

## Propagación vegetativa (macro y micro) y evaluación de la capacidad de remoción de iones $\text{Cu}^{+2}$ de *Salix humboldtiana* Willd. (sauce criollo)

### Vegetative propagation (macro and micro) and evaluation of the $\text{Cu}^{+2}$ ion removal capacity of *Salix humboldtiana*

#### Marina Adema\*

Laboratorio de Investigaciones de la Madera (LIMAD-CeProVe). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP). Ministerio de Ambiente PBA, Argentina

#### Blanca Villarreal

Laboratorio de Investigaciones de la Madera (LIMAD-CeProVe). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP). Comisión de Investigaciones Científicas-CICPBA, Argentina

#### Christian Weber

Comisión de Investigaciones Científicas-CICPBA, Argentina

#### Sebastián Galarco

Laboratorio de Investigaciones de la Madera (LIMAD-CeProVe). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP), Argentina

#### Sandra Sharry

Laboratorio de Investigaciones de la Madera (LIMAD-CeProVe). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP). Comisión de Investigaciones Científicas-CICPBA. CIT-CONICET. Viedma. Universidad Nacional de Río Negro, Argentina

#### Revista de la Facultad de Agronomía

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

ISSN: 1669-9513

Periodicidad: Semestral

vol. 121, (Num. Esp. 2), 2022

redaccion.revista@agro.unlp.edu.ar

Recepción: 15/10/2022

Aprobación: 26/10/2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/23/233546005/>

DOI: <https://doi.org/10.24215/16699513e104>

\*Autor de correspondencia: [marinaadema@gmail.com](mailto:marinaadema@gmail.com)



## Resumen

El género *Salix* (sauces y mimbrres) tiene una amplia distribución en el mundo. *Salix humboldtiana* Willd. (sauce criollo) es la única especie nativa de América del Sur, cuyo hábitat natural se extiende desde México y Centroamérica hasta el sur, en el río Chubut en Argentina, cubriendo las riberas de ríos y arroyos. Los sauces son de crecimiento rápido, de fácil propagación vegetativa, suministran una amplia gama de productos madereros, no madereros y servicios, desempeñando un papel importante en la fitorremediación de tierras degradadas, la rehabilitación de ecosistemas frágiles y la restauración del paisaje forestal. Esta capacidad fitorremediadora podría ser utilizada para la recuperación de suelos contaminados. Si se demuestra que *S. humboldtiana* tiene la capacidad de remediar suelos, podría utilizarse para la repoblación de zonas polutadas. Es importante, además, contar con una estrategia de propagación vegetativa que permita disponer de plantas para restauración o fitorremediación. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron: ajustar técnicas de propagación vegetativa (macro y micro) de *S. humboldtiana* y evaluar el potencial de los individuos propagados para la extracción de metales pesados. Se logró la macropropagación por estacas y la micropropagación de *S. humboldtiana*. Los ensayos realizados demuestran el potencial de sauce criollo para la eliminación de los iones cobre de soluciones acuosas.

**Palabras clave:** macropropagación, micropropagación, fitorremediación, biotecnología forestal

## Abstract

The genus *Salix* (willows) has a wide distribution in the world. *Salix humboldtiana* Willd. (creole willow) is the only species native to South America, whose natural habitat extends from Mexico and Central America to the south, in the Chubut river in Argentina, covering the banks of rivers and streams. Willows are fast-growing, easily vegetative propagating, supply a wide range of wood, non-timber products and services, playing an important role in phytoremediation of degraded land, rehabilitation of fragile ecosystems and restoration of forest landscape. This phytoremediation capacity could be used for the recovery of contaminated soils. If *S. humboldtiana* is shown to have the ability to remediate soils, it could be used for the repopulation of polluted areas. It is also important to have a strategy of vegetative propagation of those plants for remediation and restoration. Therefore, the objectives of this work were: to adjust vegetative propagation techniques (macro and micro) of *S. humboldtiana* and evaluate the potential of propagated individuals for the extraction of heavy metals. The macropropagation and micropropagation of *S. humboldtiana* were achieved. The tests carried out demonstrate the potential of *S. humboldtiana* for the removal of copper ions from aqueous solutions.

**Keywords:** macropropagation, micropropagation, phytoremediation, forest biotechnology

## INTRODUCCION

El género *Salix* (*Salicaceae*, sauces y mimbres) tiene una amplia distribución en el mundo. Se originó en las zonas tropicales del este de Asia, extendiéndose hasta llegar a las regiones frías del norte de Europa y Norteamérica. Por ello es posible encontrar especies de sauces que se adaptan a cualquier tipo de hábitat. El género comprende aproximadamente 500 especies de árboles y arbustos (debido a las numerosas variedades y las progenies cruzadas, es difícil dar un número exacto de especies). Los sauces prefieren sitios húmedos en bosques de llanuras aluviales, a lo largo del agua que fluye y en pantanos. Los mismos juegan un papel importante para el desarrollo de las estructuras del paisaje y para mantener el equilibrio ecológico.

Los sauces, en general, son de crecimiento rápido, de fácil propagación vegetativa y constituyen un componente de los sistemas agroforestales. Suministran una amplia gama de productos madereros, no madereros y servicios ambientales, siendo importantes en la rehabilitación de ecosistemas frágiles y la restauración del paisaje forestal (Ball et al., 2005). Sus tasas relativamente altas de transpiración y su resistencia a inundaciones estacionales y las raíces que se extienden varios metros por el terreno, son ventajas adaptativas particularmente en tierras húmedas, donde el control de la escorrentía freática es esencial para reducir la contaminación (Smart et al., 2005). En sistema de monte bajo y rotación corta se cultivan no sólo por su biomasa para producir energía, sino también para tratar suelos polutados (Dimitriou & Aronsson, 2005; Eevers et al., 2017). Por ello, las especies de sauces son consideradas como una excelente opción para la fitorremediación (Mleczek et al. 2010; Evans 2014; Nissim et al., 2021). *Salix humboldtiana* Willd. (sauce criollo, sauce colorado, sauce amargo, sauce chileno) es una especie del género *Salix* nativa de América, desde México hasta el norte de la provincia argentina de Santa Cruz, cubriendo las riberas de ríos y arroyos. El sauce criollo es el único sauce nativo en Argentina. Era muy común su distribución en el Delta del Paraná y en la ribera platense, sin embargo, procesos de invasión por parte de especies exóticas, así como diversas actividades humanas amenazan su persistencia. Actualmente se están realizando estudios de su diversidad genética y su propagación para su conservación, rescate y reintroducción (Bozzi et al., 2014; Gallo et al., 2016; Amico et al., 2017; Cerrillo & Torres, 2018; Cédres Gazzo et al., 2019).

Según Cantera Kintz (2005), en la franja costera desde Buenos Aires hasta Punta Lara se han detectado tanto en la columna de agua como en sedimentos y biota, altas concentraciones de sustancias contaminantes. El aumento de los costos y la limitada eficacia de los tratamientos fisicoquímicos para remediar sitios polutados, han estimulado el desarrollo de nuevas tecnologías. La fitorremediación representa una alternativa sustentable y de bajo costo para la rehabilitación de ambientes afectados por contaminantes naturales y antropogénicos. Es decir que, se puede aprovechar la capacidad de ciertas plantas para absorber, acumular, metabolizar, volatilizar o estabilizar contaminantes presentes en el suelo, aire, agua o sedimentos como son los metales pesados, metales radioactivos, compuestos orgánicos y compuestos derivados del petróleo (Jara Peña et al., 2014). Para iniciar un programa de fitorremediación, un requisito básico es la identificación y elección de las especies vegetales con capacidad para tolerar y secuestrar el contaminante, que dependerá del tipo, la concentración y la etapa de desarrollo de la especie (Parera, 2022). Para diseñar e implementar de manera más efectiva una tecnología de fitorremediación sostenible es fundamental conocer y estudiar los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que utiliza cada especie para responder a la presencia de un metal en particular. Otro aspecto a considerar es que las especies vegetales seleccionadas para fitorremediar se adapten a las condiciones ambientales de la zona a remediar; en este caso, las especies nativas son las más apropiadas, al mismo tiempo que se evita la introducción de especies exóticas y potencialmente invasoras que pueden generar un daño ecosistémico mayor (Asensio et al., 2018). Las principales características de estas plantas son rápido crecimiento, facilidad de arraigo y mantenimiento, alta evapotranspiración y capacidad de transformar los contaminantes en productos no tóxicos o menos tóxicos. Entre las diferentes especies, los sauces se consideran una potente herramienta para eliminar los metales pesados de los sitios más contaminados (Wani et al., 2020). La capacidad fitorremediadora de los mismos podría ser utilizada para la recuperación de estos suelos contaminados. Los sauces utilizados para acumular metales pesados del suelo pueden quemarse en centrales térmicas y los metales pesados se concentran en las cenizas para ser eliminados (Smart et al., 2005). Varios autores han estudiado la capacidad fitorremediadora de los sauces, pero hay sólo estudios exploratorios que evalúan al sauce criollo (Adema 2010; Adema et al. 2010; 2014). Gomes et al. (2011a) llevaron a cabo un experimento en un invernadero para evaluar el efecto de los niveles de metales pesados en el estado nutricional de las raíces y los brotes de las plantas jóvenes de *S. humboldtiana* en suelos

contaminados por los desechos de la industria del zinc. En estudios previos se ha demostrado la utilidad del uso de estacas o vitroplantas para evaluar la capacidad fitorremediadora de especies del género *Salix* (Dickinson & Pulford 2005; Ohlsson et al., 2008; Gomes et al., 2011b; Wani et al., 2020).

La rehabilitación de ambientes ribereños degradados busca recrear ecosistemas naturales mediante la reintroducción de especies vegetales autóctonas, entre otras acciones. Esta reintroducción podría llevarse a cabo a partir de semillas o material obtenido por propagación asexual (macro y micro) para multiplicar y mantener las características genéticas de individuos seleccionados. Por otro lado, la importancia de identificar plantas para su posterior uso con fines de fitorremediación depende del éxito de la propagación para, posteriormente llevarlos a terreno definitivo (Menacho, 2017). La macropropagación es una vía de reproducción acelerada, de pocos insumos y bajos costos. Las ventajas de la técnica son estabilidad genética de especies de interés, la obtención de altos coeficientes de multiplicación de forma sostenible y la posibilidad de combinarse con los métodos de cultivo *in vitro* (Jiménez-Terry & Agramonte, 2013). La macropropagación de biotipos de *S. humboldtiana* de distintas regiones de Argentina ha sido reportada por varios autores (Carpanezzi et al., 1999; Martínez et al., 2012; Adema et al., 2014; Bardi et al., 2016; López et al., 2020). La micropropagación (organogénesis directa e indirecta y embriogénesis somática) es una herramienta adecuada para facilitar la multiplicación de genotipos de sauce seleccionados por diferentes rasgos deseados como su capacidad fitorremediadora, para conservar germoplasma o simplemente para contar con una gran cantidad de individuos para reintroducir en paisajes degradados o contaminados. Varios autores han reportado métodos exitosos de micropropagación para diferentes especies de sauces (Lyyra et al., 2006; Naujoks, 2007; Paek et al., 2008; Mashkina et al., 2010; Capuana et al., 2022). La literatura cita una amplia gama de variantes de medios de cultivo con diferentes composiciones de nutrientes básicos y fitohormonas. Estudios exploratorios muestran algunos resultados para la micropropagación de *S. humboldtiana* (De Paiva Neto et al. 1998, Pereira et al., 2000; Adema, 2010; Adema et al., 2009; 2014). Si se demuestra que el sauce criollo tiene la capacidad de fitorremediar suelos, podrán utilizarse para la repoblación de zonas polutadas. Es importante, además, contar con sistemas de propagación vegetativa de aquellas plantas que presenten mayor capacidad de fitorremediar y para su conservación, rescate y reintroducción en ecosistemas degradados y polutados, como la zona costera del Río de la Plata. En base a esto, los objetivos de este trabajo fueron: a) ajustar técnicas de propagación vegetativa (macro y micro) de *Salix humboldtiana* proveniente la franja costera de Buenos Aires (Punta Lara). B) evaluar el potencial de los individuos propagados para la absorción de cobre.

## METODOLOGIA

### SITIO DE MUESTREO Y MATERIAL RECOLECTADO

El material vegetal se obtuvo a partir de árboles de *S. humboldtiana* que crecen naturalmente en la zona de Punta Lara, Provincia de Buenos Aires (Figura 1). De los mismos se extrajo material para la macropropagación (guías de 150 cm de longitud) y brotes. Se seleccionaron árboles masculinos y se realizó el reconocimiento botánico sobre la base de características fenotípicas. Las guías del año se cosecharon entre junio y agosto.



**Figura 1**

Sitios de recolección del material para propagación de *S. humboldtiana* y árboles seleccionados.

### **MACROPROPAGACIÓN**

Los materiales vegetales de partida fueron guías juveniles de árboles de *Salix humboldtiana*. De las mismas se obtuvieron estacas (30 cm de longitud y 0.8 cm de diámetro) y estaquillas (0,1-0,2 cm de diámetro y un largo de 4-5 cm o de 30 cm). Se realizaron diferentes ensayos. Para el Ensayo 1, 40 estacas de *S. humboldtiana* se colocaron en agua corriente durante 20 días y luego se establecieron en envases de polietileno negro Nro. 12 y 14 con sustrato constituido por una mezcla de tierra-perlita-vermiculita (6:3,5:0,5) (Abedini et al., 2008) (Figura 2 A). En el Ensayo 2, estacas de *S. humboldtiana* fueron tratadas superficialmente con fungicida sistémico benomilo (Benomyl®) 1000 mg. L<sup>-1</sup> durante 3 horas para evitar la presencia de hongos y posteriormente fueron colocadas en ácido indol butírico (AIB) a una concentración de 50 mg. L<sup>-1</sup> durante 24 h para inducir la formación de raíces. Las estacas se colocaron en un sistema hidropónico compuesto por recipientes plásticos de 20 x 20 cm de color negro con 1500 mL de agua destilada, aireador para la oxigenación del agua, planchas de telgopor® y goma espuma para sostener las estacas (Figura 2 B). Se utilizaron 150 estacas de 30 cm de longitud y 0,8 cm de diámetro. Para el Ensayo 3, se utilizaron 40 estaquillas de 0,1-0,2 cm de diámetro y 4-5 cm de largo por repetición. Se desinfectaron con fungicida sistémico benomilo (Benomyl®) 1000 mg. L<sup>-1</sup> durante 1 h. La mitad de éstas estaquillas (20) fueron tratadas en la base con AIB 20 mg. L<sup>-1</sup> durante 2h y el resto fue utilizado como testigo (20). Se probaron dos sustratos (10 estaquillas por sustrato): una mezcla de tierra-perlita (1:1) y mezcla de tierra-arena (3:1) en macetas de plástico Nro 12 T.A plastic®. El ensayo tuvo una duración de dos meses, con dos repeticiones (Figura 2 C). Para el Ensayo 4, se cortaron 120 estacas y estaquillas, de entre 30-35cm de largo y de dos diámetros diferentes (0,1-0,2 cm y 0.8 a 1 cm), como se muestra en la Figura 2 D, E, F. Primeramente, se desinfectaron con fungicida benomilo (Benomyl®) 1000 mg/L durante 2 h, posteriormente se trataron con AIB. Para las estacas se utilizó IBA 50 mg/L durante 24 horas y para las estaquillas AIB 20 mg/L durante 2 h. Luego se colocaron en sustrato, mezcla de tierra y perlita (6:4) y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero. Las variables consideradas para evaluar los resultados fueron porcentaje de estacas enraizadas y la formación de brotes.

### **MICROPROPAGACIÓN**

Para la micropropagación se utilizaron como explantes yemas, microestacas y hojas de *S. humboldtiana*. Las yemas se obtuvieron de las ramas de árboles adultos seleccionados del sitio de muestreo. Las microestacas (segmentos nodales) se obtuvieron de material adulto (ramas de árboles a campo) y material juvenil de estacas crecidas en invernadero (brotes de 4 o 5 meses). Las hojas fueron obtenidas de plántulas establecidas *in vitro* (Adema et al., 2009). Los explantes fueron acondicionados y desinfectados con distintos agentes y diferentes tiempos de inmersión para eliminar la contaminación microbiana, como se muestra en la Tabla 1. Luego se enjuagaron 3 veces en agua bidestilada estéril bajo campana de flujo laminar. En base a estudios exploratorios (Adema, 2010) se probaron las respuestas de los diferentes explantes en medios de cultivo Murashige-Skoog (Murashige & Skoog, 1962) y Woody Plant Medium (McCown & Lloyd, 1981) con la concentración completa de sus macro y micronutrientes o a la mitad de su concentración, con o sin reguladores de crecimiento (ácido naftaleno acético (ANA); bencil amino purina (BAP); ácido indol butírico (AIB) en diferentes concentraciones (Tabla 1). Se solidificaron con agar 7,5 g.L<sup>-1</sup> y se les agregó sacarosa al 2%.

El pH de los medios de cultivo se midió con pHmetro electrónico y se ajustó a 5.8 - 6,2 con hidróxido de sodio 1N y ácido cítrico. Los mismos se esterilizaron en autoclave a 120°C, durante 20 minutos y a 1 atmósfera de presión. Los cultivos fueron mantenidos en cámaras climatizadas, con iluminación LED (1,5 µmol/watt en radiación PAR) con 16 h de luz y 8 h de oscuridad. La temperatura se reguló en 21°C +/- 2°C. Las plantas completas obtenidas se aclimataron en envases de plástico (vasos plásticos y macetas) con sustrato estéril mezcla de tierra-perlita (6:4), se las cubrió con bolsas de nylon para mantener la humedad y se realizaron riegos semanales con agua corriente. Se mantuvieron en condiciones ambientales controladas de iluminación LED (1,5 µmol/watt en radiación PAR) con fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. El período de aclimatación fue de aproximadamente 8 semanas, durante el cual la humedad se fue reduciendo gradualmente, abriendo las bolsas hasta retirarlas. Luego se trasladaron a invernadero. Se evaluó la respuesta morfogénica: formación de brotes, raíz o callo (porcentaje), porcentaje de necrosis, contaminación y oxidación de los explantes.



**Figura 2**

*Ensayos de macropropagación de S. humboldtiana. Se utilizaron diferentes tamaños de estacas, tratamientos, sustratos y envases de acuerdo a lo explicado en Metodología.*

*A. Ensayo 1. Estacas de S.humboldtiana en sustrato constituido por una mezcla de tierra-perlita-vermiculita.*

*B. Ensayo 2. Estacas de S. humboldtiana en un sistema hidropónico.*

*C. Ensayo 3. Estaquillas de 0,1-0,2 cm de diámetro y 4-5 cm de largo. Se probaron dos sustratos: una mezcla de tierra-perlita y tierra-arena.*

*D. Material de propagación del ensayo 4.*

*E. Ensayo 4. Estaquillas de 30-35cm de largo y de 0,1-0,2 cm de diámetro en sustrato, mezcla de tierra y perlita (6:4).*

*F. Ensayo 4. Estacas de 30-35cm de largo y de 1 cm de diámetro en sustrato, mezcla de tierra y perlita (6:4).*

#### **EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COBRE DE ESTACAS DE SALIX HUMBOLDTIANA**

Con el objetivo de evaluar la capacidad de remoción de  $\text{Cu}^{+2}$  en solución, estacas enraizadas de *Salix humboldtiana* (10 individuos por tratamiento), fueron colocadas en diferentes concentraciones de Cu (1, 5, 10, 25 y 50  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{+2}$ ), en un sistema hidropónico, más un tratamiento testigo en ausencia del metal. Se colocaron 1000 mL de solución con la concentración de cobre correspondiente y el pH se ajustó a 5.5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y NaOH. El ensayo se realizó por el término de 20 días y fue muestreado el primer, segundo y sexto día de la 1° semana y luego semanalmente. Se tomaron muestras de 5 ml de la solución por cada tratamiento. Las mismas se filtraron con papel de filtro y se estabilizaron con 0,25 mL de  $\text{HNO}_3$  para su posterior análisis. La determinación del cobre presente en las mismas se realizó por espectrofotometría de absorción atómica utilizando Cuprizona (bis- ciclohexanona oxalildihidrazona) como reactivo (Rocha & Costa, 2006). Se midió la absorbancia las muestras tomadas y se transformaron estos valores a  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{+2}$  (ppm) y se graficaron en función del tiempo.

**Tabla 1**

**Acondicionamiento y desinfección de explantes y medios de cultivo para la micropropagación de *S. humboldtiana*.**

Ensayo	Tipo de explante	Acondicionamiento y desinfección de los explantes	Medios de cultivo
Ye	Yemas	Inmersión en fungicida benomilo 1000 mg.L <sup>-1</sup> durante 90 min, luego 1 minuto en etanol 70%, 20 min en hipoclorito de sodio comercial (55g.L <sup>-1</sup> ) 30% 2 enjuagues con agua bidestilada estéril. Las yemas fueron separadas de las secciones nodales, bajo condiciones estériles (campana de flujo laminar) y se les extrajeron las escamas protectoras con un bisturí.	MS o MS/2 sin reguladores de crecimiento o adicionados con BAP 1mg.L <sup>-1</sup> + ANA 0,5 o 1 mg.L <sup>-1</sup>
MA	Microestacas de material adulto	A. Lavado con agua corriente durante 5 minutos, Benomyl (2000 mg.L <sup>-1</sup> , 180 minutos) e hipoclorito de sodio comercial (55g.L <sup>-1</sup> ) 50 % (25 y 45 minutos). B. Cepillado con jabón blanco lavado con agua corriente durante 5 minutos. Inmersión en 2000 mg.L <sup>-1</sup> de fungicida benomyl durante 3 horas, hipoclorito de sodio comercial al 60 %, durante 50 minutos.	WPM sin reguladores de crecimiento o suplementado con BAP a diferentes concentraciones (0,1; 0,5; 1; 1,5; y 2 mg.L <sup>-1</sup> .)
MJ1	Microestacas de ramas juveniles de estacas en invernadero	Lavado con agua corriente durante 5 minutos y se desinfectaron con 1000 mg.L <sup>-1</sup> de fungicida benomyl durante 30 minutos y con cloro activo 2% (conversión al 2% de cloro activo utilizando hipoclorito de sodio comercial) durante 10 minutos.	WPM sin reguladores
MJ2	Brotos de 4 o 5 meses de estaquillas en invernadero	Lavado con agua corriente durante 5 minutos, se desinfectaron con 2000 mg.L <sup>-1</sup> de fungicida benomyl durante 60 minutos y con hipoclorito de sodio comercial al 30% adicionando 3 gotas de tween 20 durante 25 minutos.	WPM/2 sin reguladores de crecimiento.
Ho	Hojas de plántulas obtenidas <i>in vitro</i>		MS suplementado con BAP 1mg.L <sup>-1</sup> y ANA 0,5 mg.L <sup>-1</sup> . MS con 1mg/L <sup>-1</sup> de BAP y 1 mg.L <sup>-1</sup> de ANA
Callos	Callos obtenidos de hojas y microestacas <i>in vitro</i>		MS con BAP 1mg/L <sup>-1</sup> y ANA 0,5 mg.L <sup>-1</sup> .
Enraizamiento	Brotos formados <i>in vitro</i>		WPM adicionado con AIB 0,1 mg.L <sup>-1</sup> , WPM o WPM/2 sin reguladores de crecimiento

## RESULTADOS

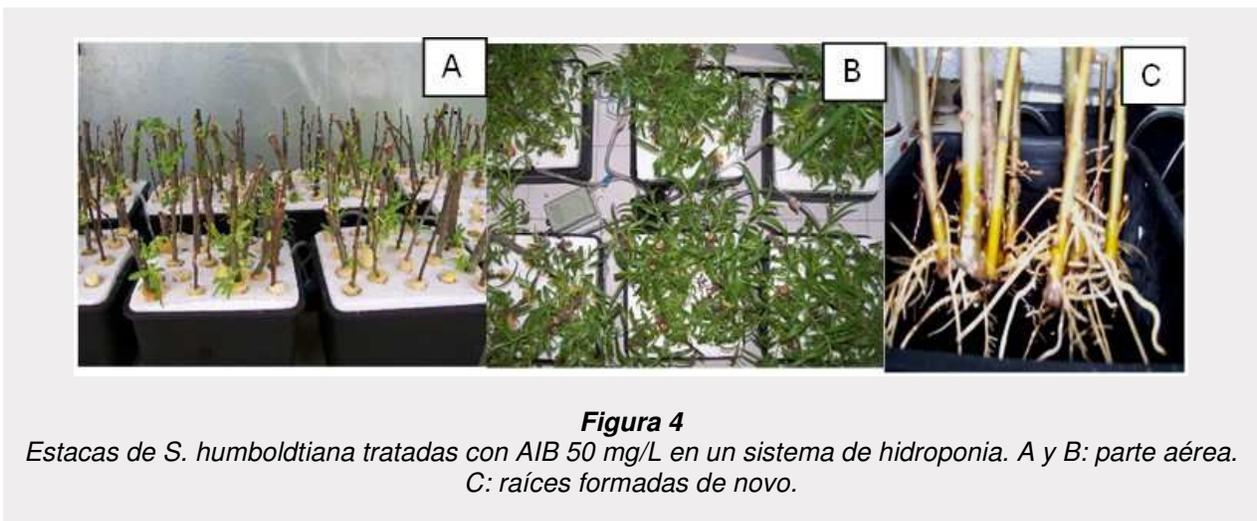
### MACROPROPAGACIÓN

El 100% de las estacas de *S. humboldtiana* que se colocaron en agua corriente (ensayo 1) formaron raíces a los 20 días. Estas estacas enraizadas se pasaron al sustrato donde formaron plantas completas normales (Figura 3).

El 95% de las estacas de *S. humboldtiana* que fueron tratadas con AIB 50 mg.L<sup>-1</sup> durante 24 horas en un sistema hidropónico (ensayo 2) formaron numerosas raíces normales y brotaron dando lugar a plantas completas (Figura 4).

En el ensayo 3, el 100% de las estaquillas brotaron. El 60% de las estacas sin aplicación de reguladores de crecimiento (testigo) y colocadas en tierra-arena enraizaron a los 20 días, contra un 40% de enraizamiento en sustrato tierra-perlita. Los tratamientos con AIB no indujeron un mayor porcentaje de enraizamiento en ninguno de los dos tipos de sustrato (40% enraizaron en tierra-arena y 30% en tierra-perlita). Las plantas obtenidas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero (Figura 5).

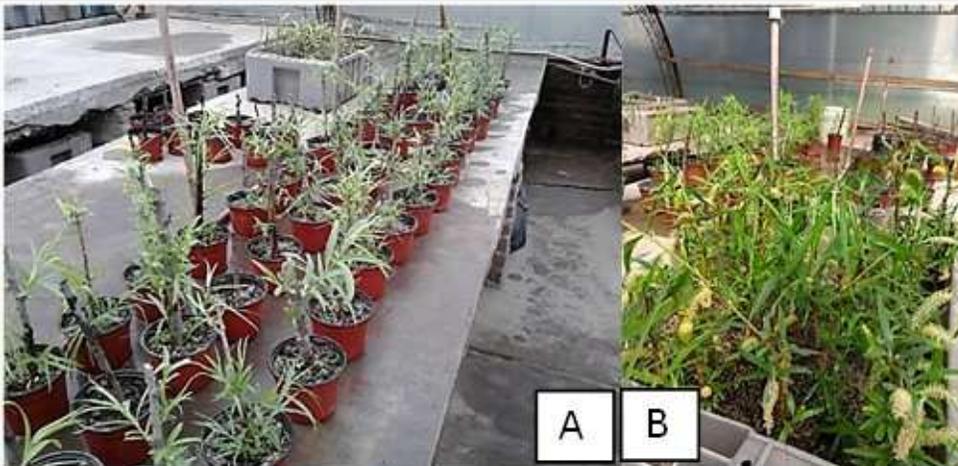
Ensayo 4. El 80% de las estacas y 90% de las estaquillas enraizaron y formaron plantas completas a los 25-30 días (Figura 6).





**Figura 5**

*Plantas obtenidas por estaquillado de *Salix humboldtiana* en sustrato tierra perlita y tierra-arena.*



**Figura 6**

*Plantas de *S. humboldtiana* obtenidas a partir de estacas (A) y estaquillas (B). Para las estacas se utilizó IBA 50 mg/L durante 24 horas y para las estaquillas, IBA 20 mg/L durante 2 h. Sustrato, mezcla de tierra y perlita (6:4).*

### **MICROPROPAGACIÓN**

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la introducción in vitro de diferentes explantes de *S. humboldtiana*, de acuerdo a los ensayos detallados en la Tabla 1.

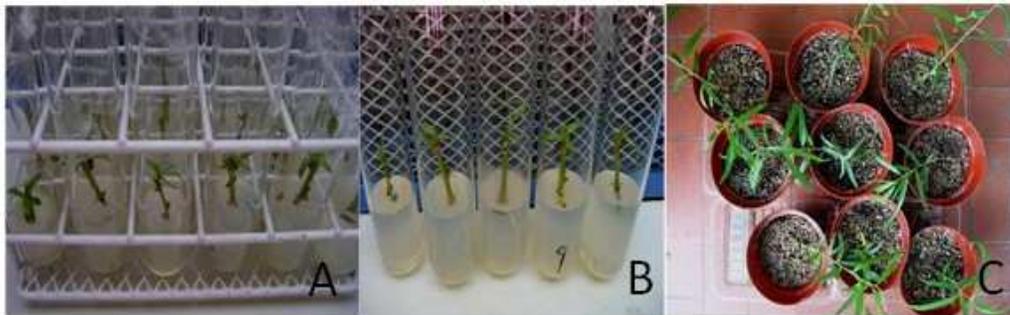
**Tabla 2**  
Resultados de la micropropagación de *S. humboldtiana*.

Ensayo	Porcentaje de contaminación	Respuesta
Ye	8% de contaminación, principalmente con hongos	El 65% de las yemas introducidas <i>in vitro</i> en un medio de cultivo MS/2 sin reguladores de crecimiento formaron brotes a partir de los meristemas preformados. No se observó la generación de brotes nuevos. El 100% de los brotes se oxidaron y necrosaron a los 40 días de cultivados <i>in vitro</i> .
MA	A. 60% de contaminación cuando se utilizó hipoclorito de sodio al 50% durante 45 minutos. 80-90% de contaminación cuando el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio fue de 25 minutos. B. 80-90% de contaminación con la desinfección ensayada	En los medios de cultivo WPM con BAP se formó callo organogénico en la base de los explantes. Los callos se subcultivaron a un medio de cultivo MS con BAP/ANA 1:0,5 mg/L donde dieron lugar a brotes de <i>novo</i> (organogénesis indirecta). Figura 7 D y E.  En el medio de cultivo WPM sin reguladores de crecimiento, el 100 % de los explantes brotaron a los 20 días (organogénesis directa) y enraizarona los 25-30 días en el mismo medio. Se obtuvieron vitroplantas que se aclimataron exitosamente. Figura 7 A, B y C.
MJ1	10 % de contaminación	El 90% de los explantes formaron brotes en un medio de cultivo WPM sin reguladores. La organogénesis fue directa, a partir de los brotes preformados. Figura 8
MJ2	Menor al 10 % de contaminación	A los 15-20 días en medio WPM/2 los brotes preformados elongaron. A los 30 días enraizaron en el mismo medio de cultivo y las plantas completas se rusticaron durante 50-60 días en un sustrato de tierra-perlita. Luego se pasaron a invernadero. La organogénesis directa se muestra en la Figura 9.
Ho		A los 35 días de cultivadas <i>in vitro</i> , las hojas formaron callos organogénicos en un medio de cultivo MS suplementado con BAP 1mg.L-1 y ANA 0.5 mg.L-1. Los callos se subcultivaron a un medio MS con BAP 1mg/L-1 y ANA 1 mg.L-1 originando brotes de novo. Los brotes obtenidos se subcultivaron a medio de enraizamiento WPM adicionado con AIB, 0,1 mg.L-1, donde formaron raíces a los 25 días. Figura 10.
Enraizamiento		100 % de enraizamiento en medio WPM o WPM/2 sin reguladores de crecimiento.



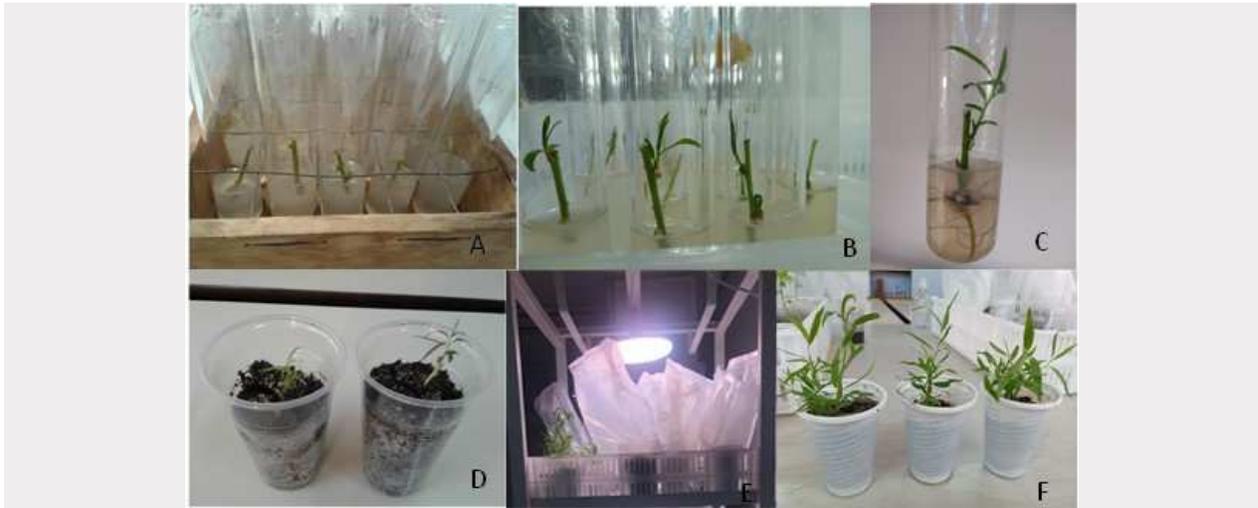
**Figura 7**

Ensayo MA (material adulto). Organogénesis directa e indirecta a partir de microestacas de material adulto de *S. humboldtiana*. A. Microestacas en medio de cultivo WPM sin reguladores de crecimiento, con yemas. B. Brotes preformados elongados y enraizados en el mismo medio de cultivo. C. Vitroplantas rusticadas. D. Callos formados en la base de microestacas en medio de cultivo MS con BAP/ANA 1:0,5 mg/L. E. Callo organogénico con brotes adventicios en medio de cultivo MS con BAP/ANA 1:0,5 mg/L.



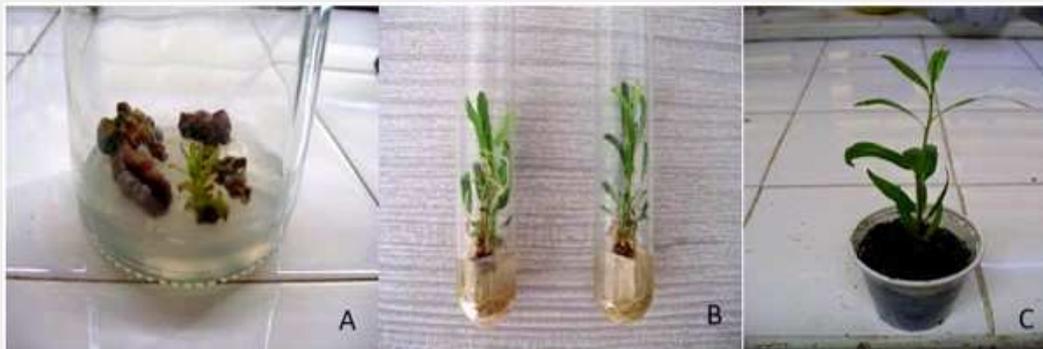
**Figura 8**

Ensayo MJ1. Organogénesis directa a partir de secciones nodales de material juvenil de estacas de *S. humboldtiana*. A. Secciones nodales con brotes. B. Microestacas con brotes y enraizadas. C. Plantas de *S. humboldtiana* rusticadas.



**Figura 9**

*Ensayo MJ2. Microestaquillado de *S. humboldtiana* a partir de secciones nodales de material juvenil de estaquillas en medio de cultivo WPM/2 sin reguladores de crecimiento. A. Microestacas. B. Microestacas con elongación de brotes. C. Microestaca enraizada. D. Vitroplantas. E. Vitroplantas en aclimatación. F. Plantas de *S. humboldtiana* aclimatadas.*



**Figura 10**

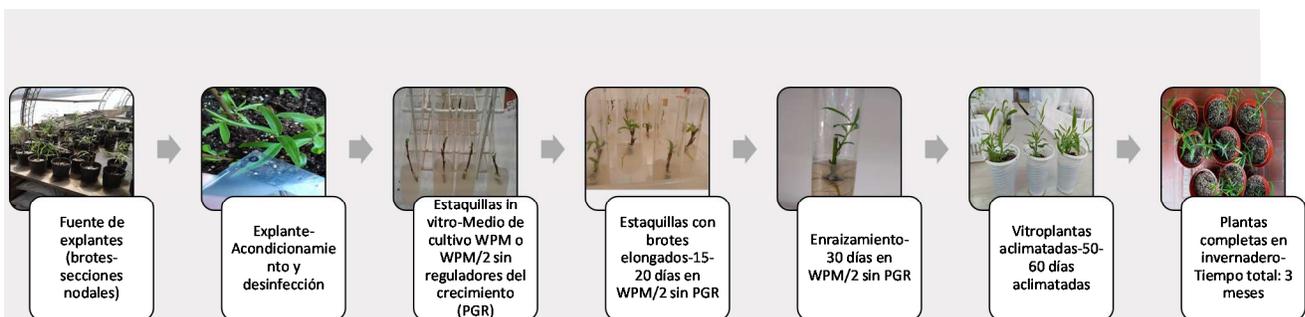
*Ensayo HO. Organogénesis indirecta a partir de hojas de *Salix humboldtiana* obtenida en un medio de cultivo MS suplementado con BAP 1mg.L<sup>-1</sup> y ANA 0.5 mg.L<sup>-1</sup>. Los callos se subcultivaron a un medio MS con BAP 1mg/L-1 y ANA 1 mg.L-1. A. Callos organogénicos. B. Brotes enraizados. C. Vitroplantas de *S. humboldtiana* aclimatadas.*

En la Tabla 3 se resumen las respuestas morfológicas obtenidas en cada medio de cultivo para cada uno de los explantes.

El protocolo optimizado para la micropropagación de *S. humboldtiana* comprende las etapas que se muestran en la Figura 11.

**Tabla 3**  
Medios de cultivo y la respuesta morfológica de explantes de *S. humboldtiana*.

Medio basal	Reg. de crecimiento	mg.L <sup>-1</sup>	Tipo de Explante	Respuesta morfológica
MS/2	-	-	Yemas de árboles adultos	Proliferación de yemas
MS completo	BAP/ANA	1:0,5	Hojas	Inducción de callo
MS completo	BAP/ANA	1:1	Hojas	Proliferación de brotes de <i>novo</i>
WPM	AIB	0,1	Brotes obtenidos <i>in vitro</i>	Enraizamiento
WPM	BAP	0,1; 0,5; 1; 1,5; 2	Microestacas	Inducción de callos
WPM/2	-	-	Microestacas	Crecimiento de brotes y enraizamiento



**Figura 11**  
Protocolo de la micropropagación por organogénesis directa de *S. humboldtiana*. Desde la introducción del explante *in vitro* hasta la obtención de plantas completas.

### EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COBRE DE ESTACAS DE *SALIX HUMBOLDTIANA*

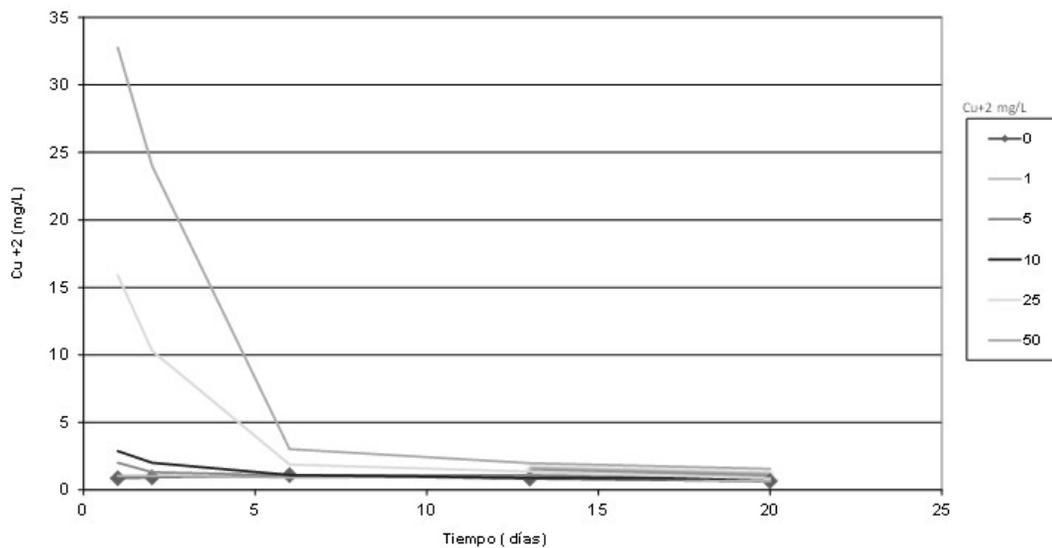
Se logró ajustar la técnica para la determinación de cobre utilizando Cuprizona como reactivo. En la Figura 12 se muestra el aspecto de la parte aérea de las plantas de *Salix humboldtiana* sometidas al ensayo exploratorio de tolerancia a diferentes concentraciones de cobre. Como puede observarse, tras la exposición a Cu, permanecieron con apariencia normal y en crecimiento activo, sin evidencia visual de toxicidad.

Se observó que, bajo las condiciones estudiadas, las concentraciones de Cu<sup>+2</sup> presentes en las muestras disminuyeron a lo largo del ensayo. Esta reducción de cobre en los diferentes tratamientos se observa durante los primeros 6 días de iniciado el ensayo y fue muy marcada en los tratamientos de 50 y 25 mg/L de Cu<sup>+2</sup>.

En la Figura 13 se muestra como la concentración de cobre se reduce a lo largo del tiempo (20 días).

**Figura 12**

Aspecto de la parte aérea de las plantas de *Salix humboldtiana* sometidas al ensayo de tolerancia a diferentes concentraciones de cobre.

**Figura 13**

Variación de la concentración de  $\text{Cu}^{+2}$  en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Ensayos con estacas enraizadas de *S. humboldtiana* colocadas en soluciones con 0 a 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de cobre durante 20 días.

## DISCUSIÓN

### MACROPROPAGACIÓN DE *SALIX HUMBOLDTIANA*

La macropropagación de *S. humboldtiana* se logró utilizando estacas con o sin aplicación de reguladores de crecimiento (estacas sumergidas en agua; estacas tratadas con AIB). Bajo las condiciones de experimentación de este trabajo, el enraizamiento de estacas en inmersión en agua (100% de enraizamiento) fue más eficiente que el uso de estacas y estaquillas tratadas con AIB (95% de enraizamiento), aunque ambos son sistemas eficaces. Los resultados obtenidos son coincidentes con los alcanzados por López et al., (2020) y Sorin et al. (2022). Los primeros ajustaron un dispositivo para el

enraizamiento de estacas de 20 cm de longitud y entre 1 y 2 cm de grosor de *S. humboldtiana* var *humboldtiana* de ambientes patagónicos sin asistencia hormonal para enraizamiento. Sorin et al. (2022) encontraron que en *S. viminalis*, el agua estimuló más de 15 raíces para esquejes de 20 y 25 cm, mientras que los reguladores de crecimiento ensayados inhibieron la formación de raíces. En este mismo sentido, Ragonese et al. (1969) reportan que el tratamiento de estacas de sauces con el AIB no produjo ventajas tan evidentes, como sí ocurrió con álamos. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por los autores citados y difieren de lo encontrado por Pereyro (2009), que logró 100% de enraizamiento de estacas de *S. humboldtiana* utilizando AIB 500 ppm, sin utilizar un sistema hidropónico y también con lo reportado por Giraldo & Ríos (2009) que indican que para enraizar barbados de *S. humboldtiana* es necesario utilizar enraizantes. El tamaño de las estacas puede influir en su capacidad de enraizamiento y en la disponibilidad de material de propagación. Existe escasa información científica sobre el tamaño adecuado de estacas a utilizar en la propagación vegetativa de *S. humboldtiana*. En este trabajo se utilizaron estacas de 30 cm de longitud y 0,8 cm de diámetro, obteniéndose un alto porcentaje de enraizamiento; el diámetro de las estacas es un poco menor al sugerido por Bardi et al. (2016), quienes determinaron que en *S. humboldtiana* es conveniente la utilización de estacas de diámetro mayor a 1 cm para la obtención de barbados de un año de raíz y uno de parte aérea, coincidiendo con el material utilizado por López et al. (2020). La técnica más común en árboles es el estaquillado y *S. humboldtiana* parecería no ser una excepción, ya que en el Ensayo 3 se observó la presencia de numerosos brotes y el 100% de las estaquillas brotaron. Uno de los sustratos más adecuados para el establecimiento de las mismas fue la mezcla de tierra- arena, coincidiendo con Cruz Aruni (2018), quien observó que para el enraizamiento de estacas de *S. viminalis* es recomendable la combinación con diferentes elementos en el sustrato, como tierra del lugar, turba, arena y estiércol.

#### **MICROPROPAGACIÓN DE SALIX HUMBOLDTIANA**

El protocolo de acondicionamiento y desinfección de los diferentes explantes fue eficaz para yemas y microestacas juveniles. El porcentaje de contaminación de las microestacas de material juvenil fue considerablemente menor (10%) que el proveniente de material adulto (80-90 %) por lo que se recomienda la utilización de material vegetal propagado por medio de estacas como fuente donante de explantes de esta especie. Para la propagación *in vitro* de especies leñosas es necesario utilizar material vegetal establecido en invernaderos que permitan reducir la incidencia de microorganismos patógenos y saprofitos y así obtener una respuesta rápida del explante. Varios reportes indican que cuando se realiza el establecimiento *in vitro* a partir de plantas madres leñosas cultivadas mediante el estaquillado en invernadero se logra mejorar la supervivencia de los explantes con menores índices de contaminación microbiana que cuando se utiliza material vegetal procedente directamente de campo (Jiménez Terry & Agramonte, 2013). En este trabajo probamos las respuestas de diferentes explantes (hoja, yemas, microestacas de material adulto y joven). La selección del explante es un aspecto clave para tener éxito en el cultivo de tejidos, ya que, dependiendo de su ubicación en la planta, del tipo de tejido que contiene, de su edad cronológica y fisiológica, de su contenido endógeno de hormonas, entre otros, se comportará de una manera o de otra. Las hojas formaron callo organogénico que dieron lugar a plantas completas en medios de cultivo MS con ANA/BAP. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores en otras especies de *Salix* (Stoehr et al., 1989; Guan et al., 2018; Xiaoxia et al., 2020). Sin embargo, utilizando segmentos foliares de *S. humboldtiana* cultivados en un medio WPM suplementado con ANA/AIB se obtuvieron solo raíces adventicias (De Paiva Neto et al., 1998; Santos et al., 2005). Si bien varios autores han reportado el éxito del uso del cultivo de tejidos vegetales para propagar diferentes especies de sauces (Chung & Carrasco, 2008), hay pocos reportes sobre la micropropagación exitosa de *S. humboldtiana* (Pereira et al., 2000; De Paiva Neto et al., 1998). En este trabajo se logró optimizar la micropropagación por organogénesis directa a partir de microestacas obtenidas de brotes de plantas clonadas por macropropagación, crecidas bajo condiciones de invernadero. La misma se indujo en un medio de cultivo WPM/2 sin reguladores de crecimiento. El proceso lleva 3-4 meses aproximadamente. Los medios de cultivo con reguladores de crecimiento como BAP promovieron la formación de callos en la base de la microestaca. El medio de cultivo WPM sin reguladores fue el medio más adecuado para la obtención de brotes y para el enraizamiento de las microestacas. Sin embargo, Pereira et al. (2000) utiliza como medio de cultivo las sales de MS, obteniendo la proliferación de brotes o la inducción raíces tanto de explantes de plantas adultas como de plántulas clonadas de *S. humboldtiana*. Bajo las condiciones de cultivo ensayadas, el uso de yemas como explante no dio buenos resultados. Las mismas se oxidaron y necrosaron. Esto difiere de los resultados obtenidos por Capuana et al. (2022) que ajustaron un protocolo

de micropropagación de tres ecotipos de *S. acmophylla*, a partir de yemas en un medio que contiene BA o carbón activado y Xiaoxia et al. (2020) que obtuvieron plantas de *S. matsudana* desde yemas apicales en un medio WPM suplementado con Zeatina y ANA. Si bien el explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas, siendo éstas las que mejor garantizan la clonación, en este trabajo no se pudo optimizar un protocolo de regeneración a partir de este tipo de explante. La oxidación es uno de los mayores problemas encontrados durante el desarrollo de procesos *in vitro* con especies leñosas. No obstante, en muchos casos se ha podido solucionar y los sistemas de propagación han logrado ser optimizados con éxito. Es necesario, para el caso de *Salix*, enfocar esfuerzos en la búsqueda de tratamientos que solucionen el problema oxidativo de las yemas, de manera que se pueda continuar y mejorar el desarrollo de un sistema de multiplicación a partir de este tipo de material. Sin embargo, pudimos multiplicar sauce criollo a partir de microestacas o secciones nodales con yemas, en un medio WPM/2 sin reguladores de crecimiento.

Se observó la formación de callos en las hojas y en la base de microestacas que provienen de material adulto, cuando se cultivan en un medio MS suplementado con BAP 1 mg.L<sup>-1</sup> y ANA 0,5 mg.L<sup>-1</sup>. La apariencia de los callos organogénicos fue translúcida, de color blanquecino, con áreas friables y compactas. Los callos organogénicos de *S. humboldtiana* dieron lugar a brotes en medio de cultivo MS con BAP 1mg/L<sup>-1</sup> y ANA 1 mg.L<sup>-1</sup>. Esto es similar a lo obtenido por Santos et al. (2005) que establecieron *Salix in vitro* a través de la inducción y formación de callos friables de explantes foliares inoculados en medio MS con auxinas y citocininas, indicando que es probable que los callos deriven de la región cambial aparentemente responsable de la acumulación de citocininas. Según Van Staden (1979), parece que los brotes en sí mismos no sintetizan citocininas pero tienen la capacidad de hidrolizar las formas de almacenamiento de la hormona, cuando se requieren para el crecimiento. Smith (2012), afirma que los callos se generan a partir de la zona de corte de los explantes, zona que está en contacto directo al medio con los reguladores de crecimiento que influyen en una acumulación de auxinas, estimulando una continua división mitótica que genera la formación de tejido calloso poco a poco hasta cubrir el explante en gran parte o por completo, y esto fue observado también en las hojas de *S. humboldtiana* introducidas *in vitro*. Si bien se han publicado varios estudios sobre la micropropagación clonal de *Salix* en los últimos 40 años, sólo cuatro estudios informaron los sistemas de cultivo de callos (Shahid & Anis, 2020). Nuestros resultados suponen un avance importante en la aplicación de técnicas biotecnológicas en programas de mejoramiento genético de sauce criollo, para futuras investigaciones en inducción de embriogénesis somática indirecta, organogénesis indirecta, rizogénesis, aislamiento de protoplastos, entre otros.

Las vitroplantas de *Salix* se aclimataron en sustrato mezcla tierra/perlita 6:4, en envases de plástico protegidas con bolsas de polietileno, regadas con agua corriente, durante 50-60 días (8 semanas) hasta que pasan a invernadero. El período de aclimatación fue suficiente para observar que las plantas pueden sobrevivir a la eliminación de un ambiente *in vitro* sin el uso de fertilizantes, fungicidas o antibióticos a diferencia de otros estudios, como el de Pereira et al (2000) que realizaron el riego con solución de ampicilina al 0,005% (v/v) para el mantenimiento de las vitroplantas. Otros estudios citados por Lyyra et al. (2006), tuvieron un período de aclimatación en el que la humedad se fue reduciendo gradualmente durante 2 a 6 semanas. En estos estudios, se utilizaron sustratos diferentes para el pasaje de las plantas a la condición de invernadero, fundamentalmente arena y tierra en diferentes proporciones. En nuestro trabajo el sustrato estéril compuesto por mezcla de 6:4 de tierra: perlita fue el más adecuado.

Los métodos de propagación no presentan una especificidad por cultivo, su aplicación varía con las características de las plantas y su objeto. Es por ello que cada protocolo para cada genotipo debe ser optimizado. Según Jiménez-Terry y Agramonte (2013), la macropropagación se utiliza principalmente en cultivos que se reproducen por vía asexual con elevados coeficientes de multiplicación y mayor rentabilidad de este método a diferencia de utilizar la costosa infraestructura inicial y gastos en reactivos de la micropropagación. Estos autores enfatizan en la necesidad de combinar estos métodos (macro y micro) para incrementar la eficiencia del proceso de reproducción a gran escala de las plantas. La combinación de estas vías de multiplicación y del corte de esquejes mediante podas sucesivas permite alcanzar mayor eficiencia y mejor respuesta de las plantas tanto para el cultivo *in vitro* como la plantación en campo de las plantas regeneradas.

#### **ESTUDIOS EXPLORATORIOS DE LA TOLERANCIA A Cu<sup>+2</sup> DE S. HUMBOLDTIANA**

Bajo las condiciones estudiadas, las concentraciones de Cu<sup>+2</sup> disminuyeron a lo largo del ensayo. La reducción de cobre se observó en los primeros 6 días de iniciado el ensayo y fue mayor cuando la concentración fue de 50 mg/L de Cu<sup>+2</sup>.

Los sauces en general, han mostrado un alto potencial para la fitoextracción de metales pesados. Algunos autores han estudiado la tolerancia a cobre y zinc (Zn) y el potencial de acumulación entre clones de sauce cultivados en una solución nutritiva tratada con 50  $\mu\text{M}$  de Cu o Zn (menor a las utilizadas en nuestro trabajo), respectivamente (Dos Santos Utmazian & Wenzel, 2007; Yang et al., 2020). Los resultados mostraron diferencias en la tolerancia y acumulación de Cu y Zn con respecto a diferentes especies/clones. La variación de la respuesta entre los clones a la exposición a Cu o Zn fue desde la estimulación del crecimiento hasta la inhibición, y todos los clones probados mostraron una mayor tolerancia a Cu que a Zn. Concluyeron que la mayoría de los clones de sauce son buenos acumuladores de estos metales. Por otro lado, Cao et al. (2018), evaluaron siete especies/clones de sauce por sus variaciones en la tolerancia y acumulación de cobre, cuando se expusieron a diferentes dosis en un sistema hidropónico durante 40 días. Tras la exposición a Cu, todas las especies/clones de sauces probados permanecieron con apariencia normal y en crecimiento activo, sin evidencia visual de toxicidad, al igual que las plantas de *S. humboldtiana*. Según los autores citados, la mayoría de Cu se acumula principalmente en las raíces. En la experiencia de tolerancia a cobre con plantas de *Salix humboldtiana* utilizamos diferentes concentraciones de  $\text{Cu}^{+2}$ . Kopittke et al. (2010), indica que un ensayo hidropónico debe contener al menos 4 concentraciones del metal a evaluar, incluyendo el testigo, por lo que se considera que el número de niveles utilizado en este ensayo (5) fue adecuado. *S. humboldtiana* también ha sido reportada como acumuladora de plomo, mercurio, arsénico, zinc y cadmio (Gomes et al., 2011b; Jara Peña et al., 2014; Camargo, 2019).

## CONCLUSIONES

*Salix humboldtiana* es la única especie de sauce nativa de América del sur y está en riesgo, por la alta hibridación con otras especies de sauces y la degradación de los ecosistemas nativos. Aunque la mayoría de los sauces pueden ser propagados fácilmente, es importante contar con diferentes estrategias para su propagación masiva, sobre todo cuando se necesitan clonar individuos de interés para la fitorremediación y reintroducción en ecosistemas degradados. En este trabajo ajustamos las técnicas de macro y micropropagación de *S. humboldtiana*. La micropropagación para la producción a gran escala se llevó a cabo utilizando tanto explantes de plantas adultas como de plántulas clonadas. Se utilizaron pocos insumos, lo que implica bajar el costo de su multiplicación. Esto destaca la factibilidad de la integración del cultivo *in vitro* y la macropropagación como vía para garantizar la sostenibilidad de la propagación de sauce criollo. Por otro lado, se evaluó la capacidad para absorber cobre de esta especie. En base a los resultados obtenidos, se pudo observar que disminuyó en el tiempo la presencia de Cu en la solución, con lo cual se asume que fue incorporado por la planta. El sauce criollo posee potencial de uso para la conservación, reintroducción, restauración ecológica o para fitorremediación. Diferentes factores como las presiones antrópicas sobre éstos ecosistemas donde crecen y el escaso conocimiento de los requerimientos para su propagación vegetativa, han generado la necesidad de implementar diferentes técnicas para su rescate. La macro y micro propagación de sauce nativo constituyen herramientas muy importantes para obtener un alto número de individuos necesarios para iniciar estrategias de recuperación de áreas contaminadas y para su conservación *ex situ*. Los ensayos realizados demuestran el potencial de *S. humboldtiana* para la eliminación de los iones cobre de soluciones acuosas. No obstante, es necesario profundizar los estudios y realizar nuevos ensayos de absorción de Cu para confirmar la capacidad y la estrategia fitorremediadora de la especie estudiada.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abedini, W.; M. Adema; J. Herrera; S. Sharry; B. Villarreal & N. Nikoloff (2008).** Recursos Forestales nativos de la provincia de Buenos Aires: la Biotecnología como una estrategia de conservación. III Congreso Nacional de Conservación de la Biodiversidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. CD ROM.
- Adema, M. (2010).** Caracterización, propagación y conservación de *Salix humboldtiana* (sauce nativo) para el desarrollo de estrategias de fitorremediación. Informe final beca de Estudio CIC. Periodo 2008-2010. 28 pp.

- Adema, M.; G. Curuchet; W. Abedini; S. Sharry; V. Briones; B. Villareal; M.A. Basiglio Cordal & G. Ciocchini (2010).** Estudio preliminar de la fitorremediación de cobre mediante *Salix humboldtiana*. VII Encuentro Latinoamericano y del Caribe sobre Biotecnología Agropecuaria. REDBIO MÉXICO 2010. pp 368.
- Adema, M.; W. Abedini; S. Sharry; B. Villarreal; N. Nikoloff & G. Ciocchini (2009).** Organogénesis indirecta de *Salix humboldtiana* Willd. VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO-Argentina" y "II Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal. La biotecnología y los futuros escenarios mundiales. Ediciones INTA. Ed. Silvia Artranz. Rosario, UNR Editora. pp. 87.
- Adema, M.; M. Basiglio Cordal; V. Briones; B. Villareal; G. Ciocchini; W. Abedini & S. Sharry, S. (2014).** Macro y micropropagación de *Salix humboldtiana*. *Salix babylonica*. Evaluación de la capacidad de remoción de Cu<sup>+2</sup>. Jornadas de Salicáceas 2014. IV Congreso Internacional de Salicáceas en Argentina. La Plata, Argentina. pp. 1-8.
- Amico, I.; L. Gallo; S. Li & C. Gallardo (2017).** Sauce criollo: rescate genético y cultural en la Provincia de Chubut. Forestal 30.
- Asensio, V.G.; F. Flórido; F. Ruiz; F. Perlatti; X.L. Otero & T.O. Ferreira (2018).** Screening of native tropical trees for phytoremediation in copper-polluted soils. International Journal of Phytoremediation 20(14): 1456-1463.
- Ball, J.; J. Carle & A. Del Lungo (2005).** Contribución de álamos y sauces a la silvicultura sostenible y al desarrollo rural. Revista Internacional de Silvicultura e Industrias Forestales 56.
- Bardi, J.; H. Borzone; C. D'Alfonso; R. Scaramuzzino; C. Villamil; J. Laddaga & G. Millione (2016).** Obtención de barbados de *Salix humboldtiana* (sauce criollo) destinados a su reintroducción en arroyos del centro de la provincia de Buenos Aires. Quebracho (Santiago del Estero) 24(1): 41-42.
- Bozzi, J.; P. Marchelli & L. Gallo (2014).** Sauce criollo: una especie nativa amenazada en Patagonia-INTA EEA Bariloche. Presencia 62: 1-5.
- Camargo, F. (2019).** Phytoremediation capacity of five native tree species from soils contaminated with heavy metals, in the Colombian Amazon. Revista sucreña de biología 21(2): 145-154.
- Cantera Kintz, J.R. (2005).** Investigación científica para la gestión ambiental integrada de espacios acuáticos compartidos, el desafío es pasar de las palabras a los hechos: El caso del río de La Plata y su frente marítimo (RPFM). Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 29(111) 255-269.
- Cao, Y.; Y. Zhang; C. Ma; H. Li; J. Zhang & G. Chen (2018).** Growth, physiological responses, and copper accumulation in seven willow species exposed to Cu-a hydroponic experiment. Environmental Science and Pollution Research 25(20): 19875-19886.
- Capuana, M.; W.G. Nissim & J.D. Klein. (2022).** Protocol for In Vitro Propagation of *Salix acmophylla* (Boiss.). Studies on Three Ecotypes. Forests 13(7): 1124.
- Carpanezzi, A. A.; F.R. Tavares & V.A. Souza (1999).** Informações sobre a estaquia do salseiro (*Salix humboldtiana* Willd.). Colombo: Embrapa Florestas. Circular Técnica, 33. 15 pp.
- Cedres Gazzo, M.N.; M. Vocos; D. Dalzotto; P. Boeri & S. Sharry (2019).** Ajuste de la desinfección de explantes de *Salix humboldtiana* Willd. (sauce nativo) para su introducción in vitro. X Encuentro Latinoamericano y Del Caribe De Biotecnología Agropecuaria Y XI Simposio Redbio Argentina. Libro de Resúmenes. Serie Técnica N°253. INIA pp 85.
- Cerrillo T. & A. Torres (2018).** Hacia la recuperación de la única especie nativa de sauces- INTA Noticias. Disponible en: <https://inta.gob.ar/noticias/hacia-la-recuperacion-de-la-unica-especie-nativa-de-sauces> Último acceso: septiembre 2022.
- Chung, P.G. & B.G. Carrasco (2008).** Micropropagación de *Salix* spp. a través de meristemas foliares. Instituto Forestal de Chile. Disponible en: <http://www.infor.cl/webinfor/PWSalix/Publicacion/Cultivo%20Invitro.htm> Último acceso: septiembre 2022.
- Cruz Aruni, H. (2018).** Enraizamiento de esquejes de sauce mimbre (*Salix viminalis* L. *mimbrera*) utilizando tres tipos de estaca apical, intermedia y basal en el vivero experimental Cipyca. Viacha departamento de La Paz. Tesis de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. 115 pp.
- De Paiva Neto, V.B.; R. Paiva & D.E. Furtado (1998).** Indução in vitro de raízes adventícias em explantes de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willdenow). Brazilian Archives of Biology and Technology 41(1): 82-87.

- Dickinson, N.M. & I.D. Pulford (2005).** Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environment International* 31: 609-613.
- Dimitriou, I. & P. Aronsson (2005).** Sauces para energía y fitorremediación en Suecia. *Revista internacional de silvicultura e industrias forestales* 56.
- Dos Santos Utmazian, M.N. & W.W. Wenzel (2007).** Cadmium and zinc accumulation in willow and poplar species grown on polluted soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 170(2): 265-272.
- Eevers, N.; J. White; J. Vangronsveld & N. Weyens (2017).** Bio-and Phytoremediation of Pesticide-Contaminated Environments: A Review. *Advances in Botanical Research* 83: 277-318.
- Evans, J. (2014).** Poplars and Willows--trees for society and the environment. *International Forestry Review* 16(4): 505+.
- Gallo, L.; A. Martínez; J. Bozzi; I. Amico & M. Hansen (2016).** Hacia el rescate genético del sauce criollo (*Salix humboldtiana*). Programa para su conservación y la restauración de ecosistemas ribereños patagónicos. *Presencia* 66: 13-17.
- Giraldo A. & H. Ríos (2009).** Efecto de dos enraizadores en tres especies forestales promisorias para la recuperación de suelos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 1: 41-47.
- Gomes, M.P.; T.C.L. Sáe Melo Marques de; G.H. Silva & A.M. Soares (2011a).** Utilization of willow (*Salix humboldtiana* Willd) as a species for phytoremediation of zinc industry waste. *Scientia Forestalis* 39(89): 117-123.
- Gomes, M.; T.C.L.L. Marques; G. Silva & A. Soares (2011b).** Utilization of Willow (*Salix humboldtiana* Willd) as a species for phytoremediation of zinc industry waste. *Scientia Forestalis* 39: 117-123.
- Guan, Q.; M. He; H. Ma; X. Liao; Z. Wang & S. Liu (2018).** Construction of genetic transformation system of *Salix mongolica*: in vitro leaf-based callus induction, adventitious buds differentiation, and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 132: 213-217.
- Jara Peña, E.; J. Gómez; H. Montoya; M. Chanco; M. Mariano & N. Cano (2014).** Capacidad fitorremediadora de cinco especies altoandinas de suelos contaminados con metales pesados. *Revista Peruana de Biología* 21(2): 145-154.
- Jiménez-Terry, F. & D. Agramonte (2013).** Cultivo in vitro y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales. *Biotecnología vegetal* 13(1).
- Kopittke, P.; F. Blamey; C. Asher & N. Menzies (2010).** Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review. *Journal of Experimental Botany* 61(4): 945-954.
- López, H.; E. Miranda; L. Datri; L. Boyero; A. Faggi & L. Gallo (2020).** Mejoras en el proceso de "cutting" o reproducción asexual de *Salix humboldtiana* Willd. (Salicaceae). Conferencia: 5° Encuentro REVINA (Red de Viveros de Plantas Nativas). Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/343810282\\_MEJORAS\\_EN\\_EL\\_PROCESO\\_DE\\_CUTTING\\_O\\_REPRODUCCION\\_ASEXUAL\\_Salix\\_humboldtiana\\_Willd\\_Salicaceae](https://www.researchgate.net/publication/343810282_MEJORAS_EN_EL_PROCESO_DE_CUTTING_O_REPRODUCCION_ASEXUAL_Salix_humboldtiana_Willd_Salicaceae). Último acceso: septiembre 2022.
- Lyra, S.; A. Lima & S. Merkle (2006).** In vitro regeneration of *Salix nigra* from adventitious shoots. *Tree physiology* 26: 969-75.
- Martínez, L.; A. Díaz & O. Vargas (2012).** Protocolo de Propagación de Plantas Hidrófilas y Manejo de Viveros para la Rehabilitación Ecológica de los Parques Ecológicos Distritales de Humedal. Grupo de Restauración Ecológica de la Universidad Nacional de Colombia y Secretaría Distrital de Ambiente. Bogotá, D.C., Colombia. 184 pp.
- Mashkina, O.; T. Tabatskaya; A. Gorobets & K. Shestibratov (2010).** Method of Clonal Micropropagation of Different Willow Species and Hybrids. *Applied Biochemistry and Microbiology* 46: 769-775.
- McCown, B.H. & G. Lloyd (1981).** Woody Plant Medium (WPM). A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. *HortScience* 16: 453-453.
- Menacho V. (2017).** Capacidad fitorremediadora de especies altoandinas para suelos contaminados por metales pesados procedentes de la compañía minera Lincuna Sac, en condiciones de invernadero, 2015-2016. Tesis de grado. Facultad de Ciencias del Ambiente, Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo". Huaraz, Ancash, Perú. 102 pp.
- Mleczek, M.; P. Rutkowski; I. Rissmann; Z. Kaczmarek; P. Golinski; K. Szentner; K. Strażyńska & A. Stachowiak (2010).** Biomass productivity and phytoremediation potential of *Salix alba* and *Salix viminalis*. *Biomass & Bioenergy* 34: 1410-1418.

- Murashige, T. & F. Skoog (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Naujoks, G. (2007).** Micropropagation of *Salix caprea* L. In: Jain, S.M., Häggman, H. (eds) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer, Dordrecht. pp: 213-220.
- Nissim, W.G.; E. Palm; C. Pandolfi; S. Mancuso & E. Elisa Azzarello (2021).** Willow and poplar for the phyto-treatment of landfill leachate in Mediterranean climate. *Journal of Environmental Management* 277.
- Ohlsson, A.B.; T. Landberg; T. Berglund & M. Greger (2008).** Increased metal tolerance in *Salix* by nicotinamide and nicotinic acid. *Plant Physiol Biochem* 46(7): 655-64.
- Paek, K.; Y. Kim; H. Moon; N. Hosakatte; Y. Choi & H. Cho (2008).** Micropropagation of *Salix pseudolasiogyne* from nodal explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93: 341-346.
- Parera, V. (2022).** Especies nativas de San Juan para fitorremediar suelos contaminados con metales pesados. Disponible en: <http://www.revista.unsj.edu.ar/?p=5353> Último acceso: septiembre 2022.
- Pereira, A.; B. Bertoni; R. Moraes & S. França (2000).** Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 2: 17-21.
- Pereyro, M. (2009).** Efecto de las auxinas sintéticas (IBA) aplicadas en solución, en la formación de raíces. Procesos fisiológicos en los que intervienen. Disponible en <https://prezi.com/cqujp4hbjqjs/rol-de-las-auxinas-en-el-enraizamiento-de-estacas-de-sauce/> Último acceso: septiembre 2022.
- Ragonese, A.; F. Rial Alberti & V. Sonvico (1969).** Enraizamiento de estacas de algunos cultivares de sauces y álamos. 30 pp. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/32796/Documento\\_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/32796/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y) Último acceso: septiembre 2022.
- Rocha, S.A.N. & A.C.S. Costa (2006).** Determinação espectrofotométrica de cobre em aguardente utilizando cuprizona (bis (ciclohexanona) oxalildihidrazona). 29a Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química. Disponible en: <http://sec.s bq.org.br/cdrom/29ra/resumos/T1125-1.pdf> Último acceso: septiembre 2022.
- Santos, B.; R. Paiva; C. Martinotto; R. Cravo Nogueira & P. Duarte de Oliveira Paiva (2005).** Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). *Ciência Rural* 35(3): 510-514.
- Shahid, A. & M. Anis (2020).** Callus Culture Systems in *Salix* L.: The Limited Database. En: Siddique, I. (eds) *Propagación y Manipulación Genética de Plantas*. Springer, Singapur. pp 83-91.
- Smart, L.B.; T.A. Volk; J. Lin; R.F. Kopp; I.S. Phillips; K.D. Cameron; E.H. White & L.P. Abrahamson (2005).** Mejora genética de los cultivos de sauce (*Salix* spp) con fines bioenergéticos y medioambientales en los Estados Unidos. *Revista Internacional de Silvicultura e Industrias Forestales* 56.
- Smith, R. (2012).** *Plant tissue culture: techniques and experiments*. 3 edición. Academic Press Elsevier. Londres. 187 pp.
- Sorin, D.; S. Gâdea; R. Vidican; M. Şandor; V. Stoian; A. Vâtcă; A. Horvath & V. Ancuța Stoian (2022).** Primary Growth Effect of *Salix viminalis* L. CV. Inger and Tordis in Controlled Conditions by Exploring Optimum Cutting Lengths and Rhizogenesis Treatments. *Sustainability* 14(15): 1-21.
- Stoehr, M.U.; C. Mantang & L. Zuffa (1989).** In vitro plant regeneration via callus culture of mature *Salix exigua*. *Canadian Journal of Forest Research* 19: 1634-1638.
- Van Staden, J. (1979).** Changes in the Endogenous Cytokinin Levels of Excised Buds of *Salix babylonica* L. Cultured Aseptically *Botanical Gazette* 140(2): 138-141.
- Wani, K.; S. Zube; M. Junaid & W. Jahanger (2020).** Phytoremediation of Heavy Metals Using *Salix* (Willows). *Bioremediation and Biotechnology* 2: 161-174.
- Xiaoxia, L.; S. Jinkai; Z. Jianguo; L. Ying & R. Guodong (2020).** Adventitious shoot regeneration from leaf and stem explants of *Salix matsudana* Koidz. *Bangladesh Journal of Botany* 49(2): 395-400.
- Yang, W.; F. Zhao; Y. Wang; Z. Ding; X. Yang & Z. Zhu (2020).** Differences in uptake and accumulation of copper and zinc by *Salix* clones under flooded versus non-flooded conditions. *Chemosphere* 241: 125059.