiadas bajo la lupa y analizadas con software ImageJ®. Para ambos grupos, se calculó el P1000 y el poder germinativo (PG) durante 10 días en material sin escarificar, con 4 repeticiones de 50 semillas equidistantes por caja de Petri, sobre papel secante húmedo (T: 25°C  $\pm$  1 FP: 16:8h).

#### ***Análisis estadístico***

Los datos obtenidos en los diferentes pasos anteriores, se analizaron estadísticamente por ANOVA y comparación de medias a través del test de Tukey al 5% de significancia.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### ***Propagación de estacas in vivo***

En la macropropagación de clones *in vivo* se obtuvo un 80% de eficiencia en el enraizamiento de los esquejes herbáceos y un 70% de supervivencia a 30 días de iniciado el proceso. Este material sirvió como fuente de explantos para los posteriores ensayos de micropropagación.

#### ***Micropropagación in vitro***

##### ***Desinfección***

El protocolo de desinfección de los explantos resultó ser adecuado y no se observó ningún tipo de contaminación endógena. El 100% sobrevivió al procedimiento y pudo establecerse bajo condiciones *in vitro*.

#### ***Introducción y establecimiento***

En la introducción *in vitro* de *H. multiflora* no se observaron diferencias en la longitud de los brotes entre las concentraciones de medio de cultivo probadas, pero si en la cantidad de brotes (MS 1X 4,43  $\pm$  0,46; MS 0,5 5,86  $\pm$  0,46 (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ). Sin embargo, los brotes desarrollados en MS 1X presentaron un mejor aspecto (color y turgencia), por lo tanto, se seleccionó este tratamiento para continuar con los ensayos.

#### ***Multiplificación***

Todos los tratamientos con BAP produjeron multibrotaciones a partir de callos de color verde y

aspecto nodular. La Figura N° 1 muestra diferentes etapas del desarrollo del cultivo *in vitro* de *H.*

*multiflora*.



Figura N° 1

Segmento binodal cultivado en medio MS (1X) suplementado con 2,2  $\mu$ M BAP (a); conjunto de brotes originados a partir de un callo de 45 días en el mismo medio (b); Brotes aislados luego de 60 días de iniciado el cultivo (c). Aclimatación de esquejes (d)

#### Enraizamiento

En la Tabla N° 1 se muestran las tasas de multiplicación (N° de brotes/explanto) en las diferentes concentraciones de BAP evaluadas

luego de 45 días de cultivo. La eficiencia de enraizamiento fue del 100% en los tratamientos probados y la supervivencia a los 45 días fue del 90% en todos los tratamientos.

Tabla N° 1

BAP ( $\mu$ M)	Tasa de multiplicación (nro. de brotes/explanto)
<b>0</b>	2,25 $\pm$ (0,14) a
<b>2,2</b>	7,05 $\pm$ (1,14) b
<b>4,4</b>	6,45 $\pm$ (1,06) b
<b>8,8</b>	7,80 $\pm$ (1,48) b
<b>17,7</b>	8,60 $\pm$ (0,95) b
<b>22,2</b>	8,20 $\pm$ (1,17) b

Número de brotes/explanto a 45 días de cultivo, obtenido en las diferentes concentraciones de BAP aplicadas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ). El tratamiento seleccionado para la multiplicación *in vitro* se resalta en **negrita**

La Tabla N° 2 compara los promedios de las longitudes y del número de raíces desarrolladas en cada brote, según los tratamientos con y sin IBA, en los diferentes tratamientos con BAP. Se observó que los explantos repicados a un medio con IBA desarrollaron raíces de menor longitud (de 9,15 a 28,10 mm) que aquellos que no fueron tratados con IBA (29,76 a 63,20 mm). También, en un medio con IBA, se observó que los brotes provenientes de

tratamientos con BAP presentaron una disminución en el número de raíces (desde 4 a 8 cuando fueron tratadas con BAP y 10 sin BAP). Con respecto al ancho, las raíces sin IBA fueron más angostas ( $0,34 \pm 0,5$  mm) que las tratadas con IBA ( $0,74 \pm 0,5$  mm). Además, poseen una tonalidad más clara respecto de las raíces desarrolladas en los tratamientos conteniendo la auxina (Figura N° 2).

Tabla N° 2

BAP (µM)	Longitud de la raíz (mm)		Número de la raíces	
	Sin IBA	Con IBA	Sin IBA	Con IBA
0	63,20 ± (2,83) a	17,63 ± (2,52) ab	7,00 ± (0,54) a	10,00 ± (0,94) a
2,2	62,30 ± (3,38) a	18,44 ± (3,44) ab	6,78 ± (0,36) a	6,33 ± (0,75) bc
4,4	52,86 ± (7,76) ab	28,10 ± (3,37) b	6,90 ± (0,82) a	8,40 ± (0,45) b
8,8	49,63 ± (8,21) ab	9,15 ± (2,21) a	4,50 ± (0,73) a	4,20 ± (0,65) c
17,7	29,76 ± (5,17) b	19,87 ± (3,70) ab	6,70 ± (0,96) a	5,00 ± (0,63) c
22,2	32,62 ± (5,98) b	9,58 ± (1,55) ab	5,40 ± (0,48) a	5,30 ± (0,54) c

Número y longitud promedio de las raíces adventicias desarrolladas en brotes provenientes de los tratamientos con BAP, transferidos a medio base MS (1X) con y sin suplementación de 2,4 µM IBA. Medias con una letra común no son significativamente diferentes según Tukey ( $p > 0,05$ ). n=50



Figura N° 2

Diferencias morfológicas en las raíces inducidas en brotes de *H. multiflora* cultivados en un medio con o sin el agregado de 2,4 µM de IBA. Coloración (a) y longitud (b).

**Aclimatación**

La mezcla de Grow Mix® estéril:perlita (1:1) ensayada previamente (datos no mostrados) resultó

adecuada como sustrato de enraizamiento para esta especie (Figura N° 3). El 100% de las plántulas prosperaron satisfactoriamente.



Figura N° 3

Plantines *ex vitro* de 60 días aclimatados bajo condiciones de invernáculo

**Transferencia a campo**

El ensayo en el campo experimental se llevó a cabo durante dos años y medio, donde se practicaron dos cosechas anuales sólo en el primer año (Diciembre y Marzo) con una supervivencia del 90%. Todas las plantas *ex vitro* se adaptaron al ambiente del predio experimental y mostraron un aumento del diámetro de la mata durante el periodo vegetativo. Si bien la altura de la mata disminuyó con el tiempo, esto se

debe a que los tallos presentaron un hábito de crecimiento decumbente (Figura N° 4). Al momento de la cosecha las plantas presentaban una altura entre 17 y 24 cm. en promedio. No se observaron diferencias en el crecimiento entre los tratamientos. A 2 meses de la implantación (plantas de 5 meses) todos los individuos florecieron en forma uniforme y luego semillaron (Figura N° 5).

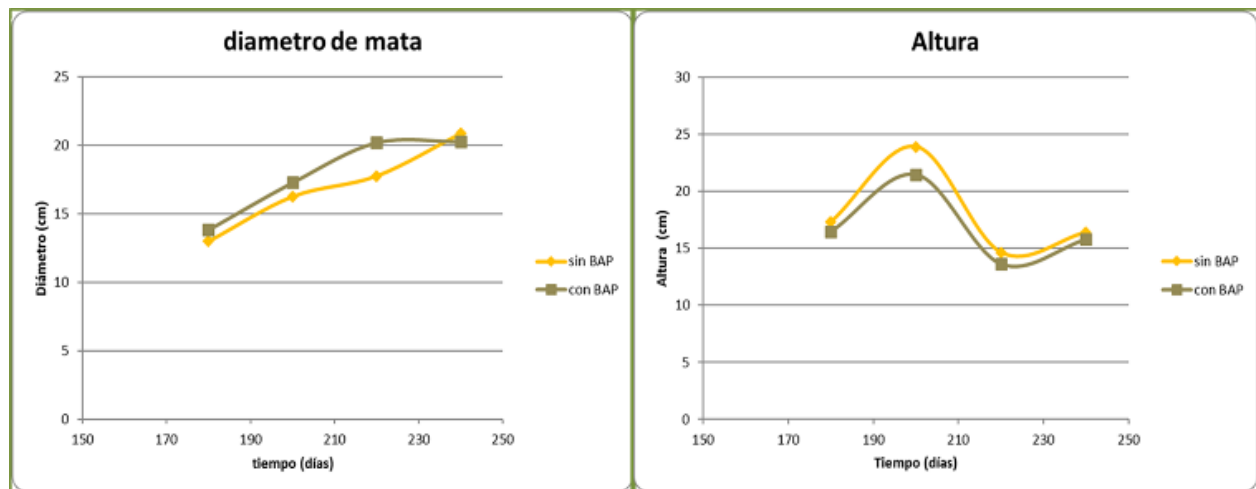


Figura N° 4

**Diámetro y altura de la mata durante el período vegetativo. En el tratamiento control se registró mayor diámetro de mata que las plantas multiplicadas con BAP (18,42 vs 16,47 respectivamente) (Tukey,  $p < 0,05$ ). No se observaron diferencias significativas en la altura**



Figura N° 5

**Plantas *ex vitro* en la parcela experimental. Vista general de la parcela (a). Vista ampliada de un surco (b). Planta en período vegetativo a 30 días de la implantación (c). Planta en período de floración a 60 días de la implantación (d)**

#### ***Producción de biomasa y rendimiento de aceite esencial***

No se observaron diferencias significativas en la producción de biomasa de la parte aérea de plantas tratadas y no tratadas con BAP, siendo de  $1,77 \pm 0,64$  g peso fresco y  $1,13 \pm 0,63$  g peso oreado, en promedio. Por último, las plantas control y las tratadas con BAP presentaron un porcentaje en aceite esencial de 0,46% y 0,57% respectivamente.

#### ***Evaluación de semillas silvestres y semillas *ex vitro****

Con respecto a las semillas, tienen forma ovoide, ápice redondeado y base aguda, levemente asimétrica, de color marrón oscuro y superficie areolada. Las mediciones entre semillas de plantas tratadas con BAP y el control, no presentaron diferencias significativas en el P1000 ( $0,013 \pm 0,0004$  g), PG (60%), el hilo basal ( $0,15 \pm 0,02$  mm), el espesor del tegumento ( $0,049 \pm 0,003$  mm) y la longitud ( $1,30 \pm 0,06$  mm), Si existen diferencias en el ancho, en donde la población silvestre presenta un valor menor ( $0,56 \pm 0,01$  mm) que las obtenidas en la cosecha de la población *ex vitro* ( $0,60 \pm 0,01$  mm).

#### **DISCUSIÓN**

Si bien se seleccionó una planta por su tasa de crecimiento y características fenotípicas y no fue evaluada previamente en la producción de metabolitos secundarios, para el desarrollo del protocolo fue satisfactorio. Se evaluó a un único clon a fin de ajustar dicho procedimiento y cerrar el ciclo de propagación, que puede ser aplicado a un ejemplar con características de interés en el futuro.

Los valores de la tasa de multiplicación, no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, excepto con el control, por lo que se tomó el tratamiento de menor concentración de citocinina ( $2,2 \mu\text{M}$ ) para continuar con los ensayos y disminuir los costos. Este valor de multiplicación de  $7,05 \pm (1,14)$  es similar al reportado por Korocho *et al.* (1997), quienes utilizaron MS 0.5X con  $22,20 \mu\text{M}$  de BAP, y también, un poco superior al obtenido por Díaz Gabutti *et al.* (2018), quienes utilizaron diferentes combinaciones de ácido naftalenacético (ANA) y BAP. Sin embargo, en resultados anteriores reportados por los mismos autores (Díaz Gabutti *et al.*, 2016), las plantas se mantuvieron más tiempo en fase de establecimiento, y al alargar el tiempo de



subcultivo obtuvieron hasta 32.5 brotes por explanto. Este resultado es similar al obtenido por nuestro grupo en ensayos previos (no mostrados), aunque el material en esas condiciones presentó vitrificación y no sobrevivieron al proceso de enraizamiento. Se destaca que tanto en nuestro trabajo como en el de Díaz Gabutti *et al.* (2018), aunque se utilizaron diferentes reguladores, no se observaron diferencias significativas para el número de brotes. También la organogénesis resultó indirecta en alguno de los tratamientos, dado por la concentración de citocinina. En nuestro trabajo, fue evidente que la concentración de BAP estimula la formación de callos y el valor más bajo fue suficiente para generar muchos brotes en un explanto más elongado.

Con respecto a las raíces, se registró una disminución en la longitud de las raíces a medida que se incrementa la concentración de BAP, lo que podría atribuirse a efectos residuales de la citocinina en el brote. También se observó que sobre el medio base probado (MS 1X), la concentración de IBA evaluada no favoreció la elongación de raíces adventicias. Son muy evidentes las diferencias que se observan en la longitud de las raíces con y sin el agregado de IBA, independientemente del tratamiento de BAP de origen. Estos resultados sobre la longitud de las raíces coinciden con los reportados para *Nothofagus glauca* por Uribe *et al.* (2012), y para *Ugni molinae* por Rodríguez Beraud *et al.* (2015). No obstante, a pesar de las diferencias observadas (longitud, diámetro, desarrollo de pelos adsorbentes, color) la aclimatación, la posterior implantación, y el comportamiento a campo confirma la funcionalidad de las raíces adventicias desarrolladas en todos los tratamientos. Según nuestros resultados, no es necesario el aporte extra de auxinas (IBA) para el desarrollo radicular *in vitro*, y con bajas concentraciones de citocinina (BAP) es suficiente para la generación de multibrotación. Esto permite trabajar con un protocolo más económico si se tiene en cuenta que el medio MS 1X sólo fue seleccionado por el aspecto del explanto, pero que no registró diferencia en la introducción cuando se evaluó el MS a la mitad de su concentración.

La aclimatación resultó efectiva, la supervivencia fue superior al 20% reportado por Díaz Gabutti *et al.* (2018), después de la quinta semana de supervivencia, siendo del 90% en nuestro ensayo. Además, el 90% de las plántulas implantadas cumplieron su ciclo de vida en los dos años y medio de evaluación a campo.

Vale destacar que, si bien las plantas a campo

se adaptaron muy bien, el espacio entre ellas resultó muy amplio, por lo que se ajustará el marco de implantación para futuros ensayos.

En este trabajo se registraron rendimientos de aceites esenciales entre 0,46% y 0,57%. Estos valores difieren de los reportados por otros autores. Koroch *et al.* (1999), determinaron un 1,9%, mientras que van Baren *et al.* (2010), obtuvieron rendimientos del 3,40% - 5,43% dependiendo del origen del material. Estos últimos señalan que estas variaciones podrían ser resultado de factores ecológicos y del estado fenológico de las plantas a la cosecha, obteniéndose los mayores rendimientos en plena floración. En este sentido, debemos considerar que en este trabajo se realizó la cosecha y destilación luego de la fructificación, pues era necesario evaluar las semillas, lo que explicaría valores más bajos de rendimiento. De todos modos, el objetivo de este análisis era netamente comparativo para determinar si existían diferencias en la producción de aceite esencial entre los tratamientos.

Finalmente, los resultados al comparar las semillas silvestres con las obtenidas de las plantas *ex vitro*, muestran que pueden utilizarse para la siembra, sin importar la metodología ni el origen de las plantas madres. Esto garantiza su reproducción y la supervivencia de plantines destinados a su domesticación y aporta a proyectos de conservación para este recurso. Con respecto al PG obtenido, es un poco inferior al 72% reportado por Suárez *et al.* (2000), aunque las condiciones de temperatura fueron diferentes. En dicho ensayo, fue de 30°C en los períodos de luz y de 20°C en oscuridad y se evaluaron por 18 días. En cuanto a la diferencia en el ancho de las semillas, puede deberse a que las plantas cultivadas en el ensayo, tuvieron riego, por lo tanto, mayor cantidad de reserva.

## CONCLUSIÓN

Se completó eficazmente tanto el ciclo de propagación *in vivo* como *ex vitro* de *H. multiflora*.

La organogénesis observada fue de naturaleza indirecta, a través de un callo, por lo que el protocolo de propagación aplicado podría llegar a ser fuente de variabilidad si se incrementa la concentración de citocinina. Este procedimiento podría aprovecharse para restaurar su ambiente dañado, su conservación en bancos *in vitro* y para la producción y evaluación de metabolitos secundarios.

La biomasa puede incrementarse en menor tiempo con esta metodología y contribuir a la producción de aceites esenciales en mayor escala.

Se logró satisfactoriamente la implantación a campo de las plantas *ex vitro*, con un 90 % de supervivencia.

No hay diferencias en el desempeño de las plantas tratadas, es decir, en su crecimiento, floración uniforme, producción de semillas, poder germinativo y rendimiento de aceites esenciales. Todas cumplieron un ciclo bianual.

El PG en las semillas silvestres y las obtenidas de plantas tratadas son muy similares, esto indica que, mediante la metodología propuesta, podría generarse en menor tiempo, una mayor cantidad, que abastezca bancos de germoplasma o a pequeños productores del sector de plantas aromáticas y medicinales.

A pesar de las diferencias observadas *in vitro*,

las concentraciones de BAP o de IBA evaluadas no modificaron el crecimiento de las plantas a campo. Por lo tanto, la utilización de estas hormonas con el objetivo de aumentar la cantidad de plántulas a partir de un clon, resultó efectiva.

Se dio un paso relevante en el ajuste de un protocolo para la preservación, eventual domesticación y mejoramiento de esta especie.

Se espera lograr la reducción del impacto negativo que genera la sobreexplotación de esta especie nativa y colaborar en la reducción de su erosión genética.

Este trabajo podría apoyar el desarrollo de pequeños productores en la introducción a cultivo de esta especie.

## REFERENCIAS

- Brunetti P, Ortiz L, Palacio L, Lloret C, Goleniowski M. 2007. Micropropagación de “Tomillo de las Sierras” *Hedeoma multiflora* Benth. **Bol Latinoam Caribe Plants Med Aromat** 6: 391 - 392
- Brunetti P. 2008. Propagación *in vitro* de *Hedeoma multiflorum* Benth. y composición de aceites esenciales. Tesis, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Cárdenas Burgos CA, Araque-Barrera J, Bohorquez-Quintero MA, Hernández-Herrera Y, Pacheco-Maldonado JC. 2019. Propagación *in vitro* de *Bucquetia glutinosa*, especie endémica de los Paramos colombianos. **Rodriguésia** 70: e00682018. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201970057>
- Dadé MM, Fioravanti DE, Schinella GR, Tournier HA. 2009. Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra valley (Argentina). **Bol Latinoam Caribe Plants Med Aromat** 8: 529 - 539.
- Díaz Gabutti MS, Figueroa AC, Palacio L, Goleniowski ME. 2010. “*In vitro*” *Hedeoma multiflora* Benth. propagation in response to different nutritional conditions. **Mol Med Chem** 21: 17 - 20.
- Díaz Gabutti MS, Leporati J, Terenti C, Ponce A, Verdes P. 2016. Establecimiento *in vitro* de *Hedeoma multiflora* Benth. **Dominguezia** 32: 61.
- Díaz Gabutti MS, Leporati J, Verdes P. 2018. Propagación *in vitro* de germoplasma nativo de *Hedeoma multiflora* Benth. vía organogénesis. **Biot Veg** 18: 105 - 110.
- Elechosa MA, Aguirre E, Bandoni AL, Di Leo Lira PMR, Fernández EA, Heit C, Juárez MA, López S, Martínez AJ, Martínez E, Marino AM, Molina AC, Molina AM, van Baren CM, Vitorro CI. 2009. **Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de la Argentina**. IRB-CIRN-INTA Castelar. Ediciones INTA, Castelar, Argentina.
- Farmacopea Nacional Argentina. 2013. VII Edición. **Codex medicamentarius Argentino**. Ministerio de Salud de la Nación, ANMAT. Buenos Aires, Argentina [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Libro\\_Tercero.pdf](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Libro_Tercero.pdf)
- Fester GA, Martinuzzi EA, Retamar JA, Ricciardi AI. 1961. **Aceites esenciales de la República Argentina**. Academia Nacional de Ciencias, Córdoba, Argentina
- Goleniowski ME, Bongiovanni GA, Palacio L, Núñez CO, Cantero JJ. 2006. Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. **J Ethnopharmacol** 107: 324 - 341. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.026>
- Heywood VH. 2003. **Conservation and sustainable use of wild species as sources of new ornamentals**. In: Düzyaman E, Tüzel Y. (eds.). Proceedings of the international symposium on sustainable use of plant biodiversity to promote new opportunities for horticultural production development. **Acta Hort.** 598: 43 - 53. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.598.5>
- Irving R. 1980. The systematics of *Hedeoma* (Labiatae). **SIDA** 8: 218 - 295
- Koroch AR, Juliani HR, Juliani HR, Trippi VS. 1997. Micropropagation and acclimatization of *Hedeoma*

- multiflorum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 48: 213 - 217. <https://doi.org/10.1080/10412905.1999.9701100>
- Koroch AR, Juliani HR, Juliani HR, Trippi VS. 1999. Chemical constituents of the essential oil of *Hedeoma multiflorum* Benth. (Lamiaceae). **J Essent Oil Res** 11: 165 - 116.
- Lagrottería M, Lozada C. 1993. Medicinal and aromatic plants from Córdoba, Argentina; Their commercial and socio-cultural aspects. **Acta Hort** 330: 101 - 106. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1993.330.10>
- Luján MC, Martínez GJ. 2019 Etnobotánica médica urbana y periurbana de la ciudad de Córdoba, (Argentina). **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 18: 155 - 196. <https://doi.org/10.37360/blacpma.19.18.2.12>
- Martínez G, Planchuelo A, Fuentes E, Ojeda M. 2006. A numeric index to establish conservation priorities for medicinal plants in the Paravachasca Valley, Córdoba, Argentina. **Biodiv Conserv** 15: 2457 - 2475. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5283-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5283-5_8)
- Martínez G, Audisio C, Luján MC. 2021. Las plantas medicinales, patrimonio natural y cultural de la Reserva Hídrica Natural y Recreativa Bamba, La Calera, Córdoba, Argentina. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 20: 270 - 302. <https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.3.21>
- Montes AL. 1964. La producción de plantas aromáticas nativas. INTA, Reunión de Programación sobre Plantas Aromáticas. INTA Castelar. **Relato** 25: 1 - 20
- Mroginski L, Sansberro P, Flaschland E. 2010. **Establecimiento de cultivos vegetales**. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L (eds.) Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473 - 497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Ordóñez A, Baldoncini S, Berio G, Chaves G, Bled L, Massuh Y, Liébana C, Torres L, Ojeda M. 2006. Domestication of native aromatic plants. **Mol Med Chem** 11: 58 - 59.
- O'Leary N. 2018. **Genero *Hedeoma***. In flora vascular de la República Argentina. Eucotiledóneas: Lamiales. Editores: Zuloaga F, Belgrano M, Instituto de Botánica Darwinion, San Isidro, Argentina.
- Rodríguez Beraud M, Carrillo López R, Chacón Fuentes M, Hormazábal Vásquez N, Tampe Pérez J, Tighe Neira R. 2015. Enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de microtallos de *Ugni molinae* Turcz., una especie nativa de Chile. **Gayana Bot** 72: 14 - 20. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432015000100002>
- Suárez D, Serdiuk I, Rolando R. 2000. Estudios preliminares de multiplicación por semillas y obtención de plantines de *Hedeoma multiflora* Benth. **Anales de SAIPA** 16: 85 - 90
- Uribe M, Ulloa J, Delaveau C, Sáez K, Muñoz F, Cartes P. 2012. Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. **Gayana Bot** 69: 105 - 112. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432012000100010>
- van Baren CM, Sanguinetti S, Di Leo Lira P, Bandoni AL, Juárez MA, Elechosa MA, Martínez E. 2010. El aceite esencial de *Hedeoma multiflora* Benth. (Lamiaceae) de poblaciones naturales en la provincia de San Luis, Argentina. Estudio comparativo. **Dominguezia** 26: 13 - 20.