



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Agrarias



TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
MODALIDAD TESINA

TÍTULO: “Propagación *in vitro* de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* vía organogénesis directa de embriones cigóticos maduros”.

ALUMNO: Daiana Nerea Riza.

DIRECTOR: Dra. Claudia Luna.

Año 2017

INDICE:

| | Pág. |
|--------------------------------|------|
| I-Resumen..... | 1 |
| II-Introducción..... | 2 |
| III- Objetivos..... | 3 |
| IV- Antecedentes..... | 4 |
| V-Materiales y métodos..... | 4 |
| VI-Resultados y discusión..... | 6 |
| VII-Conclusión..... | 10 |
| VIII-Cuadros y gráficos..... | 11 |
| IX-Bibliografía..... | 14 |

I-RESUMEN:

Estudios realizados sobre germoplasmas de origen australiano indican que el híbrido *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* tiene mejores propiedades de la madera que las especies que le dan origen e indican que las diferencias halladas no presentan inconvenientes para su utilización en el mercado. La escasa producción de semilla híbrida F_1 ha determinado que se recurra por un lado a la multiplicación vegetativa de esta descendencia. Con el cultivo de tejidos vegetales se puede llevar a cabo la clonación de árboles de importancia forestal con el fin de obtener su mejoramiento genético o propagación masiva. La organogénesis, entre otras técnicas, ha sido considerada como el sistema *in vitro* de elección para la potencial propagación masiva de genotipos superiores de especies forestales. El objetivo general de este trabajo fue obtener un protocolo óptimo de regeneración, producción de yemas a partir de embriones cigóticos maduros de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*; y su posterior elongación en biorreactores de inmersión temporal. Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos sugieren que la estratificación en frío de las semillas durante 3 días optimiza la regeneración de yemas una vez que los embriones cigóticos son cultivados en medio semisólido (0,65% de agar) compuestos por las sales y vitaminas del medio basal de Murashige y Skoog (1962) diluido a la mitad de su concentración, con 3% de sacarosa y adicionado con 0,1 mg. L^{-1} de Bencilaminopurina y Thidiazuron. Para mejorar el proceso de regeneración de yemas, las estructuras inducidas en el medio semisólido descrito deben ser transferidas a biorreactores de inmersión temporal con un medio basal libre de reguladores de crecimiento vegetal. Por otra parte si el objetivo es optimizar la producción de brotes por explantes se recomienda utilizar un medio enriquecido con BA 2,5 mg. L^{-1} . Adicionalmente, los datos generados en este trabajo permiten observar un efecto positivo al combinar Giberelina 0,2 mg. L^{-1} y Ácido indol acético 0,1 mg. L^{-1} en la elongación de yemas vegetativas obtenidas vía organogénesis en pino híbrido.

II-INTRODUCCIÓN:

De acuerdo al último inventario satelital realizado por la Dirección Forestal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (2002), y estimaciones realizadas por Braier (2004), la República Argentina cuenta con 1,2 millones de hectáreas de bosques cultivados; de las cuales, aproximadamente el 80 % se encuentran distribuidas en las Provincias de Misiones, Corrientes y Entre Ríos.

La Provincia de Misiones cuenta con plantaciones de *Pinus elliottii* y *P. taeda*, y en menor medida, *P. caribaea* y *Araucaria angustifolia*; posee una pequeña proporción de eucaliptos (*Eucalyptus dunnei*, *E. saligna* y *E. grandis*), y pequeñas superficies implantadas con especies de mayor valor tales como toona o cedro australiano (*Toona ciliata*), paraíso (*Melia azedarach*), grevillea (*Grevillea robusta*) y kiri (*Pawlonia* sp.). Por su parte, la provincia de Corrientes posee plantaciones mayormente de pinos y eucaliptos; en pinos se cultivan las mismas especies que en Misiones mientras que en eucaliptos predomina *E. grandis*. Asimismo, existen algunas plantaciones de *Grevillea* sp. y paraíso. En la provincia de Entre Ríos predominan las implantaciones de eucaliptos y solo un 10 % de la superficie restante es complementada con especies de pinos, principalmente *P. elliottii* y *P. taeda* (Sánchez Acosta y Vera, 2005).

El empleo de germoplasma híbrido de *P. elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* (Pee x Pch) ha tenido amplia aceptación en la región nordeste de nuestro país, adaptándose a una amplia variación de condiciones ambientales, en la comunidad forestal existe un consenso generalizado acerca de las ventajas técnicas e industriales que ofrece el empleo de las generaciones F₁ y F₂ (Gauchat *et al.*, 2005) con relación al uso de sus parentales individuales, ya que ha demostrado ser uno de los híbridos más prometedores en países como Australia y Sudáfrica, Sur de Brasil y Noreste de la Argentina. Esta entidad taxonómica ha sido desarrollada en Queensland (Australia) en la década del 1950, alcanzando un gran reconocimiento por el incremento de la productividad en plantaciones, a través de un amplio rango de ambientes, ya que combina caracteres deseables de los parentales, como ser: rectitud de fuste, resistencia al viento, tolerancia a suelos pobremente drenados y resistencia a heladas del *P. elliottii* var. *elliottii* (Pee) y el rápido crecimiento, buena ramificación y uniformidad de la madera del *P. caribaea* var. *hondurensis* (Pch) (Fortes, 2011).

El híbrido Pee x Pch se obtiene llevando a cabo cruzamientos controlados entre dichas especies, utilizando al Pee como madre y al Pch como donador de polen. Sin embargo, dos problemas se encuentran asociados a la producción del híbrido: primero, la floración de las especies progenitoras no ocurre de manera simultánea. El segundo problema que se suscita en la producción del híbrido, es la alta incompatibilidad de las dos especies, lo que resulta en un bajo número de semillas híbridas viables (Doyle y Verhoeven, 2002).

En la actualidad, la oferta de semillas comercializadas tradicionalmente por los centros de origen (Australia y Sudáfrica) es superada por la demanda mundial. Los problemas

asociados a la propagación por semillas constituyen factores limitantes, para la obtención del material requerido para las plantaciones y ante esta dificultad las técnicas biotecnológicas pueden desempeñar un papel importante, para garantizar ante determinadas condiciones un suministro adecuado de vitroplantas como material de plantación (Daquinta *et al.*, 2004).

Esta escasa producción de semilla híbrida F₁ ha determinado que se recurra por un lado a la multiplicación vegetativa de esta descendencia, y por otro lado a la utilización de semilla híbrida F₂ obtenidas mediante polinización abierta de progenies F₁. Si bien, los individuos F₂ muestran mayor variabilidad, aún se conserva una buena tasa de crecimiento y calidad de madera (Nikles, 2000; Harding y Copley, 2000).

Con el cultivo de tejidos vegetales, utilizando partes aisladas de la planta (semillas, embriones, hojas, tallos, raíces, flores, frutos, anteras, microsporas, células, protoplastos, etc.) se puede llevar a cabo la multiplicación de árboles de importancia forestal con el fin de obtener su mejoramiento genético, propagación masiva o simplemente recuperarlo si éste se encuentra dentro de alguna categoría de extinción (Roca y Mroginski, 1993; Pierik, 1997). Varias especies forestales se propagan por esta vía, tales como los géneros *Pinus*, *Thuja*, *Quercus*, *Picea*, *Abies*, *Sequoia*, *Pawlonia*, *Ulmus*, *Eucalyptus*, entre otros ya sea por medio de la regeneración de brotes (organogénesis) o por la formación de embriones somáticos (embriogénesis somática) (Nehra *et al.*, 2005).

El establecimiento de cultivos *in vitro* mediante la siembra de semillas ofrece grandes ventajas para la propagación: 1) proporciona de una manera rápida plántulas que sirven como fuente de explantes para llevar a cabo la micropropagación; 2) permite conservar plántulas con variabilidad genética natural, y 3) permite la germinación de semillas que de forma natural no lo hacen o es muy difícil de hacer en condiciones normales (Fay, 1992; Pierik, 1993).

La regeneración de plantas a partir de cultivo *in vitro* de ciertas especies leñosas, exige la búsqueda de técnicas complejas, como ser la obtención de plantas a partir del aislamiento y cultivo de embriones inmaduros, inducción de la embriogénesis somática y micropropagación a partir del cultivo de segmentos nodales provenientes de individuos juveniles y/o adultos e inclusive la automatización para la obtención de plantas a escala masiva (Luna, 2010). La regeneración de plantas mediante organogénesis ha demostrado ser eficiente en la propagación comercial de muchas especies vegetales (Zhang *et al.*, 2006).

III- OBJETIVOS:

El objetivo general de este trabajo fue obtener un protocolo óptimo de regeneración, producción de yemas a partir de embriones cigóticos maduros de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* y su posterior elongación en biorreactores de inmersión temporal.

Objetivos particulares

- Establecer un protocolo de estratificación de semillas para la especie.
- Constituir cultivos para la regeneración y producción de yemas a partir de embriones cigóticos maduros.
- Ensayar distintas formulaciones de composición química definida en biorreactores de inmersión temporal para elongar las estructuras obtenidas vía organogénesis.

IV- ANTECEDENTES:

El método preferido para propagar el pino híbrido es mediante estacas, ya que ésta es la manera más rentable y eficiente de reproducir clones superiores. Desafortunadamente, a medida que los setos de producción maduran, las estacas tomadas a partir de ellos exhiben menores porcentajes de enraizamiento y sistemas radiculares inferiores comparados con los obtenidos a partir de estacas tomadas de material más juvenil, a menudo con orientaciones de raíces horizontales o unilaterales. Este problema durante mucho tiempo ha sido reconocido como un impedimento grave en sistemas de producción de pino clonal (Horgan *et al.*, 1997; Aimers-Halliday *et al.*, 2003).

Meyer (1998) obtuvo plantas de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* mediante organogénesis directa a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros; utilizando medios basales suplementados con citocininas (bencilaminopurina, zeatina y cinetina) y auxinas (ácido indol butírico) para inducir la formación de brotes adventicios y la elongación de los mismos.

González (2010) ha micropropagado el pino híbrido mediante organogénesis indirecta a partir del cultivo de embriones cigóticos maduros y mediante segmentos nodales. Ensayando distintos medios basales con diferentes combinaciones de auxinas (ácido indol butírico) y citocininas (bencilaminopurina), en múltiples etapas de cultivo para la obtención de vástagos a partir de callos.

Fortes (2011) obtuvo plantas de pino híbrido a partir de la organogénesis directa. Trabajo con medio de cultivo semisólido de Murashige y Skoog (1962) con y sin el agregado de citocininas (bencilaminopurina y thidiazuron) para la regeneración de yemas, como medio de elongación utilizó el mismo medio basal modificado con auxinas. Los resultados experimentales obtenidos en el contexto de este trabajo permiten contar con un procedimiento tecnológico para la producción masiva de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *Hondurensis* mediante el uso de biorreactores de inmersión temporal.

V-MATERIALES Y MÉTODOS:

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste.

Material Vegetal: Se trabajó con semillas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, cosecha 2016 correspondiente al Proyecto PIA 14025. 2015-2017.

Condiciones experimentales:

1- Acondicionamiento de las semillas:

Primeramente, las semillas fueron escarificadas con peróxido de hidrogeno 30 vol. por 24 h en agitación constante (Fortes, 2011).

A continuación las semillas fueron sometidas a un proceso de esterilización superficial, sumergiéndolas sucesivamente en etanol al 70% (2 min), agua estéril (5-10 min), hipoclorito de sodio al 30% (15-20 min), y 3 veces en agua estéril (10-15 min).

2- Estratificación de semillas:

Una vez escarificadas, las semillas fueron sometidas a estratificación (TE) en frío de heladera (4-10°C) durante 1 a 6 días.

Se ensayaron distintos tiempos de estratificación (4-10°C): TE 0 días; TE 1 día; TE 2 días; TE 3 días; TE 4 días; TE 5 días y TE 6 días.

3- Establecimiento *in vitro*:

Los embriones cigóticos maduros provenientes de los distintos tratamientos de estratificación fueron aislados y cultivados (puestos horizontalmente) en tubos de 11 cc conteniendo 3 ml del medio de cultivo semisólido de regeneración propuesto por Fortes (2011); consistente en la solución nutritiva compuesta por las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) diluida a la mitad de concentración, con 3% de sacarosa y adicionado con TDZ (Thidiazuron) (0,1 mg. L⁻¹) y BA (Bencilaminopurina) (0,1 mg. L⁻¹). El pH del medio 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 kg.cm⁻² durante 20 minutos.

La siembra se realizó en campana de flujo laminar, colocando un embrión por tubo. Posteriormente fueron incubados durante 45 días en condiciones de luz (116 µmol.m⁻². s⁻¹, PAR, fotoperíodo 14 hs.) y temperatura (27±2 °C) controladas. Luego de 45 días de incubación se registró el porcentaje de organogénesis y/o neoformación de yemas adventicias a partir del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos, contabilizando el número de estructuras obtenidas para cada tratamiento de estratificación.

4- Influencia del uso de reguladores de crecimiento sobre la regeneración y elongación de yemas vegetativas obtenidas vía organogénesis en pino híbrido:

En esta etapa del trabajo se utilizaron embriones cigóticos provenientes de semillas con tres días de estratificación en frío, ya que estos arrojaron los mejores resultados.

Con el propósito de estimular el desarrollo de brotes, los explantes regenerantes provenientes de un medio de inducción fueron subcultivados en unidades de inmersión temporal RITA, se ensayaron distintas formulaciones constituidas del mismo medio basal de la etapa anterior pero adicionado con diferentes reguladores de crecimiento: auxinas

(Ácido indol acético: AIA) y citocininas (BA); por otra parte giberelinas (GA₃) y auxinas (AIA) en distintas concentraciones y biocida¹ (según protocolo propuesto por Luna, 2010) para controlar la contaminación bacteriana endógena, detectada en ensayos preliminares a esta tesis.

La evaluación se realizó a los 45-60 días de incubación. Se determinó porcentaje de oxidación, de regeneración y de elongación de yemas; número de brotes por explante, número de brotes elongados por explante y longitud de los brotes elongados (mm).

Análisis estadístico

Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento en todos los experimentos. Se cultivaron explantes individuales empleándose 25 por tratamiento; considerándose éste una unidad experimental. Los parámetros evaluados fueron sometidos al análisis de la variancia (ANOVA) y prueba de Tukey ($P \geq 0,05$) empleándose el programa Infostat® (Di Rienzo *et al.*, 2011).

VI-RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

- **Estratificación de semillas**

En esta experiencia se ha logrado registrar que el número de yemas neoformados por explantes ($13,2 \pm 8,2$) fue mayor en las semillas estratificadas a 4 ° C en heladera durante 3 días (Tabla 1 y Figura 1) (Ayala *et al.*, 2017). En los parentales de la especie en estudio, se ha registrado que en *P. elliottii* se ha mejorado la capacidad germinativa por encima del 90 % con solo remojarlas en peróxido de hidrogeno durante 36 h y con un remojo en peróxido de hidrogeno por 4h y estratificación fría por 15 días se logró el 100% de germinación (Willan, 1991). Mientras que Matias *et al.* (1973) comprobaron que las semillas de *Pinus caribaea* que habían estado en remojo en agua a temperatura ambiente durante 48 horas tenían una germinación más uniforme que las semillas que no se habían tratado. En este caso ambas técnicas (escarificado químico con peróxido de hidrogeno y estratificación en frio) han logrado mejorar los resultados reportados por Fortes (2011) de $6 \pm 0,8$ yemas adventicias por explante (Ayala *et al.*, 2017).

El peróxido de hidrógeno ha sido empleado exitosamente en especies del género *Pinus* como promotor de la germinación y antimicrobiano previniendo la proliferación de algunos hongos (Muñoz López *et al.*, 2009; Mas I Gisbert *et al.*, 2011). Su acción desinfectante se centraría en su capacidad de actuar como un agente oxidante energético, disociándose en agua y oxígeno molecular, sin dejar residuos tóxicos (Iáñez, 1998); a la vez que su propiedad de disminuir la dureza de la testa (escarificación) favorecería la absorción del

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>).

hipoclorito de sodio u otros desinfectantes que se utilicen en combinación (Mas I Gisbert *et al.*, 2011).

Semillas con un pericarpio duro e impermeable, exhiben doble dormancia y requieren de tratamientos de escarificación y estratificación (Rowe y Bazich, 2008). Algunos autores mencionan que estos tipos de dormancia pueden ser superados con tratamientos que incluyan el uso de ácidos o estratificándolas a bajas temperaturas obteniendo hasta un 50% de germinación (García-Magaña, 1994).

Parece que la combinación de un nivel de humedad elevado y una temperatura baja pone en marcha una serie de cambios bioquímicos que transforman sustancias nutritivas complejas en otras formas más sencillas que son utilizadas por el embrión cuando éste renueva su crecimiento en la germinación (Willan, 1991). Para el género *Pinus*, la estratificación se encuentra más que recomendada, empleándose diferentes condiciones dependiendo de la especie. Por ejemplo para *P. halepensis*, *P. pinaster*, *P. pinea* es de 2 a 4 semanas en frío y para *P. nigra*, *P. sylvestris* y *P. uncinata* es de 4 semanas en frío de heladera (4 a 10 °C) (AHIM, 2009). Mientras que para *Pinus ponderosa*, y *Pinus jeffreyi* es conveniente que se realicen estratificaciones dentro del rango de 40 a 60 días de estratificación a baja temperatura (2 a 3° C) (Varela y Arana, 2011).

Mediante la estratificación en frío no sólo se supera la latencia fisiológica, sino que se puede reducir también la sensibilidad de las semillas durmientes y no durmientes a sus necesidades óptimas de luz y temperatura, de lo que se deriva un incremento de la tasa de germinación y de la uniformidad de ésta en condiciones diversas. Si se efectúa correctamente, la estratificación en frío no produce daños en las semillas no durmientes que están intactas y que no han resultado deterioradas por un envejecimiento fisiológico excesivo. Por consiguiente, puede aplicarse sin riesgo cuando cabe esperar diferentes grados de latencia en el mismo lote de semilla (Willan, 1991). Esta metodología puede utilizarse en programas de mejoramiento para la crioconservación de germoplasma de la especie en estudio (Ayala *et al.*, 2017).

- **Influencia del uso de reguladores de crecimiento sobre la regeneración y elongación de yemas vegetativas obtenidas vía organogénesis en pino híbrido.**

Auxinas (AIA) y citocininas (BA):

En los distintos tratamientos el porcentaje de oxidación varió entre 88,38±31,49 y 43,33±15,28 dándose la mayor oxidación en el tratamiento (T12) (Tabla 2 y Figura 2). La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot *et al.*, 1996; Bray *et al.*, 2000). La toxicidad de los exudados está en relación con el incremento en la producción de

compuestos fenólicos ya que estos son oxidados para formar quinonas, debido a la actividad de enzimas oxidativas, y posteriormente polimerizados (Tabiyeh *et al.*, 2006). El daño que resulta de la producción de exudados es usualmente más severo durante los estados iniciales de cultivo. El problema tiende a cesar cuando el explante inicia su crecimiento. Como en el cultivo de brotes y yemas de *Alnus oregona* que se produjo liberación y oxidación de sustancias durante las 10 primeras semanas en cultivo, provocando pérdidas importantes. Luego de la semana 22, cuando los explantes iniciaron su multiplicación, el problema desapareció (Garton y Moses, 1986).

Con respecto a la regeneración el tratamiento libre de reguladores (T0) ha registrado el mayor porcentaje de regeneración ($56,67 \pm 15,27\%$); con ello queda demostrado que el tejido queda inducido en la primera etapa de cultivo en medio semisólido y que el agregado de hormonas en esta fase de elongación no favorece a la regeneración de yemas adventicias, como se puede observar en los valores registrado entre $11,62 \pm 4,37\%$ (T12) y $51,28 \pm 8,62\%$ (T9). En cuanto a número de brotes por explantes los valores fluctuaron entre $3,67 \pm 1,07$ (T1) como valor menos favorable y $19,42 \pm 4,15$ (T4) como más favorable (Tabla 2). de Feria *et al.*, (2009) observaron cómo la respuesta *in vitro* de las plantas de *Pinus caribaea* var. *caribaea* (uno de los parentales del híbrido) varió en función de la concentración de BA adicionada al medio de cultivo; la conversión de los brotes y longitud de la planta principal fue mayor en ausencia de este regulador del crecimiento o al adicionar bajas concentraciones.

La regeneración de plantas de pino por organogénesis, se ha desarrollado 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 citocininas (Nandwani *et al.*, 2001). Los enfoques que parecen factibles con la propagación *in vitro* de los pinos son la producción de plantas a través de la formación adventicia de brotes de embriones maduros (Minocha, 1980; Aitken *et al.*, 1988; Halos y Go, 1993).

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a número de yemas elongadas por explante (Tabla 2). Desde el punto de vista práctico, podemos destacar que el T0 actuaría como medio de expresión, permitiendo manifestarse a las estructuras neoformadas en la inducción del establecimiento de los embriones con citocininas, al ser subcultivado a un medio libre de hormonas; demostrando no solo uno de los mejores valores de yemas por explante sino el mayor valor de conversión a yemas elongadas del experimento, junto con el T9 ($3,57 \pm 2,49$ a $3,56 \pm 4,74$ respectivamente).

La neoformación de los brotes adventicios está controlado por fitohormonas, siendo indispensable una adecuada relación auxina/citocinina en el proceso morfogénico. En general, una baja proporción auxina/citocinina favorece la formación de yemas adventicias,

mientras que la relación inversa promueve el enraizamiento de los brotes resultantes (Tang y Newton, 2005). Por su parte, las citocininas son reguladores del crecimiento muy eficaces para estimular la iniciación directa o indirecta de brotes *in vitro*. Cuando se utilizan altas concentraciones de este regulador en la fase de multiplicación, los brotes que se producen reducen su desarrollo (van Staden *et al.*, 2008). La adición de auxinas al medio de cultivo de elongación podría generar un brote con mayor potencial de enraizamiento en la siguiente fase por inducir la formación de raíces adventicias (Chávez y de Feria, 2012).

Giberelinas (GA₃) y auxinas (AIA)

De la misma forma que en el ensayo anterior la oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, ha sido notable. En este ensayo se registró un 33,33±6,00% de oxidación como resultado más favorable con T12 y 63,33±12,00 %, con el T8 como el menos deseable (Riza *et al.*, 2017).

Cuando se busca complementar el proceso de producción de yemas, mediante la elongación de las mismas se muestra como alternativa la utilización de reguladores de crecimiento (Weaver, 1976). Dentro de las fitohormonas recomendadas se encuentran las giberelinas y auxinas que tienen propiedades estimuladoras de la germinación, crecimiento y elongación caulinar, el alargamiento celular y la emergencia de la radícula a través del endospermo, entre otros (Salisbury y Ross, 2000). En esta experiencia, con la combinación del T12, coincidente con el menor ennegrecimiento tisular, se ha logrado el 66,67±6,00 % de brotes elongados (Figura 3). Por otra parte, aunque si bien no hubo diferencias significativas entre tratamientos se observó que con una dosis menor de GA₃ en el T11 se ha logrado 4,00±0,48 brotes elongados por explante, siendo el de mejor respuesta, para dicho parámetro.

En cuanto a la longitud de los mismos, el T6 ha mostrado diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos, registrando la mejor respuesta con 10,55±2,55 mm (Tabla 3).

De forma separada, existen reportes que en representantes de la familia pináceas la respuesta al uso de GA₃ es escasa sino pobre, mientras que la misma es satisfactoria ante la combinación de GA₄+GA₇. En experiencias a campo aplicado en forma de aspersión, este fitorregulador incrementó el largo de brotes apicales, y combinado con citocininas produjo un aumento de brotes vegetativos en *Pinus pinea* (Venegas-González *et al.*, 2016). En el cultivo de tejidos GA₃ se usa para estimular la elongación de los tallos o la conversión de brotes a tallos (Paredes, 2009), coincidente con el efecto observado en esta experiencia.

En cuanto al ácido indol-3- acético o AIA es la fitohormona más estudiada, la mejor caracterizada de todas las auxinas y participa en numerosos mecanismos en la fisiología de la planta; se le puede atribuir que afecta distintas funciones y alteraciones en el rendimiento de la planta, eventualmente, en promoción del crecimiento (Massena-Reis *et al.*, 2011; Vega-Celedón *et al.*, 2016).

Si bien para coníferas, no se han encontrado reportes que informen acerca del sinergismo de ambos reguladores de crecimiento en cultivo de tejidos; cabe destacar que existen

interacciones de síntesis y degradación de GAs con otras hormonas, como el AIA. Se ha determinado que la presencia de AIA estimula la síntesis de GA₁ provocando consiguiente crecimiento (Jordán y Casaretto, 2006).

VII-CONCLUSIÓN:

Los resultados experimentales obtenidos sugieren que la estratificación en frío de las semillas durante 3 días optimiza la fase de regeneración de yemas; a la vez que si se desea mejorar dicho proceso se debe repicar las estructuras inducidas en medio semisólido compuesto por sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) diluido a la mitad de su concentración, con 3% de sacarosa y adicionado con BA 0,1 mg.L⁻¹ y TDZ 0,1 mg.L⁻¹ a los biorreactores de inmersión temporal con un medio basal libre de reguladores de crecimiento. Por otra parte si el objetivo es optimizar la producción de brotes por explantes se recomienda utilizar un medio enriquecido con BA 2,5 mg.L⁻¹. Además los datos generados en este trabajo permiten observar un efecto positivo al combinar GA₃ 0,2 mg.L⁻¹ y AIA 0,1 mg.L⁻¹ en la elongación de yemas vegetativas obtenidas vía organogénesis en pino híbrido.

VIII-CUADROS Y GRAFICOS:

Tabla 1: Influencia de la estratificación de las semillas de pino híbrido en el número de yemas neoformadas/explante.

| Tratamiento | Nº yemas neoformadas/explante |
|-------------|-------------------------------|
| TE 0 días | 8,17±6,01 ab |
| TE 1 día | 7,33±6,5 ab |
| TE 2 días | 9,5±7,71 ab |
| TE 3 días | 13,2±8,24 a |
| TE 4 días | 8,3±8,46 ab |
| TE 5 días | 13,47±10,64 a |
| TE 6 días | 9,6±9,55 ab |

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos por columna según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabla 2: Influencia de la combinación de auxinas y citocininas sobre la regeneración y elongación de yemas vegetativas obtenidas vía organogénesis de pino híbrido en biorreactores de inmersión temporal durante 45-60 días.

| Tratamientos | Oxidación (%) | Regeneración(%) | Brotes/explante | YE |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| T0= Testigo | 43,33 ± 15,28 a | 56,67 ± 15,27 b | 12,12 ± 3,37 abc | 3,57 ± 2,49 a |
| T1= BA 0,1 | 80,00 ± 17,32 ab | 20,00 ± 17,32 ab | 3,67 ± 1,07 a | 0,22 ± 0,00 a |
| T2= BA 0,5 | 70,00 ± 17,32 ab | 30,00 ± 17,32 ab | 8,17 ± 0,70 abc | 0,00 ± 0,00 a |
| T3= BA 1 | 60,00 ± 20,00 ab | 40,00 ± 20,00 ab | 16,28 ± 4,02 bc | 2,39 ± 1,06 a |
| T4= BA 2,5 | 63,33 ± 11,55 ab | 36,67 ± 11,54 ab | 19,42 ± 4,15 c | 2,98 ± 4,28 a |
| T5= BA 5 | 66,67 ± 5,77 ab | 33,33 ± 5,77 ab | 14,64 ± 2,11 abc | 0,61 ± 0,77 a |
| T6= AIA 0,1 | 58,27 ± 20,48 ab | 41,73 ± 20,42 ab | 8,25 ± 0,36 abc | 0,97 ± 1,10 a |
| T7= AIA 0,1 + BA 4,5 | 73,42 ± 19,59 ab | 26,58 ± 16,59 ab | 12,53 ± 6,91 abc | 1,23 ± 0,38 a |
| T8= BA 0,1 + AIA 0,01 | 73,81 ± 8,58 ab | 26,19 ± 8,58 ab | 18,25 ± 8,78 c | 2,42 ± 0,59 a |
| T9= BA 0,5 + AIA 0,01 | 48,72 ± 8,62 ab | 51,28 ± 8,62 ab | 12,61 ± 3,10 abc | 3,56 ± 4,74 a |
| T10= BA 1 + AIA 0,01 | 84,98 ± 0,63 b | 15,02 ± 0,63 a | 9,5 ± 6,42 abc | 1,67 ± 4,08 a |
| T11= BA 2,5 + AIA 0,01 | 80,65 ± 4,90 ab | 19,35 ± 16,85 ab | 4,97 ± 4,29 ab | 0,00 ± 0,00 a |
| T12= BA 5 + AIA 0,01 | 88,38 ± 31,49 b | 11,62 ± 4,37 a | 6,00 ± 0,00 ab | 0,67 ± 0,00 a |

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos por columna según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). Referencias: YE: Nº yemas elongadas/explante.

Tabla 3: Influencia de la combinación de auxinas y giberelinas sobre la regeneración y elongación de yemas vegetativas obtenidas vía organogénesis de pino híbrido en biorreactores de inmersión temporal durante 45-60 días.

| Tratamientos | Oxidación (%) | Elongación (%) | Brotes Elongados/exp. | Longitud de brotes/exp. |
|------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-------------------------|
| T1=Testigo | 43,00 ± 15,00 a | 56,67 ± 15,00 a | 3,57 ± 4,68 a | 3,95 ± 3,09 ab |
| T2= GA₃0,1 | 47,00 ± 25,00 a | 53,00 ± 25,00 a | 3,01 ± 2,42 a | 3,77 ± 2,43 a |
| T3= GA₃ 0,2 | 43,00 ± 21,00 a | 57,00 ± 21,00 a | 1,91 ± 1,75 a | 3,80 ± 1,74 a |
| T4= GA₃ 0,5 | 60,00 ± 17,00 a | 40,00 ± 17,00 a | 1,73 ± 0,87 a | 5,28 ± 3,69 ab |
| T5=GA₃0,1+AIA0,1 | 50,00 ± 10,00 a | 50,00 ± 10,00 a | 2,35 ± 0,38 a | 8,91 ± 1,72 bc |
| T6=GA₃0,2+AIA0,1 | 40,00 ± 0,00 a | 60,00 ± 0,00 a | 2,22 ± 0,08 a | 10,55 ± 2,55 c |
| T7=GA₃0,5+AIA0,1 | 46,67 ± 6,00 a | 53,33 ± 6,00 a | 2,50 ± 0,55 a | 7,28 ± 5,14 abc |
| T8= GA₃ 1 | 63,33 ± 12,00 a | 36,67 ± 12,00 a | 1,93 ± 1,33 a | 5,37 ± 1,05 ab |
| T9= GA₃ 2 | 46,67 ± 12,00 a | 53,33 ± 12,00 a | 2,47 ± 0,66 a | 4,84 ± 0,38 ab |
| T10=GA₃5 | 56,67 ± 6,00 a | 43,33 ± 6,00 a | 2,73 ± 0,28 a | 3,77 ± 0,27 a |
| T11=GA₃1+AIA0,1 | 50,00 ± 20,00 a | 50,00 ± 20,00 a | 4,00 ± 0,48 a | 4,13 ± 0,73 ab |
| T12=GA₃2+AIA0,1 | 33,33 ± 6,00 a | 66,67 ± 6,00 a | 2,45 ± 0,93 a | 4,49 ± 0,91 ab |
| T13=GA₃5+AIA0,1 | 56,67 ± 31,00 a | 43,33 ± 31,00 a | 2,22 ± 0,01 a | 3,81 ± 2,71 a |

Promedios con letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos por columna según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). Referencias: GA₃=Giberelina; AIA= Acido indol acético; testigo=sin reguladores de crecimiento; las concentraciones se expresan en mg. L⁻¹. LBE: Longitud de brotes/explante (mm)



Figura 1: Detalle de yemas neoformadas a partir de embrión cigótico maduro de pino híbrido.



Figura 2: Detalle de la oxidación de tejidos cultivados *in vitro* de embriones cigóticos maduro de pino híbrido. A: yemas neoformadas y oxidadas; B: embrión con respuesta y oxidado.



Figura 3: Detalle de brotes elongados de pino híbrido. La barra indica 1cm.

IX-BIBLIOGRAFIA:

AHIM (Asociación de Herbarios Ibero-Macaronésicos). (2009). Conservación *ex situ* de plantas silvestres. ANEXO DIGITAL (I). Recolección y conservación de semillas de árboles y arbustos mediterráneos. 23p.

AIMERS-HALLIDAY J., MENZIES M., FAULDS T., HOLDEN D., LOW C., DIBLEY M. (2003). Nursery systems to control maturation in *Pinus radiata* cuttings, comparing hedging and serial propagation. *New Zealand journal of science* 33(2): 135-155.

AITKEN-CHRISTIE J., SINGH AP DAVIES H. (1988) Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiata pine. In: Hanover IW & Keathley DE (eds) Genetic Manipulation of Woody Plants. Plenum Press, New York. Pp: 413-432.

AMIOT M., FORGET F., GOUPY P. (1996). Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. *HerbaPolonica* 42: 237-247.

AYALA L., RIZA D., LUNA C., SANSBERRO P. (2017). Optimization of direct shoot regeneration using mature zygotic embryos explants from *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. 7th International symposium on production and establishment of micropropagated plants (PEMP BRAZIL 2017).

BRAIER G. (2004). Tendencias y perspectivas del sector forestal al año 2020 – Argentina. FAO: 236 p.

BRAY E., BAILEY-SERRES J., WERETILNYK E. (2000). Responses to abiotic stresses. In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Eds). Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. Pp: 1158-1203.

CHÁVEZ M., DE FERIA M. (2012). Aspectos básicos de la propagación *in vitro* del género *Pinus* por organogénesis. *Biotechnología Vegetal* 12(3): 131 – 142.

DAQUINTA M., CID M., LEZCANO Y., PINA D., RODRÍGUEZ R., Y ESCALONA M. (2004). Recuperación de especies forestales y bambúes por métodos biotecnológicos. Forum de Ciencia y Técnica, Ciudad de La Habana. 40 p.

de FERIA M., CHÁVEZ M., BARBÓN R., LA O., PÉREZ M., JIMÉNEZ-TERRY F., QUIALA E., AGRAMONTE D. (2009) Multiplicación *in vitro* de plantas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*. *Biotechnología Vegetal* 9 (4): 217-224.

DI RIENZO J., CASANOVES F., BALZARINI M., GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C. (2011). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

- DOYLE J., VERHOEVEN R. (2002). Germ-furrow morphology and Storage conditions determine the degree of viability of *Pinus caribaea* pollen. *South African Journal of Botanical* 68: 457-463.
- FAY M. (1992). Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 28: 1-4.
- FORTES N. (2011). Clonación de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* mediante el uso de birreactores de inmersión temporal. Tesis para optar al grado de Magíster en Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. 80p.
- GARCÍA-MAGAÑA J. (1994). Tratamientos pre germinativos para la propagación en vivero *Tilia mexicana* Schlecht. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. *INIFAP. CIRPAC. Boletín Técnico* 27: 3-6.
- GARTON S., MOSES M. (1986). Production of native plants in tissue culture. Combined Proceeding International Plant Propagator's Society 35: 306-315.
- GAUCHAT M., RODRIGUEZ G., BELABER E., BISCHOFF D. (2005). Híbridos de alta productividad. Combinando crecimiento y forma. *IDIA* 21: 162-164.
- GONZÁLEZ P. (2010). Propagación *in vitro* de un Híbrido entre *Pinus elliottii* var. *elliottii* y *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Tesis para optar al grado de Master en Producción Vegetal- Universidad Nacional del Nordeste. 67p.
- HALOS S., GO N. (1993). Micropropagation of *Pinus caribaea* Morelet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 47- 53.
- HARDING K., COPLEY T. (2000). Wood property variation in Queensland-grow, slash x caribbean pine hybrids. En: Dungey H., Dieters M., Nikles D. (Eds). *Híbrido Breeding and Genetics of forest trees. Proceedings of QFRI/CRC-SPF symposium, 9-14 Abril 2000. Queensland, Australia. Pp: 160-167.*
- HORGAN K., SKUDDER D., HOLDEN G. (1997). Almacenamiento clonal y rejuvenecimiento. IUFRO 97 genética del pino radiata. *FRI Bulletin*, Rotorua, Nueva Zelanda. 203: 273-280.
- IÁÑEZ P. (1998). Metabolismo energético. In: Curso de microbiología general. Facultad de Ciencia Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes República, Argentina.

JORDÁN M., CASARETTO J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. Fisiología Vegetal. Ediciones Universidad de la Serena, La Serena. 16 p.

LUNA C. (2010). Automatización de la micropropagación de *Ilex paraguariensis* e *Ilex dumosa*: Estudio del intercambio gaseoso, estado hídrico y fotosíntesis durante las etapas de aclimatación y post-aclimatación. Tesis para optar al grado de Doctor de la UNNE en el Área de Recursos Naturales. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. 160p.

MAS I GISBERT H., PÉREZ-LAORGA ARIAS E., PITXER M., VEINTIMILA P., CAMPOS E. (2011). Influencia del tratamiento por inmersión en peróxido de hidrógeno para el control químico de *Fusarium circinatum* en la viabilidad y el almacenamiento de las semillas del género *Pinus*. Acta de II Reunión de Sanidad Forestal de la Sociedad Española de Ciencias Forestales. 20 p.

MASSENA-REIS V., TEXEIRA K., PEDRAZA R. (2011). What is excepted from the genus *Azospirillum* as a plant Growth-Promoting bacteria (Eds). Maheshwari D. Springer Berlin Heidelberg. In: Bacteria in Agrobiology; Plant Growth Responses. Chapter: 6. Pp: 123-138.

MATIAS A., BETANCOURT A., ZAYAS A., PENA, A., RIVERO R. (1973). Forest seed in Cuba. En Seed Processing Proc. Symposium IUFRO Wkg. Group on Seed Problems, Bergen. Vol. II, Paper 31.

MEYER H. (1998). *In vitro* formation of adventitious buds on mature embryos of *Pinus elliottii* Engelm. x *P. caribaea* Morlet hibryds.S. *African Journal of Botany*, 64(3): 220-225.

MINOCHA S. (1980). Callus and adventitious shoot formation in excised embryos of white pine (*Pinus strobus*). *Canadian Journal of Botany* 58: 366-370.

MUÑOZ LÓPEZ C., CUERVO SÁNCHEZ M., AMPUDIA DÍAZ A., GASTÓN GONZÁLEZ J., PEÑUELAS RUBIRA S., IGLESIAS SAUCE A., HERRERO SIERRA N. (2009). Control químico de *Fusarium circinatum* Nirenberg., O'Donnell en semillas del género *Pinus*. 5º Congreso Forestal Español. Ref: 5CFE01-503. 12 p.

MURASHIGE T., SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

NANDWANI D., KUMARIA S., TANDON P. (2001). Micropropagation of *Pinus kesiya* Royle ex Gord (Khasi pine). *Gartenbauwissenschaft* 66: 68-71.

NEHRA N., BECWAR M., ROTTMANN W., PEARSON L., CHOWDHURY K., CHANGS., WILDE H., KODRZYCKI R., ZHANG C., GAUSE K., PARKS D., HINCHEE M. (2005). Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41: 701-717.

NIKLES D. (2000). Experience with some *Pinus* hybrids in Queensland, Australia. Dungey H., Dieters M., Nikles D. (Eds). En: Hibrid Breeding and Genetics of forest trees. Proceedings of QFRI/CRC-SPF symposium. Queensland, Australia. Pp: 27-43.

PAREDES I. (2009). Utilización de Giberelinas en explantes vegetales. Seminario de crecimiento y desarrollo. Universidad de América. Santiago de Chile. 20p.

PIERIK R. (1993). Micropropagation: Technology and Opportunities. En: Plant biotechnology commercial prospects and problems. Prakash, J., Pierik R. (Eds.). Science Publishers, Inc., Lebanon. Pp: 9-22.

PIERIK R. (1997). *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht, NL. Kluwer Academic Publishres. Pp: 348.

RIZA D., AYALA L., LUNA C. (2017). Influencia del uso de reguladores de crecimiento sobre la elongación de yemas vegetativas obtenidas vía organogénesis en pino híbrido. Actas de la Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. SECYT, UNNE. 2017. Versión on line (www.unne.edu.ar).

ROCA W., MROGINSKI L. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. Pp: 969.

ROWE D., BLAZICH F. (2008). *Tilia l.*, linden or basswood. Bonner F., Karrfalt R. (Eds.). U.S. Dept. Agr. For. Serv., Washington, D.C., Agric.Hdbk, En: The woody plant seed manual. 727: 1113-1118.

SALISBURY F., ROSS C. (2000). Fisiología de las plantas. Ed. Paraninfo. 1000 p.

SÁNCHEZ ACOSTA M., VERA L. (2005). Situación foresto-Industrial de Argentina al 2005. En: Actas del III Simposio Ibero-Americano de Gestión y Economía Forestal. Ubatuba, San Pablo. Pp: 1-23.

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. (2002). Inventario Nacional de Plantaciones Forestales. SAGPyA. Buenos Aires, Argentina. 63 p.

TABIYEH D., BERNARD F., SHACKER H. (2006). Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Horticulturae* 726: 201-204.

TANG W., NEWTON R. (2005). Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Report* 24: 1-9.

van STADEN J., ZAZIMALOVA E., GEORGE E F. (2008). Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. George E., Hall M., de Klerk G. (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd Edition. Pp: 205-226.

VARELA S., ARANA V. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. En: Serie técnica: Sistemas Forestales Integrados. Área Forestal - INTA EEA Bariloche. Sección: Silvicultura en vivero. Varela A., Aparicio A. (Eds.). Cuadernillo N° 3: Marzo de 2011. ISSN: 1853-4775.

VEGA-CELEDÓN P., CANCHIGNIA MARTÍNEZ H., GONZÁLEZ M., SEEGER M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales* 37: 33-39.

VENEGAS-GONZALEZ A., LOEWE MUÑOZ V., TORAL-IBANEZA M. (2016). Influencia del uso de reguladores de crecimiento sobre brotes vegetativos y número de estróbilos masculinos en *Pinus pinea* L. en Chile. *Ciência Florestal* 26 (4): 1087-1096.

WEAVER R. (1976). Reguladores del crecimiento de las plantas de la agricultura. Editorial Trillas, México. 622 p.

WILLAN R. (1991). Guía de Manipulación de Semillas Forestales con especial referencia a los Trópicos. Centro de Semillas Forestales de DANIDA. Estudio FAO MONTES 20/2. Pp: 510.

ZHANGY., WEI Z., XI M., SHI J. (2006). Direct organogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of masson pine (*Pinus massoniana* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 84: 119-123.