



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**



**Especialización en Manejo de Recursos Forestales  
Trabajo Final Integrador**

**Propagación de Pino Híbrido a partir de individuos genéticamente superiores y su  
aplicación práctica a la producción de plantines en vivero.**

**Alumna: Ing. Agr. Silvia Vila  
Docente orientador: Dra. María E. Gauchat**

**Corrientes, 2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), donde cursé mis estudios universitarios y de post-grado y donde me aceptaron para realizar la Especialización en Manejo de Recursos Forestales.

Al Dr. Pedro Sansberro por la organización y por preocuparse por traer a los mejores referentes del país para dictar cada módulo.

A todos mis compañeros de esta Especialización, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y acompañarme en cada módulo cursado y con quienes se forjó gran compañerismo y amistad. Y especialmente al Ing. Guillermo Perrotti por su constante acompañamiento.

A la Dra. María Elena Gauchat por haber aceptado ser mi asesora en esta tesis y por su importante guía en la realización

A mis hijos Agustina, Facundo y Ana Paula, quienes siendo niños entienden y respetan mucho mi trabajo y que como parte de ello tenemos que especializarnos siempre.

## RESUMEN

El pino híbrido (*Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*) ha demostrado superioridad respecto a otros pinos que se plantan en la zona. Las semillas que se utilizan para su propagación corresponden a una F2 y son muy costosas, y con frecuencia presentan problemas en la germinación y pierden rápidamente la viabilidad. Sin embargo, no existen muchos trabajos sobre clonación *in vitro* de este taxón. Por el momento no se visualiza la posibilidad de usar la técnica en programas de mejoramiento.

La regeneración de plantas *in vitro* del género *Pinus* por embriogénesis somática ha sido muy estudiada. Sin embargo, el establecimiento *in vitro* de plantas de este género a partir de brotes apicales y su multiplicación, han sido alternativas menos analizadas y en consecuencia se ha limitado la obtención de plantas regeneradas por organogénesis. El presente trabajo se realizó con el objetivo de presentar una revisión de la literatura científica sobre la propagación *in vitro* (principalmente por embriogénesis somática) del pino híbrido y sus especies relacionadas, incluyendo un análisis de cuáles podrían ser las principales vías de regeneración por cultivo *in vitro* de acuerdo a las aplicaciones requeridas, en base a la cual definir las posibles vías de regeneración en este taxón.

**Palabras claves:** pino híbrido, propagación vegetativa, embriogénesis somática, organogénesis

## ABSTRACT

Hybrid pine (*Pinus elliottii* var. *Elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*) has proved to be shown superior respect to other pines that are planted in the area. The seeds used for propagation correspond to an F2 and are very expensive, often present germination problems and rapidly lose viability. However, fear papers on *in vitro* cloning of this species and there is also no possibility of using the technique in breeding programs.

The regeneration of *in vitro* plants of the genus *Pinus* through somatic embryogenesis has been well studied. However, the *in vitro* establishment of plants of this genus from apical shoots and their multiplication have been less considered and, consequently, the production of regenerated plants by organogenesis has been limited. The present work was carried out

with the objective of presenting a review of the scientific literature on the *in vitro* propagation (mainly by somatic embryogenesis) of hybrid pine and its related species, including an analysis of what could be the main *in vitro* regeneration pathways according to the applications required, in order to define the possible regeneration pathways in this species.

**Keywords:** Hybrid pine, vegetative propagation, somatic embryogenesis, organogenesis

## ABREVIATURAS USADAS

ABA = ácido abscísico

ANA = ácido naftalenacético

BA = benciladenina

CA = carbón activado

KIN = cinetina

2,4- D = ácido 2,4- diclorofenoxiacético

IBA = ácido indolbutírico

LP = medio desarrollado por von Arnold and Eriksson (1982)

¼ MS = un cuarto de MS

MS = sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962)

SH = medio de Schenk y Hildebrandt (1972)

TDZ = thidiazuron

WP = medio de Lloyd y McCown (1980) (Woody Plant Medium)

DCR= medio de Gupta & Durzan (1985)

PEG= Polyethylen glicol

MSG= medio de Becwar *et al.* (1990)

BMS= medio modificado de Krogstrup (1986)

## INDICE

<b>Introducción.....</b>	<b>7</b>
<b>El Problema y sus Antecedentes.....</b>	<b>8</b>
<b>Materiales y Métodos a Emplear para Resolver el Problema.....</b>	<b>9</b>
1- Usando como material de partida embriones cigóticos maduros o inmaduros.....	9
Propuesta de protocolos de trabajo en pino híbrido para lograr embriogénesis.....	15
somática	
2- Usando como material de partida plantas juveniles.....	17
3- Usando como material de partida plantas adultas.....	18
<b>Conclusión.....</b>	<b>19</b>
<b>Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>20</b>

## INTRODUCCIÓN

Durante el cursado de la Especialización en Manejo de Recursos Forestales en varios módulos de la misma he podido constatar la importancia que actualmente toma, entre las especies exóticas utilizadas en plantaciones forestales, el pino híbrido (*Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, PEE x PCH).

Este híbrido ha sido desarrollado en Australia, en la década del 50, y alcanzó gran reconocimiento por el incremento de la productividad en plantaciones, a través de un amplio rango de ambientes presentes en dicho país (Nikles *et al.*, 1987). Además, el híbrido PEE x PCH combina mayor densidad de madera, resistencia a vientos y mejor rectitud de fuste de PEE, con las altas tasas de crecimiento y ramas más finas de PCH (Dieters, 1996). Estos híbridos fueron probados en muchas zonas subtropicales de países como: Brasil, Argentina, Sudáfrica (Nikles, 1991), Zimbabwe (Gwaze, 1999), Estados Unidos (Rockwood y Nikles, 2000) y China (Zheng, 2000).

En Argentina, los primeros antecedentes de introducciones de la F<sub>1</sub> de este híbrido, han sido registrados en la década del 80 (Barrett *et al.*, 1991) y han demostrado su superioridad respecto de *Pinus elliottii* y *P. taeda* en el noreste de Argentina y sur de Brasil (Pahr *et al.*, 2002, Barrett *et al.*, 1991). Tanto la F<sub>1</sub> como la F<sub>2</sub> producidas en Australia han expresado su alto potencial de crecimiento en la región mesopotámica, demostrando además extraordinarias cualidades de rectitud de fuste, diámetro de ramas y estructura de copa (Parh *et al.*, 2002; Cappa *et al.*, 2012). Las plantaciones con este híbrido se iniciaron hace poco más de 20 años y, si bien no se dispone de estadísticas precisas, se estima una superficie importante dada básicamente por plantaciones de empresas de Corrientes y Misiones (Enrique R. Zeni y Cía SACIAFei, Evasa SA, Las Marías SA, Forestal BDP SA, LIPSIA SA, PINDO SA). En los últimos 5-10 años, se ha producido un incremento de la tasa de plantación con estos materiales de 600-800 hectáreas por año.

Teniendo en cuenta la demanda creciente por esta entidad taxonómica y varios aspectos sobre la propagación de la misma, cabe destacar que el material seminal que se está usando en los viveros es difícil de conseguir (solo hay dos semilleros donde adquirir semillas F<sub>2</sub> del mismo), es costoso y además su viabilidad es baja. Por otra parte, al tratarse de una F<sub>2</sub>, las plantas muestran cierta variabilidad entre los individuos que conforman las plantaciones logradas.

La escasa producción de semilla híbrida F<sub>1</sub> ha determinado que se recurra a la multiplicación vegetativa de la descendencia F<sub>1</sub>. Si bien, actualmente se están utilizando técnicas de macropropagación para subsanar estos inconvenientes (González *et al.*, 2011) existen algunos antecedentes sobre el empleo de técnicas *in vitro* (González, 2010; González *et al.*, 2011; Vera Bravo *et al.*, 2011, 2014, 2016; Marum *et al.*, 2014), aún no se han logrado llevar a escalas operativas técnicas eficientes de micropropagación y embriogénesis somática en esta especie.

Por otro lado, en todo programa de mejoramiento también es sumamente importante el desarrollo biotecnológico, que incluye la incorporación de protocolos de micropropagación por organogénesis y embriogénesis somática. Actualmente, el INTA lleva adelante un programa de hibridación para la producción de pino híbrido en el cual se realizan ensayos de progenies de polinización controlada, donde se evalúa a campo el comportamiento de las mismas y se identifican familias o cruza con características sobresalientes. Actualmente hay más de 300 familias provenientes de cruzamientos controlados en evaluación (Belaber, 2016). Las mejores familias o individuos identificadas a través de análisis genéticos-cuantitativos podrían ser repropagadas mediante el uso de herramientas biotecnológicas (Gauchat *et al.*, 2005) si existieran los protocolos.

Teniendo en cuenta todo lo mencionado me he planteado muchas veces, y es lo que me motivó a elegir este tema, cuáles pueden ser los motivos por los que hasta el momento no existan técnicas eficientes de cultivo *in vitro* para la propagación de este taxón, o trabajos publicados en revistas con referato.

## **EL PROBLEMA Y SUS ANTECEDENTES**

El problema a resolver consiste en definir cuál sería el mejor sistema de propagación de pino híbrido y las posibilidades de poder desarrollarlo. Para lograrlo es primordial determinar cuál sería el material adecuado de propagación, es decir el material de partida y cuales los protocolos de cultivo de tejidos adecuados para su multiplicación. Con este propósito se revisó profundamente la bibliografía que existe en este taxón y particularmente aquellas especies relacionadas, sobre el cultivo de tejidos tratando de definir posibles combinaciones de metodologías para una estrategia de propagación efectiva del híbrido.

Si bien, los protocolos se podrían estudiar con cualquier material vegetal del pino híbrido, este debería ser reproducible en el material elite. Es decir, hasta la obtención del material genético de partida, se podría estudiar el protocolo con otras semillas o plantas de esta entidad híbrida para luego repetirlo con el material elite. Finalmente, se deberían definir cuáles podrían ser los ensayos preliminares de micropropagación, por embriogénesis somática o por organogénesis, a evaluar en esta especie.

La existencia de protocolos que ayuden a solucionar la problemática de propagación de esta especie por cultivo de tejidos sería importante para comenzar con la parte práctica de ensayos. El desarrollo de un sistema de propagación *in vitro* es importante no solo desde el punto de vista de la multiplicación de material elite, sino también debe complementarse con otras áreas como el mejoramiento genético, transformación, conservación y crio-conservación.

## **MATERIALES Y MÉTODOS A EMPLEAR PARA RESOLVER EL PROBLEMA**

Se realizó una revisión bibliográfica con el fin de encontrar las posibles soluciones al problema, como por ejemplo, se trató de definir cual sería el mejor material de partida pensando en la finalidad perseguida y genética requerida. Entre los materiales vegetales se evaluaron los siguientes: embriones cigóticos maduros e inmaduros; plantas juveniles y árboles adultos.

Por otra parte, se buscaron en la bibliografía existente, los protocolos desarrollados de propagación en este taxón y de sus especies relacionadas. También se recurrió a algunas consultas a profesionales de diferentes instituciones, INTA y Facultad de Cs. Agrarias que estén trabajando con la especie. Finalmente, con la información recolectada se definió la mejor alternativa de propagación teniendo en cuenta la necesidad de clonación en forma masiva.

### **1- Usando como material de partida embriones cigóticos maduros o inmaduros**

Si bien hay algunos trabajos en pino híbrido realizados a partir de embriones cigóticos maduros (Meyer, 1998; Fortes *et al.* 2014) en ellos se obtienen plantas a través de la organogénesis directa, lo cual es muy bueno pero requiere de varios pasos para llegar a obtener

plantas completas. Sin embargo, con este tipo de explante o con embriones cigóticos inmaduros se podría aspirar a lograr la embriogénesis somática, proceso que no ha sido desarrollado completamente para este taxón, con el cual se obtendrían plantas completas en un solo proceso. A su vez se podría estudiar el modo de inducir a los embriones cigóticos a diferenciar embriones somáticos de forma directa o a través de una fase de callo. Sería también interesante estudiar la posibilidad de que esos embriones somáticos o callos embriogénicos continúen diferenciando embriones o callos embriogénicos al ser transferidos a nuevos medios de cultivo y que puedan ser mantenidos en el tiempo, con la finalidad de producir plantas de manera masiva durante todo el año bajo condiciones controladas. La embriogénesis somática es frecuentemente reconocida como el mejor sistema de micropropagación, principalmente porque ambos meristemas, caulinar y radicular, están presentes simultáneamente, lo que posibilita la encapsulación de los mismos para la producción de semillas sintéticas. Por otra parte, la embriogénesis somática es ampliamente considerada como un sistema eficiente para la aplicación de técnicas de preservación de germoplasma, transformación genética y mejoramiento en especies leñosas (Park *et al.*, 1998; Minocha y Jain, 2000).

La embriogénesis somática en algunas especies de coníferas fue reportada por primera vez hace más de 20 años. Desde entonces, se ha producido una explosión de investigaciones destinadas a desarrollar y optimizar protocolos para la regeneración eficiente de plántulas. Aunque rutinariamente se utiliza tanto como medio de propagación o como un sistema modelo valioso para investigar los eventos estructurales, fisiológicos y moleculares que ocurren durante el desarrollo del embrión, la embriogénesis *in vitro* sigue siendo problemática para algunas especies de coníferas. Los principales problemas incluyen un bajo número de embriones generados y una baja frecuencia de embriones maduros capaces de convertirse en plántulas viables. Hasta los últimos años, a pesar de que la embriogénesis se compone de una secuencia de pasos definidos que incluyen inducción de masas o callos embriogénicos, proliferación de tejido embriogénico, maduración embrionaria y germinación, los intentos de mejorar todo el procedimiento se han realizado casi exclusivamente durante la etapa de maduración. Esta estrategia se basó en el supuesto de que la regeneración exitosa está relacionada con los tratamientos proporcionados durante el desarrollo de los embriones. En los últimos 2 años, sin embargo, en trabajos con especies de bosques templados como las del género *Abies*, se ha demostrado claramente que los primeros acontecimientos en la embriogénesis son cruciales para la finalización con éxito del programa embriogénico global. El uso de técnicas de seguimiento de células, implementadas por estudios fisiológicos y

moleculares, ha revelado que las manipulaciones de las condiciones de cultivo temprano en el proceso pueden aumentar tanto el número como la calidad de los embriones producidos en cultivo. La embriogénesis somática se ha desarrollado exitosamente en numerosas especies de gimnospermas (Filonova *et al.*, 2000; Pullman y Bucalo, 2011; Jain *et al.* 1995), y estos procesos podrían ser usados como modelo o guía para los estudios que se realicen en pino híbrido.

Si bien, el protocolo de embriogénesis somática ha sido reportado en un solo trabajo para el pino híbrido, sí se ha desarrollado tanto para *P. elliotii* como para *P. caribaea*. Por lo tanto, analizando estos trabajos se podría definir un posible protocolo para el híbrido. La regeneración por cultivo *in vitro* de *P. elliotii* ha sido muy difícil, motivo por el cual hay pocos trabajos publicados sobre embriogénesis somática en esta especie, a pesar de que este proceso fue descrito por primera vez en *P. elliotii* hace más de 25 años (Jain *et al.*, 1989). En dicho trabajo se usaron como explantes embriones inmaduros aislados de conos en varias etapas de desarrollo, y se observó que cuando los embriones inmaduros eran inferiores a 1 mm no producían callos y en la mayoría de los casos sólo las células suspensoras eran visibles.

Por otra parte, los embriones cigóticos bien desarrollados con cotiledones (3-5 mm de largo) comenzaban a hincharse y la mayoría de ellos tampoco producían callos, incluso después de varios subcultivos en medios frescos. Sin embargo, los embriones cigóticos inmaduros de aproximadamente 1 mm de longitud formaron callos mucilaginosos blancos y translúcidos, sueltos y brillantes y parecían desarrollarse a partir de las células del suspensor (Jain *et al.*, 1989).

En coníferas, la morfología del callo embriogénico presenta estas características.

Según Jain *et al.* (1989), los medios más adecuados fueron WPMG con 20 uM 2,4-D + 5 uM BAP + 250 mg/L glutamina y MNCI con 50 uM 2,4-D + 20 uM BAP + 20 uM kinetin + 450 mg/L glutamina, los cuales fueron adecuados para la inducción de la embriogénesis somática en *P. elliotii*. Sin embargo, la frecuencia de formación de callos embriogénicos fue bastante baja. Para el desarrollo de embriones somáticos, los callos embriogénicos se subcultivaron en medios frescos con menores cantidades de hormonas, y fueron mantenidos en la oscuridad. Si bien, no se observaron masas embriogénicas sí se formaron algunos embriones somáticos.

Posteriormente, el anterior protocolo fue mejorado por el mismo equipo de trabajo (Newton *et al.*, 1995). En este caso, usaron para la inducción el medio basal DCR con 9 uM de 2,4-D + 4,4 uM de BAP. Después de varios pasajes, los niveles de hormonas y el medio

basal se redujeron a una décima parte (DCR/10) de sus niveles originales para el mantenimiento a largo plazo y la proliferación de tejido embriogénico. Los tejidos embriogénicos proliferaron rápidamente, y mantuvieron su estado embriogénico y su potencial indefinidamente en el medio de mantenimiento. Debido a que el protocolo anterior estaba asociado con la maduración de *Pinus elliottii* (Jain *et al.*, 1989) y no dio lugar a la regeneración de las plántulas, en este caso se usaron medios con carbón activado, que se utilizan a menudo para eliminar los reguladores de crecimiento en exceso. El carbón activado condujo a la maduración de los embriones somáticos de *P. elliottii*, lo que sugirió que el exceso de ambas auxinas y citoquininas pudo ser inhibidores de la maduración. El BA mejoró la maduración junto con ABA, pero también se vió que podía prevenir la maduración adicional y germinación en la etapa de plántula. Luego las plantas fueron obtenidas en medios libres de hormonas.

En otros estudios sobre embriogénesis somática en *P. elliottii* los gametófitos femeninos y embriones cigóticos inmaduros recogidos en diferentes etapas de desarrollo se cultivaron sobre medios de iniciación con diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento, obteniéndose los mejores resultados sobre medio LPM con 0,25  $\mu$ M BAP, 0,25 $\mu$ M KIN, 1 $\mu$ M 2,4-D, 2  $\mu$ M ABA (Gupta y Durzan, 1987). En este trabajo se hizo mayor referencia a los tipos de células que daban origen a los callos embriogénicos, y se determinó que las masas de células suspensoras embrionales extruidas a partir de explantes del gametófito, producían callos blancos o translúcidos y mucilaginosos pero en baja frecuencia. Por otra parte, se observó una variación en la frecuencia de extrusión entre las fuentes de semillas. Se determinó que, a mayor madurez del explante las tasas de extrusión de células fue más reducida. Se agruparon cuatro tipos de extrusiones según su morfología. El tipo de extrusión que produjo el mayor número de cultivos embriogénicos de larga supervivencia fue asociado con una extrusión en la que la totalidad de la masa embrionaria del suspensor se produjo fuera del gametofito. Los otros tres tipos de extrusión tuvieron menos establecimiento y supervivencia en los cultivos (Liao y Amerson, 1995).

Posteriormente, Wei *et al.* (1997) obtuvieron callos embriogénicos a partir de embriones cigóticos inmaduros de *P. elliottii* cuando los mismos fueron cultivados en medio LP con 8 mg/L de 2,4 D y 4 mg/L de BA, mientras que la multiplicación se consiguió en medio LP con 1 mg/L de 2,4 D y 0,5 mg/L de BA. Se formaron masas suspensoras embrionarias y proembriones en estadio temprano, a partir de callos embriogénicos cultivados en medio de alta presión osmótica. Los embriones cultivados en esta etapa temprana desarrollaron en embriones cotiledonares en medio LP suplementado con 4 mg/L de ABA , 75 g/L de PEG y

5 g/L de carbón activado. Los embriones somáticos maduros germinaron en medio libre de hormonas. Aunque la frecuencia de conversión de embriones somáticos en plántulas no fue muy elevada.

En trabajos posteriores, se estudiaron los estados de desarrollo de los embriones cigóticos usados como explantes, determinándose similares resultados a los publicados por Jain (1995). En este caso los mejores medios de iniciación fueron LP + 2,4-D 2,2 mg/L + 6-BA 1,0 mg/L y DCR + NAA 2,0 mg/L + 6-BA 0,63 mg/L + KT 0,61 mg/L, en el que las tasas de iniciación de embriones somáticos fueron del 24% y del 22,75%, respectivamente. Con AgNO<sub>3</sub> y tampón de pH se mejoró la tasa de iniciación de embriones somáticos (Wu, 2009).

En trabajos más actuales se lograron masas embriogénicas de *P. elliottii* a partir de embriones cigóticos inmaduros. En este caso, el medio óptimo de proliferación contenía medio DCR + 1,0 mg/L de NAA + 0,32 mg/L de 6 BA + 0,30 mg/L de KT. Para su maduración, posteriormente, los embriones fueron transferidos a LP + 50 mg/L de ABA + 20% de PEG6000 + 6% de sacarosa + 2,5 g/L de CA. Sin embargo, no se obtuvieron embriones maduros (Wu, 2010).

Los resultados anteriores motivaron la realización de trabajos sobre identificación y estudio de los factores críticos que afectaban a la maduración de los embriones somáticos (Wu *et al.* 2013). Wu *et al.* (2013) observaron que la presencia de PEG de diferentes pesos moleculares en diferentes concentraciones con ABA y CA en el medio, afectaba la embriogénesis somática tanto cualitativa como cuantitativamente, y determinaron que el medio más conveniente para la maduración de embriones consistía de LP + ABA70mg/L + PEG 8000 150g/L + maltosa 60g/L + AC 2,0 g/L + agar 3,0 g/L. En el mismo, obtuvieron embriones en estado cotiledonar.

En los trabajos publicados sobre el tema, se puede observar que si bien comparten similitudes, sobre todo en cuanto a el estado de desarrollo de los explantes utilizados, en general hay variabilidad con respecto a los medios de cultivo y se aprecia la dificultad para lograr un sistema óptimo de propagación por embriogénesis somática en *P. elliottii*.

En los primeros trabajos sobre la embriogénesis somática en *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* también se utilizaron como explantes embriones cigóticos inmaduros (Laine and David, 1990). Sin embargo, también se pudo obtener este proceso a partir de embriones cigóticos maduros (Malabadi *et al.* 2011). En el primer caso, los callos logrados de esta etapa de desarrollo del explante podían ser subcultivados durante más de diez meses y conservaban su capacidad embriogénica. En general, en el género *Pinus* responden mejor los explantes en etapa de desarrollo muy temprana del embrión cigótico, es decir, en la etapa de poliembriónía

(Gupta and Durzan, 1987; Hugues-Jarlet, 1988). Mientras que, en el género *Picea* las mejores respuestas del explante se ven en una etapa más avanzada del desarrollo embrionario, pero todavía inmaduro (Hakman and von Arnold, 1985; Hugues-Jarlet, 1988). Incluso los embriones maduros o los cotiledones de algunas plántulas de pocos días de edad fueron sensibles y mantuvieron la capacidad embriogénica (Von Arnold, 1987; Krogstrup, 1986).

Por otra parte, Laine y David (1990) determinaron que los mejores medios para la proliferación de callos embriogénicos en *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis*, fueron BMS con 10 uM 2,4-D y 5 uM zeatina y DCR pero con 10 g/L sacarosa, 20 g/L glucosa, 10 g/L maltosa, 1 g/L glutamina, myo-inositol y caseína hidrolizada, 600 mg/L MES, 5 uM 2,4-D y 2 uM BA. Sin embargo, la respuesta variaba dependiendo de las líneas de callos, ya que diferentes líneas de callos (diferentes genotipos) expresaron distintas necesidades nutricionales para el crecimiento. Los embriones que llevaban cotiledones bien diferenciados se recuperaron después de la transferencia de callos sobre un medio modificado de Hakman y Von Arnold (1985) suplementado con ácido abscísico y desprovisto de nitrógeno orgánico.

Las plántulas enraizadas se obtuvieron después de la transferencia a un medio libre de hormonas. También en este trabajo, se obtuvo la embriogénesis somática a través del cultivo de los protoplastos, después de 5 meses de su aislamiento de suspensiones de células embriogénicas. Similares resultados fueron obtenidos por David *et al.* (1995) logrando además, realizar la crioconservación de las masas celulares embriogénicas. Durante el recultivo, se produjeron nuevas células tipo suspensor, después de unas semanas, se obtuvo tejido embriogénico y los embriones somáticos regenerados se desarrollaron de una manera similar a los cultivos no congelados.

En el estudio realizado por Malabadi *et al.* (2011), se destaca la exitosa estimulación mediada por brassinoloide en la embriogénesis somática de distintos genotipos de *P. caribaea* a partir de embriones maduros. Los brasinoesteroides, que incluyen brassinoloide, son un grupo relativamente nuevo de reguladores de crecimiento de plantas que se encuentran en muchas especies vegetales. En este trabajo se logró aumentar la formación de tejido embriogénico con 24-epibrassinoloide a 2,0 uM y 9 uM de 2,4-D adicionado al medio basal MSG diluido a la mitad. Los tejidos embriogénicos blancos y mucilaginosos fueron transferidos al medio de mantenimiento (MSG con 130 mM de maltosa, 4 g/L de goma vegetal, 2 uM de 2,4-D y 0,5 uM de 24-epiBr) donde los pro embriones que se formaron no continuaron su desarrollo hasta que fueron transferidos a medios con maltosa y ABA, y posteriormente germinaron en el medio MSG diluido a la mitad y libre de hormonas.

Similares resultados en cuanto a la embriogénesis somática se obtuvieron en *Pinus wallichiana* cuando se usó 24-epiBrassinolide en los medios de cultivo (Malabadi y Nataraja, 2007). Además, se ha demostrado que se mejoraron los porcentajes de iniciación de tejidos embriogénicos de *Pinus taeda*, *Pseudotsuga menziesii* y *Picea abies*. Mediante el uso de brassinolide se mejoró la iniciación en el *P. taeda*, que es a menudo recalcitrante para los genotipos deseables (Pullman, 2003).

***Propuesta de protocolos de trabajo en pino híbrido para lograr embriogénesis somática***

***Tipo de explante:*** gametófitos femeninos y embriones cigóticos inmaduros cultivados semanalmente posterior a la polinización, en diferentes estadios de maduración del embrión (siguiendo hasta la maduración del embrión cigótico)

***Medio de iniciación:*** Ensayos con medio basal DCR, LP, MSG

Combinaciones de hormonas, 2,4-D desde 0,1 – 15 mg/L; BAP y KIN desde 0,1 hasta 10 mg/L. Repetir todo con adición de Brassinolide (Cuadro 1).

De lograrse callos embriogénicos, usar medios de mantenimiento y multiplicación con el mismo medio basal de origen diluido o no y disminuir las concentraciones de hormonas. Para la maduración de embriones, usar ABA y carbón activado. Posteriormente, inducir la germinación en medios libres de hormonas (Fig. 1)

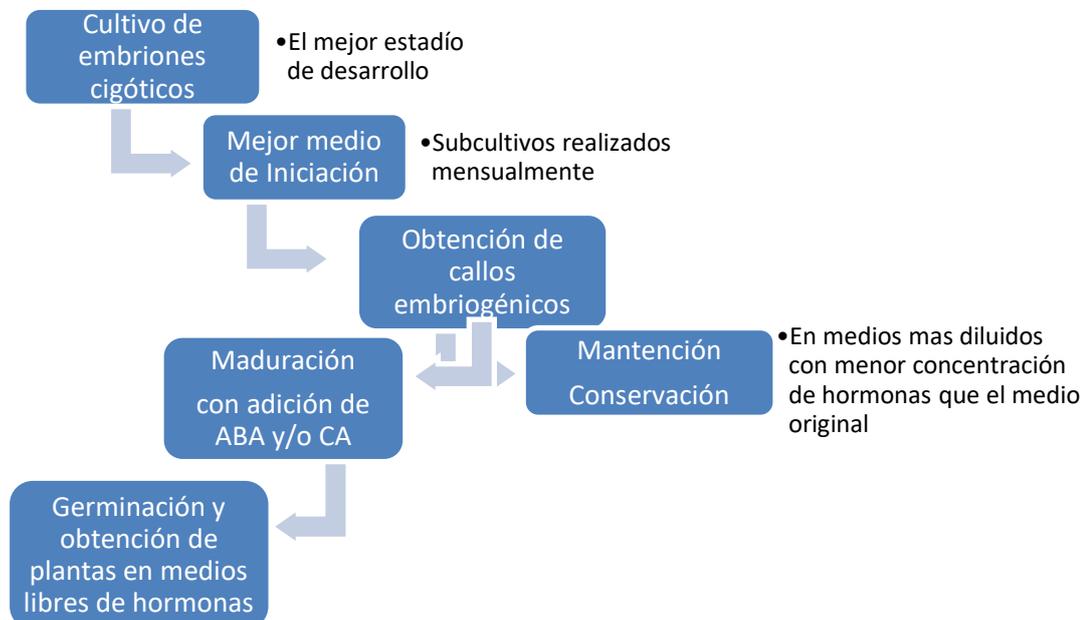
Cuadro 1. Explantes, medios de iniciación y combinaciones de hormonas a utilizar

Medios Basales	2,4-D (mg/L)	BAP y KIN (mg/L)
		0,1
	0,5	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
DCR	1	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	1,5	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	5	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	10	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	15	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
		0,1
LP	0,5	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	1	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	1,5	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	5	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	10	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	15	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
MSG	0,1	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	0,5	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	1	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	1,5	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	5	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	10	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10
	15	0,1; 0,5; 1; 1,5; 5; 10

**Explante: embriones cigóticos en varios estados de desarrollo (Estróbilos cosechados desde la segunda quincena de noviembre hasta la primer semana de diciembre)**

**Repetir todo con adición de Brassinolide**

Fig. 1. Esquema de las etapas consideradas en la metodología desarrollada



## 2- Usando como material de partida plantas juveniles

Cuando la regeneración de plantas por cultivo *in vitro* pasa por una fase de callo, previo a la diferenciación de embriones somáticos o a la producción de brotes adventicios y la eventual formación de plántulas, pueden inducirse variaciones genéticas conocidas como variación somaclonal (White, 2007). Esto puede ser deseable si se busca variabilidad para mejorar la especie, pero no si se desea clonar un individuo. Las mutaciones son menos propensas a ocurrir en la propagación por cultivo *in vitro* a partir de brotes o yemas, que continúan su crecimiento sin pasar por una fase de callo, y por lo tanto manteniendo las características de la planta madre.

En la bibliografía consultada sobre el pino híbrido solamente se han encontrado dos trabajos en cultivo *in vitro* de brotes de plantas jóvenes (González, 2010; Chengqun y Baoling Huang, 2012). El trabajo de González (2010) reporta resultados acerca del proceso de organogénesis logrado a partir de segmentos nodales de plantines de vivero.

En el estudio llevado adelante por Chengqun y Baoling Huang (2012) fue posible obtener plántulas con éxito a través del cultivo *in vitro* de tallos tiernos de plantas de *P. elliottii* × *P. caribaea* de 5 años de edad. En el mismo, se optimizaron las condiciones de crecimiento *in vitro*, determinando que los mejores explantes fueron los fragmentos a 1,5 ~ 3,0 cm de la parte superior del tallo que fueron cultivados en medio DCR suplementado con 2,0 mg/L de BA, 0,10 mg/L de NAA y 30 g/L de sacarosa, obteniéndose una tasa de diferenciación temprana de 43,7%. Si bien los tallos cultivados en el medio basal DCR han tenido la tasa de inducción promedio más alta, también fueron aceptables los resultados obtenidos en los otros medios basales probados ½MS, WPM, GD (con las mismas hormonas).

Para la propagación de los brotes adventicios logrados, estos se subcultivaron al medio DCR suplementados con 2,5 mg/L de BA y 0,2 mg/L NAA dando una tasa de propagación de 96,7% y 6,2, respectivamente (Chengqun y Baoling Huang, 2012). Posteriormente, la elongación de brotes adventicios se logró en el medio DCR suplementado con 0,3 mg/L de NAA, 1,5 g/L de carbón activado y 20 g/L de sacarosa, donde la tasa de propagación fue de 444,6%. Finalmente, para el enraizamiento los brotes fueron transferidos a medio DCR diluido a la mitad y suplementado con 2,0 mg/L de NAA, y se cultivaron en oscuridad durante 10 días seguido de iluminación 12 h/d, dando como resultado un alto porcentaje de enraizamiento (55,3%).

### 3.- Usando como material de partida plantas adultas

La propagación clonal de árboles suficientemente adultos como para expresar sus características deseables es un medio eficaz para obtener rápidamente material de siembra mejorado. Sin embargo, la clonación de árboles maduros de especies de coníferas es a menudo difícil o imposible, con las técnicas actuales. Por lo tanto, las especies se seleccionan para la propagación clonal cuando todavía son demasiado jóvenes para la evaluación apropiada. Para muchas especies, tal evaluación no es posible en la actualidad hasta que los árboles hayan alcanzado aproximadamente la mitad de su edad de rotación. Debido a esta situación, no se puede esperar el máximo beneficio de la propagación clonal hasta que no se encuentren los medios adecuados para clonar árboles más viejos o para determinar a una edad temprana cómo serán los árboles al final de su rotación.

En esta fase del proceso de propagación *in vitro*, el empleo de brotes apicales ha sido una alternativa poco estudiada, fundamentalmente, porque la respuesta del material vegetal durante el proceso de propagación *in vitro* no ha sido buena. En muchos casos ha estado condicionada por la influencia del genotipo, la edad fisiológica y las características de las plantas donantes. Ello ha derivado en que los coeficientes de multiplicación y los porcentajes de formación de órganos *in vitro* que se han obtenidos en muchas especies del género *Pinus*, hayan sido descriptos como bajos (Parasharami *et al.*, 2003).

La propagación *in vitro* a partir de árboles adultos siempre ha sido difícil debido a problemas tales como el establecimiento de cultivos asépticos (severa contaminación microbiana), la influencia de la época del año en la respuesta, o a la acumulación de determinados metabolitos secundarios que provocan fenolización (Agrawal *et al.*, 2002).

La maduración es un fenómeno complejo y es la principal etapa que impide una aplicación más amplia de la tecnología del cultivo de tejidos entre las especies leñosas. A pesar de los problemas mencionados, la posibilidad de multiplicar árboles adultos mediante clonación y establecimiento de ensayos de campo con material micropropagado se ha demostrado para los eucaliptos, *Sequoia sempervirens*, *Pinus pinaster* y *Pinus radiata*. El éxito con estos árboles se ha logrado principalmente mediante el uso de material de partida especial, tomado desde la base del árbol, mediante pretratamiento especial *in vivo* y/o por cultivo *in vitro*. Todos estos procedimientos, que mejoran la propagación se describen a menudo por el término general rejuvenecimiento, un término que es difícil de apreciar, ya que por lo general no aclara lo que de hecho implica. Sin embargo, es claro que el rejuvenecimiento es un prerrequisito para la

posible clonación de árboles adultos y que el éxito en la práctica dependerá principalmente de la capacidad de rejuvenecerlos (Pierik, 1990)

En el pino híbrido, existen algunos trabajos sobre propagación de árboles clonales adultos. Se trabaja en Queensland bajo dos enfoques paralelos que se emplean para mantener la juvenilidad de los materiales clonales. En primer lugar, cada clon se mantiene como setos de 20 cm altura para la duración de las pruebas de campo. En segundo lugar, los brotes de los setos se almacenan como cultivo de tejidos a baja temperatura y baja irradiancia para ralentizar el crecimiento y lenta maduración. Una vez que los mejores clones han sido identificados, los setos de producción se propagan tanto de setos como de brotes de cultivo de tejidos (Trueman, 2006). En este caso, el cultivo de tejidos se emplea principalmente como un medio para retrasar la maduración clonal y producir plantas juveniles, más que como un método directo de multiplicación y producción para plantas listas para ir a campo. Los métodos utilizados para el cultivo de tejidos y el almacenamiento en frío se basan en los desarrollados para *P. radiata* (Horgan, 1987).

## CONCLUSIONES

Podemos afirmar que, de acuerdo a los fines perseguidos, hay algunos trabajos desarrollados que pueden ser usados como modelo, como ser, plantas obtenidas por cultivo *in vitro* a partir de semillas maduras y por cultivo de segmentos nodales y a partir de plantas jóvenes y setos. Sin embargo, habría que repetirlos y ponerlos a punto en cada laboratorio.

Por otra parte, para lograr la embriogénesis somática en esta especie será necesario llevar a cabo numerosos ensayos basados en los ya realizados tanto en *P. elliotii* como en *P. caribaea*. Esta última especie pareciera ser menos recalcitrante para la embriogénesis que el *P. elliotii*. Se podría inferir que el pino híbrido tenga un comportamiento intermedio en cuanto a la respuesta, sin embargo, dependerá de los resultados a obtenerse de los ensayos que se lleven a cabo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal V., Prakash S., Gupta S.C. 2002. Effective protocol for *in vitro* shoot production through nodal explants of *Simmondsia chinensis*. Biol. Plant 45. 449-453
- Barrett H., Danner M., Hennig A. 1991. Híbridos de *P. elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* en cultivo en el norte de Corrientes. Jornada sobre *Pinus caribaea*, Actas, Centro de Investigaciones y Experiencias Forestales. Eldorado, Misiones – Argentina, 25-26 de Abril. Pp. 107-111
- Belaber, E.C, 2016. Parámetros genéticos en progenies híbridas F<sub>1</sub> de *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* y su utilización en un programa de mejora en el noreste argentino. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional de Misiones. 143 pp.
- Cappa E.P., Marcó M.A., Nikles D.G., Last I.A. 2012. Performance of *Pinus elliotii*, *Pinus caribaea*, their F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and backcross hybrids and *Pinus taeda* to 10 years in the Mesopotamia region, Argentina. New Forests, 44:197–218.
- Chengqun L., Huang B. 2012. Stem Tissue Culture of *Pinus elliotii* × *Pinus caribaea*. Proceedings of the International 2012 Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology. Pp. 1700-1703.
- David A., Laine E., David H. 1995. Somatic Embryogenesis in *Pinus Caribaea*. In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol. 44-46 of the series Forestry Sciences. Pp 145-181
- Dieters, M.J. 1996. Genetic parameters for slash pine (*Pinus elliotii*) grown in south- east Queensland, Australia: Growth, stem straightness and crown defects. Forest Genetics, 31.Pp. 27-36.
- Filonova H., Bozhkov V., Von Arnold S. 2000. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. J Exp Bot. 51(343). Pp. 249-264
- Fortes N., Duarte E., González A., Sansberro P, Luna C. 2014. Direct shoot regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus elliotii* x *P. caribaea* hybrids and plantlets production assisted by temporary immersion bioreactors. Congresos y Reuniones Científicas, IUFRO.
- Gauchat M. E., Rodríguez G. H., Belaber E., Bischoff D. 2005. Híbridos de alta productividad combinando crecimiento y forma : *Pinus elliotii* var. *elliotii* x *P. caribaea* var. *hondurensis*. IDIA XXI, Vol 5, (8). Pp 162- 164

- González, P., Belaber, E.; Gauchat, M. E.. 2011. Macropropagación de *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (F1). V Reunión GEMFO/ J. A. López, P. S. Pathauer, E. P. Cappa (eds.). - 1a ed. - CABA : Ediciones INTA, 2011. ISBN 978-987-679-082-6. [http://inta.gob.ar/documentos/v-reunion-gemfo-resumenes-1/at\\_multi\\_download/file/INTA-RESUMENES%20GEMFO%202011.pdf](http://inta.gob.ar/documentos/v-reunion-gemfo-resumenes-1/at_multi_download/file/INTA-RESUMENES%20GEMFO%202011.pdf)
- González, P.A. 2010. Propagación *in vitro* de un híbrido entre *Pinus elliottii* var. *elliottii* y *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes. AR. 2010. 67 p.
- Gupta P.K., Durzan D.J. 1987. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Biotechnol.*, 5. Pp 147-151.
- Gwaze, D.P. 1999. Performance of some interspecific F1 pine hybrids in Zimbabwe. *Forest Genetics*, 6: 283-289.
- Hakman I.C., Von Arnold S. 1985. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). *J. Plant Physiol.*, 121. Pp 149-158
- Horgan K., 1987. *Pinus radiata*. Cell and Tissue Culture in Forestry. In: Bonga J.M. and Durzan D.J. (Eds) Volume 3. Case Histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms. Dordrecht, Martinus Nijhoff, Pp. 128-145
- Hugues-Jarlet E. 1988. Recherches sur l'aptitude á l'embryogenése somatique de matériel juvénile et de matériel issu d'arbres adultes de *Pinus Pinaster* Sol. Ph.D. Thesis, Universite Paris VI. Pp 1-1250
- Jain S., Dong N., Newton R. 1989. Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii*) from immature embryos cultured *in vitro*. *Plant Science*. Vol. 65, 2. Pp. 233-241
- Jain S., Gupta K., Newton J. 1995. *Forestry Science. Somatic Embryogenesis in Woody Plants: Vol 3: Gymnosperms*. Springer Science & Business Media. 391 Pps.
- Krogstrup P. 1986. Embryo like structures from cotyledons and ripe embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Can. J. For. Res.*, 16. Pp 664-668
- Laine E., David A. 1990. Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplasts of *Pinus caribaea*. *Plant Science*. Vol 69, 2. Pp. 215–224
- Liao Y. K., Amerson H. V. 1995. Slash Pine (*Pinus elliottii* Engelm.) Somatic Embryogenesis I. Initiation of Embryogenic Cultures from Immature Zygotic Embryos. *New Forests* 10. Pp 145-163
- Malabadi R.B., Nataraja K. 2007. 24-epiBrassinolide Induces Somatic Embryogenesis in *Pinus wallichiana* A. B. Jacks. *Journal of Plant Sciences* 2 (2). Pp 171-178.

- Malabadi R.B., Teixeira Da Silva J.A., Mulgund G.S. 2011. Induction of Somatic Embryogenesis in *Pinus caribaea*. Tree and Forestry Science and Biotechnolog. Pp 27-32
- Marum L., Almeida, Correia S., Farinha N., Figueiredo J., Mano N., Nunes S., Sousa D.,Dias C., Oliveira M., Santos , Pereira V. 2014. Pine tree biotechnology for high value forestry. Proceedings of the Third International Conference of the IUFRO, on “Woody Plant Production Integrating Genetic and Vegetative Propagation Technologies“. Pp 101- 104
- Meyer H.J. 1998. *In vitro* formation of adventitious buds on mature embryos of *Pinus elliottii* Engelm. x *P. caribaea* Morelet hybrids. S. Afr. J. Bot., 64(3). Pp 220-225
- Minocha R., Jain S.M. 2000. Tissue culture of woody plants and its relevance of molecular biology. In: Jain, S.M.; Minocha, S.C., eds. Molecular biology of woody plants. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 315-340
- Newton R., Marek-Swize K., Magallanes-Cedeno M., Dong N., Sen S., Jain S. 1995. Somatic Embryogenesis in Slash Pine (*Pinus Elliottii* Engelm.). In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol. 44-46 of the series Forestry Sciences. Pp. 183-195
- Nikles D.G. 1991. Increasing the value of future plantations in Argentina and southern Brazil using slash × Caribbean pine hybrids developed in Queensland. Actas: Jornada sobre *Pinus caribaea*. Eldorado, Misiones, Argentina. Centro de Investigaciones y Experiencias Forestales, Pp 93-102.
- Nikles, D.G., Bowyer, P.C., Eisemann, R.L. 1987. Performance and potential of hybrids of Slash and Honduras Caribbean pines in the subtropics. In: Simposio sobre silvicultura y mejoramiento genético de especies forestales, Centro de Investigaciones y experiencias forestales, Buenos Aires. Pp 68-79.
- Pahr P., Gauchat E., Sorge F., Rodriguez G. 2002. Ensayo comparativo de pinos subtropicales mejorados de NO de Misiones, Argentina. IX Jornadas Técnicas Forestales. FCF-UNAM-INTA-MENyR. Eldorado. Misiones.
- Parasharami V., Poonawala I., Nadgouda R. 2003. Bud break and plantlet regeneration *in vitro* from mature trees of *Pinus roxburghii* Sarg. Current Science 84. P 25
- Park Y. S., Barrett J. D. Bonga J. M. 1998 Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: Deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant. Vol. 34, 3. Pp. 231-239

- Pierik, R.I.M. 1990. Rejuvenation and micropropagation. En: H.J.J. Nijkamp, I.H.W. van der Plas & J. van Aartrijk (eds.), Progress in Plant Cellular and Molecular Biology 91-101. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.
- Pullman G. S., Zhang Y., Phan B.H. 2003. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. Plant Cell Reports, Vol. 22, 2. Pp 96–104
- Pullman S., Bucalo K. 2011. Pine somatic embryogenesis using zygotic embryos as explants. Methods Mol Biol.710. Pp. 267-291
- Rockwood D. y Nikles D.G. 2000. Performance of slash pine x Caribbean pine hybrids southern Florida, USA. In: Dungey, H.S., Dieters, Nikles, D.G. (Eds.) Hybrid Breeding Genetics of Forest Trees. Proceedings of a QFRI/CRC-SPF Symposium, 9-14 April 2000, Noosa, Queensland, Australia. Department of Primary Industries, Brisbane. Pp 114-119.
- Trueman S.J. 2006. Clonal propagation and storage of subtropical pines in Queensland, Australia. The Southern African Forestry Journal, 208:1. Pp 49-52
- Vera Bravo C., Belaber E. C., Gauchat M. E. 2011. Influencia del estado de desarrollo del embrión cigótico sobre la inducción de masas embriogénicas en progenies de clones de *Pinus taeda*. V Reunión GEMFO / Juan A. López (ed.); Pablo S. Pathauer (ed.); Eduardo P. Cappa (ed.). - 1a ed. - CABA : Ediciones INTA, 2011. ISBN 978-987-679-082-6.
- Vera Bravo C., Belaber E. C., Gauchat M. E. 2014. Development of somatic embryogenesis in Loblolly pine (*Pinus taeda* L.): Advances in the induction. En: Park, Y.S. and Bonga, J.M. (eds.). Proceedings of the 3rd international conference of the IUFRO unit 2.09.02 on “Woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies.” Publicado online: <http://www.iufro20902.org>. 8-12 de Septiembre de 2014. Vitoria-Gasteiz, España.
- Vera Bravo C., Belaber E. C., Gauchat M. E. 2016. Possibilities of somatic embryogenesis for production of hybrid pine and loblolly pine. En: Park, Y.S. and Bonga, J.M. (eds.). Proceedings of the 4th international conference of the IUFRO unit 2.09.02 on “Somatic Embryogenesis and Other Vegetative Propagation Technologies”. 19-21 de Septiembre de 2016. La Plata, Argentina.
- Von Arnold S. 1987. Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. J. Plant Physiol, 128. Pp 233- 244
- Wei T., Fan O., Che G.Z. 1997. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in slash pine. Journal of Plant Resources and Environment. 02. Pp 8-11

- White T.L., Adams W.T., Neale D.B. 2007. Forest genetics. CABI Publishing, Oxfordshire.
- WU L. 2009. Study on development course of zygotic embryos and initiation of somatic embryos of slash pine. Journal of Forest and Environment 03
- WU L. 2010. Proliferation and maturation of somatic embryos of slash pine. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 02
- WU L., WENG Q., CHEN D. 2013. Factors affecting maturation of somatic embryos of slash pine. Fujian Journal of Agricultural Science, 04
- Zheng Y. 2000. Hybrid breeding of *Pinus caribaea* in China. In Dungey H.S., Dieters M. J., Nikles D.G. (Eds.). Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees. Proceedings of QFRI/CRC-SPF symposium, Noosa, Queensland, Australia. Department of Primary Industries, Brisbane.