



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Agrarias



TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

MODALIDAD TESINA

TITULO: Evaluación de distintos sistemas de cultivo *in vitro* que afectan la organogénesis de yemas adventicias en *Pinus taeda*

ALUMNO: Behmetiuk, Cesar Maximiliano

DIRECTOR: Ing. Agr. (Dra.) Claudia Luna.

Lugar de trabajo: Facultad de Ciencias Agrarias. Cátedra de Silvicultura.

2021

RESUMEN

En la regeneración vía organogénesis de yemas adventicias en *Pinus taeda*, tanto la composición del medio basal como el sistema de cultivo utilizado, han demostrado ser de suma importancia. En base a los resultados obtenidos, se concluye que el medio basal compuesto por las sales de Murashige y Skoog al 50% de su concentración original con la adición de Nitrógeno al 50 %, expresó una mayor producción de yemas. En cuanto a los sistemas de cultivo evaluados; los medios líquidos si bien no favorecieron el desarrollo de los embriones cigóticos cultivados; al existir pocos reportes de su uso en el género *Pinus*, son necesarios mayores estudios. En cambio, la utilización de medios semisólidos ha arrojado resultados positivos, en cuanto al porcentaje de regeneración de yemas adventicias vía organogénesis. El empleo de un biocida comercial y un *buffer*, ha permitido lograr un control químico efectivo de la contaminación; además de mantener el pH del medio basal en un rango óptimo para el cultivo. Lo que posibilitó la obtención de un mayor porcentaje de embriones germinados con síntomas de nula a moderada fitotoxicidad. La prueba de viabilidad empleada, ha sido de utilidad para confirmar la calidad de las semillas utilizadas en los experimentos y ha hecho posible explicar algunos resultados, como ser, que la elevada falta de respuesta de los explantes al utilizar medio líquido, se debe al sistema de cultivo. Si bien son necesarios mayores estudios, acerca de los distintos parámetros que afectan la organogénesis de yemas adventicias en *P. taeda*, queda demostrado que el microclima dentro del recipiente de cultivo, ejerce un efecto determinante para lograr una mayor eficiencia en el uso de biorreactores de inmersión temporal, como una alternativa viable para su micropropagación a mayor escala.

INTRODUCCIÓN

Pinus taeda es originario del sudeste de Estados Unidos, desde el este de Texas y centro de Florida hasta el sur de Nueva Jersey, entre los 28 y 39° de latitud norte (Hampel, 2005). Fue introducido en Argentina a finales de la década de 1940. Se cultiva en la región litoral, desde la provincia de Buenos Aires hasta

Misiones (Di Marco, 2014). Algunos orígenes de *P. taeda*, como Marión y Livingston, son utilizados en la Mesopotamia por su productividad (Pezzutti *et al.*, 2017).

Su crecimiento exuberante le permite alcanzar de 30 a 35 metros de altura; destacándose la rectitud del fuste y densidad de madera que, al ser blanda y liviana, es utilizada en la producción de pasta de celulosa y paneles aglomerados (Jiménez *et al.*, 2014). En tal escenario, el plan de mejoramiento genético de *P. taeda* inició en la década de 1990, conformando un trabajo en conjunto entre INTA y empresas privadas radicadas principalmente en Misiones y Corrientes (Faustino *et al.*, 2012). Su ejecución posibilitó la selección de familias en base a un ranking elaborado en función del crecimiento en volumen y la rectitud del fuste de las progenies respectivas; contándose actualmente con ganancias genéticas, para el carácter mencionado, que oscilan entre un 18 y 40% en huertos semilleros clonales del origen Marion (Faustino *et al.*, 2012; Schenone, 2012).

A fin de mantener esta ganancia genética y producir una amplia gama de genotipos de una población; la incorporación de la propagación vegetativa contribuirá sustancialmente a mantener un programa silvicultural de la especie (Handley *et al.*, 1994). La propagación de individuos élites del género *Pinus* se realiza comúnmente por injertos; sin embargo, la escasa compatibilidad que se suscita entre pie (portainjerto) y copa (injerto), limita su empleo en escala comercial (Ritter, 2017). Asimismo, la propagación vegetativa a través del uso de macroblastos es fuertemente influenciada por las estaciones climáticas y la edad del material que se desea propagar (Andrejow e Higa 2007). Ante estas circunstancias, la incorporación de las variadas herramientas que ofrece el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales podría contribuir al desarrollo de un procedimiento de clonación masiva que permita su uso en planes de mejoramiento genético y expansión del cultivo.

OBJETIVO.

Estudiar el efecto que ejerce el microclima dentro del recipiente de cultivo, sobre la organogénesis de yemas adventicias en *Pinus taeda*.

ANTECEDENTES.

En el caso de la regeneración de plantas de pino por organogénesis, aunque menos estudiado que la embriogénesis somática, se han desarrollado protocolos a partir de la brotación de yemas axilares y la inducción de yemas adventicias. La primera emplea ápices, yemas laterales y microestacas, mientras que la inducción de yemas adventicias se produce sobre el explante, previa formación de un callo a partir de meristemos preexistentes o tejido no meristemático. Estas yemas se originan de una o varias células cuando se cultivan con concentraciones elevadas de citoquininas (Chávez Millán y De Fera, 2012).

En la literatura existe abundante información que indican la posibilidad de obtener plantas de *P. taeda* mediante la generación de yemas adventicias u organogénesis (Mehra-Palta *et al.*, 1978; Mott y Amerson, 1981; Dhumale y Newton, 1996; Tang y Ouyang, 2000; Tang y Guo, 2001), no obstante, la baja eficiencia del procedimiento limita su adopción. Entre las causas principales que podrían afectar negativamente la tasa de conversión en plantas, se podría mencionar la carencia de un medio de cultivo nutricionalmente balanceado para cada una de las fases que comprende la neoformación de yemas adventicias y micropropagación de los brotes resultantes.

La regeneración de plantas por organogénesis, ha sido un método que ha demostrado ser eficiente en la propagación comercial de muchas especies vegetales. Existen investigaciones que refieren la regeneración de plantas de pino por organogénesis, pero a partir de embriones cigóticos (Tang *et al.*, 2004; Tang y Newton, 2005; Alonso *et al.*, 2006; Cantillo *et al.*, 2011).

En ese sentido, ya Zárate *et al.* (1997) atentos a que surgía gran atención a la aplicación del cultivo *in vitro* para conservar especies valiosas o en peligro de extinción, propusieron establecer un protocolo de micropropagación con especial referencia a las distintas fases del proceso de propagación: (a) esterilización y establecimiento del cultivo, (b) multiplicación de yemas, (c) aislamiento de las yemas-brotes producidos para su desarrollo y posterior enraizamiento y (d) aclimatación de las plantas ya enraizadas a condiciones de suelo, con el fin último de conseguir la aclimatación de plantas y su introducción en jardines botánicos como parte de un proyecto más amplio acerca del conocimiento y conservación de especies.

A nivel mundial, la mayoría de los trabajos realizados *in vitro* del género *Pinus*, han utilizado como material vegetal inicial embriones cigóticos de plantas mejoradas genéticamente (Nehra *et al.*, 2005; Lelu *et al.*, 2006; Pullman y Skryabina, 2007). La micropropagación en el pino es una alternativa atractiva porque con los propágulos vegetativos, la producción puede comenzar rápidamente después de que los resultados obtenidos de ensayos de progenies lleguen a estar disponibles. Estas plantas madre brindan brotes o estacas que luego de enraizadas y una vez que alcanzan los estándares de calidad, son plantadas en campo para integrar plantaciones operativas (Goldfarb *et al.*, 1999).

En coníferas, los explantes más utilizados en cultivos de tejido, son embriones maduros e inmaduros porque en la mayoría de las especies de coníferas es difícil inducir la organogénesis o la embriogénesis somática a partir de los tipos de explantes utilizados en otros cultivos (Tang y Newton, 2005). En el caso específico del *P. taeda* existen pocos trabajos en la literatura consultada que hagan referencia a la fase de elongación como fase previa al enraizamiento tanto *ex vitro* como *in vitro* (Tang *et al.*, 2000). La regeneración de plantas vía organogénesis, ha sido un método eficiente empleado en la propagación comercial de muchas especies vegetales. Sin embargo, respecto al género *Pinus* existen pocas investigaciones sobre el tema (Cantillo *et al.*, 2006), y no fueron desarrollados los protocolos para la propagación *in vitro* de ninguna de las especies de pino plantadas en el país.

La multiplicación se puede llevar a cabo en medios líquidos y sólidos, donde la mayor parte se realiza a través de una vía gelificada con agar, haciendo que el proceso sea largo y costoso. El uso de biorreactores con el objetivo de lograr una reducción en la manipulación manual y en los costos (Ziv, 2000), presenta la desventaja la hiperhidricidad y la oxidación de los tejidos.

Entre los estudios de relevancia consultados con relación a la presente investigación, destacan las investigaciones de Jiménez y Agramonte (2006) quienes presentaron un trabajo cuyo objetivo apuntó a compendiar diferentes métodos de propagación que se utilizan en especies forestales de gran importancia y como el más relevante se enfoca a la factibilidad de la integración *in vitro* y la macropropagación como vía para garantizar la sostenibilidad de la propagación de dichas especies. Entre las especies analizadas para dicho estudio se incluye al *P. taeda*. Entre las conclusiones se destaca el hecho de la macropropagación como una estrategia sostenible de reproducción de especies maderables para complementar los novedosos métodos de cultivo *in vitro* en estas plantas y lograr resultados similares en la calidad de la semilla que se utiliza tradicionalmente en la plantación.

Igualmente, se consideró la investigación de Sánchez *et al.* (2008), donde se consideraba que la micropropagación de material embrionario colectado de árboles adultos constituye una alternativa relevante en la propagación masiva de fenotipos selectos, adecuados para los programas de clonación desarrollado por las empresas forestales. Cabe señalar que la implementación de esta técnica, basada en ejes embrionarios maduros extraídos desde conos lignificados ubicados a diferentes alturas en el árbol, fueron introducidos *in vitro* con el objeto de analizar la posible relación entre el estado fisiológico del tejido formador y la respuesta obtenida en la micropropagación de embriones maduros de *Pinus radiata*. Dentro de los resultados logrados los embriones obtenidos desde conos ubicados en la zona basal del árbol donador mostraron los

mejores resultados en germinación (95%), supervivencia (100%), proliferación de microtallos (1,7 yemas/microtallos) y longitud de microtallos (25 mm); permitiendo a los autores establecer una relación entre el estado de desarrollo del explanto y su respuesta en condiciones artificiales de cultivo *in vitro*.

Posteriormente Chávez (2012) presentó un trabajo, donde el objetivo fue exponer una revisión de literatura científica sobre la propagación *in vitro* por organogénesis del género *Pinus*, incluyendo un análisis de los principales factores que de alguna forma podrían afectar el éxito de regeneración de plantas por este método, con énfasis en la formación de raíces tanto *in vitro*, como *ex vitro*. El estudio surgió a partir de detectar que el del establecimiento *in vitro*, a partir de brotes apicales y su multiplicación, no ha sido tan analizada y por ello se ha limitado la obtención regenerada por organogénesis capaces de lograr con éxito la supervivencia en la fase de aclimatación. Como conclusión se destaca que el estudio abre nuevos debates y puntos de partida en la búsqueda de soluciones a dificultades que se presentan para lograr con éxito la fase de enraizamiento *in vitro* o *ex vitro* de este género de plantas.

Más recientemente, el trabajo de Barone *et al.* (2018) plantearon evaluar el efecto de diferentes medios basales sobre la regeneración de yemas adventicias a partir de embriones cigóticos maduros de *P. taeda*. Observaron que el éxito de la propagación *in vitro*, depende mayormente de la naturaleza y concentración de los nutrientes minerales del medio de cultivo. En su caso la composición del medio basal influyó en la regeneración de yemas adventicias de *P. taeda*, observándose mayor producción de yemas cuando los embriones fueron cultivados en medio MS al 50% de su concentración original.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se trabajó a partir de embriones cigóticos maduros de lotes de semillas de *P. taeda* (HSCA Livingston. Código INASE: 19W6016KP) de distintas cosechas (2008 a la fecha). Se entiende por lote a un grupo de semillas con algún factor en común, por ejemplo, año de colecta, rodal o huerto semillero, árbol plus, punto de origen en una prueba de procedencia, entre otros. En este caso el material vegetal provino de la Empresa Forestal Bosques del Plata S.A. (Posadas, Misiones), por lo que el lote atiende a una sola procedencia.

En cuanto a calidad del lote manejado cumple con las propiedades necesarias para asegurarla, a saber, cuenta con genuinidad (el lote de semillas deber responder a la especie y cultivar deseado); pureza (lote libre de semillas extrañas, de semillas de malezas u otros cultivares o especies); limpias, sanas y viables.

- Establecimiento *in vitro* de inóculos: Escarificación y desinfección de semillas.

Las semillas fueron sometidas al siguiente procedimiento:

- *Escarificación*: H₂O₂ 30 vol. en una concentración de 9 g.L⁻¹ por 12 h. (Barone *et al.*, 2018).
- *Desinfección*: luego de la escarificación, se procedió a la inmersión de las semillas en una solución de etanol a 70° durante 1 minuto, luego transferido a un 2,2% solución acuosa de hipoclorito de sodio agregada con 0,1% de TRITON® y finalmente enjuagada tres veces con agua destilada estéril (Barone *et al.*, 2018).
- Los embriones cigóticos maduros extraídos de las semillas fueron cultivados individualmente en tubos de vidrio de 15 mL de capacidad conteniendo 3 mL de medio de cultivo de regeneración.

- Optimización del medio de regeneración u organogénesis

Se llevaron a cabo diferentes experimentos para cumplir con este objetivo:

- Efecto de la interacción entre el contenido de nitrógeno inorgánico y benciladenina sobre la organogénesis de embriones cigóticos maduros de *P. taeda*

En la tabla 1 se detallan las formulaciones ensayadas, cabe señalar que durante todos los medios ensayados fue adicionada benciladenina 4,44 μM (Barone *et al.*, 2018), suplementados con sacarosa 30 gr. L^{-1} y agar SIGMA® A-1296, 0,65 %. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5,8 con KOH o HCl antes de la adición del agente gelificante; esterilizándose por calor húmedo mediante autoclave a 1,46 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ durante 20 minutos.

Condiciones de cultivo: Se trabajó en el flujo laminar con pinza, bisturí y lupa. Los tubos conteniendo los explantes fueron tapados con papel Resinite AF-50® (Casco S.A.C. Company, Buenos Aires) e incubados en condiciones de luz (116 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, radiación PAR, fotoperíodo 14 hs.) y temperatura (27 ± 2 °C) controladas.

A los 45 días se evaluaron los siguientes parámetros:

- % infectados-cultivo con contaminación visible (bacteriana y/o fúngica);
 - % oxidados-cultivo con ennegrecimiento tisular;
 - % germinados-embriones cigóticos maduros con tejido vivo, pero sin regeneración
 - % regenerados- embriones cigóticos maduros con estructuras neoformadas.
 - N° de brotes/ explante- cantidad estructuras neoformadas por embrión cigótico maduro cultivado.
- Efecto de los diferentes sistemas de cultivo sobre sobre la organogénesis de yemas adventicias en *P. taeda*

Se evaluaron dos sistemas de cultivo contrastantes:

- Medio semisólido sin ventilación por difusión.
- Medio líquido con ventilación forzada con exposición por inmersión temporal.

Los medios basales utilizados en esta experiencia consistieron en una solución nutritiva de Murashige y Skoog (1962), $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{2}$ diluidas de su formulación original, y fuentes nitrogenadas modificadas (NH_4NO_3 y KNO_3 . N=25, 50,75 y 100% de su formulación original). En todos los casos se adicionó benciladenina 4,44 μM (Barone *et al.*, 2018), complementados con sacarosa 30 gr. L^{-1} y agar SIGMA® A-1296, 0.65 %.

Condiciones de cultivo: Los cultivos fueron cultivados en condiciones asépticas e incubados en condiciones de luz (116 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, radiación PAR, fotoperíodo 14 hs.) y temperatura (27 ± 2 °C) controladas.

A los 45 días se evaluó: % de infección, % oxidación, % de embriones germinados, % regeneración y N° brotes/explante.

- Control químico de la contaminación basado en el uso de biocida comercial sobre la organogénesis de yemas adventicias en *P. taeda* en biorreactores de inmersión temporal

Por antecedentes de contaminación bacteriana en biorreactores en la especie, a los medios de cultivo líquido de los biorreactores se le adicionó un biocida¹ comercial Delcide™ TG (5-cloro-2-metil-4-isotiazolin 3-ona 1.05 % + 2-metil-4-isotiazolin 3-ona 0.45 %) y el buffer MES monohidratado (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) ajustado a pH: 5.8; en diferentes concentraciones (Luna *et al.*, 2013).

El medio basal utilizado fue MS ¼+N50%, benciladenina 4,44 µM, sacarosa 30 gr. L⁻¹.

Condiciones de cultivo: Los cultivos fueron cultivados en condiciones asépticas e incubados en condiciones de luz (116 µmol.m⁻². s⁻¹, radiación PAR, fotoperíodo 14 hs.) y temperatura (27±2 °C) controladas.

A los 45 días se evaluaron los siguientes parámetros: % de explantes con respuesta (indica explantes verdes sin síntomas de ennegrecimiento tisular), rango de fitotoxicidad², pH, % de infectados, % de regeneración, N° yemas/explante.

- Efecto que ejerce el microclima dentro del recipiente de cultivo, sobre la organogénesis de yemas adventicias en *P. taeda*

Sistemas de cultivo

Se evaluaron los siguientes tratamientos:

- Medio semisólido sin ventilación por difusión.
- Medio semisólido con ventilación por difusión.
- Medio líquido con ventilación forzada (presión: 0.5 bar), exposición por inmersión temporal (Biorreactores con inmersión completa mediante dispositivos que emplean fuerza neumática -RITA®)
- Medio líquido con ventilación forzada (presión: 0.5 bar), exposición por inmersión temporal (Biorreactor de inmersión temporal diseño de doble recipiente denominado BIT).

Condiciones de cultivo: Se cultivaron 50 embriones cigóticos maduros de *P. taeda* por recipiente conteniendo un medio de cultivo compuesto por diferentes concentraciones de Nitrógeno, sacarosa y adicionado con bencilaminopurina para inducir la organogénesis de yemas adventicias. En el caso de los tratamientos con medio semisólido, se adicionó agar 0.65% (Sigma A-1296). Para los biorreactores de inmersión temporal automatizados se utilizaron los prototipos RITA® y para los BIT se utilizaron frascos de 300 cc con tapas de polipropileno, provistas de 2 unidades filtrantes (nylon, 0.22 µm) de 50 mm de diámetro. En los tratamientos con ventilación forzada, el recipiente de cultivo se inoculó con aire comprimido (presión: 0,5 bar) durante 1 min., repitiéndose esta operación cada 4 hs. En inmersión temporal se utilizó una frecuencia de inmersión de 4 horas con una duración de inmersión de 1 min. Los cultivos fueron incubados en un cuarto climatizado a 27±2°C con 14 hs de fotoperíodo (116 µmol m⁻² °C y 14 hs. de fotoperíodo (180 µmol m⁻² s⁻¹, luz PAR). El medio basal utilizado en los biorreactores fue MS ¼+N50%, benciladenina 4,44 µM, sacarosa 30 gr. L⁻¹.

¹ Se entienden por **biocidas** a las sustancias activas y preparados que contengan una o más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos (<http://www.senasa.gov.ar>).

² Rango de **fitotoxicidad** y/o efectos secundarios: es la capacidad de un compuesto de provocar un daño o una acción no deseada en la planta. Se interpreta como la expresión fenológica de una afección metabólica en las plantas por factores físico- químicos, bióticos o abióticos, que se pueden expresar en distintos órganos en la planta. Se suele manifestar como síntomas que van desde quemazón de puntas de hojas, hasta clorosis parcial o general. Las consecuencias van desde la disminución o retraso del crecimiento hasta la pérdida total del tejido analizado. Se determinó de manera semi-cuantitativa al finalizar el experimento asignando un valor 1, 0.5 y 0 para alta, moderada y nula fitotoxicidad, respectivamente.

Cada recipiente conteniendo 50 embriones cigóticos maduros es considerado una unidad experimental, realizándose tres repeticiones del experimento. Al cabo de 45 días de cultivo se evaluó la neoformación de yemas adventicias; porcentaje y promedio de explantes que presentaron respuesta; utilizando la siguiente fórmula: CBF (capacidad de formación de brotes) = (Nº. Promedio de brotes por explante) + (% de explantes que formaron brotes) / 100; según la metodología utilizada por (Lambardi *et al.*, 1993). Número de yemas por explante.

Breve descripción de los equipos de inmersión temporal

Biorreactores con inmersión completa mediante dispositivos que emplean fuerza neumática (RITA®).

Consiste en un vaso de cultivo de 1 L de capacidad que contiene dos compartimentos conectados por un tubo. El compartimento superior, contiene a los explantes, mientras que el apartado inferior contiene el medio de cultivo. Se aplica una presión determinada en el seno del líquido y este asciende hasta el compartimento superior, sumergiendo los explantes. Durante el período de inmersión, el flujo de aire permite el burbujeo del medio, remueve los brotes y renueva la atmósfera dentro del recipiente de cultivo. Cuando la presión de aire baja, el medio líquido vuelve al compartimento inferior por gravedad. Por capilaridad, una fina película de medio se mantiene en contacto sobre los explantes, hasta el inicio de un nuevo ciclo (Figura 1).

Biorreactor de inmersión temporal diseño de doble recipiente denominado BIT.

Está compuesto por dos recipientes de vidrio traslúcido, uno alberga los explantes; mientras que el recipiente restante sirve de reservorio del medio de cultivo. Ambos recipientes se comunican mediante el principio de vasos comunicantes proporcionado por una manguera; siendo el movimiento del fluido, propulsado por la fuerza neumática proveniente de un compresor. La presión positiva del aire comprimido permite el pasaje del medio de cultivo entre los recipientes sumergiendo completamente los explantes durante la fase de inmersión. Cumplida esta fase, el flujo de aire se invierte retornando el medio de cultivo a su respectivo recipiente. La frecuencia y duración de la inmersión es controlada mediante temporizadores electrónicos que regulan el funcionamiento de las válvulas solenoides de tres vías. En el caso de la micropropagación autotrófica, una tercera electroválvula conectada a la línea de retorno proveerá CO₂ (calidad medicinal) durante el periodo que transcurre entre dos inmersiones (Figura 2).

Pruebas de viabilidad mediante la Prueba Topográfica por Tetrazolio

A modo de complementariedad de los resultados del ensayo de semillas con testa, se realizó la prueba topográfica por tetrazolio, para evaluar viabilidad de las simientes cultivadas en los biorreactores y que no germinaron durante el ensayo. El mismo se basa en un cambio de coloración de los tejidos vivos en presencia de una solución de la sal de cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio. Se acondicionaron las semillas realizando sumersión en la solución de tetrazolio para su tinción utilizando frascos de vidrio de 100 ml con tapa hermética. Se incubaron en estufa (DALVO, modelo TDE/70, Buenos Aires, Argentina) a 28 °C y en oscuridad durante 24 h. Una vez cumplida la tinción, las semillas se enjuagaron con abundante agua corriente y se realizaron observaciones individuales sobre cada semilla disectada. Se utilizó el patrón de clasificación de viabilidad adaptado de Fogaça *et al.* (2006). Las variables se expresaron en porcentajes.

Para el análisis de las imágenes se procedió a documentar fotográficamente todas las semillas tratadas para luego emplear el programa morfométrico ImageJ Versión 1,52p (Rasband, 2007).

Análisis estadístico: Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento en todos los experimentos. Se cultivaron explantes individuales empleándose 30 por tratamiento; considerándose éste una unidad. En todos los

casos, los datos fueron sometidos al análisis de la variancia (ANOVA) y prueba de Tukey ($P \geq 0.05$), empleándose el programa Infostat versión 2018 (Di Rienzo *et al.*, 2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización del medio de regeneración u organogénesis

Efecto de la interacción entre el contenido de nitrógeno inorgánico y benciladenina sobre la organogénesis de embriones cigóticos maduros de *P. taeda*

Luego de completar los días de cultivo, en cuanto al porcentaje de los parámetros evaluados se detecta una influencia por el medio basal utilizado, el mejor resultado en cuanto al objetivo propuesto, pertenece al medio compuesto MS $\frac{1}{4}$ +N 50%; aunque contrastando con los demás tratamientos, no haya mostrado el mayor porcentaje de explantes regenerados, ha sido el medio que menor número de embriones oxidados ($25,5 \pm 20,34$) y mayor número de brotes por explante ($9,4 \pm 6,06$) mostró (Tabla 2).

En la propagación *in vitro* de *Pinus caribaea* vía organogénesis el uso de benciladenina influyó en el desarrollo de las plantas *in vitro*, con concentraciones mayores a la utilizada en esta experiencia; se lograron los mejores resultados en cuanto al número y longitud de los brotes por plantas y el coeficiente de multiplicación (Chávez Millán, 2010).

Cedrés Gazo *et al.* (2015) sostienen que los embriones cigóticos, son una fuente de explantes que poseen la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación. Ojeda-Zacarías *et al.* (2006) obtuvieron regeneración *in vitro* de *Pinus maximartinezii* empleando como fuente de explantes, embriones cigóticos maduros completos, adicionando $0,5 \text{mg l}^{-1}$ de BAP al medio basal. Barone *et al.* (2018) por su parte, comprobaron que la composición del medio basal influye en la regeneración de yemas adventicias de *P. taeda*, observándose mayor producción de yemas cuando los embriones eran cultivados en medio MS al 50% de su concentración original.

Efecto de los diferentes sistemas de cultivo sobre la organogénesis de yemas adventicias en *P. taeda* (medio semisólido-SS vs. biorreactores RITA-IT)

El porcentaje de regeneración estuvo influenciado por el sistema de cultivo utilizado como así también por el medio basal. La mayor respuesta se obtuvo en SS, con los medios MS $\frac{1}{2}$ +N $0,5$ ($68,89 \pm 10,18$) y MS $\frac{1}{4}$ +N $0,25$ ($63,33 \pm 20,82$). En IT las respuestas de los embriones no fueron favorables con respecto a los parámetros evaluados (% germinados, % regenerados y N° yemas/explante), ya que no se logró registrar resultados, mientras que los valores de contaminación *in vitro* ($26 \pm 45,03$) fueron elevados (Tabla 3).

Al respecto Chávez (2012) demostró la importancia en esta fase del proceso de propagación *in vitro*; que tiene definir correctamente el agente gelificante y la concentración a emplear, pues son factores que inciden directamente en el potencial de la matriz del medio de cultivo y con ello favorecen o no que las plantas *in vitro* puedan asimilar los diferentes componentes del medio de cultivo. Los resultados constituyen la base para futuros estudios relacionados con la fase de enraizamiento *in vitro* en pino, el cual es considerado recalcitrante para formar raíces en sistemas artificiales.

Se ha demostrado que la automatización de la regeneración *Pinus pinea* mediante el uso de biorreactores es un método eficiente, mejorando el protocolo sustancialmente (González-Cabrero *et al.*, 2018).

Control químico de la contaminación basado en el uso de biocida comercial sobre la organogénesis de yemas adventicias en *P. taeda* en biorreactores de inmersión temporal

Los tratamientos químicos en esta experiencia fueron evaluados a través de su eficiencia para controlar el agente microbiano (expresada en porcentaje de cultivos sin síntomas de contaminación visible) y su acción sobre el crecimiento vegetativo de los explantes (producción y elongación de vástagos). Ambos parámetros fueron cuantificados al finalizar cada experimento. Asimismo, la fitotoxicidad del biocida fue determinada visualmente mediante la evaluación de cambios morfológicos, vitrificación y ennegrecimiento de los explantes.

El biocida utilizado en el ensayo, logra inhibir en todas las concentraciones el crecimiento bacteriano endofítico. Se evaluó además el efecto que ejerce la interacción del biocida DELCIDE™ TG (DCD) y/o en conjunto con el buffer Acido 2-N-Morfolino etano sulfúrico (MES) sobre el control del patógeno.

La mayor eficiencia en el control de la contaminación lo registró con una concentración 50µL DCD y 50µl DCD + 2000µl MES, pero con la salvedad que también presentó fitotoxicidad (Tabla 4).

Unos de los graves problemas para el cultivo *in vitro* de especies leñosas es la contaminación endofítica la cual puede restringir el uso de sistemas de inmersión temporal. Para eliminar las bacterias, los antibióticos son añadidos al medio de cultivo (Silva *et al.*, 1998) o son usados en la preparación de soluciones del material vegetal en remojo en el comienzo del cultivo *in vitro* (Leifert *et al.*, 1991; Luna *et al.*, 2008). Desafortunadamente, los antibióticos a menudo sólo ejercen un efecto bacteriostático, lo que lleva a la selección de cepas resistentes y puede llegar a inducir efectos fitotóxicos en los tejidos de las plantas (Leifert *et al.*, 1991; Falkner, 1997). Los biocidas son compuestos químicos utilizados en el control de microorganismos que perjudican a los cultivos y se utilizan en diferentes concentraciones según la época del año, y registrando fenómenos de toxicidad sobre los microorganismos (Giménez Verdú, 1984).

Los biocidas con isotiazolona tienen un complejo mecanismo de acción que implica una rápida inhibición de crecimiento seguido de una pérdida de viabilidad, estos biocidas atacan las rutas metabólicas centrales de células microbianas (Consumo de oxígeno y la síntesis de ATP) mediante la inhibición de varias enzimas clave implicadas en el ciclo del ácido tricarbóxico y la generación de energía (Williams, 2007).

Al momento de evaluar los síntomas de fitotoxicidad de tejido analizado, se ha logrado observar necrosis, ennegrecimiento tisular sectorizado y/o quemazón de las acículas, justamente en el mayor rango; mientras que en los niveles medios se ha detectado clorosis parcial.

Efecto que ejerce el microclima dentro del recipiente de cultivo, sobre la organogénesis de yemas adventicias en *P. taeda*

Los efectos del microclima dentro de cada recipiente fueron diversos, el medio semisólido sin ventilación por difusión ha arrojado los mejores resultados, con la salvedad de que se registró el mayor valor de embriones sin respuestas ($35 \pm 12,36$), se observó además un bajo porcentaje de explantes oxidados ($16,66 \pm 15,59$) y germinados ($13,33 \pm 9,5$), el mayor número de yemas por explante ($10,84 \pm 4,65$) y como así el valor del índice de capacidad de formación de brotes ($11,19 \pm 4,64$) (Tabla 5)

Zárate *et al.* (1997) señala que, en los cultivos de plantas producidas *in vitro* con ventilación, el microclima es más adecuado, debido a las condiciones de alta humedad y presencia de sacarosa en el medio de cultivo; los mecanismos fotosintético y estomático no funcionan o están mínimamente activos, así como la carencia de ceras y cutícula foliares. En los sistemas con medio semisólido la regeneración fue directa (Tabla 5).

La utilización de medios líquidos, presentan ventajas en comparación al medio semisólido, con respecto a los costos operativos y de fabricación. Existen recipientes costosos como el sistema comercial RITA, y otro

más accesible conocido como los BIT, con mayor facilidad de ensamblaje y menor costo inicial (Peña *et al.*, 2014).

Los sistemas evaluados con medios líquidos no favorecieron el desarrollo de los embriones cigóticos cultivados. Experiencias realizadas en *Psidium guajava* utilizando BIT reportan resultados muy alentadores en su multiplicación *in vitro* (Vílchez y Albany, 2014).

El uso de medio de cultivo líquido en lugar de los medios semisólidos tiene beneficios en la tasa de crecimiento y multiplicación de los tejidos, reduce el trabajo del personal, facilita el contacto del explante con el medio de cultivo, permite la absorción de nutrientes y reguladores del crecimiento, además del escalamiento a través de la automatización de los procesos. El sistema de inmersión temporal, al combinar los beneficios de la aireación del medio sólido y el contacto completo con medio líquido, ofrece una alternativa viable en la multiplicación *in vitro*, ya que proporciona un entorno más natural para el cultivo *in vitro* de plantas. Los brotes cultivados se sumergen periódicamente en un medio líquido y luego se exponen a un entorno gaseoso, a través de un sistema semiautomático o totalmente automatizado. Como resultado se reducen los costos asociados con el manejo y la cosecha, facilitan la renovación del medio de cultivo, se reduce el área de estantería y la contaminación, mejoran la supervivencia en la aclimatación, e incrementan la eficiencia y la calidad de las plantas (Chávez-García *et al.*, 2018).

El cultivo en sistemas de inmersión temporal automatizados fue exitoso en variados cultivos en los cuales se ha probado (Steinmacher *et al.*, 2011; Mallón *et al.*, 2012; Quiala *et al.*, 2012; Watt, 2012); sin embargo, existen pocos estudios de su uso en el género *Pinus*, por lo que son necesarios mayores estudios.

Pruebas de viabilidad

Luego de someter las semillas al test de viabilidad de tetrazolio se lograron categorizar un $44,29 \pm 12,37\%$ en la Clase 2 (semillas con menos del 50% de tinción rojo intenso, típica de deterioro); un $31,43 \pm 0,00\%$ en la Clase 4 (inviabile); un $15,71 \pm 20,97\%$ en la Clase 3 como viable y finalmente $8,57 \pm 29,44\%$ en la Clase 5 (semillas con el eje embrionario con más del 50% de coloración rojo intenso) (Tabla 6). También se encontraron casos de ausencia de embrión esto podría deberse a que posiblemente se tenga un desbalance hormonal durante el desarrollo de la semilla, producto del microclima *in vitro* generado (Figura 3).

Si bien el hecho de que una semilla no germine no siempre quiere decir que se trate de una semilla muerta (Rodríguez *et al.*, 2008), la interpretación visual de la tinción es subjetiva y requiere experiencia, especialmente en semillas pequeñas (Howarth y Stanwood, 1993).

El test de viabilidad de tetrazolio, consiste en reacciones de oxidación-reducción que se producen en las células vivas del embrión de la semilla al entrar en contacto con la sal de tetrazolio. Las células vivas poseen unas enzimas, denominadas hidrogenasas, que están implicadas en la respiración celular, y son capaces de reaccionar con la solución de tetrazolio, formando un compuesto insoluble de color rojo (formazán) que permite identificarlas, diferenciándolas de las células muertas que pueden encontrarse en la semilla (ISTA, 2014). La clase viable son aquellas semillas que tienen la capacidad de crecer y desarrollarse aún en ambientes no favorables. La prueba de tetrazolio es útil para determinar la causa de una baja germinación de semillas, sea por dormición, deterioro o inhibidas por alguna sustancia.

Antes de realizar la evaluación, es necesario conocer la anatomía y la función de cada estructura en la semilla. En este sentido, la integridad del embrión es primordial. Cualquier daño que pueda sufrir el embrión conlleva normalmente a la falta de germinación o a la formación de plántulas anormales poco viables y vigorosas. El endospermo (tejido que contiene las sustancias de reserva de algunas semillas) también interviene sustancialmente en el proceso de germinación, así como en la formación de la plántula.

La evaluación de cada semilla se basa en múltiples factores, a saber: turgencia y aspecto general de los tejidos, fracturas, tejidos sin embrión, daños causados por insectos, anormalidades y otras causas que puedan debilitar la semilla o hacerla no viable. El tamaño, localización y naturaleza de los daños y otros defectos en o entre las estructuras son factores decisivos para determinar el nivel de viabilidad (Rodríguez *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

En la regeneración vía organogénesis de yemas adventicias en *Pinus taeda*, tanto la composición del medio basal como el sistema de cultivo utilizado, han demostrado ser de suma importancia. En base a los resultados obtenidos, se concluye que el medio basal compuesto por las sales de Murashige y Skoog al 50% de su concentración original con la adición de Nitrógeno al 50 %, expresó una mayor producción de yemas.

En cuanto a los sistemas de cultivo evaluados; los medios líquidos si bien no favorecieron el desarrollo de los embriones cigóticos cultivados; al existir pocos reportes de su uso en el género *Pinus*, son necesarios mayores estudios. En cambio, la utilización de medios semisólidos ha arrojado resultados positivos, en cuanto al porcentaje de regeneración de yemas adventicias vía organogénesis.

El empleo de un biocida comercial, con el fin de contrarrestar o neutralizar el crecimiento bacteriano endofítico y un buffer con buena capacidad de amortiguación, ha permitido lograr un control químico efectivo de la contaminación; además de mantener el pH del medio basal en un rango óptimo para el cultivo. Lo que posibilitó la obtención de un mayor porcentaje de embriones germinados con síntomas de nula a moderada fitotoxicidad.

La prueba de viabilidad empleada, ha sido de utilidad para confirmar la calidad de las semillas utilizadas en los experimentos y ha hecho posible explicar algunos resultados, como ser, que la elevada falta de respuesta de los explantes al utilizar medio líquido, se debe al sistema de cultivo empleado.

Si bien son necesarios mayores estudios, acerca de los distintos parámetros que afectan la organogénesis de yemas adventicias en *P. taeda*, queda demostrado que el microclima dentro del recipiente de cultivo, ejerce un efecto determinante para lograr una mayor eficiencia en el uso de biorreactores de inmersión temporal, como una alternativa viable para su micropropagación a mayor escala.

CUADROS Y GRÁFICOS

Tabla 1: Formulaciones ensayadas para determinar el efecto de la interacción entre el contenido de nitrógeno inorgánico y benciladenina sobre la organogénesis de embriones cigóticos maduros de *P. taeda*

Tratamientos	Concentración Medio Basal	Nitrógeno inorgánico*
1	MS $\frac{1}{4}$	N 25%
2	MS $\frac{1}{4}$	N 50%
3	MS $\frac{1}{4}$	N 75%
4	MS	N 100%
5	MS $\frac{1}{2}$	N 50%

Referencias: MS= solución nutritiva provista de las sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{2}$ = diluidas a 25 y 50% respectivamente de su formulación original. *: Las fuentes nitrogenadas de la solución nutritiva MS modificadas en cada formulación fueron NH_4NO_3 y KNO_3 . N=25, 50,75 y 100% de su formulación original.

Tabla 2: Efecto de la interacción entre el contenido de nitrógeno inorgánico y benciladenina sobre la organogénesis de embriones cigóticos maduros de *P. taeda* en medio semisólido.

Tratamientos	% infectados	% oxidados	% germinados	% regenerados	Nºbrotes/explante
1	44±19,49 b	6±13,41 a	2±4,47 ab	20±15,81 b	4,43±3,96 a
2	14,44±22,08 a	25,5±20,34 ab	0±0,00 a	10,72±1,10 ab	9,4±6,06 a
3	0±0,00 a	28±13,03 ab	10±10 ab	8±8,36 ab	2,1±2,50 a
4	0±0,00 a	28±19,23 ab	14±5,47 b	4±8,94 ab	1±1,41 a
5	0±0,00 a	51,11±18,87 b	8±8,36 ab	2±4,47 a	3,2±6,61 a

Referencias: % germinados- indica los embriones cigóticos que germinaron, pero no demostraron regeneración alguna.

Tabla 3. Efecto de los diferentes sistemas de cultivo sobre sobre la organogénesis de yemas adventicias en *P. taeda*.

Tratamientos	% infectados		% oxidados		% germinados		% regenerados		N° yemas/explante	
	SS	IT	SS	IT	SS	IT	SS	IT	SS	IT
MS ¼+N 25%	36,67±20,82 b	0±0,00 a	0±0,00 a	18,67±6,11 b	0±0,00 ab	0±0,00 a	63,33±20,82 a	0±0,00 a	5,57±2,91 a	0±0,00 a
MS ¼+N 50%	23,33±11,55 ab	0±0,00 a	6,67±11,55 ab	0±0,00 a	20±20,82 a	0±0,00	33,33±20,82 ab	0±0,00 a	4,25±2,95 a	0±0,00 a
MS ¼+N 75%	0±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 ab	0±0,00 a	0±0,00 ab	0±0,00 a	0±0,00 ab	0±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a
MS + N 100%	0±0,00 a	0±0,00 a	6,67±5,78 ab	0±0,00 a	59,17±21,26 b	0±0,00 a	34,17±26,50 ab	0±0,00 a	1,53±0,50 a	0±0,00 a
MS ½+N 50%	0±0,00 a	26±45,03 b	6,67±5,77 b	0,67±1,15 a	21,11±18,36 ab	0±0,00 a	68,89±10,18 a	0±0,00 a	6,69±0,70 a	0±0,00 a

Referencias: SS- sistema semisólido; IT- Biorreactores de inmersión temporal RITA®. % **germinados**- indica los embriones cigóticos que germinaron, pero no demostraron regeneración alguna.

Tabla 4. Control químico de la contaminación basado en el uso de biocida comercial en la organogénesis de yemas adventicias en *P. taeda* en distintos sistemas de cultivo.

N° tratamiento	Tratamiento	% germinados	Rango de fitotoxicidad	pH	% infectados	% regenerados	N° yemas /explante
1	25 µL DCD	13,33±15,28 a	0	5,09±0,07 a	0±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a
2	50 µl DCD	56,67±11,55 b	0,5	5,01±0,06 a	0±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a
3	75 µl DCD	33,33±32,15 ab	0	5,11±0,10 a	0±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a
4	100 µl DCD	46,67±15,28 ab	0,5	4,95±0,02 a	0±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a
5	SIN DCD / 2000 µl MES	13,33±11,55 a	0	5,64±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a
6	25 µL DCD / 2000 µL MES	30,00±10,00 ab	0	5,57±0,01 a	0±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a
7	50 µl DCD / 2000 µl MES	56,67±28,87 b	1	5,63±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a
8	75 µl DCD / 2000 µl MES	16,67±15,28 a	0	5,62±0,01 a	0±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a
9	100 µl DCD / 2000 µl MES	20,00±26,46 a	0	5,62±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a

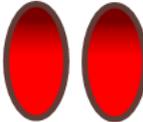
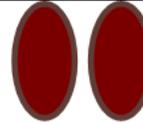
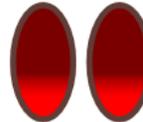
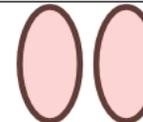
Referencias: Fitotoxicidad y/o efectos secundarios: es la capacidad de un compuesto de provocar un daño o una acción no deseada en la planta y se determinó de manera semi-cuantitativa al finalizar el experimento asignando un valor 1, 0.5 y 0 para alta, moderada y nula fitotoxicidad, respectivamente. **% con respuesta:** indica explantes verdes sin síntomas de ennegrecimiento tisular.

Tabla 5. Evaluación de los distintos sistemas de cultivos, sobre la regeneración u organogénesis a partir de embriones cigóticos de *P. taeda*.

Sistemas de cultivo	% SR	% oxidados	% germinados	N° yemas /explante	% de explantes con estructuras (yemas)	CBF	Sistema de regeneración
Medio semisólido sin ventilación por difusión	35±12,36 a	16,66±15,59 a	13,33±9,5 a	10,84±4,65 b	35±16,03 b	11,19±4,64 ab	D
Medio semisólido con ventilación por difusión	16±15,17 a	26±5,48 a	20±17,32 a	5,12±4,33 ab	38±22,8 b	5,50±4,29 b	D; I
Medio líquido con ventilación forzada (RITA®)	91,67±7,64 b	5±5 a	3,33±5,77 a	0±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a	I
Medio líquido con ventilación forzada (BIT)	80±17,32 b	20±17,32 a	0±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a	0±0,00 a	I

Referencias: % sin respuesta (SR)- embriones cigóticos sin respuesta; % germinados- indica los embriones cigóticos que germinaron, pero no demostraron regeneración alguna. CBF (capacidad de formación de brotes) = (N°. promedio de brotes por explante) + (% de explantes que formaron brotes) / 100; según la metodología utilizada por Lambardi *et al.* (1993). Sistema de regeneración: D (directo) e I (indirecto).

Tabla 6. Patrón de clasificación de viabilidad de semillas de *P. taeda*: descripción de las clases para la prueba de tetrazolio y porcentajes para cada una de ellas (Adaptado de Fogaça et al., 2006).

Categoría	Descripción	Patrón de clasificación de viabilidad	Resultados obtenidos (%)
Clase 1	VIABLE: Semillas completamente teñidas de rosa uniforme y tejido firme		0
Clase 2	VIABLE: Semillas con menos del 50% de tinción rojo intenso, típica de deterioro		44,29±12,37
Clase 3	VIABLE: Semillas que presentan menos del 20% con coloración rojo intenso, más del 20% de rojo y más de 10% de rosado		15,71±20,97
Clase 4	INVIABLE: Semilla con tinción rojo intenso en su totalidad		31,43±0,00
Clase 5	INVIABLE: Eje embriionario y más del 50% de coloración rojo intenso típico de deterioro		8,57±29,44
Clase 6	INVIABLE: Semilla con coloración totalmente blanco lechoso que presenta tejidos flácidos		0

Uso de sistemas de biorreactores en la propagación de especies forestales

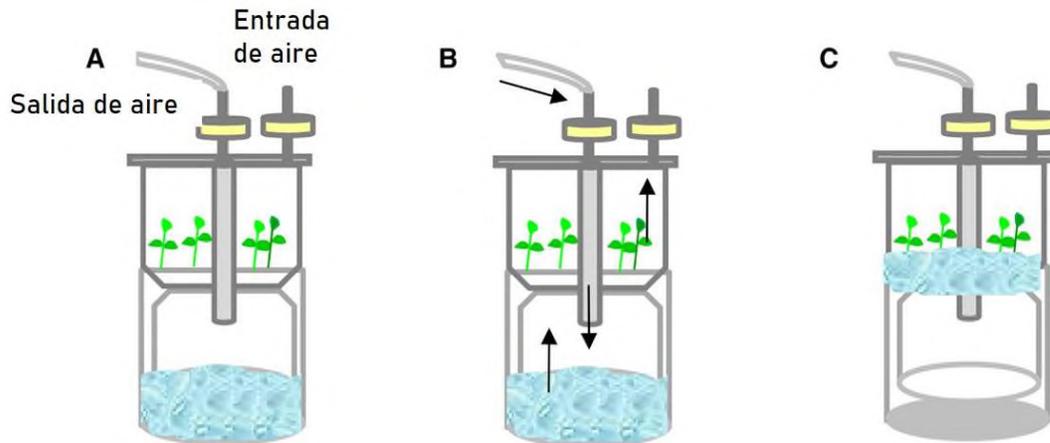


Figura 1: Biorreactor de inmersión temporal RITA®. Tomado de: **Engineering in Life Sciences, Volume: 19, Issue: 12, Pages: 896-915, First published: 19 September 2019, DOI: (10.1002/elsc.201900041).** (A) La bomba está apagada y el medio líquido está en el compartimento inferior, (B) la bomba impulsa aire a través del filtro de entrada, (C) la sobrepresión mueve el medio hacia arriba y provoca la inmersión de los explantes, así como la expulsión de aire a través del filtro de salida. Cuando la bomba está apagada, el medio baja por gravedad.

Uso de sistemas de biorreactores en la propagación de especies forestales

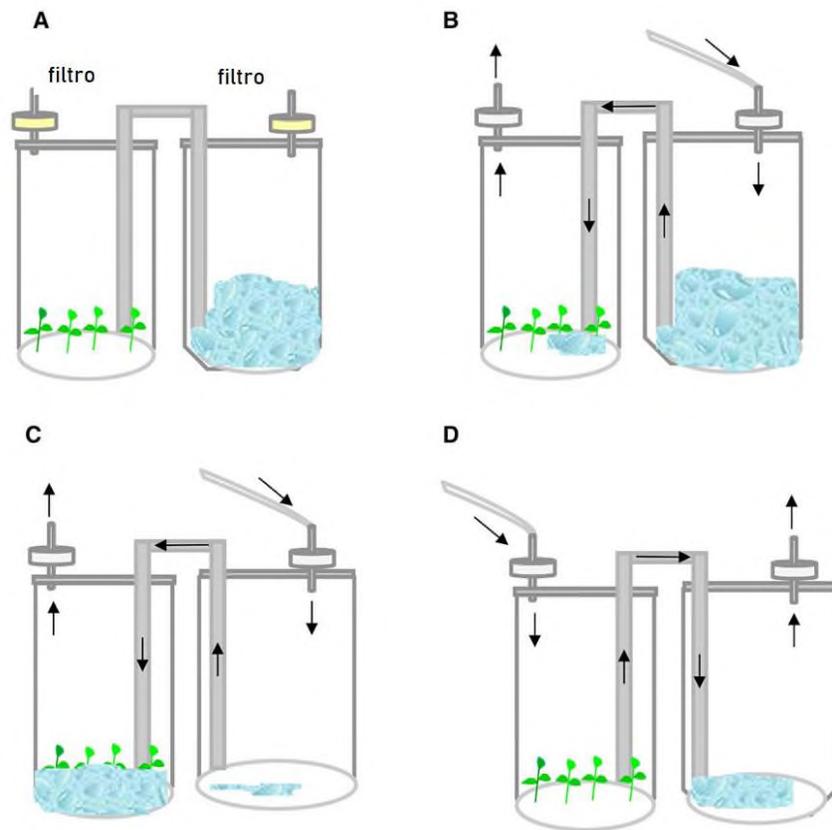


Figura 2: Biorreactor de inmersión temporal BIT. Tomado de: **Engineering in Life Sciences, Volume: 19, Issue: 12, Pages: 896-915, First published: 19 September 2019, DOI: (10.1002/elsc.201900041).** (A) El medio líquido está en un matraz separado del recipiente de cultivo que contiene los explantes, (B) la bomba impulsa aire a través del matraz que contiene el medio, forzando su movimiento hacia el recipiente de cultivo, (C) el medio causa la inmersión de los explantes, así como la expulsión del aire a través del filtro de salida, y (D) la bomba impulsa el aire a través del recipiente de cultivo, forzando su movimiento hacia el matraz vacío.



Figura 3: Determinación de viabilidad mediante la Prueba Topográfica por Tetrazolio.

BIBLIOGRAFIA:

- Alonso, P.; Moncaleán, P.; Fernández, B.; Rodríguez, A.; Centeno, M.L.; Ordás, R.J. (2006) An improved micropropagation protocol for stone pine (*Pinus pinea* L.). *Ann. For. Sci.* 63: 879-885
- Andrejow, G. e Higa, A. (2009). Potencial de enraizamiento de miniestacas de *Pinus taeda* L. provenientes de brotación apical de mudas juvenes. *Revista Floresta* 39 (1):897-903.
- Barone, J.; Luna, C.; Oberschelp, G. (2018). Efecto del medio basal en la organogénesis directa del *Pinus taeda* L. UNNE. Argentina. Disponible en https://bdigital.uncuyo.edu.ar/objetos_digitales/13179/17-ciencia-tecnologa-e-innovacin-barone-javier-unne.pdf
- Cantillo, R.; Rodríguez, L., Rosales, Y.; Guadalupe, O. (2006). Germinación *in vitro* de *Pinus cubensis* Griseb. *Biología Vegetal* 9 (4): 217 – 224.
- Cantillo, R.; Igarza, J.; Ochoa, A.M. (2011) Propagación *in vitro* de plantas de *Pinus cubensis* Griseb. *Biología Vegetal* 11 (1): 3-13
- Cedrés Gazo, M. [et al.]. 2015. Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro* / coordinación general de Sandra Sharry; Marina Adema; Walter Abedini. - 1a ed. adaptada. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata. 241 pp.
- Chávez, A., Egertsdotter, U. y Flinn, B. (2012). Comparison of gene expression markers during zygotic and somatic embryogenesis in pine. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 48 (1):341–354.
- Chávez Millán, 2010. Propagación *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *caribaea* por organogénesis. Tesis en opción al título académico de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. Universidad Central “Marta Abreu” De las Villas. Santa Clara, Cuba. 72 p.
- Chávez Millán, M. y De Feria, M. (2012). Aspectos básicos de la propagación *in vitro* del género *Pinus* por organogénesis. *Biología Vegetal* 12 (3): 131 – 142.
- Chávez-García, J.; Andrade-Rodríguez, M.; Juárez-López, P.; Villegas-Torres, O.; Sotelo-Nava, H.; Perdomo-Roldan, F. 2018. Evaluación de tres sistemas de cultivo *in vitro* para la multiplicación de microcormos de gladiolo. *Rev. fitotec. Mex.* 41(4a): 551-554.
- Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C. (2018). InfoStat Software Estadístico. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <https://www.infostat.com.ar/>
- Di Marco, E. (2014). *Pinus taeda* L. (Pino taeda, Pinotea, Pino Resinoso, Loblolly Pine) Familia Pinaceae. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Disponible en: <http://forestoindustria.magyp.gob.ar/archivos/procedimiento-requerido-en-plantaciones/pinus-taeda-l-familia-pinaceae.pdf>
- Dhumale, D. y Newton, R. (1996) Effect of mannitol induced stress and ABA on shoot enhancement from apical meristems in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Indian Journal of Plant Physiology* 1, 214-215.
- Falkner, F (1997) Antibiotics in plant tissue culture and micropropagation what are we aiming at?. En: Cassells AC (Ed) *Pathogen and Microbial Contamination Management in micropropagation*. Kluwer Academic Publishers. pp155-160. Dordrecht.
- Faustino, L., Bulfe, N., Pinazo, M. y Graciano, C. (2012). Crecimiento de cuatro familias de *Pinus taeda* en respuesta a la fertilización con nitrógeno y fósforo en el establecimiento de la plantación. *Revista Facultad de Agronomía* 111 (2): 54-63.

- Fogaça, C., Malvasi, M., Zucareli, C. y Malvasi, U. (2006). Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. *Caesalpinaceae*. *Revista Brasileira de Sementes* 28(3):101-107.
- Giménez Verdú, I. (1984). Efecto inhibitor de algunos biocidas sobre la actividad enzimática del suelo. *Bol. Serv. Plagas*. 10: 257-298.
- Goldfarb, B, LeBude A, Dougherty K, Newkirk S, Jetton R. (1999). Effect of age on maturation of loblolly pine clones maintained by hedging and serial propagation. Disponível en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/117/97>
- González-Cabrero, N., Ruiz-Galea, M., Alegre, J. et al. (2018). Growth, morphology and maturation ability of *Pinus pinea* embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 135, 331–346. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1467-9>
- Hampel, H. (2005). El potencial de Negocio de Especies Forestales No Tradicionales en Misiones, Argentina. Universidad Nacional de Misiones.
- Handley, L., Becwar, M., Chesick, E., Coke, J., Godbey, A. y Rutter, M. (1994), Research and development of commercial tissue culture systems in loblolly pine, *Pinus taeda* L. *Division Biological Sciences Symposium*.
- Howarth, M. y Stanwood, P. (1993). Tetrazolium staining viability test using color image processing. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* 36:1937–1940.
- ISTA (2014). International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing. Bassersdorf, Switzerland.
- Jiménez- Terry, F. y Agramonte, D. (2006). Cultivo in vitro y micropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Vol. 13. Núm. 1. Cuba. Disponible en <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/89/456>
- Jiménez, P., Medina, J., Pan, E., Ruiz, A. y Umlandt, M. (2014). Uso de residuos de carpintería de las especies *Prosopis alba* y *Pinus* sp. en la elaboración de paneles aglomerados. *Revista Quebracho* 24(1,2): 26-35.
- Lambardi, M.; Sharma, K. y Thorpe, T. (1993). Optimization of in vitro bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). *In vitro Cell Dev Biol Plant*, 29(1):189-199.
- Leifert, C.; Ritchie, Jy.; Waities Wm. (1991). Contaminants of plant-tissue and cell cultures. *World J Microb Biotechnol* 7:452–469.
- Lelu, M., Michele W. y Klimaszewska K. (2006). Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). *Plant Cell Report* 25: 767-776.
- Luna, C.; Collavino, M.; Mroginski, L.; Sansberro, P. (2008). Identification and control of bacterial contaminants from *Ilex dumosa* nodal segments culture in a temporal immersion bioreactor system using 16S rDNA analysis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 95:13–19. Doi:10.1007/s11240-008-9408-7.
- Luna, C.; Acevedo, R.; Collavino, M.; González, A.; Mroginski, L.; Sansberro, P. (2013). Endophytic bacteria from *Ilex paraguariensis* shoot cultures: localization, characterization, and response to isothiazolone biocides. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. Volume 49, Issue 3, pp 326-332.
- Mallón, R., Covelo, P. y Vieitez, A. (2012). Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: application of temporary immersion for mass propagation. *Trees*. 26(3): 731-741.

- Mehra-Palta, A., Smeltzer, R. y Mott, R. (1978). Hormonal control of induced organogenesis– Experiments with excised plant parts of loblolly pine. *Tappi J*, 61(1):37.
- Mott, R., Amerson, H. y McKeand, S. (1981) Tissue culture and greenhouse practices for the production of loblolly pine plantlets. In Proc. 16th South. For. Tree Impr. Conf., pp. 168-173.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nehra, N., Becwar M., Rottmann W., Pearson L., Chowdhury K., Chang S., Wilde H., Kodrzycki R., Zhang C., Gause K., Parks D. y Hinchee M. (2005). Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 41: 701-717.
- Ojeda-Zacarías, M.; Luna-Olvera, H.; Morales-Ramos, L.; Verde-Star, M.; Torres-Cepeda, T.; Pereyra-Alfárez, B.; Iracheta-Donjuan, L.; Olivares-Sáenz, E.; Salazar-Sáenz, R.; Cárdenas-Cerda, E. (2006). Multiplicación *in vitro* del Piñón Azul *Pinus maximartinezii* (Rzedowski). *Phyton* 75: 109-113.
- Peña, T., Rocano, C., Salazar, O. y Torres, C. (2014). Inducción de la brotación *in vitro* de microplántulas de Nogal (*Juglans neotropica*) tratadas con Thidiazuron (TDZ) y 6-Bencilaminopurina (BAP). *MASKANA* 5(2):81-85.
- Pezzutti, R., Schenone, R., Caldato, S. Chrapek, C., Ortega, V. (2017). Productividad de procedencias de *Pinus taeda* y *Pinus elliotii* x *Pinus caribaea* var *hondurensis*. *Anuario Universidad del Salvador*.
- Pullman, G., Skryabina A. (2007). Liquid medium and-liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Report* 26:873-887.
- Quijala, E., Cañal, M, Meijón, M., Rodríguez, R, Chávez, M., Valledor, L. y Barbón, R. (2012). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 109(2): 223-234.
- Ritter, L. (2017). Regeneración de árboles nativos en plantaciones de *Pinus taeda* L. en el Norte de Misiones: efectos del manejo a nivel del rodal y el paisaje. Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Disponible en http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/63363/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Rasband, W.S. (2007). ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Disponible en <https://imagej.nih.gov/ij/>
- Rodríguez, I., Gilles, A. y Altisent, J. (2008). Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. *Revista Agricultura*, 912(1):836-838.
- Sánchez, M., Zapata, J., Sáez, P., Ríos, D., Spiercolli, S., Álvarez, C., Delaveau, C. y Pereira, G. (2008). Competencia morfogénica de embriones maduros de *Pinus radiata* cultivados *in vitro* y su relación con la posición del cono en el árbol. *Bosque (Valdivia)*, 29(3): 212-216. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002008000300004>
- Schenone, R., Pezzutti, R., Caldato, S., Becerro, G. y Chrapek C. (2012). Estudio del crecimiento hasta la edad de corte de un rodal de *pinus taeda* l. localizado en el nordeste de Corrientes. XXVI Jornadas forestales de Entre Ríos.
- Silva, F. (1998). Datos climáticos de Iguazú, período 1941 – 1990. [S.l.]. Facultad de Ciencias Forestales. Informe asesoría. Cátedra agrometeorología.

- Steinmacher, D. A., Guerra, M. P., Saare-Surminski, K. and Lieberei, R. (2011). A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany* doi:10.1093/aob/mcr033.
- Tang, W. y Ouyang, F. (2000). Plant regeneration via organogenesis from six families of loblolly pine. *Plant Cell, Tissue and Organ culture* 58: 223-226.
- Tang, W, Guo Z (2001) In vitro propagation of loblolly pine via direct somatic organogenesis from mature cotyledons and hypocotyls. *Plant Growth Regulation* 33(1): 25-31.
- Tang, W.; Harris, LC.; Outhavong, V.; Newton, R.J. (2004) Antioxidants enhance in vitro plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Cell Report* 22: 871-877
- Tang, W. y Newton, R. (2005). Regeneración de plantas a partir de cultivos de callos derivados de embriones cigóticos maduros en pino blanco (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Reports*, 24 (1), 1–9.
- Vílchez, J. y Albany, N. (2014). Multiplicación in vitro de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersión temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVI (2), 96-103. ISSN: 0123-3475. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=776/77632757012>
- Watt, M. (2012). The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*; 11(1): 14025-14035.
- Williams, T. (2007). The mechanism of action of isothiazolone biocides. *Power Plant Chem* 9:14–22.
- Zárate, R.; Aparacio, A.; Cantos, M.; y Troncoso, A. (1997). Regeneración de plantas mediante organogénesis adventicia. Málaga. Disponible en http://www.biolveg.uma.es/abm/Volumenes/vol22/22_Zarate.pdf
- Ziv, M. (2000). *Bioreactor Technology for Plant Micropropagation*. Rehovot 76100, Israel: Jules Janick.