

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura



**“DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO DE
MULTIPLICACIÓN VEGETATIVA Y CRIOCONSERVACIÓN
APLICABLE AL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO
DE *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var.
hondurensis”**

**Tesis para optar el grado de Doctor en Biología
de la Universidad Nacional del Nordeste**

Lilian Patricia Elizabeth Ayala

2024

PREFACIO

Los experimentos llevados a cabo en esta tesis han sido realizados en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET), Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional.

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Pedro A. SANBERRO (Facultad de Ciencias Agrarias - Universidad Nacional del Nordeste, Argentina).

CO-DIRECTORA: Dra. Paloma MONCALEÁN GUILLÉN (Neiker, España).

Dedicado a la razón de mi vida...

Mi hija Eva Victoria.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Dr. Pedro A. Sansberro, por el tiempo dedicado, por acompañarme y enseñarme, por el asesoramiento profesional y personal, por haber confiado en mí y haberme abierto las puertas de su laboratorio para trabajar y realizar mi doctorado.

A la Dra. Paloma Moncaleán Guillén, por haber aceptado ser la co-directora y por su predisposición siempre.

A la Dra. María Elena Gauchat y al Dr. Rafael Scherer, por considerarme para este proyecto, por su generosidad, sus sabios consejos y por estar siempre presentes a pesar de la distancia.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la empresa PINDÓ S.A. por concederme una beca cofinanciada para concretar mi carrera de doctorado.

A la Universidad Nacional del Nordeste y en especial a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, por admitirme como estudiante de esta casa de estudios.

A todo el personal del Instituto de Botánica del Nordeste por estar siempre predispuestos en los momentos que necesité.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional que hicieron que cada día sea especial. Gracias por el apoyo incondicional, por el trabajo en equipo, por el conocimiento compartido y por la empatía.

A los grandes amigos que me regaló esta etapa de la vida. A Gabi, Pame, Andrea y Edgardo, ¡Qué difícil hubiera sido esto sin ustedes! Gracias por ser únicos, por acompañarme, entenderme y enseñarme tanto. Gracias por aceptarme e incluirme desde el primer día.

Agradezco a mis padres, Carmen y Mario por su amor incondicional. Por los valores con los que me formaron, por el ejemplo de trabajo y honestidad, porque todo lo que soy se los debo a ellos.

Gracias a mis hermanas Gabi y Cami por alentarme siempre a seguir adelante, por ser mis compañeras, porque todo es más lindo cuando lo hacemos juntas. Gracias a mi hermano Adri

que a pesar de haber partido físicamente, nunca dejó de acompañarme, su esencia y su espíritu están siempre presentes. Se que desde donde esté es feliz de compartir esto conmigo.

Finalmente, y no por eso menos importante, gracias a Lisandro, mi gran compañero de vida. Por creer en mí, por sacarme los miedos y la desconfianza, por eliminar mis límites y siempre impulsarme a lograr cosas nuevas. Gracias por hacerme feliz. Gracias por tu amor. Y a mi hija Eva, por elegirme, por enseñarme, por reconfortarme, por ese amor tan puro y genuino; porque con solo verte, todo tiene sentido.

Gracias a Dios, por la hermosa vida que tengo.

¡Gracias a todos!

TRABAJOS PUBLICADOS EN EL MARCO DE ESTA TESIS

- ◆ **Cryopreservation of mature zygotic embryos, shoot bud regeneration, and field establishment of *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis* in vitro-derived plants.** Lilian P. E. Ayala; Claudia V. Luna; Elsa A. Brugnoli; Fabiana D. Espasandin; María J. Duarte; Ana M. González; María E. Gauchat; Paloma Moncaleán Guillén; Pedro A. Sansberro. *Trees: Structure and Functions* 37: 417-433. 2023. <https://doi.org/10.1007/s00468-022-02359-0>

PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y REUNIONES CIENTIFICAS

- ◆ **Optimization of direct shoot regeneration using mature zygotic embryos explants from *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.** 7th International symposium on production and establishment of micropropagated plants (PEMP). Lavras-Brasil, 2017.
- ◆ **Optimización de un procedimiento para la organogénesis directa de *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.** XI Simposio Nacional de Biotecnología (REDBIO). Bahía Blanca, 2017.
- ◆ **Desarrollo de brotes adventicios de *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis* en sistemas de inmersión temporal.** XXIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas (SECYT, UNNE). Corrientes, 2018.
- ◆ **Influencia del sistema de cultivo y la fuente de nitrógeno sobre el desarrollo in vitro de brotes adventicios de pino híbridohíbrido.** XXVI Reunión de Comunicaciones Científicas, Técnicas y de Extensión (FCA, UNNE). Corrientes, 2018.
- ◆ **Desarrollo biotecnológico para el sector Foresto-industrial.** XXIV Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Vinculación Tecnológica (SECYT, UNNE). Resistencia, 2019.

TRABAJOS PRESENTADOS EN COLABORACIÓN CON OTRAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

- ◆ **Influencia del uso de reguladores de crecimiento sobre la elongación de yemas vegetativas obtenidas vía organogénesis en pino híbrido.** Riza D., Ayala L., Luna C. (2017). Actas de la Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas (SECYT, UNNE). Resistencia, 2017.
- ◆ **Long-term preservation of *Lotus tenuis* adventitious buds.** Fabiana D. Espasandin; Elsa A. Brugnoli; Paula G. Ayala; Lilian P. Ayala; Oscar A. Ruiz; Pedro A. Sansberro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 136: 373-382. 2019.

ABREVIATURAS Y TERMINOS TOMADOS DEL INGLÉS

ABA	Acido abscísico
ACP	Análisis de componentes principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFA	Formaldehido/etanol/ácido acético
ANA	Ácido 1-Naftalenacético
BA	6-benciladenina
BIT	Biorreactores de inmersión temporal
Ca	Símbolo del elemento químico, Calcio.
CC	Capacidad de campo
CP1	Componente principal 1
CP2	Componente principal 2
CRA	Contenido relativo de agua de las acículas
CTAB	Del inglés: hexadecyl trimethyl ammonium bromide
DAC	Diámetro a la altura del cuello
Dap	Densidad aparente del suelo
DAP	Diámetro a la altura del pecho
DMSO	Dimetilsulfóxido
E1	Estrés moderado (50% < Capacidad de Campo)
E2	Estrés severo (40% < Capacidad de Campo)
HC	Humedad critica
IBA	Ácido indol 3-butírico
IC	Índigo carmín
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ISSR	Del inglés: Inter-Simple Sequence Repeat
K	Símbolo del elemento químico, Potasio.
LEDs	Del ingles: light-emitting diode
MES	Del inglés: Monohydrate 2-(N-Morfolino) ethanesulfonic acid
Mg	Símbolo del elemento químico, Magnesio.
MM	Marcadores monomórficos
MO	Materia Orgánica
MS	Medio Murashige-Skoog
MZEs	Del ingles: Mature Zygotic Embryos
NH ₄ ⁺	Iones amonio
NL	Nitrógeno líquido
NO ₃ ⁻	Iones nitrato
O	Plantas obtenidas por organogénesis

OC	Plantas obtenidas por organogénesis cuyo embrión fue crioconservado
P	Símbolo del elemento químico, Fosforo
PAR	Del inglés: Photosynthetically active radiation
pb	Pares de bases
PCH	<i>Pinus caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PEE	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i>
PEE × PCH	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> × <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>
PEG	Polietilenglicol
PIC	Información polimórfica contenida
PF	Peso fresco
PM	Marcadores polimórficos
PPFD	Del inglés: Photosynthetic photon flux density
PPL	Porcentaje de loci polimórfico
PROMEFL	Programa de Domesticación y Mejoramiento de Especies Forestales Nativas e Introducidas para Usos de Alto Valor
PS	Peso seco
PT	Peso en turgencia máxima
PVS	Del inglés, Plant Vitrification Solutions
RAPD	Del inglés, Random Amplification of Polymorphic DNA
RH	Rehidratación
rpm	Revoluciones por minuto
S	Plantas obtenidas por germinación de semilla
sd	Sin dato
SEM	Del inglés: standard error of the mean
SC	Plantas obtenidas por germinación de semilla cuyo embrión fue crioconservados
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TDZ	Thidiazurón
TM	Marcadores totales
TZ	Tetrazolio
UPGMA	Del inglés: Unweighted pair group method using arithnetc average

INDICE GENERAL

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCION	4
1.1. EL SECTOR FORESTAL ARGENTINO	4
1.2. ANTECEDENTES DEL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO VIGENTE.....	5
1.3. DESCRIPCIÓN DEL GERMOPLASMA OBJETO DEL ESTUDIO	6
1.4. FUNDAMENTOS DE LA ELECCIÓN DEL TEMA PROPUESTO	8
1.4.1. <i>Cultivo in vitro de tejidos vegetales</i>	9
1.4.2. <i>Crioconservación</i>	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. OBJETIVO GENERAL	13
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES	13
3. HIPÓTESIS.....	13
4. MATERIALES Y METODOS.....	15
4.1. MATERIAL VEGETAL.....	15
4.2. PROPAGACIÓN VEGETATIVA <i>IN VITRO</i> VÍA ORGANOGÉNESIS.....	15
4.2.1. <i>Fase de inducción</i>	15
4.2.1.1. Experimento 1: Desarrollo de un medio de inducción	15
4.2.1.2. Experimento 2: Determinación del periodo óptimo de inducción.....	15
4.2.1.3. Experimento 3: Pretratamiento de los embriones aislados en condiciones de oscuridad.....	15
4.2.1.4. Experimento 4: Pretratamiento de las semillas a bajas temperaturas	16
4.2.2. <i>Fase de elongación</i>	16
4.2.2.1. Experimento 1: Determinación de la concentración de sales del medio de cultivo	16
4.2.2.2. Experimento 2. Control de la proliferación bacteriana.....	16
4.2.2.3. Experimento 3: Efecto de la relación de iones amonio/nitrato en el medio nutritivo.....	17
4.2.2.4. Experimento 4: Determinación del sistema de cultivo	17
4.2.2.5. Experimento 5: Duración de las fases de inducción y elongación.....	17
4.2.2.6. Experimento 6: Determinación del número óptimo de explantes cultivados por recipiente.....	17

4.2.3. Fases de enraizamiento y aclimatación	18
4.2.4. Análisis morfo-fisiológicos de respuestas a déficit hídrico en plantas obtenidas por germinación de semillas, macropropagación y organogénesis	19
4.2.5. Análisis del crecimiento e incremento en altura, diámetro y masa radical de plantas obtenidas por germinación de semillas, macropropagación y organogénesis durante la implantación del dosel forestal	20
4.3. CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS MADUROS (EXPLANTES)	20
4.3.1. Experimento 1: Evaluación de la técnica convencional	20
4.3.2. Experimento 2: Evaluación de la técnica de vitrificación	21
4.3.3. Experimento 3: Evaluación de la técnica de desecación	21
4.3.4. Experimento 4: Influencia del tiempo de desecación sobre el contenido de humedad, sobrevivencia y capacidad de regeneración de los explantes	21
4.3.5. Experimento 5: Determinación de viabilidad por métodos bioquímicos	22
4.4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	23
4.5. ESTABILIDAD GENÉTICA DE LAS VITROPLANTAS	23
4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	24
5. RESULTADOS	26
5.1. PROPAGACIÓN VEGETATIVA <i>IN VITRO</i> VÍA ORGANOGÉNESIS	26
5.1.1. Fase de inducción	26
5.1.1.1. Experimento 1: Desarrollo de un medio de inducción	26
5.1.1.2. Experimento 2: Determinación del período óptimo de la fase de inducción	27
5.1.1.3. Experimento 3: Efecto de la oscuridad sobre la sobrevivencia y capacidad morfogénica de los embriones aislados.	28
5.1.1.4. Experimento 3: Pretratamiento de las semillas a bajas temperaturas	29
5.1.2. Fase de elongación	30
5.1.2.1. Experimento 1: Determinación de la concentración de sales del medio de cultivo	30
5.1.2.2. Experimento 2. Control de la proliferación bacteriana	31
5.1.2.3. Experimento 3: Efecto de la relación de iones amonio/nitrato del medio nutritivo sobre la sobrevivencia y crecimiento de los brotes en la fase de elongación.	32
5.1.2.4. Experimento 4: Determinación del sistema de cultivo	33
5.1.2.5. Experimento 5: Duración de las fases de inducción y elongación	34
5.1.2.6. Experimento 6: Determinación del número de explantes regenerantes cultivados por recipiente	35
5.1.3. Fases de enraizamiento y aclimatación	37

5.1.4. Análisis morfo-fisiológicos de respuestas a déficit hídrico en plantas obtenidas por germinación de semillas, macropropagación y organogénesis	39
5.1.5. Análisis del crecimiento e incremento en altura, diámetro y masa radical de plantas obtenidas por germinación de semillas, macropropagación y organogénesis durante la implantación del dosel forestal	42
5.2. CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS MADUROS (EXPLANTES)	44
5.2.1. Experimento 1: Evaluación de la técnica convencional.....	44
5.2.2. Experimento 2: Evaluación de la técnica de vitrificación	44
5.2.3. Experimento 3: Evaluación de la técnica de desecación	45
5.2.4. Experimento 4: Influencia del tiempo de desecación sobre el contenido de humedad, sobrevivencia y capacidad de regeneración de los explantes	45
5.2.5. Experimento 5: Determinación de viabilidad por métodos bioquímicos	48
5.3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	48
5.4. ESTABILIDAD GENÉTICA DE LAS VITROPLANTAS	50
6. DISCUSION.....	53
6.1. PROPAGACIÓN VEGETATIVA <i>IN VITRO</i> VÍA ORGANOGÉNESIS.....	53
6.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE RESPUESTA A DÉFICIT HÍDRICO Y ESTABLECIMIENTO A CAMPO DE LAS PLANTAS OBTENIDAS POR GERMINACIÓN DE SEMILLAS, MACROPROPAGACIÓN Y ORGANOGÉNESIS.....	58
6.3. CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS MADUROS (EXPLANTES)	59
6.4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y ESTABILIDAD GENÉTICA DE LAS VITROPLANTAS.....	60
7. CONCLUSIONES	65
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Efectos de la duración de la fase de inducción sobre el ennegrecimiento tisular de los explantes y la capacidad morfogénica de embriones cigóticos cultivados en ½ MS adicionado con BA 0.5 µM y TDZ 0.5 µM.	27
Figura 2 Efecto del pretratamiento de oscuridad sobre la formación de yemas adventicias de PEE × PCH a partir del cultivo de embriones cigóticos maduros.	28
Figura 3 Análisis de componentes principales de respuestas morfogénicas de semillas expuestas a un pretratamiento con bajas temperaturas.	29
Figura 4 Efecto de la concentración del medio nutritivo sobre el crecimiento de yemas adventicias de PEE × PCH.	31
Figura 5 Análisis de componentes principales. Efecto del sistema del cultivo y la proporción de iones amonio: nitrato en la elongación de las yemas diferenciadas en la etapa de inducción.	33
Figura 6 Crecimiento de yemas vegetativas en diferentes sistemas de cultivo.	34
Figura 7 Efecto del subcultivo en el crecimiento de las yemas adventicias diferenciadas.	37
Figura 8 Efecto de la interacción entre el pretratamiento de inducción con IBA y el uso de diferentes soportes físicos durante la etapa de expresión del enraizamiento adventicio de PEE × PCH.	38
Figura 9 Diferenciación y crecimiento de raíces adventicias en brotes de PEE × PCH en medios de expresión con agar (A), Phytigel® (B) o vermiculita (C).	39
Figura 10 Ensayo comparativo de respuesta a sequía en plantas de PEE × PCH de 12 meses obtenidas por germinación de semilla, organogénesis y macropropagación.	41
Figura 11 Establecimiento en campo de las plantas híbridas PEE × PCH obtenidas por germinación de semillas, organogénesis y macropropagación.	43
Figura 12 Establecimiento de PEE × PCH en condiciones de cultivo comercial.	43
Figura 13 Técnica convencional.	44
Figura 14 Técnica de vitrificación.	44
Figura 15 Técnica de deshidratación osmótica + desecación en flujo laminar. Influencia del contenido de humedad del explante en la sobrevivencia, regeneración y número de yemas por explante post crioconservación.	46
Figura 16 Técnica de desecación en flujo laminar. Influencia del contenido de humedad del explante en la sobrevivencia, regeneración y número de yemas por explante post crioconservación.	47
Figura 17 Formación de yemas adventicias a partir de embriones cigóticos de PEE × PCH, crioconservados (+NL) y sin crioconservar (-NL).	50

Figura 18 Análisis de coordenadas principales. Variabilidad genética de plantas provenientes de organogénesis (O) y germinación de semillas (S).	51
Figura 19 Dendrograma UPGMA obtenido mediante el coeficiente de disimilitud de Jaccard. Distancia genética entre las plántulas de semilla y vitroplantas obtenidas por organogénesis directa.	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Efecto de la adición de BA y TDZ al medio de cultivo ($\frac{1}{2}$ MS con sacarosa 0.09 M) sobre la formación y proliferación de yemas adventicias a partir del cultivo <i>in vitro</i> de embriones cigóticos maduros de PEE × PCH.	26
Tabla 2 Efecto del pretratamiento de las semillas de PEE × PCH a bajas temperaturas sobre la diferenciación y proliferación de yemas adventicias a partir del cultivo de embriones cigóticos maduros.	30
Tabla 3 Estimulación del crecimiento vegetativo en biorreactores de inmersión temporal. Efecto del contenido de sacarosa del medio nutritivo.	32
Tabla 4 Efecto de la proporción de iones $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ de la solución nutritiva, sobre el crecimiento de las yemas adventicias de PEE × PCH.	32
Tabla 5 Efecto de la modificación de $\frac{1}{2}$ MS con distintas proporciones de amonio:nitrato sobre la sobrevivencia y desarrollo de yemas adventicias que crecieron en distintos sistemas de cultivo.	34
Tabla 6 Efecto de la duración de la fase de inducción en $\frac{1}{2}$ MS suplementado con 0.5 μM BA y 0.5 μM TDZ sobre la sobrevivencia y desarrollo de yemas adventicias.	35
Tabla 7 Efecto del número de explantes cultivados por recipiente sobre la sobrevivencia, brotación y desarrollo de yemas adventicias durante la fase de elongación.	36
Tabla 8 Incremento en altura y diámetro de las vitroplantas durante los primeros 60 días de la etapa de aclimatación.	39
Tabla 9 Efectos de distintos pretratamientos de deshidratación osmótica y física a los explantes sobre la sobrevivencia al congelamiento y producción de yemas adventicias transcurridos 30 días de cultivo en $\frac{1}{2}$ MS, semisólido, adicionado con 0.5 μM BA y 0.5 μM TDZ.	45
Tabla 10 Efecto de la crioconservación sobre la capacidad de regeneración y proliferación de yemas adventicias.	47
Tabla 11 Efecto del tiempo de tinción, de la concentración de la solución de tetrazolio y del empleo de índigo carmín como estimadores de la sobrevivencia y regeneración a partir de la viabilidad de los embriones de PEE × PCH.	48
Tabla 12 Análisis de las predicciones de las pruebas de tetrazolio e índigo carmín en embriones con desecación y crioconservación.	49
Tabla 13 ISSR caracterización molecular de plantas provenientes de semillas y organogénesis con y sin crioconservar.	50

RESUMEN

Desde su introducción a la Argentina en la década del 80, el híbrido entre *Pinus elliotii* var. *elliotii* y *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, ha demostrado atributos de forma, adaptabilidad y crecimiento deseables. Las expectativas generadas despertaron el interés del sector foresto-industrial poniendo de manifiesto la necesidad de contar con suficiente material que atienda la creciente demanda. Sin embargo, la baja producción de semillas del híbrido restringe su expansión comercial, por lo que es necesario asegurar una crioconservación eficiente y un protocolo de propagación que asegure su estabilidad genética. Los embriones cigóticos maduros se cultivaron en medio Murashige y Skoog (1962) reducido a la mitad de su concentración ($\frac{1}{2}$ MS) con 6-benciladenina (BA) y tidiazurón (TDZ). Tras 45 días en cultivo, la mayor tasa de regeneración ($86.7 \pm 8.8\%$) y el máximo número de yemas diferenciadas por explante (15.5 ± 2.8) se obtuvieron a partir de embriones cultivados en $\frac{1}{2}$ MS suplementado con sacarosa 0.09 M y adicionado con $0.5 \mu\text{M}$ de cada citocinina. El empleo de la misma formulación nutritiva, gelificada con Phytigel[®] ($3.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y libre de reguladores de crecimiento en recipientes provistos de ventilación asistida, promovió la elongación de las yemas adventicias diferenciadas. Posteriormente, el $73 \pm 6.7\%$ de los brotes produjeron raíces tras el pretratamiento en una solución con 1.25 mM de ácido indol-3-butírico (IBA) durante 5 min y el cultivo en MS diluido 4 veces, semisólido (Phytigel[®] $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), con sacarosa (0.045 M). La crioconservación de los embriones cigóticos aplicando la técnica de desecación y la posterior inmersión directa en nitrógeno líquido no afectó la tasa de regeneración, permitiendo prolongar el tiempo de almacenamiento del explante. Las vitroplantas se transfirieron con éxito a condiciones *ex vitro*. Teniendo en cuenta que el déficit hídrico es la principal tensión durante el establecimiento de la plantación, se llevó a cabo un experimento en condiciones controladas para determinar la aptitud de las plantas propagadas *in vitro* para superar esta situación desfavorable. Finalmente, los estudios de campo evaluaron la tasa de sobrevivencia y el crecimiento de las plantas de 16 meses de edad durante la implantación del bosque. Nuestros resultados indicaron que, durante la fase de establecimiento del dosel comercial, la sobrevivencia y crecimiento de las plantas provenientes de organogénesis es comparable a aquellas obtenidas por germinación de semillas y macropropagación. Además, el análisis de marcadores inter-simple sequence repeat (ISSR) reveló la uniformidad genética entre las plantas cultivadas *in vitro*, demostrando la fiabilidad y validez del procedimiento. De este modo, los protocolos de regeneración y crioconservación desarrollados constituyen una valiosa alternativa para los programas de mejora genética y propagación comercial de *Pinus elliotii* var. *elliotii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

ABSTRACT

Since its introduction to Argentina in the 1980s, the hybrid between *Pinus elliottii* var. *elliottii* and *Pinus caribaea* var. *hondurensis* has demonstrated desirable attributes of form, adaptability and growth. The expectations generated aroused the interest of the forestry-industrial sector, highlighting the need for sufficient material to meet the growing demand. However, the low seed production of the interspecific hybrid restricts its commercial expansion, making it necessary to ensure efficient cryopreservation and a propagation protocol with no genetic variability. Mature zygotic embryos (MZEs) were cultured in half-strength Murashige and Skoog ($\frac{1}{2}$ MS) medium containing 6-benzyladenine (BA) and tidiazurón (TDZ). After 45 days in culture, the highest rate of regeneration ($86.7\pm 8.8\%$) and the maximum number of differentiated buds per responsive explant (15.5 ± 2.8) were achieved from explants cultivated on $\frac{1}{2}$ MS enriched with sucrose (0.09 M), BA and TDZ ($0.5\ \mu\text{M}$ each). The same nutrient formulation gelled with gellan gum ($3.5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and free of growth regulators in containers provided with forced ventilation culture was used for shoot elongation. Subsequently, $73\pm 6.7\%$ of shoots produced roots after pretreatment with 1.25 mM indole-3-butyric acid solution for 5 min and culture on quarter-strength MS with gellan gum ($4\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and sucrose (0.045 M). Cryopreservation of zygotic embryos using a simple desiccation step and a direct immersion into liquid nitrogen did not affect regeneration and would enhance embryo storage duration. The regenerated plantlets were successfully transferred to *ex vitro* conditions. Considering that water deficit is the major strain during forest establishment, a controlled experiment was carried out to determine the competence of plantlets to overcome this stress. Next, field studies assessed the survival rate and growth of 16-month-old plants. Our results indicated that the field performance of tissue-culture-derived plants is similar to seedlings and rooted cutting plants. Additionally, inter-simple sequence repeat marker analysis revealed the genetic uniformity among the *in vitro* raised plants, demonstrating the reliability and validity of the procedure. Thus, the developed regeneration and cryopreservation protocol for mature zygotic embryo explants is a valuable alternative for breeding programs and commercial *Pinus elliottii* var. *elliottii* \times *Pinus caribaea* var. *hondurensis* propagation.

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCION

1.1. El sector forestal argentino

La extensión de su territorio y la diversidad de sus climas permiten a la Argentina poseer una importante riqueza forestal. Según datos oficiales nuestro país cuenta con 50.000.000 hectáreas de bosques nativos y 1.317.793 hectáreas de bosques cultivados, entre los que predominan las forestaciones de pinos (*Pinus sp.*), eucaliptos (*Eucalyptus sp.*), sauces (*Salix sp.*) y álamos (*Populus sp.*) (Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas, 2019).

A pesar de poseer una superficie menor, las plantaciones forestales conforman un recurso valioso para la Argentina y fundamentalmente para las provincias de Misiones, Corrientes y Entre Ríos, donde se concentra actualmente el 81% de la superficie total forestada (Dirección Nacional de Desarrollo Foresto Industrial, 2019).

En este sentido, la madera proveniente de los bosques implantados cubre el 95% de la demanda de materia prima de las industrias de base forestal, siendo el principal producto de extracción, rollizos para uso industrial (Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas, 2019). Asimismo, el sector forestal contribuye al desarrollo socioeconómico nacional al generar y/o requerir considerable mano de obra, principalmente en las etapas de preparación del terreno, plantación y cuidados silviculturales. A su vez, éstas tienen un efecto multiplicador de empleo sobre las etapas posteriores de producción, como la industrialización y los servicios asociados (Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas, 2019). La posibilidad de crecer en superficie forestada se presenta como una gran oportunidad para el sector. En este contexto, existen en Argentina entre 8 y 20 millones de hectáreas disponibles para la forestación (FAO, 2012); de las cuales, 5 millones no compiten en el uso con otras alternativas agropecuarias y pueden ser complementadas con otras actividades productivas tales como sistemas agrosilvopastoriles. La madera es además un producto insignia de la bio-economía, es renovable, reciclable, carbono neutral y con amplias aplicaciones industriales que incluyen papeles, muebles, viviendas, energía, y nuevas aplicaciones a partir de la biorrefinería, la nanotecnología y la biotecnología (Mesa de Competitividad Foresto Industrial, 2019). Al mismo tiempo, esta actividad es generadora de industrias y servicios complementarios tales como la química, el transporte, la informática, ingeniería y el diseño (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, 2017).

El alto potencial de crecimiento de las cadenas y aglomerados foresto industriales, su proyección para generar una amplia oferta de bienes y servicios con incorporación de valor agregado y su capacidad de creación de empleos directos e indirectos calificados y no calificados (Marcó et al., 2016); sumados a las condiciones naturales óptimas, los recursos humanos y capacidades instaladas y la creciente demanda interna y externa de productos de base forestal en un contexto de cambio climático, se presentan como una oportunidad para los bosques argentinos y toda la cadena de valor foresto industrial (Mesa de Competitividad Foresto Industrial,

2019). En este escenario, el estado nacional impulsa desde hace décadas programas destinados a favorecer la actividad forestal. La implementación de la Ley 25.080 significó un gran aporte, al proporcionar un régimen de promoción para las inversiones que se efectúen en nuevos emprendimientos forestales, en ampliaciones de los bosques existentes y en proyectos foresto industriales. Su importancia quedó demostrada al ser prorrogada por un nuevo período de 10 años en 2008 (Ley N.º 26.432) y 2019, (Ley N.º 27.487), respectivamente. Al mismo tiempo, se desarrolló el Programa de Producción de Material de Propagación Mejorado con la finalidad de contribuir a la ley mediante el abastecimiento de las principales especies cultivadas con material de propagación (semillas y clones) genéticamente superior (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2010). Atendiendo a las nuevas determinaciones, en el transcurso del mismo año se implementó el Programa de Domesticación y Mejoramiento de Especies Forestales Nativas e Introducidas para Usos de Alto Valor (PROMEAF), cuyo objetivo principal fue generar material genético mejorado, de especies forestales nativas e introducidas, que incrementen y diversifiquen la oferta de madera de calidad fomentando la rentabilidad y la sustentabilidad de la cadena forestal en todo el país y conservando a su vez el recurso genético (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2010).

1.2. Antecedentes del programa de mejoramiento genético vigente

En las últimas décadas, los diversos programas de mejoramiento genético forestal sustanciados en Argentina y otros países, se convirtieron en un componente esencial para incrementar la adaptabilidad y productividad de los bosques cultivados (Marcó et al., 2016). En este sentido, los procesos de domesticación que posibilitan la obtención de árboles con una arquitectura de copa que les permita capturar la luz de forma más eficiente, que concentren el almacenamiento de fotosintatos, que presenten menor cantidad de ramas, entrenudos más largos, mejor aptitud y comportamiento en los procesos de transformación de la madera para fines específicos, entre otras características, contribuirán a mejorar la calidad y cantidad del producto final; a la vez que, reducirán los turnos de aprovechamiento y los costos de establecimiento, cosecha y/o procesos industriales (Cortizo, 2011).

Los primeros pasos del mejoramiento genético de coníferas realizados en Argentina se remontan a la década del 60 a través de la introducción de especies seleccionadas por su adaptación a las distintas zonas ecológicas. El avance de los programas involucró la ejecución de numerosos ensayos de especies, orígenes y procedencias que permitieron determinar las fuentes de semillas que brindaran plantaciones forestales con mayor ganancia genética en relación con el rendimiento volumétrico (Marcó et al., 2016). Sin embargo, en los últimos años y de manera creciente, se estableció el concepto de que las ventajas comparativas y competitivas de la foresto-industria no solo radican en su producción volumétrica; sino que, además, interviene de manera significativa la calidad de la madera para usos específicos (Marcó et al., 2016). En este contexto, la disponibilidad de material genético superior en calidad y adaptabilidad

constituye uno de los eslabones principales del Programa de Mejoramiento Forestal vigente. El concepto de “calidad” comprende la conjunción de ciertos atributos en los individuos que conforman el bosque, particularmente aquellos que disminuyen los costos de producción silvícolas e industriales tales como velocidad de crecimiento, forma del fuste y propiedades intrínsecas de la madera. Mientras que, la “adaptabilidad” resulta de la interacción entre el genotipo y el ambiente e indica la habilidad para superar situaciones adversas producidas por factores bióticos y/o abióticos.

La implementación operativa del PROMEF se realiza a través de seis subprogramas de alcance nacional, en los cuales la selección de las especies incluidas fue definida según las necesidades de las diferentes regiones del país. En este contexto, considerando que más del 60% de las forestaciones en la Mesopotamia corresponden a especies pertenecientes al género *Pinus*, se implementó en la región el Subprograma *Pinus* y *Pseudotsuga*. Éste es llevado adelante por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y tiene como objetivo general garantizar la disponibilidad de material de propagación genéticamente mejorado en cuanto a calidad de la madera, crecimiento y adaptabilidad. A tal fin, trata de incrementar la competitividad y sustentabilidad de la cadena forestal a través de: 1) evaluaciones y raleos genéticos de huertos semilleros clonales y de progenies, 2) instalación de nuevos ensayos de progenies, 3) generación de híbridos intra- e inter-específicos, 4) incorporación de caracteres de calidad de madera y tolerancia a estrés abiótico como criterio de selección, 5) desarrollo de protocolos de propagación vegetativa basados en micropropagación y cultivo de embriones inmaduros, 6) utilización de herramientas biotecnológicas para el monitoreo de la variabilidad genética contenida en los programas de mejora y 7) promoción y difusión del material genético mejorado al sector productivo. Dada la importancia que presentan estas especies, el subprograma prioriza el mejoramiento genético de *Pinus taeda*, *Pinus elliottii*, *Pinus caribaea* var. *hondurensis* y contempla, además, el híbrido resultante del cruzamiento entre *Pinus elliottii* var. *elliottii* (PEE) y *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (PCH), material vegetal sobre el cual se centran los objetivos planteados en el marco de la presente tesis.

1.3. Descripción del germoplasma objeto del estudio

La hibridación en especies forestales constituye una estrategia de mejoramiento aplicada con el propósito de incrementar la adaptabilidad, rendimiento y calidad de madera. En tal sentido, los híbridos inter- e intra-específicos pueden expresar combinaciones útiles de rasgos que no ocurren naturalmente (o que tomarían varias generaciones de mejoramiento a través de ciclos de selección) y manifestar el vigor híbrido o heterosis, toda vez que esta descendencia, en términos de crecimiento, es superior a la media de los dos padres (Marcó, 2005). En este sentido, en la comunidad forestal existe un consenso generalizado acerca de las ventajas técnicas e industriales que ofrece el empleo del material híbrido *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (PEE × PCH) con relación al uso de sus parentales individuales (Gauchat et al.,

2005). Esta entidad taxonómica ha sido desarrollada en Australia en la década del 50, alcanzando un gran reconocimiento por el incremento de la productividad en plantaciones, a través de un amplio rango de ambientes (Nikles, 2000). La superioridad híbrida parece derivarse de una recombinación complementaria de los rasgos deseables de las dos especies parentales: tasa de crecimiento y buena ramificación característicos del PCH, combinada con la resistencia al viento, adaptabilidad a los sitios húmedos, alta densidad de la madera y rectitud del fuste de PEE (Dieters y Brawner, 2007). Estos atributos han quedado demostrados desde el inicio en los ensayos establecidos en el sudeste de Queensland y en los trópicos meridionales en Byfield donde el híbrido fue superior en crecimiento e igual o mejor en rectitud de fuste que ambas especies parentales, produciendo además madera de densidad y resistencia suficientemente alta como para satisfacer al mercado de productos predominantemente estructurales. Posteriormente, se realizaron las primeras introducciones en países tropicales y subtropicales como África (Zimbabue), EEUU (Florida), Brasil (Paraná), Argentina, China, Sudáfrica y Uruguay donde los beneficios de este material han quedado demostrados al reportarse además una marcada superioridad del híbrido respecto a los controles válidos para cada país (Nikles, 2000).

El primer ensayo de pino híbrido en Argentina fue implantado en 1981, en un sitio bien drenado de la provincia de Corrientes. Diez años después Barrett et al. (1991) confirmaron que los híbridos generaron mayor biomasa que PEE y que la forma del árbol, en particular del fuste, fue mejor que los controles utilizados. La tasa de sobrevivencia, por su parte, demostró una gran adaptabilidad a la zona, en comparación con PEE y fue muy superior a la observada para PCH (Nikles, 1996). Resultados promisorios fueron a su vez reportados por Bunse (2003), a partir de ensayos realizados en sitios contrastantes de la misma provincia que incluyeron, desde suelos arenosos de baja fertilidad y agua subterránea a 1-1.5 metros de profundidad hasta suelos rojos profundos, bien drenados y muy productivos. Estudios realizados por INTA, validaron la superioridad del híbrido F_1 y destacaron además el elevado potencial del material F_2 , considerándolos como una opción adecuada para la plantación en las zonas más cálidas de la región mesopotámica, donde se utilizan principalmente PEE (en suelos mal drenados y sitios forestales de baja productividad) y *Pinus taeda* (en sitios bien drenados y sitios forestales productivos). En estas circunstancias, los híbridos F_1 y F_2 evidenciaron una mejor rectitud de fuste y estructura de copa considerándose apropiada su utilización en sistemas silvopastoriles (Cappa et al., 2013).

La disponibilidad del conocimiento basado en experiencias locales favoreció la preferencia en la implantación del híbrido despertando el interés de las empresas por la importación de materiales seminales desde Australia con el objeto de incorporarlos a los planes de forestación anual. Sin embargo, la aplicación a escala comercial de este material vegetal se ha visto, desde los inicios de su introducción a nuestro país, limitada por problemas inherentes a su producción.

1.4. Fundamentos de la elección del tema propuesto

El material híbrido se obtiene llevando a cabo cruzamientos controlados entre *Pinus elliottii* var. *elliottii* empleado como madre y el *Pinus caribaea* var. *hondurensis* como donador de polen. Sin embargo, dos problemas se encuentran asociados a su producción: primero, la floración de las especies parentales no ocurre de manera simultánea, dándose la maduración del polen del PCH unos tres meses antes de que los óvulos del PEE estén receptivos (Doyle et al., 2002)., Este hecho imposibilita la instalación de huertos semilleros biclonales de polinización libre para la producción de semilla híbrida F_1 , requiriéndose la instalación de huertos monoclonales de PEE, donde se realiza polinización masal con PCH (Haines y Nikles, 1987). En esta situación incluso, el éxito del cruzamiento depende en gran medida de la viabilidad del polen, la cual se ve directamente afectada por el tiempo y las condiciones (temperatura y humedad) de almacenamiento, como también por el estado de desarrollo del cono al momento de ser cosechado (Doyle et al., 2002). El segundo problema se suscita debido a la pronunciada incompatibilidad que presentan las especies progenitoras resultando en una baja producción de semillas híbridas viables (Slee, 1970). A su vez, este número se ve condicionado por el porcentaje de germinación que se logre en condiciones de vivero. Esta escasa producción de semilla híbrida F_1 ha determinado que se recurra, por un lado, a la multiplicación vegetativa de esta descendencia, y por otro, a la utilización de semilla híbrida F_2 obtenida mediante polinización abierta de progenies F_1 . Si bien, los individuos F_2 muestran mayor variabilidad, aún se conserva una buena tasa de crecimiento y calidad de madera (Harding y Copley, 2000; Nikles, 2000). Independientemente de la calidad de semilla que se desee implementar, su disponibilidad se ve condicionada por la oferta de material vegetal, que en la actualidad es superada por la demanda mundial, atraída por las cualidades del germoplasma antes mencionadas. Este hecho, sumado a la dificultad de utilizar material genético local, ampliamente adaptado a las condiciones ambientales de la región, crean la necesidad de contar con un sistema de clonación y conservación eficiente que permitan asegurar una producción constante y confiable del recurso vegetal, de manera efectiva y en términos económicos costeables. La incorporación de técnicas de clonación en los programas de mejoramiento genético de especies perennes tiene vital importancia dado que, por un lado, el prolongado ciclo de vida de las especies y por el otro, el alto grado de heterocigosidad que presentan las mismas limitan el uso del método de cruzamientos y selección como una herramienta estratégica, requiriéndose de varias generaciones para lograr una pequeña ganancia genética (Von Aderkas y Bonga, 2000). Además, la expansión del cultivo mediante semillas solo permite el aprovechamiento de los efectos aditivos, sin embargo, los efectos no aditivos pueden ser capturados mediante la clonación (Marcó, 2005).

La propagación clonal de plantas se refiere a la multiplicación de individuos genéticamente idénticos por métodos asexuales de regeneración a partir de tejidos u órganos somáticos,

constituye una práctica común en la horticultura y la silvicultura a fin de preservar los caracteres deseables de genotipos seleccionados o variedades (Bhojwani y Dantu, 2013^a). En coníferas, en particular, se aplican varios métodos de propagación para tal fin, entre los que se incluyen injertos, manejo de rebrote y enraizamiento de estacas. Por su parte, el injerto, es utilizado principalmente para el establecimiento de huertos semilleros, pero es raramente empleado para la clonación masiva, por tratarse de un trabajo intensivo y costoso que puede resultar en el rechazo del injerto (Miller y DeBell, 2013). El aprovechamiento del rebrote, si bien resulta muy eficaz para muchas especies de madera dura (Wendling et al., 2014), no es una opción para las coníferas, ya que la mayoría de ellas no presentan esta característica (Bonga, 2014). La propagación vegetativa mediante el enraizamiento de estacas de tallos ha sido extensamente empleada en la clonación de especies forestales. Sin embargo, este proceso morfogénico es fuertemente influenciado por la edad del material que se desea propagar, siendo a veces necesario la implementación de un proceso de rejuvenecimiento previo a la clonación masiva de un determinado genotipo (Von Aderkas y Bonga, 2000). En la actualidad, las estrategias más efectivas se logran a través de la combinación de estas técnicas convencionales con nuevas herramientas biotecnológicas como la organogénesis y la embriogénesis somática.

1.4.1. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales implica el aislamiento de un órgano, tejido, célula o protoplasto de una planta en condiciones asépticas y su crecimiento en un medio nutritivo claramente definido en un ambiente estable con luz, temperatura y humedad relativa controlada (Dagla, 2012). Su aplicabilidad se basa en una capacidad específica de las células vegetales denominada "totipotencia". El concepto de totipotencia establece que, todas las células vegetales (excepto el polen y los óvulos) contienen la totalidad del complemento de los genes, lo que hace posible el crecimiento de plantas completamente sanas a partir de células vegetales individuales, en condiciones de laboratorio (Sherif, 2018). En este contexto, el cultivo *in vitro* ofrece una variedad de herramientas que podrían implementarse en un proceso de mejoramiento genético, y que han sido utilizadas con éxito en la propagación masiva y en la conservación de numerosas especies leñosas (Dagla, 2012). Entre ellas, la organogénesis directa de yemas vegetativas es una técnica viable de ser aplicada para tal fin (De Diego et al., 2008).

La organogénesis es un proceso por el cual el explante inicial se diferencia para formar un órgano adventicio o primordio, en un medio nutritivo definido bajo condiciones ambientales controladas (Ganapathi et al., 2003). Dicho de otro modo, porciones de órganos o tejido pueden ser cultivados para desarrollar brotes adventicios que posteriormente, mediante la adición de combinaciones adecuadas de hormonas vegetales, formarán raíces adventicias constituyendo un individuo completo (Sherif, 2018). Esta regeneración se puede dar de manera directa, cuando los brotes se diferencian desde cualquier parte del explante, o bien de manera indirecta, cuando los nuevos órganos vegetativos se originan a partir de una masa de tejido indiferenciado

denominado “callo”. La principal ventaja de la organogénesis es que no se limita a un determinado momento del año para su iniciación y el material puede ser multiplicado y enraizado respondiendo a la demanda (Montalbán et al., 2011).

Existen numerosos estudios en la literatura que destacan la formación directa de vástagos adventicios a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros. En este sentido, resultados previos demostraron la influencia del tipo y la concentración del medio nutritivo, la concentración de citocininas y la presencia de ácido 1-Naftalenacético (ANA) en la capacidad morfogénica de embriones de *Pinus elliotii* (Pérez-Bermúdez y Sommer, 1987). En *Pinus caribaea* var. *hondurensis* la obtención de plantas completas fue posible gracias a la determinación adecuada del tiempo de exposición al medio nutritivo y la concentración de BA durante la inducción, la concentración del medio nutritivo en la etapa de crecimiento de yemas y el tipo de hormona empleado en el enraizamiento (Go et al., 1993). Este grupo desarrolló además un procedimiento para la micropropagación de *Pinus caribaea* al analizar conjuntamente el efecto del agregado de distintos niveles de sacarosa y aditivos orgánicos en la formación de raíces adventicias (Halos y Go, 1993). De igual modo y con el propósito de incrementar el número de plantas de *Pinus elliotii* × *Pinus caribaea*, ante la baja producción de semillas viables, Meyer (1998) desarrolló un procedimiento para la multiplicación del híbrido, incluyendo en su estudio como factor determinante, el efecto de la luz en el desarrollo de brotes adventicios. La organogénesis directa fue desarrollada a partir de brotes de *Pinus caribaea* var. *caribaea* obtenidos de plantas madre que crecían en condiciones de invernáculo (Chávez Milián, 2010). Por su parte, Lv y Huang (2012) informaron un procedimiento para la obtención de vitroplantas de *Pinus elliotii* × *Pinus caribaea* a partir del establecimiento de brotes extraídos de plantas de 5 años de edad. Un protocolo simple y eficiente también fue publicado para *Pinus elliotii* var. *elliotii* empleando como explante inicial brotes apicales de plántulas germinadas *in vitro* (Nunes et al., 2018). Asimismo, es factible la inducción de este proceso morfogénico de manera indirecta a partir de tejidos indiferenciados originados de explantes embrionarios de *Pinus elliotii* cultivados en medios nutritivos suplementados con auxinas y citoquininas (Tang et al., 2006).

En el caso específico del genotipo objeto del estudio, el grupo de trabajo a través de la dirección de una Tesis de Maestría ha desarrollado un procedimiento que permite la neoformación de yemas adventicias a partir del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos maduros (Fortes, 2011). Recientemente, ha sido descrito para el híbrido un protocolo de embriogénesis somática que emplea como explante al megagametofito. Si bien, mediante este procedimiento se posibilita la obtención de múltiples vitroplantas estables genéticamente, resulta necesaria su optimización para la aplicación a gran escala (Nunes et al., 2018).

La regeneración exitosa de plantas enteras mediante el empleo de técnicas de cultivo *in vitro* se transforma en una herramienta invaluable cuando se la combina con métodos eficientes para conservación del germoplasma. En este sentido, el desarrollo de procedimientos de

crioconservación cumple un rol fundamental en el éxito de los programas de mejoramiento genético al permitir que los cultivos puedan mantenerse en un estado juvenil mientras se realizan las pruebas de campo, generalmente de largo plazo, que determinarán los mejores cultivares para la propagación masiva (Bonga, 2016).

1.4.2. Crioconservación

Desde su desarrollo en 1960, la crioconservación de plantas es considerado un método extraordinario para la conservación segura y a largo plazo de material biológico; sin inducir alteraciones genéticas y preservando el potencial de regeneración del material conservado (Ozudogru y Lambardi, 2016). Cuando los explantes son almacenados a temperaturas ultra bajas proporcionadas por nitrógeno líquido (NL) las divisiones celulares y los procesos metabólicos son detenidos. En estas condiciones, el material vegetal puede almacenarse sin alteración o modificación por un período de tiempo teóricamente ilimitado (Engelmann, 2011). El contenido de agua de las células durante la inmersión en NL es el factor clave que afecta al éxito de la criopreservación ya que éste debe ser lo suficientemente bajo para evitar la formación de cristales de hielo intracelular y lo suficientemente alto para permitir la recuperación de los explantes viables después del almacenamiento (Ozudogru y Lambardi, 2016). En términos criobiológicos, el agua libre o congelable es la fracción que es necesario eliminar o minimizar. Por lo tanto, las células tienen que ser deshidratadas artificialmente para protegerlas del daño causado por la cristalización del agua intracelular (Mazur, 1984). La deshidratación puede ser lograda de diferentes maneras: (1) Induciendo la “criodeshidratación” de los explantes mediante un descenso gradual de la temperatura (usualmente a tasas de -0.5 a -1 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) hasta los -40 $^{\circ}\text{C}$ antes de la inmersión en NL; (2) mediante el uso de soluciones de vitrificación altamente concentradas; (3) por exposición constante del explante a un flujo de aire estéril o gel de sílice (Ozudogru y Lambardi, 2016). Los protocolos desarrollados emplean tales técnicas de manera aislada o combinadas. Entre los procedimientos usualmente empleados se incluyen a los métodos convencionales; encapsulación - deshidratación; vitrificación y protocolos derivados (gota - vitrificación, encapsulación - vitrificación y crio-lámina); precultivo - desecación y desecación (González y Engelmann, 2013). La crioconservación se puede aplicar a cualquier tipo de material biológico, desde semillas hasta ápices meristemáticos, incluyendo células, callos, polen, embriones somáticos, entre otros (Benson et al., 2008). Sin embargo, no es posible diseñar un protocolo criogénico único que funcione satisfactoriamente para todos los sistemas biológicos, como tampoco se puede considerar que un mismo método necesariamente será siempre exitoso para un determinado explante (González y Engelmann, 2013).

La crioconservación de líneas embriogénicas ha sido ampliamente estudiada en el género *Pinus*, desarrollándose numerosos procedimientos basados en la aplicación de métodos convencionales y descenso térmico gradual. De este modo, Laine et al. (1992) utilizando como agentes crioprotectores sacarosa y dimetilsulfóxido (DMSO), conservaron material de *Pinus*

caribaea var. *hondurensis* de manera exitosa. La misma combinación de soluciones fue empleada para *Pinus nigra* con resultados favorables (Salaj et al., 2007). En *Pinus sylvestris* la recuperación de los cultivos embriogénicos fue exitosa cuando se utilizó una mezcla de polietilenglicol (PEG), glucosa y DMSO (Häggman et al., 1998). Por su parte, Ford et al. (2000) posibilitaron la conservación de *Pinus patula* a partir de una combinación de sorbitol y DMSO. La implementación de un pre-tratamiento con sacarosa y PSD (DMSO + PEG + sacarosa), seguido de un enfriamiento previo a la criopreservación, permitió la recuperación de líneas celulares embrionarias de PEE × PCH sin detectar variaciones genéticas significativas a nivel de ploidía del ácido desoxirribonucleico (ADN) o pérdida de potencial embriogénico (Marum et al., 2018; Nunes et al., 2017). Contrariamente, son escasos los conocimientos referidos a procedimientos que empleen otros métodos y/o explantes para la crioconservación. En este sentido, mediante la aplicación de la técnica de vitrificación, brotes apicales de *Pinus kesiya* fueron almacenados en NL y luego recuperados, evidenciándose el efecto del tiempo de exposición del explante a las soluciones vitrificantes (Kalita et al., 2012). Asimismo, procedimientos aplicables en el marco de un sistema de propagación por organogénesis fueron desarrollados únicamente para *Pinus radiata* a partir de embriones cigóticos completos y cotiledones con resultados promisorios en ambos casos (Hargreaves et al., 1999; 2004).

Basado en lo anteriormente expuesto, las variadas técnicas que ofrece el cultivo *in vitro* de tejidos permiten no solo el desarrollo de procedimientos de conservación a corto, medio y largo plazo (Marco Medina y Serrano Martínez, 2012) sino que, además, brinda la posibilidad de producir plantas a tasas más altas que las que se obtienen por métodos tradicionales. No obstante, el éxito de la propagación *in vitro* se garantiza cuando las vitroplantas son capaces de superar la situación adversa que se suscita durante la implantación y establecimiento del cultivo en el campo. Las altas temperaturas y la ausencia de lluvias en verano reducen la disponibilidad hídrica del suelo y aumentan la demanda evaporativa de la atmósfera, coincidiendo con gran parte del período potencial de crecimiento, disminuyendo en consecuencia el rendimiento del cultivo (Sansberro et al., 2004). En estas condiciones, la sobrevivencia depende en gran medida de la capacidad de las plantas para adaptarse a las variaciones ambientales siendo necesario contar con individuos que sean capaces de administrar sus recursos adecuadamente de manera tal que le permita una profusa exploración radicular evitando el desbalance hídrico. Con el objeto de conocer este comportamiento en plantas obtenidas por biotecnología, el establecimiento de ensayos de estrés en condiciones controladas ha sido ampliamente utilizado. Cerrillo et al. (2004) trabajando con plantas de *Pinus halepensis* provenientes de cinco procedencias comprobaron, en condiciones medioambientales inducidas, que el índice de eficiencia fotosintética puede ser empleado como una medida indirecta del nivel de estrés en etapas previas a la aparición de pérdidas generales de sobrevivencia. Los resultados observados para *Pinus sylvestris*, en condiciones experimentales, apoyan la generalización de que; la tolerancia a la sequía de la especie varía en relación con el área de distribución (Cregg y Zhang, 2001). Estudios realizados

en *Pinus radiata* proporcionaron evidencias empíricas de que parámetros como los niveles de hormonas, el balance hídrico, el intercambio gaseoso y la fluorescencia de la clorofila, pueden ser empleados como indicadores del comportamiento de las plantas durante la exposición a periodos de déficit hídricos (De Diego et al., 2012).

La posibilidad de desarrollar un procedimiento de propagación vegetativa a partir de técnicas de cultivo *in vitro* que garantice la disponibilidad de material vegetal, capaz de combinarse adecuadamente con un protocolo que permita la conservación a largo plazo del germoplasma sin afectar la estabilidad genética, significarían un gran aporte al programa de mejoramiento genético en vigencia. Asimismo, conocer a priori el comportamiento de las plantas obtenidas a condiciones ambientales adversas y verificar este comportamiento en condiciones reales de implantación a campo permitirá contar con un desarrollo tecnológico robusto y confiable.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Desarrollar un procedimiento biotecnológico que permita la propagación vegetativa y crioconservación de las familias F₂ de *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis* a fines de su aplicación en el plan de mejoramiento genético forestal.

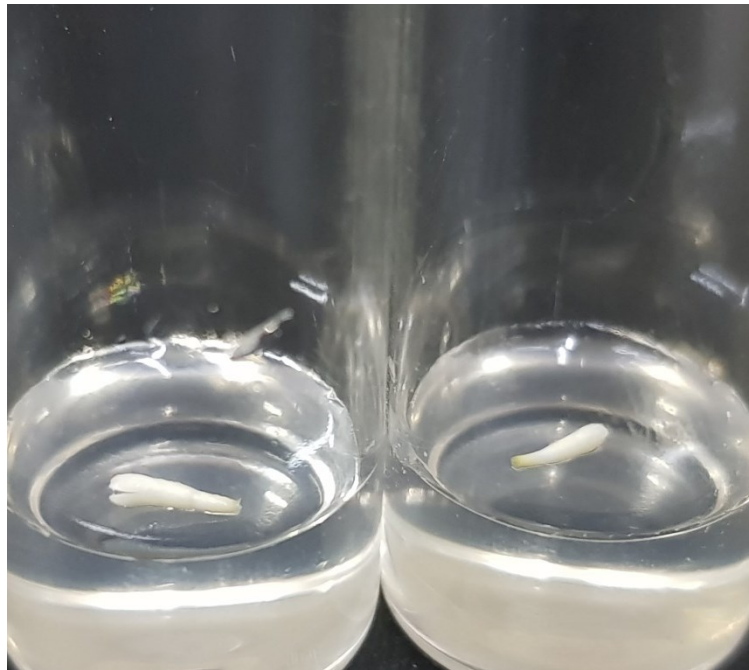
2.2. Objetivos particulares

- ◆ Inducir organogénesis de yemas vegetativas a partir del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos maduros.
- ◆ Desarrollar un protocolo de conservación *ex situ* de largo plazo a partir de la crioconservación.
- ◆ Ajustar un sistema mixotrófico que estimule el crecimiento de las yemas vegetativas neoformadas y posterior enraizamiento de los macroblastos resultantes.
- ◆ Evaluar la sobrevivencia y el crecimiento de las plantas propagadas durante la etapa de aclimatación.
- ◆ Caracterizar y analizar la variación de los parámetros fisiológicos y de crecimiento en respuesta a déficit hídrico.
- ◆ Evaluar la capacidad de adaptación de las plantas de idéntico origen, provenientes del enraizamiento de estacas, semillas y organogénesis durante implantación del cultivo.

3. HIPÓTESIS

El uso de las variadas herramientas que ofrece la biotecnología vegetal permite disponer de un sistema de crioconservación del germoplasma y favorece el escalado de la propagación vegetativa de las familias F₂ de *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS



4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Material vegetal

Se trabajó con semillas F₂ resultantes del cruzamiento de *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis* cosechadas en el año 2014. Éstas fueron escarificadas químicamente mediante inmersión en una solución de peróxido de hidrogeno 8% (v:v), en agitación (100 rpm) constante durante 24 h. Posteriormente, las semillas fueron desinfectadas con una solución acuosa de hipoclorito de sodio 1.5% (v:v) durante 30 min y enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. Finalmente, los embriones cigóticos maduros fueron aislados asépticamente constituyendo la fuente de explantes con fines de cultivo.

4.2. Propagación vegetativa *in vitro* vía organogénesis

4.2.1. Fase de inducción

4.2.1.1. *Experimento 1: Desarrollo de un medio de inducción*

Se realizaron varios experimentos con el propósito de desarrollar un procedimiento que permita la obtención masiva de plantas mediante la proliferación de yemas adventicias. Primeramente, los explantes aislados fueron inmediatamente expuestos a una elevada concentración de citoquininas a fin de establecer la relación hormonal adecuada que permitiese la neoformación de yemas adventicias. En este contexto, los embriones fueron cultivados individualmente en tubos de vidrio (11 mL) que contenían 3 mL de la solución basal formulada por Murashige y Skoog (1962), diluida al 50% de su concentración original (½ MS), semisólida (agar, 6.5 gr·L⁻¹), adicionada con sacarosa 0.09 M y diferentes concentraciones de 6-benciladenina (BA; 0.5, 2, 5, 15 y 20 µM) sola, o en combinación con 0.5 µM de TDZ.

4.2.1.2. *Experimento 2: Determinación del periodo óptimo de inducción*

Una vez establecida la relación hormonal, se realizó un segundo experimento con el propósito de determinar el tiempo óptimo de exposición a los fitorreguladores que maximice la formación de yemas adventicias a través de un sistema de regeneración directo, sin proliferación de tejidos indiferenciados. Para ello, los explantes fueron cultivados en el medio de inducción semisólido (agar 6.5 gr·L⁻¹), compuesto por ½ MS con sacarosa 0.09 M y adicionado con BA (0.5 µM y TDZ 0.5 µM) durante 30, 45 y 60 días, transfiriéndose inmediatamente a un medio de cultivo de similar constitución química y desprovisto de reguladores del crecimiento vegetal.

4.2.1.3. *Experimento 3: Pretratamiento de los embriones aislados en condiciones de oscuridad*

Ajustado el periodo óptimo de inducción, se condujo un nuevo experimento a fin de evaluar el efecto de la exposición previa de los explantes a condiciones de oscuridad. En este sentido,

los explantes aislados fueron cultivados en el medio de inducción antes definido e incubados en condiciones de oscuridad durante 1 a 4 días y transferidos a condiciones de luz hasta completar 45 días de inducción; incluyéndose un tratamiento control donde éstos fueron incubados en luz durante el periodo mencionado.

4.2.1.4. Experimento 4: Pretratamiento de las semillas a bajas temperaturas

Posteriormente, se analizó el efecto del pretratamiento de las semillas a bajas temperaturas, considerándose éste, un efecto ambiental sinérgico del proceso morfogénico. A tal fin, las semillas desinfectadas fueron expuestas a $4\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 1 a 6 días. Cumplido el tiempo asignado, los embriones fueron extraídos y cultivados durante 45 días en el medio de inducción descrito. Se incluyó un tratamiento control, sin frío, en el cual los explantes se cultivaron inmediatamente después de la desinfección.

En todos los experimentos, los embriones fueron cultivados individualmente en tubos de vidrio (11 mL) que contenían 3 mL de medio nutritivo (esterilizado en autoclave a 121°C y 1 atm de presión por 20 min) e incubados en condiciones de luz ($118\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR, luz día, provista por lámparas LEDs, fotoperíodo 14 h) y temperatura ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$) controladas. Se cultivaron tres réplicas de diez embriones por tratamiento. Transcurrido el periodo de incubación se cuantificó el número de explantes con síntomas visibles de ennegrecimiento tisular, explantes que permanecieron vivos, pero no formaron yemas adventicias (sin respuesta), explantes con yemas adventicias (regeneración) y número promedio de yemas adventicias formadas por explante.

4.2.2. Fase de elongación

4.2.2.1. Experimento 1: Determinación de la concentración de sales del medio de cultivo

Se realizaron una serie de experimentos tendientes a promover el crecimiento de las yemas neoformadas. Inicialmente, los explantes organogénicos conteniendo numerosas yemas adventicias fueron cultivados durante 30 días en biorreactores de inmersión temporal, tipo BIT (Escalona et al., 1999), provistos de frascos de 300 mL de capacidad. Se empleó el medio basal MS, en su concentración original o diluido dos ($\frac{1}{2}$ MS) y cuatro ($\frac{1}{4}$ MS) veces, adicionado con sacarosa 0.09 M y sin reguladores de crecimiento.

4.2.2.2. Experimento 2. Control de la proliferación bacteriana

Debido a la presencia de contaminación bacteriana, seguidamente se evaluó la suplementación al medio de cultivo con un biocida comercial (Delcide™ TG, 100 μL), conteniendo una mezcla de 5-cloro-2-metil-4-isotiazol-3-ona 1.05% y 2-metil-4-isotiazol-3-ona 0.45%, y solución buffer 1000 μL (MES: Monohydrate 2-(N-Morfolino) ethanesulfonic acid) siguiendo el procedimiento desarrollado por Luna et al. (2013). Además, se indagó el efecto de diferentes

concentraciones de sacarosa (0.045 M y 0.09 M) sobre el crecimiento de los brotes. Los cultivos fueron incubados durante 45 días.

4.2.2.3. Experimento 3: Efecto de la relación de iones amonio/nitrato en el medio nutritivo

Finalmente se analizaron algunas condiciones fisicoquímicas del medio de cultivo consideradas relevantes en la fase de elongación. Se modificó la proporción de los iones amonio y nitrato ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$) presentes en la formulación salina $\frac{1}{2}$ MS, manteniéndose constante la concentración total de nitrógeno (30 mM). En este contexto, los explantes regenerados fueron expuestos durante 45 días a diferentes tratamientos donde se analizaron las proporciones 0:30, 5:25, 10:20, 15:15, 20:10, 25:5 y 30:0 mM de los iones amonio y nitrato. Se ensayaron medios semisólidos (agar, $6.5 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$) y líquidos (inmersión temporal).

4.2.2.4. Experimento 4: Determinación del sistema de cultivo

Basados en los resultados preliminares obtenidos, se realizó un nuevo experimento empleando recipientes de cultivos de 200 mL de capacidad con el propósito de evaluar la combinación de medio semisólido y aireación asistida, manteniéndose el tratamiento de inmersión temporal. En este caso se testearon dos agentes gelificantes, agar ($6.5 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$) y Phytigel® ($3.5 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$). El medio basal consistió en $\frac{1}{2}$ MS (sacarosa 0.09 M), modificándose la relación $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (10:20 y 15:15 mM). Los embriones con numerosas yemas adventicias diferenciadas se mantuvieron bajo estas condiciones durante 60 días

4.2.2.5. Experimento 5: Duración de las fases de inducción y elongación

Una vez establecida la solución nutritiva y el sistema de cultivo que maximice la producción de brotes con más de 5 mm de longitud durante la fase de elongación, se ajustó el período óptimo de inducción. En tal contexto, los explantes organogénicos permanecieron en un medio de inducción compuesto por $\frac{1}{2}$ MS, semisólido (agar, $6.5 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$), adicionado con sacarosa (0.09 M), BA ($0.5 \mu\text{M}$) y TDZ ($0.5 \mu\text{M}$) durante 10, 20, 30 o 45 días. Seguidamente, los explantes regenerantes fueron transferidos a recipientes provistos de aireación asistida, conteniendo un medio fresco de elongación compuesto por $\frac{1}{2}$ MS, semisólido (Phytigel®, $3.5 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$) suplementado con sacarosa (0.09 M) y sin citoquininas, permaneciendo en estas condiciones durante 60 días

4.2.2.6. Experimento 6: Determinación del número óptimo de explantes cultivados por recipiente.

Empleando un sistema de cultivo conformado por recipientes de 200 mL con 50 mL de medio semisólido y provisto de aireación asistida, se cultivaron 10, 15 o 20 explantes por recipiente, a fin de indagar el efecto de la competencia entre explantes en la promoción del crecimiento caulinar. Los brotes resultantes fueron evaluados transcurridos 60 días de incubación.

En el sistema de inmersión temporal, los explantes estuvieron en contacto con el medio de cultivo (fase de inmersión) durante 1 minuto, repitiéndose esta operación cada 4 h. En el sistema semisólido con aireación asistida, se utilizó una duración y frecuencia similar a fin de posibilitar la renovación del ambiente gaseoso en el recipiente de cultivo. En ambos casos se utilizó una presión de aire de 0.5 bar provisto por un compresor. El número de explantes por recipiente de cultivo varió según el tratamiento.

En todos los casos, el pH de la solución se ajustó a 5.8 antes de la adición del agente gelificante. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 1 atm de presión por 20 min. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de luz ($118 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR, luz día provista por lámparas LEDs, fotoperíodo 14 h) y temperatura ($27\pm 2^\circ\text{C}$) controladas.

En todos los casos se realizaron cinco repeticiones independientes considerándose cada recipiente una unidad experimental. Al finalizar el periodo de incubación, se determinó la tasa de ennegrecimiento de los explantes organogénicos, porcentaje de explantes que permanecieron vivos, pero no manifestaron crecimiento caulinar de las yemas adventicias, porcentaje de explantes que brindaron brotes mayores a 5 mm de longitud, y número de brotes con más de 5 mm de longitud diferenciados por explante.

4.2.3. Fases de enraizamiento y aclimatación

Se emplearon brotes adventicios provenientes de la fase de elongación que alcanzaron al menos 20 mm de longitud caulinar. Éstos fueron sometidos a un tratamiento de inducción consistente en la inmersión de la base del brote en una solución de ácido indol butírico (IBA; 0.5, 1.25 y 2.5 mM) durante 5, 15 y 30 min. Seguidamente, fueron cultivados en recipientes de 200 mL de capacidad, conteniendo $\frac{1}{4}$ MS (50 mL) con sacarosa 0.045 M; se ensayaron como sustratos, gelificación con agar ($6.5 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$), Phytigel® ($4 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$) o vermiculita estéril. Se cultivaron 5 macroblastos por recipiente de 200 mL capacidad provisto de aireación asistida, realizándose 5 repeticiones del experimento. Se consideró cada recipiente de cultivo como una unidad experimental. Transcurridos 55 días de incubación se determinó el número de brotes que brindaron raíces, número de raíces formadas por brote y longitud promedio de éstas.

Los macroblastos que brindaron raíces fueron trasplantados en tubetes de 150 mL de capacidad conteniendo como substrato corteza de pino compostada suplementada con 0.5 gr de fertilizante de liberación controlada (Osmocote®, N-P-K; 18-15-9, liberación= 180 días) y transferidos a una cámara climatizada diseñada para tal fin. Se utilizó un régimen hídrico programado en el cual la humedad relativa se mantuvo en 90% durante los primeros 7 días, disminuyendo paulatinamente hasta alcanzar 70%. Se empleó luz natural (50% de radiación PAR). Se determinó la altura y el diámetro a la altura del cuello (DAC) de las plantas, al momento del trasplante y transcurridos 30 y 60 días de rustificación. Finalmente, las plantas rustificadas fueron transferidas a condiciones de invernadero.

4.2.4. Análisis morfo-fisiológicos de respuestas a déficit hídrico en plantas obtenidas por germinación de semillas, macropropagación y organogénesis

A fin de evaluar la aptitud de las vitroplantas obtenidas respecto a su balance hídrico durante la etapa de implantación, primeramente, se condujo un experimento comparativo entre plantas genéticamente similares e idéntica edad (12 meses) donde, bajo condiciones ambientales controladas, se indujo una situación de déficit hídrico severo. Se emplearon plantas provenientes de la germinación de semillas, enraizamiento de estacas (macropropagación) y organogénesis *in vitro* (organogénesis), creciendo en condiciones de invernáculo en macetas de 2.4 L de capacidad conteniendo suelo laterítico (pH=5.88; MO=8.59%; P=32.42 ppm; Ca=12.53 mEq/100g; Mg=0.80 mEq/100g; K=0.77 mEq/100g; Dap=0.98). Luego de 7 días de aclimatación, las plantas fueron irrigadas hasta alcanzar capacidad de campo (CC), cubriéndose posteriormente las macetas con papel de aluminio para evitar pérdida de agua por evaporación de la superficie del suelo. En los tratamientos de estrés, el riego se suspendió hasta que la disponibilidad hídrica del suelo se redujo a 50% propiciando un estrés moderado (E1) y 40% causando un estrés severo (E2), incluyéndose un tratamiento de rehidratación (RH) una vez que la tensión del factor de estrés llegara a E2. La irrigación se realizó por ascenso capilar a fin de eliminar los gases acumulados en los poros del suelo. Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas de luz (PAR: 380 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo: 14 h), temperatura (fotoperíodo/escotoperíodo: 27 \pm 1/20 \pm 2 °C) y humedad relativa (50-55%).

Finalizado cada tratamiento se determinó: el contenido relativo de agua de las acículas (CRA), rendimiento cuántico máximo del fotosistema II, crecimiento de raíz, diámetro, altura y peso seco (110°C) de raíz y parte aérea. Para la determinación del CRA de acículas, se cuantificó el peso fresco de cada acícula (PF) y seguidamente, se sumergió la muestra en agua destilada hasta peso constante logrando el peso en turgencia máxima (PT) y finalmente, se secó en estufa a 110°C para determinar su peso seco (PS). El CRA se calculó siguiendo la ecuación $[(PF-PS) / (PT-PS)] \times 100$. Las determinaciones de fluorescencia se realizaron al mediodía con un medidor de fotosíntesis portable Li-6400 (Li-Cor, Nebraska, USA) siguiendo el protocolo de flash multifásico (Loriaux et al., 2013). El crecimiento radical se determinó utilizando el método no destructivo de capacitancia eléctrica (Cseresnyés et al., 2018); para lo cual, previamente, se realizó una curva de crecimiento correlacionando los valores de capacitancia con el peso seco de raíces. La capacitancia se determinó con un tester digital (MULTIMETER DT-980 "G"), introduciendo un electrodo en el suelo y el otro en el cuello de la planta. Las mediciones se realizaron en condiciones de capacidad de campo al inicio y al final del experimento. Se consideraron 5 plantas por tratamiento, representando cada individuo una unidad experimental.

4.2.5. Análisis del crecimiento e incremento en altura, diámetro y masa radical de plantas obtenidas por germinación de semillas, macropropagación y organogénesis durante la implantación del dosel forestal

Plantas de 16 meses de edad, obtenidas mediante el uso de los sistemas de propagación antes mencionados, fueron implantadas en condiciones de campo en el mes de octubre de 2020 en la localidad de Puerto Esperanza, Misiones, Argentina (26°01'42" S, 54°38'49" W). El sitio se caracteriza por presentar clima subtropical húmedo, con temperaturas medias en julio, enero y anuales de 14.6, 25 y 20.2 °C, respectivamente, y una precipitación media anual de 1950 mm (Servicio Meteorológico Nacional, Argentina). Se implantaron 90 plantas por origen de los propágulos (plantas de semillas, macropropagación y organogénesis), utilizándose un marco de plantación de 2.5 m × 3 m, estableciéndose 3 repeticiones de 30 plantas cada una. Las parcelas de 225 m² de superficie fueron dispuestas en bloques al azar y contaron con una bordura perimetral de ensayo de 2 líneas de plantación y 1 línea entre tratamientos. Previo a la plantación, se retiraron los residuos con grúa, se realizó una pasada con rastra pesada. Dos semanas después se efectuó el control de malezas y posteriormente el control de hormigas. El periodo de evaluación se extendió durante los primeros 180 días desde la implantación, determinándose cada 60 días la tasa de sobrevivencia, el crecimiento de raíces (por capacitancia eléctrica), diámetro del cuello y altura de las plantas.

4.3. Crioconservación de embriones cigóticos maduros (explantes)

4.3.1. Experimento 1: Evaluación de la técnica convencional

Se aislaron y cultivaron embriones cigóticos maduros en el medio de inducción compuesto por ½ MS, semisólido (6.5 gr·L⁻¹), adicionado con sacarosa 0.09 M y 0.5 µM de BA y TDZ durante 10, 20, 30 o 45 días. Cumplido el tiempo preestablecido, éstos fueron transferidos a una solución de ½ MS conteniendo sacarosa 0.5 M, donde se mantuvieron en agitación (120 rpm) durante 24 h. Seguidamente, los recipientes conteniendo los explantes fueron expuestos a una temperatura de 0 °C, agregándose DMSO en alícuotas hasta alcanzar una concentración final de 5%. Los embriones inmersos en la solución crioprotectora fueron transferidos a crioviales de 5 mL de capacidad y almacenados a -18°C (freezer comercial) durante 1 h. Finalmente, los recipientes conteniendo las muestras fueron transferidos a nitrógeno líquido (-196°C) por 24 h. El descongelamiento se realizó de manera rápida mediante la inmersión de los crioviales en baño María a 40±2°C durante 2 a 3 min. En condiciones de asepsia, se procedió a eliminar el volumen de solución crioprotectora, enjuagándose los explantes mediante inmersión en una solución compuesta por ½ MS adicionado con sacarosa 1.2 M. Posteriormente, los embriones se colocaron durante 10 min en cajas de petri sobre papel filtro a fin de eliminar el excedente de la solución. Finalmente, los explantes fueron sub-cultivados en medios frescos de similar composición química e incubados en las condiciones de luz y temperatura antes descriptas.

4.3.2. Experimento 2: Evaluación de la técnica de vitrificación

Las soluciones de vitrificación permiten una marcada deshidratación osmótica de los tejidos, resultante de la exposición del material biológico a mezclas crioprotectoras muy concentradas, conocidas comúnmente como formulaciones PVS (*del inglés*, Plant Vitrification Solutions). En el contexto de esta tesis, se evaluaron las soluciones vitrificantes PVS-2 ($\frac{1}{2}$ MS + sacarosa 0.4 M + etilenglicol 15% + glicerol 30% + DMSO 15%), PVS-3 (sacarosa 50% + glicerol 50%) y PVS-4 ($\frac{1}{2}$ MS + sacarosa 0.6 M + etilenglicol 20% + glicerol 35%), en dos tiempos de inmersión (20 y 30 min.). Los embriones cigóticos fueron cultivados en el medio de inducción e incubados durante 10 días en las condiciones ambientales antes descritas. Seguidamente, los explantes fueron transferidos a frascos de vidrio conteniendo 50 mL de la “solución de carga” consistente en una mezcla de sacarosa 0.4 M y glicerol 2 M, manteniéndose en agitación (120 rpm) por 20 min. Inmediatamente, éstos fueron transferidos a las soluciones vitrificantes. Una vez cumplido el tiempo de exposición estipulado, los embriones cigóticos fueron transferidos a crioviales de 5 mL de capacidad y sumergidos en nitrógeno líquido durante 24 h. El descongelamiento, enjuague y escurrimiento se realizó de manera similar al procedimiento anterior. Finalmente, los explantes fueron cultivados en el medio de inducción siguiendo el protocolo desarrollado a tal fin.

4.3.3. Experimento 3: Evaluación de la técnica de desecación

Con el objeto de reducir el contenido de agua libre en el ámbito de los tejidos, se evaluaron distintos tratamientos que incluyeron el uso de agentes osmóticos en el medio de cultivo semisólido buscando disminuir el potencial agua de la solución; como así también, la exposición directa del explante a una corriente de aire estéril (flujo laminar). En el primer caso, los embriones cigóticos permanecieron durante 24 h en un medio de cultivo semisólido (agar 6.5 gr L⁻¹) compuesto por $\frac{1}{2}$ MS suplementado con sacarosa 0.5 M, transfiriéndose o no por idéntico periodo a un medio con dosis creciente de sacarosa ($\frac{1}{2}$ MS + sacarosa 1M). Se incluyó un tratamiento control, sin deshidratación. Los explantes provenientes de cada tratamiento fueron colocados en crioviales (10 embriones/criovial) y sumergidos en nitrógeno líquido por 24 h. El descongelamiento se realizó de manera rápida en baño maría (40±2 °C) durante 2-3 min. Seguidamente, los explantes fueron cultivados en el medio de inducción siguiendo el protocolo desarrollado a tal fin. Transcurridos 45 días de incubación se determinó la tasa de ennegrecimiento de los explantes, sobrevivencia, regeneración y número promedio de yemas adventicias neoformadas por explante.

4.3.4. Experimento 4: Influencia del tiempo de desecación sobre el contenido de humedad, sobrevivencia y capacidad de regeneración de los explantes

El tiempo óptimo de desecación se determinó a partir de la relación entre el contenido de humedad de los embriones, la sobrevivencia post-crioconservación y la tasa de formación de

yemas adventicias. A tal fin, los explantes deshidratados osmóticamente (precultivo en ½ MS suplementado con sacarosa 0.5 M por 24 h y transferencia por idéntico período al mismo medio conteniendo sacarosa 1M) o no (embriones sin precultivo), fueron pesados previo a ser expuestos a la corriente de aire del flujo laminar. En adelante y cada 30 minutos se separaron y pesaron 10 embriones, efectuándose 3 repeticiones. En simultáneo, una muestra de igual tamaño fue puesta dentro de crioviales de 2.5 mL de capacidad y sumergida en NL. Posteriormente éstas fueron descongeladas siguiendo el procedimiento descrito y cultivadas en el medio de inducción. Este procedimiento se repitió hasta completar el tiempo total de desecación de 120 min. Finalmente, 30 explantes fueron secados en estufa a 80°C hasta peso constante. Estas evaluaciones permitieron establecer el contenido de humedad de los embriones al momento de la crioconservación y determinar los valores de sobrevivencia, regeneración y número de yemas obtenidas por explante.

Una vez seleccionado el procedimiento de deshidratación más eficaz, se intentó optimizar la tasa de regeneración de los explantes. Para ello, los embriones crioconservados se cultivaron en ½ MS (0.09 M sacarosa), ensayándose las combinaciones de BA (0.5, 2, 5, 15 y 20 µM) y TDZ (0.5 µM) evaluadas en los explantes que no recibieron tratamiento de frío.

4.3.5. Experimento 5: Determinación de viabilidad por métodos bioquímicos

La viabilidad de los embriones crioconservados se determinó mediante el uso del test de tetrazolio (TZ) e índigo carmín (IC). El primero se basa en la coloración que adquieren las células vivas al producirse la reducción del indicador (solución de cloruro 2, 3, 5-trifenil tetrazolio) por la actividad de la deshidrogenasa (ISTA, 2007); esto permite distinguir las partes vivas del explante (teñidas de rojo) de las muertas (no coloreadas). La confiabilidad de esta técnica de predicción está supeditada a las condiciones de tinción (tiempo, concentración, temperatura, entre otros), la cuales deben ser definidas para cada material vegetal en particular. Por su parte, en el test de índigo carmín los tejidos muertos se tiñen de azul y los vivos permanecen incoloros al ser introducidos en una solución al 0.15% durante 3 horas, a temperatura ambiente (Kamra, 1972).

Se emplearon embriones deshidratados sin inmersión en NL, embriones deshidratados y criopreservados, y embriones sin deshidratación y criopreservados. Cada material fue sumergido en tres concentraciones de TZ (0.1, 0.2 y 0.5 %) para su tinción, utilizando viales de 5 mL con tapa hermética. Los recipientes se incubaron en estufa a 28°C y en oscuridad durante 18, 24 y 36 h. En cuanto al test de IC, se realizó según lo establecido por Kamra (1972). Una vez completada la tinción, los embriones fueron colocados sobre papel absorbente a fin de eliminar el excedente de solución, se tomaron fotografías de cada uno de los tratamientos y empleando el software ImageJ®, se realizaron las observaciones sobre cada embrión individualmente. De este modo fueron clasificados como *viabiles* aquellos embriones que, ante el TZ, manifestaban más del 50% del área de cotiledones e hipocótilos teñidos de rojo o rosa uniforme; o bien, sin

tinción en la prueba de índigo carmín. Se consideraron *no viables* aquellos embriones que presentaron más del 50% del área de cotiledones e hipocótilos completamente blancos o teñidos de rojo oscuro intenso (TZ) o completamente teñidos de azul (IC). Los resultados obtenidos fueron analizados en conjunto con los valores de sobrevivencia y regeneración previamente conocidos. De este modo se identificó el tratamiento de tinción cuya estimación fue la más acertada sin diferenciarse estadísticamente de los valores de sobrevivencia y regeneración ya conocidos. Considerando el procedimiento de tinción seleccionados para los embriones deshidratados y criopreservados, complementariamente se constató la confiabilidad de clasificación establecida por los métodos bioquímicos mediante matrices de confusión, a partir de las cuales se obtuvieron las métricas de sensibilidad, especificidad y exactitud, según lo establecido por Hossin y Sulaiman (2015).

4.4. Análisis histológico

El análisis histológico fue realizado de acuerdo a lo establecido por (González y Cristóbal, 1997). Los explantes cultivados en el medio de inducción compuesto por ½ MS adicionado con BA 0.5 µM y TDZ 0.5 µM, crioconservados o no, fueron fijados en una solución de formaldehído/etanol/ácido acético (AFA), deshidratados en serie con Biopur® e infiltrados en parafina. Los preparados fueron seccionados con ayuda de un micrótopo rotativo efectuándose cortes transversales y longitudinales de 10 µm, posteriormente éstos fueron coloreados con safranina-azul (Sigma-Aldrich) y montados en bálsamo de Canadá (Biopack). Las microfotografías fueron tomadas con un microscopio Leica DMLB2 equipado con una cámara digital de la misma marca ICC50HD (Leica, Wetzlar, Germany). Las observaciones histológicas fueron realizadas diariamente desde el inicio y hasta el día 25 de la fase de inducción.

4.5. Estabilidad genética de las vitroplantas

Mediante el empleo de una adaptación del método hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) (Yamamoto et al., 2000), se aisló ADN genómico de plantas (10 plantas por tratamiento) obtenidas por organogénesis y germinación *in vitro* de embriones no congelados y crioconservados. Se emplearon 11 cebadores ((AG)₈-C; (AGAC)₄-GC; (CAG)₇-CA; (CA)₈-T; (GA)₈-T; (GT)₈-G; (CT)₈-G; (GAG)₇-AC; (AC)₈-T; (AC)₈-G y (AG)₈-GC) para la amplificación (ISSR) de los cuatro tratamientos a evaluar. La reacción ISSR fue realizada según lo descrito por (Brugnoli et al., 2013). Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 2% en 1×TAE buffer a 70V. Los perfiles amplificados de ADN obtenidos para cada planta fueron introducidos en una matriz binaria de datos, clasificando a los marcadores ISSR por la presencia (1) y ausencia (0) de bandas homólogas de ADN. Fragmentos con la misma masa molecular fueron considerados amplicones análogos representando al mismo locus. Los resultados de la matriz binaria de datos fueron analizados utilizando el software Info-Gen

(Balzarini y Di Rienzo, 2013). Se realizó un análisis de coordenadas principales y se determinó la estabilidad genética entre las poblaciones por el coeficiente de disimilitud de Jacard's (1-S).

4.6. Diseño experimental

El tamaño de n para cada experimento se detalla en los resultados correspondientes representados por tablas y/o figuras. En todos los casos, se realizaron replicas independientes. Las variables fueron evaluadas con diseños factoriales a través de análisis de variancia (ANOVA) sobre los datos de las variables de cada fase y las medias fueron comparadas entre sí por prueba de comparaciones múltiples ($P \leq 0.05$) utilizándose el software Infostat® (Di Rienzo et al., 2011) y GraphPad Prism 9.3 (Prism, 2014).

RESULTADOS



5. RESULTADOS

5.1. Propagación vegetativa *in vitro* vía organogénesis

5.1.1. Fase de inducción

5.1.1.1. Experimento 1: Desarrollo de un medio de inducción

Con el propósito de inducir la formación de yemas adventicias, los embriones cigóticos maduros fueron aislados y cultivados en ½ MS suplementado con sacarosa 0.09 M, BA y TDZ. Transcurridos 45 días de incubación en las condiciones descritas en materiales y métodos pudo observarse la formación *de novo* de yemas en todos los tratamientos testeados (Tabla 1). Si bien, la adición al medio de cultivo con BA 0.5 µM posibilitó que el 23.3±12% de los explantes brindaran yemas adventicias, la mayoría de los embriones cigóticos no respondieron al tratamiento hormonal, continuando su desarrollo ontogénico hasta brindar plántulas. Dosis mayores de BA estimularon el proceso morfogénico; siendo máxima la tasa de regeneración cuando se suplementó al medio de cultivo con BA 2 µM, permitiendo que el 76.7±12% de los explantes brindaran 9.2±1.1 yemas adventicias. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron cuando se adicionó al medio basal con BA 0.5 µM y TDZ 0.5 µM. En este contexto, el 86.7±8.8% de los explantes brindaron 15.5±2.8 yemas adventicias, diferenciándose a partir de los cotiledones y de la zona distal del hipocótilo próxima a los cotiledones.

Tabla 1 | Efecto de la adición de BA y TDZ al medio de cultivo (½ MS con sacarosa 0.09 M) sobre la formación y proliferación de yemas adventicias a partir del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos maduros de PEE × PCH.

BA (µM)	TDZ (µM)	Explantes ennegrecidos (%)	Explantes sin respuesta ¹ (%)	Explantes con yemas adventicias (%)	N.º Yemas adventicias por explante
0.5	-	0 ± 0 ^a	76.7 ± 12 ^b	23.3 ± 12 ^b	6.5 ± 3.7 ^b
2	-	0 ± 0 ^a	20 ± 10 ^a	76.67 ± 12 ^a	9.2 ± 0.1 ^{ab}
5	-	3.3 ± 3.3 ^a	30 ± 5.8 ^a	66.7 ± 8.8 ^{ab}	9.7 ± 1.1 ^{ab}
15	-	16.7 ± 8.8 ^a	20 ± 5.8 ^a	63.3 ± 3.3 ^{ab}	10.4 ± 0.3 ^{ab}
20	-	16.7 ± 6.7 ^a	30 ± 10 ^a	53.3 ± 3.3 ^{ab}	7.7 ± 0.9 ^{ab}
0.5	0.5	3.3 ± 3.3 ^a	6.7 ± 3.3 ^a	86.7 ± 8.8 ^a	15.5 ± 2.8 ^a
2	0.5	16.7 ± 6.7 ^a	30 ± 10 ^a	53.3 ± 8.8 ^{ab}	14.9 ± 1.9 ^{ab}
5	0.5	20 ± 0 ^a	26.7 ± 3.3 ^a	53.3 ± 3.3 ^{ab}	11.1 ± 1.3 ^{ab}
15	0.5	6.7 ± 3.3 ^a	20 ± 15.3 ^a	63.3 ± 16.7 ^{ab}	9.4 ± 1.5 ^{ab}
20	0.5	10 ± 10 ^a	26.7 ± 8.8 ^a	60 ± 11.5 ^{ab}	7.3 ± 0.6 ^{ab}

¹ se considera explante sin respuesta a aquel que permanece vivo y continúa su desarrollo hasta brindar una plántula. Los valores expresan el promedio de 3 repeticiones ± el error estándar de la media (SEM) (n= 10). Letras iguales no representan diferencias significativas entre los tratamientos según el test de Comparaciones Múltiples de Tukey (P≤0.05).

5. 2.1.2. Experimento 2: Determinación del período óptimo de la fase de inducción

Una vez establecida la relación hormonal adecuada para el proceso morfogénico en cuestión, se desarrolló un experimento a fin de establecer el tiempo óptimo de duración de la fase de inducción (Figs. 1 A-D). Al momento de la evaluación, se observó un aumento significativo de la mortalidad por oxidación como consecuencia de la extensión del período de inducción (Fig. 1 A). En este sentido, transcurridos 60 días, el $36\pm 8.1\%$ de los explantes presentó síntomas de necrosis tisular diferenciándose estadísticamente de los restantes tratamientos. El porcentaje de explantes sin respuesta disminuyó desde $28\pm 9.7\%$ a $6\pm 2.5\%$ cuando éstos fueron incubados durante 30 y 45 días, respectivamente, siendo nulo cumplidos 60 días de cultivo (Fig. 1 B). El mayor porcentaje de embriones que brindaron brotes se observó cuando éstos fueron expuestos a un medio de cultivo enriquecido con citoquininas durante 45 días (Fig. 1 C). Sin embargo, el máximo número de yemas adventicias formadas se obtuvo transcurridos 60 días de incubación (Fig. 1 D). Del análisis de ambos parámetros determinantes de la capacidad morfogénica se deduce que, el tratamiento de inducción de 45 días resultó el más promisorio posibilitando que el $78\pm 4.9\%$ de los embriones cigóticos brindaran 10.9 ± 1.8 yemas adventicias. En todos los casos se observó un patrón morfogénico directo, sin proliferación de tejidos indiferenciados (callos).

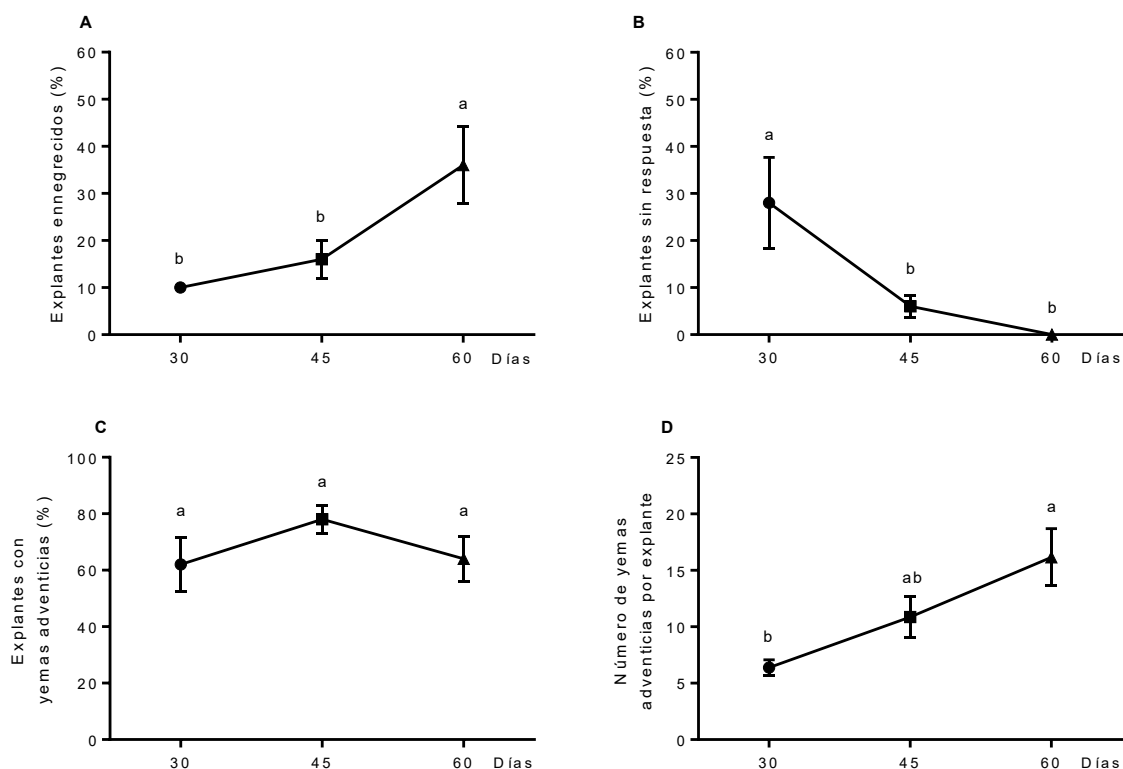


Figura 1 | Efectos de la duración de la fase de inducción sobre el ennegrecimiento tisular de los explantes y la capacidad morfogénica de embriones cigóticos cultivados en $\frac{1}{2}$ MS adicionado con BA $0.5 \mu\text{M}$ y TDZ $0.5 \mu\text{M}$.

Los valores expresan el promedio de 5 repeticiones (n=10). En todos los casos, las barras indican el error estándar de la media (SEM). Tratamiento con letras distintas indican diferencias significativas según el Test de Comparaciones Múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$).

5.2.1.3. Experimento 3: Efecto de la oscuridad sobre la sobrevivencia y capacidad morfológica de los embriones aislados.

Ajustado el periodo óptimo de inducción, se condujo un nuevo experimento a fin de evaluar el efecto de la exposición previa de los explantes a condiciones de oscuridad sobre la sobrevivencia y capacidad morfológica (Figs. 2 A-D). Transcurridos 45 días de incubación se observó una mayor tasa de oxidación en los embriones que recibieron un pretratamiento de oscuridad (Fig. 2 A). El porcentaje de explantes sin respuesta aumentó conforme lo hizo el tiempo de exposición a la oscuridad, alcanzando el máximo ($34 \pm 6.8\%$) cuando éstos permanecieron tres días en estas condiciones (Fig. 2 B). Si bien, se observó diferenciación de yemas adventicias en todos los tratamientos, el proceso morfológico fue promovido en presencia de luz (Fig. 2 C). El número promedio de yemas adventicias formadas por explante fue mayor (17.2 ± 1.3) cuando éstos recibieron un día de oscuridad (Fig. 2 D). Sin embargo, al analizar los parámetros en su conjunto, el tratamiento control (sin pretratamiento de oscuridad) resultó el más promisorio, posibilitando que el $84 \pm 5.1\%$ de los embriones cigóticos brindaran 14 ± 5.1 yemas adventicias.

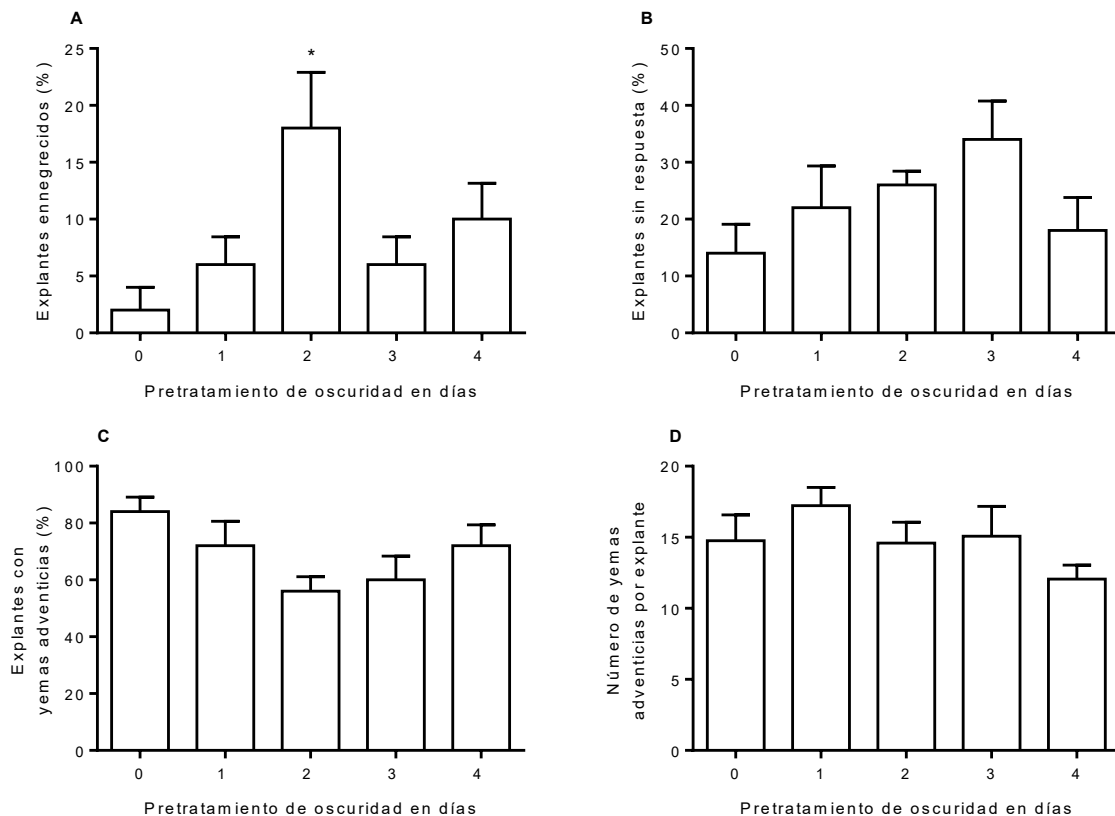


Figura 2 | Efecto del pretratamiento de oscuridad sobre la formación de yemas adventicias de PEE × PCH a partir del cultivo de embriones cigóticos maduros.

Los valores expresan el promedio de 5 repeticiones \pm el error estándar de la media (n= 10). En el tratamiento “cero” los explantes no recibieron un periodo de incubación en oscuridad estando sujetos al fotoperiodo establecido en materiales y métodos. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento control (Tukey, $P \leq 0.05$).

5.2.1.4. Experimento 3: Pretratamiento de las semillas a bajas temperaturas

Previo a la extracción de los embriones, las semillas desinfectadas fueron expuestas a $4\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 1 a 6 días, incluyéndose un tratamiento control, sin frío. Cumplido el tiempo asignado, los embriones fueron extraídos y cultivados en el medio de inducción compuesto por $\frac{1}{2}$ MS con 0.09 M sacarosa y adicionado con BA $0.5\ \mu\text{M}$ y TDZ $0.5\ \mu\text{M}$. Los cultivos fueron incubados durante 45 días en las condiciones de luz y temperatura descritas en materiales y métodos. Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante el análisis de componentes principales (Fig. 3). En este contexto, la componente principal 1 (CP1) explica el 68.6% de la variabilidad de los datos; mientras que, la componente principal 2 (CP2) revela el 21.9%, permitiendo una clara separación de los tratamientos. La estratificación de las semillas durante tres días evidenció la máxima correlación positiva en CP1, vinculándose ésta con la tasa de regeneración y el número de yemas adventicias neoformadas por explante. Contrariamente, el tratamiento control, sin exposición al frío, presentó la máxima correlación negativa, relacionándose fuertemente con el porcentaje de explantes sin respuesta.

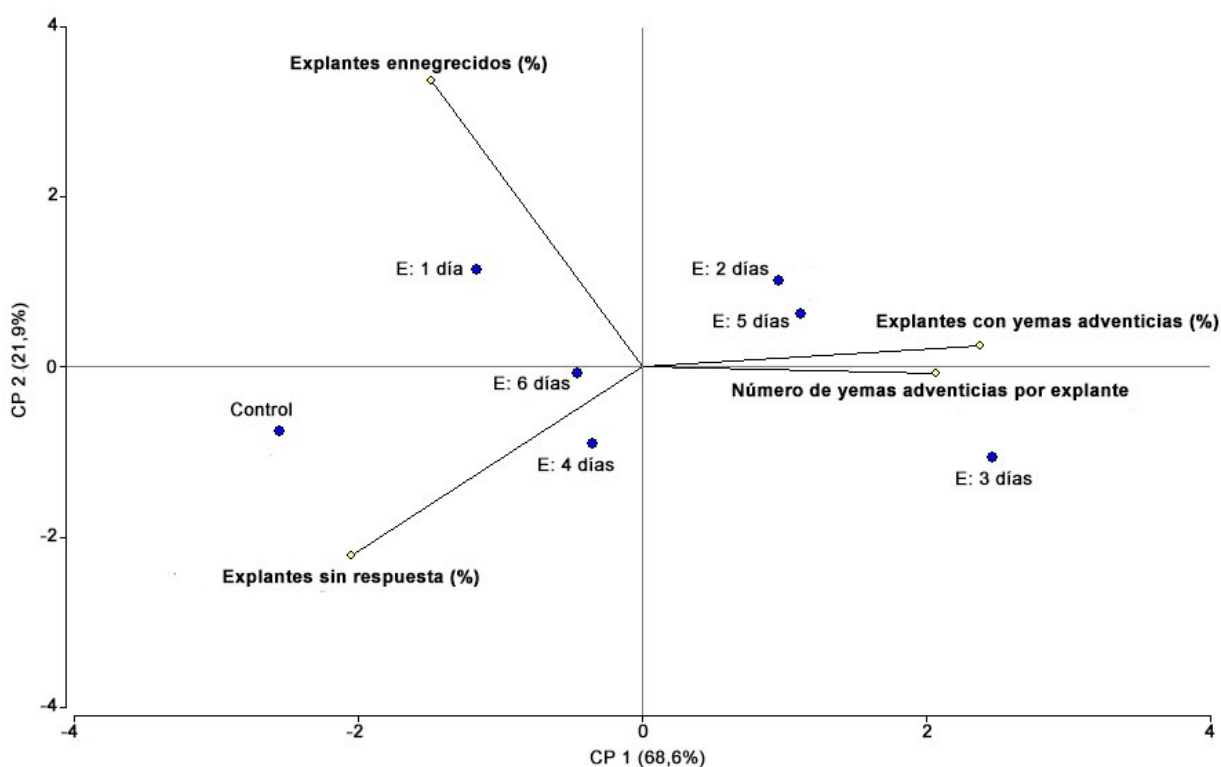


Figura 3 | Análisis de componentes principales de respuestas morfológicas de semillas expuestas a un pretratamiento con bajas temperaturas.

CP1: Componente principal N°1; **CP2:** Componente principal N°2. **E:** estratificación a $4\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. **Control:** semillas sin estratificación.

Si bien, no se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos, la exposición de las semillas a bajas temperaturas favoreció el proceso morfológico, especialmente cuando éstas permanecieron a $4\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 3 días (Tabla 2). En este contexto, el $86.7\pm 8.8\%$ de los explantes produjeron 14.9 ± 2.6 yemas adventicias y no se observaron explantes necróticos. Por otro lado, la tasa de regeneración se redujo a $66.7\pm 6.7\%$ cuando las semillas no recibieron un

pretratamiento de frío, disminuyendo además el número de yemas adventicias (9.2 ± 0.8) neoformadas por explante.

Tabla 2 | Efecto del pretratamiento de las semillas de PEE × PCH a bajas temperaturas sobre la diferenciación y proliferación de yemas adventicias a partir del cultivo de embriones cigóticos maduros.

Pretratamiento $4 \pm 0.5^\circ\text{C}$	Explantes ennegrecidos (%)	Explantes Sin respuesta (%)	Explantes con yemas adventicias (%)	Yemas adventicias por explante
Control	6.7 ± 3.3	26.7 ± 8.8	66.7 ± 6.7	9.2 ± 0.8
1 día	10 ± 5.8	16.7 ± 8.8	73.3 ± 14.5	10.5 ± 1.2
2 días	6.7 ± 3.3	10 ± 10	83.3 ± 6.7	11.6 ± 2.5
3 días	0 ± 0	13.3 ± 8.8	86.7 ± 8.8	14.9 ± 2.6
4 días	3.3 ± 3.3	20 ± 5.8	76.7 ± 8.8	10.7 ± 1.7
5 días	6.7 ± 3.3	13.3 ± 3.3	80 ± 0	14.9 ± 2.6
6 días	6.7 ± 6.7	20 ± 5.8	73.3 ± 3.3	13.2 ± 0.9

Los valores expresan el promedio de 3 repeticiones \pm el desvío estándar de la media ($n=10$). No existen diferencias significativas respecto al tratamiento control (sin exposición al frío).

5.1.2. Fase de elongación

5.1.2.1. *Experimento 1: Determinación de la concentración de sales del medio de cultivo*

Con el propósito de promover el desarrollo de las yemas adventicias que permita contar con un tamaño óptimo del brote en la subsiguiente fase de enraizamiento, los explantes organogénicos fueron transferidos a biorreactores de inmersión temporal, conteniendo diferentes concentraciones de la formulación basal del MS. Transcurridos 30 días de incubación en condiciones de luz, se observó que el empleo de MS en su concentración original resultó severamente tóxico, desencadenando la muerte del $97 \pm 3\%$ de los explantes. Sin embargo, la dilución de la formulación nutritiva vislumbró un efecto promotor de la brotación reduciendo la necrosis tisular a menos del 20% (Fig. 4 A). En estas condiciones, tanto el crecimiento de los tallos como la calidad de los brotes resultantes dependieron de la concentración del medio basal. Si bien, el uso de $\frac{1}{4}$ MS incidió favorablemente en el porcentaje de explantes con brotes mayores a 5 mm de longitud ($63 \pm 12\%$), el $70 \pm 10\%$ de los explantes regenerados que crecieron en $\frac{1}{2}$ MS produjeron 4.3 ± 1.2 brotes con más de 5 mm de longitud y aspecto saludable, caracterizados por un color verde intenso (Figs. 4 B-D).

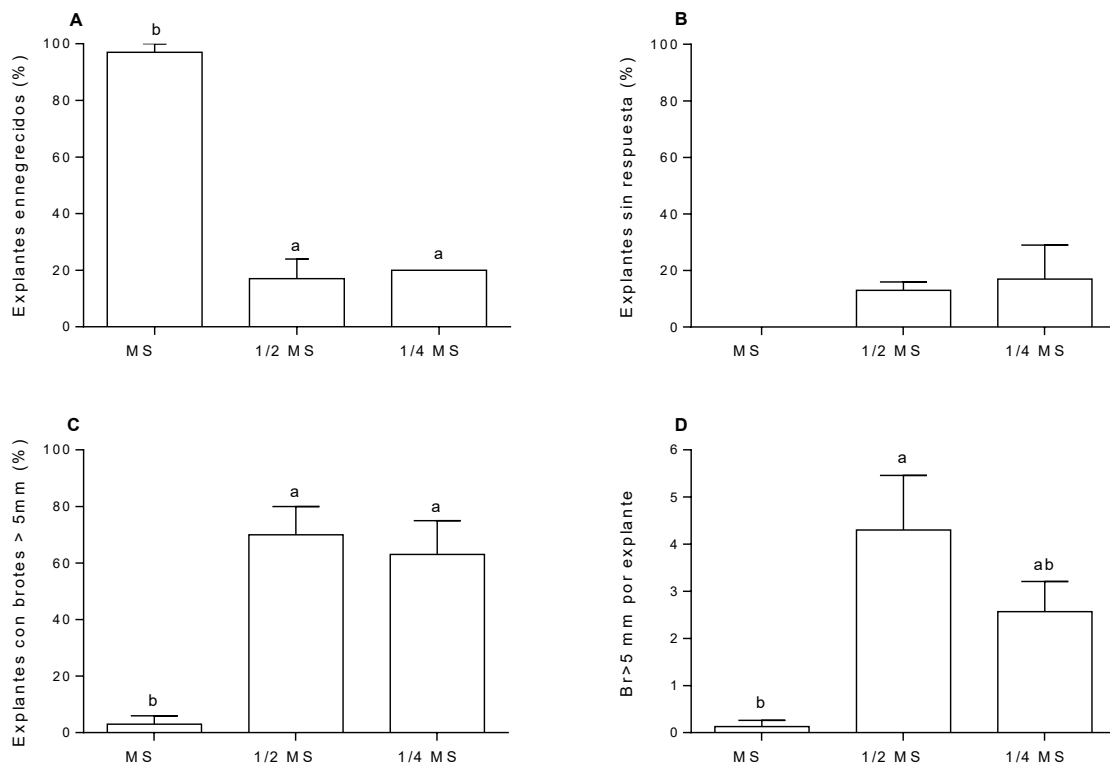


Figura 4 |Efecto de la concentración del medio nutritivo sobre el crecimiento de yemas adventicias de PEE x PCH.

Los valores expresan el promedio de 5 repeticiones \pm SEM ($n=10$). Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos según el test de Tukey ($P \leq 0.05$). Variables sin letras no se diferencian estadísticamente para el mismo test. **MS**: medio basal MS en su concentración original; $\frac{1}{2}$ **MS**: medio basal MS diluido dos veces; $\frac{1}{4}$ **MS**: medio basal MS diluido 4 veces; **Br>5mm por explante**: Brotes con más de 5 mm de longitud diferenciados por explante.

5.1.2.2. Experimento 2. Control de la proliferación bacteriana

Dada la incidencia de bacterias endófitas, en el presente experimento se evaluó la adición al medio de elongación ($\frac{1}{2}$ MS + sacarosa 0.045 y 0.09 M) con o sin el agregado de 100 μ L Delcide™ TG (biocida comercial) y de 1000 μ L MES. Los resultados obtenidos demuestran que el biocida comercial controló eficazmente la proliferación bacteriana. En este sentido, los explantes regenerantes no prosperaron cuando fueron cultivados en el medio nutritivo adicionado únicamente con la solución buffer. Si bien la suplementación con Delcide™ TG garantizó la sobrevivencia de los explantes, la combinación del biocida con la solución buffer optimizó la respuesta permitiendo que el $20 \pm 8\%$ de los explantes brindaran 1.2 ± 0.4 brotes con más de 5 mm de longitud caulinar (Tabla 3 A). Por otra parte, la reducción del contenido de sacarosa del medio nutritivo incrementó significativamente la necrosis de más del $90 \pm 6\%$ de los explantes, afectando la sobrevivencia y desarrollo de las yemas neoformadas. Consecuentemente, el alargamiento caulinar fue promovido por la adición de 0.09 M de sacarosa al medio de cultivo. En este contexto, el $28 \pm 8\%$ de los explantes presentó brotes mayores a 5 mm (Tabla 3 B).

Tabla 3 | Estimulación del crecimiento vegetativo en biorreactores de inmersión temporal. Efecto del contenido de sacarosa del medio nutritivo.

	Tratamiento	Explantos ennegrecidos (%)	Explantos Sin respuesta (%)	Explantos con brotes > 5mm (%)	Número de brotes > 5mm longitud
A	Buffer	0	0	0	0
	Biocida	78 ± 9	7 ± 2	15 ± 8	0.7 ± 0.2
	Biocida+Buffer	73 ± 10	7 ± 5	20 ± 8	1.22 ± 0.4
B	0.09 M Sacarosa	92 ± 4 ^b	2 ± 2 ^a	7 ± 3 ^b	0.7 ± 0.3 ^a
	0.045 M Sacarosa	60 ± 8 ^a	12 ± 4 ^b	28 ± 8 ^a	1.3 ± 0.3 ^a

Los valores expresan el promedio de 3 repeticiones ± SEM (n=20). Letras iguales no representan diferencias significativas para el Test de Comparaciones Múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$). Los resultados presentados en la sección A y B de la tabla fueron analizados en forma independiente. No existen diferencias significativas en A para los tratamientos que prosperaron (no contaminados).

5.1.2.3. Experimento 3: Efecto de la relación de iones amonio/nitrato del medio nutritivo sobre la sobrevivencia y crecimiento de los brotes en la fase de elongación.

Manteniéndose constante la concentración total de nitrógeno (30 mM) del medio MS diluido dos veces se modificó la proporción de los iones amonio y nitrato ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$) empleando medios semisólidos y líquidos. Transcurridos 45 días de incubación se observó que la proporción de los iones amonio y nitrato del medio nutritivo influyó significativamente sobre la tasa de ennegrecimiento de los explantes. La suplementación al medio de cultivo con nitrato como única fuente inorgánica de nitrógeno (0:30) incrementó la tasa de necrosis en medios semisólidos y líquidos. En contraposición, el agregado de amonio como única fuente nitrogenada (30:0), si bien, redujo el desencadenamiento de los procesos oxidativos en explantes que crecieron en medios semisólidos con aireación asistida, no favoreció el crecimiento de los brotes. La suplementación al medio basal con ambas formas de nitrógeno inorgánico estimuló la elongación caulinar de los brotes adventicios. En este contexto, el 24±8% de los explantes regenerados que crecieron en medios semisólidos con una proporción molar 10:20 (amonio: nitrato) brindaron 2.4±0.8 brotes con más de 5 mm de longitud caulinar (Tabla 4).

Tabla 4 | Efecto de la proporción de iones $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ de la solución nutritiva, sobre el crecimiento de las yemas adventicias de PEE × PCH.

Proporción de iones amonio:nitrato	Explantos ennegrecidos (%)	Explantos Sin respuesta (%)	Explantos con brotes > 5mm (%)	Número de brotes
0/30 L	86 ± 6 ^b	10 ± 4 ^a	4 ± 2 ^a	0.4 ± 0.2 ^a
0/30 S	66 ± 18 ^{ab}	6 ± 4 ^a	8 ± 4 ^a	0.8 ± 0.5 ^a
5/25 L	58 ± 16 ^{ab}	12 ± 5 ^a	10 ± 5 ^a	1 ± 0.4 ^a
5/25 S	46 ± 19 ^{ab}	6 ± 4 ^a	8 ± 4 ^a	0.8 ± 0.4 ^a
10/20 L	56 ± 15 ^{ab}	24 ± 8 ^a	0 ^a	0 ^a
10/20 S	44 ± 13 ^{ab}	12 ± 4 ^a	24 ± 8 ^a	2.4 ± 0.8 ^a
15/15 L	76 ± 7 ^{ab}	12 ± 4 ^a	12 ± 5 ^a	1.2 ± 0.5 ^a
15/15 S	26 ± 13 ^a	22 ± 12 ^a	12 ± 6 ^a	1.2 ± 0.6 ^a
20/10 L	76 ± 5 ^{ab}	14 ± 4 ^a	10 ± 6 ^a	1 ± 0.6 ^a
20/10 S	20 ± 9 ^a	32 ± 15 ^a	8 ± 6 ^a	0.8 ± 0.6 ^a
25/5 L	64 ± 7 ^{ab}	28 ± 5 ^a	8 ± 4 ^a	0.8 ± 0.4 ^a

25/5 S	18 ± 8 ^a	34 ± 15 ^a	8 ± 5 ^a	0.8 ± 0.5 ^a
30/0 L	64 ± 7 ^{ab}	22 ± 5 ^a	12 ± 10 ^a	0.8 ± 0.6 ^a
30/0 S	40 ± 11 ^{ab}	32 ± 9 ^a	8 ± 4 ^a	0.8 ± 0.4 ^a

Los valores expresan el promedio de 5 repeticiones ± SEM (n=20). Letras iguales no representan diferencias significativas para el Test de Comparaciones Múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$).

5.1.2.4 Experimento 4: Determinación del sistema de cultivo

Mediante el empleo de frascos de vidrio de 200 mL capacidad se evaluó el uso de medios semisólidos provistos con aireación asistida y medios líquidos basados en el principio de inmersión temporal automática. Se ensayó el uso de agar y Phytigel® como agentes gelificantes. La Figura 5, basada en el análisis de componentes principales, evidenció diferencias en la respuesta de los explantes según el sistema de cultivo ensayado. La CP1 explicó el 83% de la variación total de los datos y permitió separar claramente los sistemas de cultivo. En comparación, la CP2 explicó 16.5% de la variabilidad separando los tratamientos según el agente gelificante empleado. Independientemente de la proporción de iones $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$, los explantes que crecieron en medios líquidos con inmersión temporal presentaron la máxima correlación positiva en la CP1, vinculándose fuertemente con la tasa de ennegrecimiento tisular. Por el contrario, los sistemas con medio semisólido y aireación asistida favorecieron la sobrevivencia del material vegetal. Además, el empleo de Phytigel® como agente gelificante, estimuló el crecimiento de las yemas vegetativas, incrementando en consecuencia, el número de brotes con más de 5 mm de longitud.

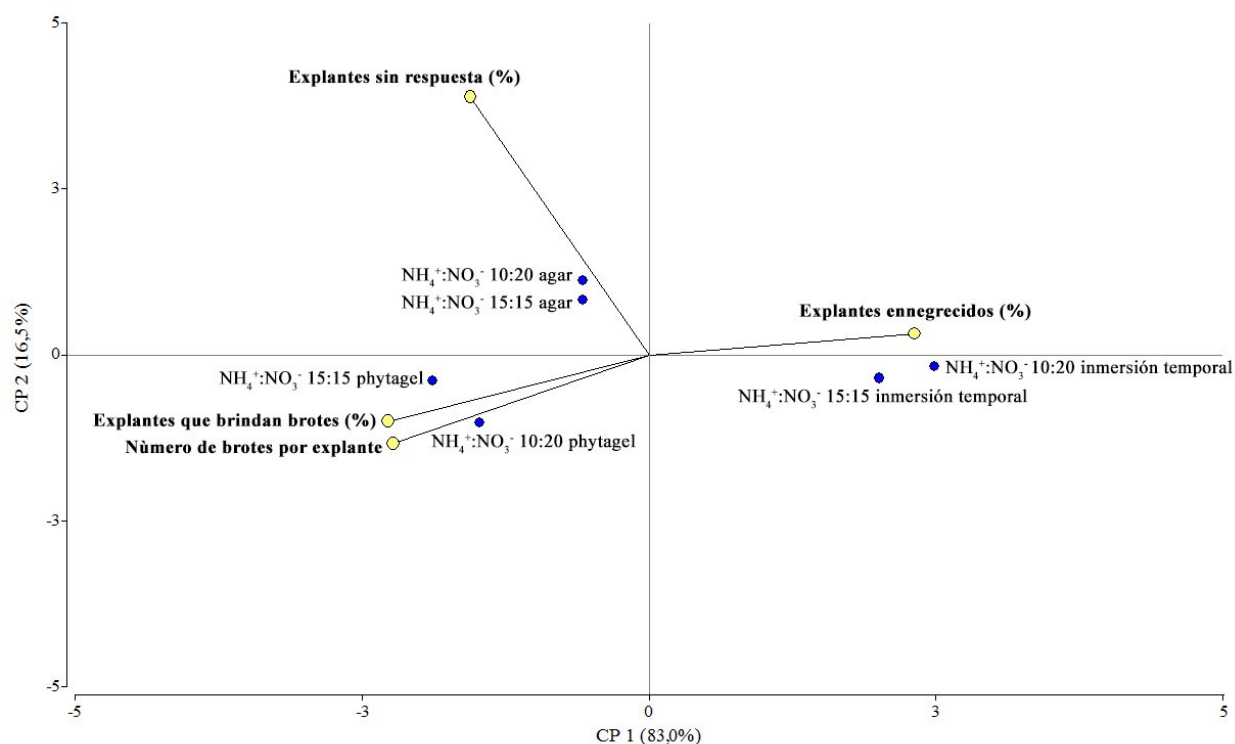


Figura 5 | Análisis de componentes principales. Efecto del sistema del cultivo y la proporción de iones amonio: nitrato en la elongación de las yemas diferenciadas en la etapa de inducción.

CP1: Componente principal N°1; **CP2:** Componente principal N°2.

Transcurridos 60 días de cultivo fue posible observar que el empleo de biorreactores de inmersión temporal afectó negativamente el crecimiento y desarrollo de los brotes adventicios desencadenando vitrificación y ennegrecimiento tisular (Fig. 6 A). En consecuencia, entre el 85±5% y el 91±3% de los explantes no sobrevivieron en la fase de elongación. En tales condiciones, sólo el 16±4% de los explantes regenerantes brindaron brotes con más de 5 mm de longitud (Tabla 5). Por su parte, el empleo de agar como agente gelificante redujo considerablemente la necrosis del tejido; sin embargo, no estimuló la brotación de las yemas adventicias (Fig. 6 B). Finalmente, el uso de Phytigel® no solo disminuyó significativamente la tasa de ennegrecimiento (38±13%) sino que, además, promovió el alargamiento caulinar de los brotes resultantes, donde el 60±14% de los explantes regenerantes brindaron 11.5±1 brotes con más de 5 mm de longitud, sin signos de vitrificación (Fig. 6 C).

Tabla 5 | Efecto de la modificación de ½ MS con distintas proporciones de amonio:nitrato sobre la sobrevivencia y desarrollo de yemas adventicias que crecieron en distintos sistemas de cultivo.

Proporción de iones amonio:nitrato	Sistema de cultivo	Explantes ennegrecidos (%)	Explantes Sin respuesta (%)	Explantes con brotes > 5mm (%)	Número de brotes > 5mm longitud
10:20	Líquido (IT)	91 ± 3 ^b	0 ± 0 ^a	9 ± 3 ^b	1.6 ± 0.4 ^b
15:15	Líquido (IT)	85 ± 5 ^b	0 ± 0 ^a	16 ± 4 ^b	2.9 ± 0.8 ^b
10:20	Semisólido (agar)	52 ± 15 ^{ab}	8 ± 4 ^a	40 ± 10 ^{ab}	6.2 ± 1.9 ^{ab}
15:15	Semisólido (agar)	54 ± 14 ^{ab}	8 ± 8 ^a	39 ± 14 ^{ab}	7.4 ± 2.1 ^{ab}
10:20	Semisólido (Phyt.)	38 ± 13 ^a	3 ± 3 ^a	60 ± 14 ^a	11.5 ± 1.0 ^a
15:15	Semisólido (Phyt.)	30 ± 3 ^a	5 ± 3 ^a	65 ± 3 ^a	10.5 ± 1.0 ^a

Los valores expresan el promedio de 3 repeticiones ± el desvío estándar de la media (n=20). Letras iguales no representan diferencias significativas para el Test de Comparaciones Múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$). IT: inmersión temporal. Phyt.: Phytigel.

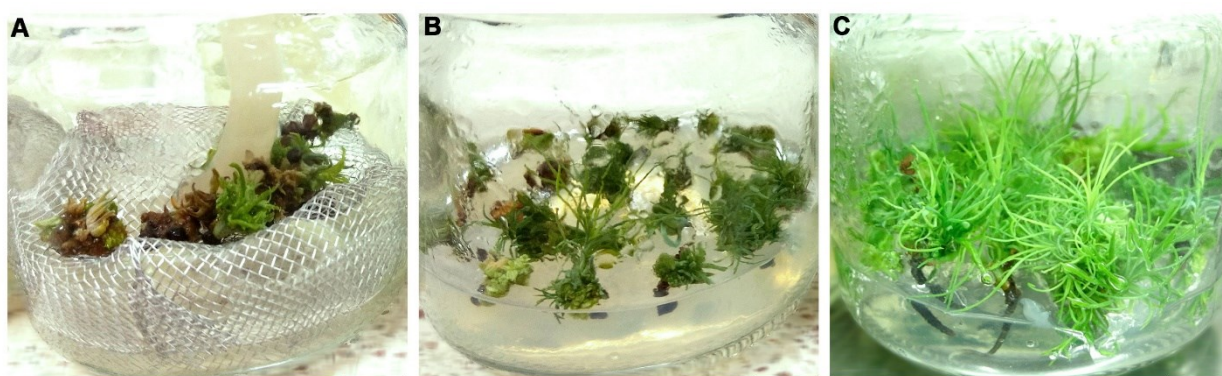


Figura 6 | Crecimiento de yemas vegetativas en diferentes sistemas de cultivo.

A, Medio líquido (inmersión temporal); **B**, Medio semisólido (agar) con aireación asistida; **C**, Medio semisólido (Phytigel®) con aireación asistida. Las barras indican 1 cm.

5.1.2.5. Experimento 5: Duración de las fases de inducción y elongación

Una vez establecida la solución nutritiva y el sistema de cultivo que maximice la producción de brotes con más de 5 mm de longitud durante la fase de elongación y partiendo de la premisa de que periodos prolongados de exposición a altas concentraciones de citoquininas afectan el ulterior desarrollo de las yemas neoformadas, se ajustó la duración del período de inducción. A

tal fin, los embriones cigóticos maduros se incubaron en el medio de regeneración antes descrito durante 10, 20, 30 o 45 días antes de ser transferidos a ½ MS sin hormonas, semisólido (Phytigel®) y provisto con aireación asistida. Bajo exposición prolongada a citoquininas (45 días), el 74±6% de los explantes regenerantes necrosaron y murieron. Por el contrario, la inducción a corto plazo (10 y 20 días) redujo el ennegrecimiento y promovió la brotación de yemas en más del 50% de los explantes; sin embargo, no estimuló significativamente la elongación de los brotes resultantes (6.7±0.4). Los mejores resultados se observaron cuando se empleó un periodo de inducción de 30 días en donde el 65±6% de los explantes regenerantes produjeron 11.7±1.1 brotes con más de 5 mm de longitud, sanos y vigorosos (Tabla 6).

Tabla 6 | Efecto de la duración de la fase de inducción en ½ MS suplementado con 0.5 µM BA y 0.5 µM TDZ sobre la sobrevivencia y desarrollo de yemas adventicias.




Periodo de inducción	Exp. ennegrecidos (%)	Exp. sin respuesta (%)	Exp. Con brotes > 5mm (%)	Nº Brotes > 5mm long.
10 días	19 ± 7 ^a	27 ± 7 ^a	54 ± 10 ^a	4.5 ± 0.4 ^b
20 días	32 ± 5 ^a	17 ± 5 ^a	51 ± 7 ^{ab}	6.7 ± 0.4 ^{ab}
30 días	26 ± 3 ^a	9 ± 6 ^a	65 ± 6 ^a	11.7 ± 1.0 ^a
45 días	74 ± 6 ^b	9 ± 3 ^a	17 ± 7 ^b	13.2 ± 3.7 ^a

Los valores expresan el promedio de 5 repeticiones ± el desvío estándar de la media (n=20). Letras iguales no representan diferencias significativas para el test de Tukey (P≤0.05).

5.1.2.6. Experimento 6: Determinación del número de explantes regenerantes cultivados por recipiente

Considerando las determinaciones previas, en el siguiente experimento se buscó promover el crecimiento de las yemas adventicias, mediante la exposición de los explantes a diferentes densidades de cultivo. Al momento de la evaluación, se observó que la situación de competencia generó una respuesta diferenciada entre los tratamientos probados (Tabla 7). Si bien, al cultivar 10 explantes por recipiente se evidenció el crecimiento de yemas adventicias en algunos de los embriones cultivados, la mayoría de ellos no respondieron favorablemente. Asimismo, pudo constatar que, en estas condiciones, el 65±14% de los explantes no sobrevivieron debido a una necrosis prematura. El aumento en la densidad de los explantes (15 embriones/recipiente) estimuló la brotación (25±5%); no obstante, el número de brotes elongados se mantuvo prácticamente constante. En contraposición, cuando se cultivaron 20 explantes regenerantes por recipiente se duplicó la tasa de brotación (50±5%) a la vez que se incrementó de 7.5±1.5 a 11.9±0.9 el número de brotes con más de 5 mm de longitud caulinar.

Tabla 7 | Efecto del número de explantes cultivados por recipiente sobre la sobrevivencia, brotación y desarrollo de yemas adventicias durante la fase de elongación.

Número de explantes cultivados por recipiente	10	15	20
Variables evaluadas			
Explantes ennegrecidos (%)	65 ± 14 ^a	48 ± 10 ^a	25 ± 7 ^a
Explantes sin respuesta (%)	18 ± 9 ^a	27 ± 5 ^a	15 ± 2 ^a
Explantes con brotes > 5mm longitud (%)	18 ± 8 ^b	25 ± 5 ^b	50 ± 5 ^a
Número de brotes > 5mm longitud	7 ± 3.2 ^a	7.5 ± 1.5 ^a	11.9 ± 0.9 ^a

Los valores expresan el promedio de 5 repeticiones ± el desvío estándar de la media. Letras iguales no representan diferencias significativas para el Test de Comparaciones Múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$).

Tomando en consideración la eventual transferencia tecnológica de los resultados obtenidos, se realizó el seguimiento de 26 explantes regenerados cultivados en recipientes con aireación asistida conteniendo ½ MS semisólido (Phytigel®) y adicionado con sacarosa 0.09 M. Transcurridos sesenta días de incubación, se realizó una separación de los brotes de mayor longitud. El explante restante conteniendo yemas aún sin elongar, fue dividido en porciones más pequeñas. Los brotes individualizados por un lado y las porciones de explante remanente por el otro, fueron transferidos a un medio fresco de idéntica composición química. Transcurridos 30 días, se individualizaron y sub-cultivaron los nuevos brotes elongados, descartándose en esta oportunidad las porciones restantes del explante. En este contexto, el subcultivo resultó favorable para el crecimiento de las yemas adventicias (Fig. 7). La primera separación (60 días) estimuló la elongación de yemas codominantes, elevando de 8.7 ± 1.5 a 17.8 ± 1.8 el número de brotes por explante aptos para ser transferidos a la etapa de enraizamiento.

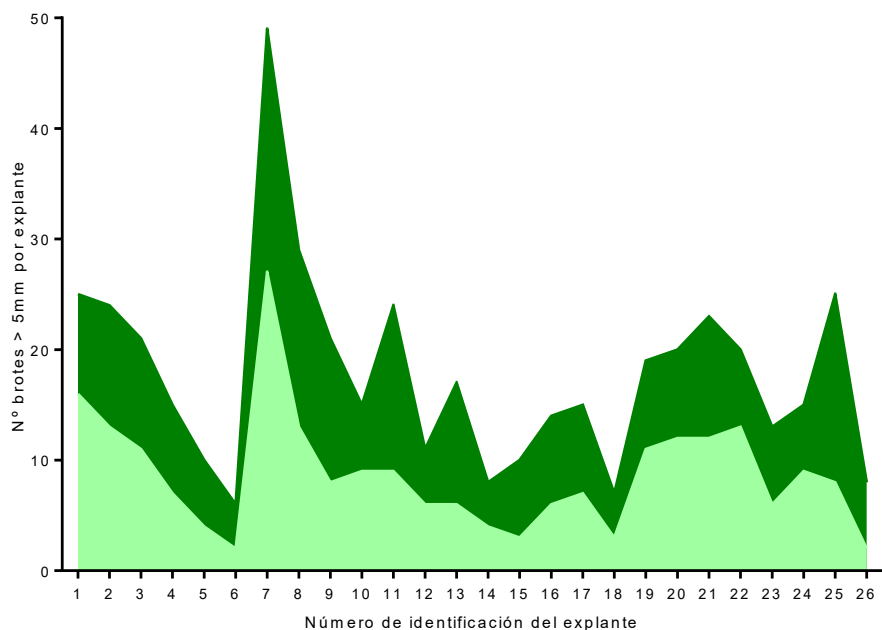


Figura 7 | Efecto del subcultivo en el crecimiento de las yemas adventicias diferenciadas.

■ 1º escisión de brotes con más de 5 mm de longitud y subcultivo de los explantes a medio fresco (60 días). ■ 2º escisión de brotes con más de 5 mm de longitud (90 días).

5.1.3. Fases de enraizamiento y aclimatación

Cuando los brotes alcanzaron 20 mm de longitud fueron transferidos a la fase de enraizamiento. El desarrollo de raíces adventicias se estimuló mediante el pretratamiento de los explantes en una solución acuosa de IBA y su posterior transferencia al medio de expresión consistente en $\frac{1}{4}$ MS con sacarosa 0.045 M, utilizándose como sustratos, gelificación con agar o Phytigel® y vermiculita estéril. Transcurridos 55 días de iniciado el experimento, se observó que el porcentaje de enraizamiento dependió tanto del pretratamiento hormonal como del sustrato empleado durante la etapa de expresión (Fig. 8). Independientemente de la duración del pretratamiento, menos del 20% de los brotes expuestos a 0.5 mM IBA formaron raíces adventicias. Sin embargo, el empleo de concentraciones crecientes de la auxina (1.25 o 2.5 mM) estimuló el enraizamiento de brotes en medios nutritivos semisólidos. En general, en medios gelificados con agar, el porcentaje de enraizamiento, el número de raíces diferenciadas por brote y la longitud promedio de éstas fueron mayores cuando se utilizó un pretratamiento con 2.5 mM IBA, en donde el $66.7 \pm 13.3\%$ de los explantes brindaron 1.7 ± 0.7 raíces alcanzando una longitud promedio de 4.5 ± 0.8 mm (Fig. 9 A). Por su parte, y a pesar de no observarse diferencias significativas en los valores máximos de enraizamiento, el empleo de un pretratamiento con 1.25 mM IBA durante 5 minutos permitió que el $73.3 \pm 3.3\%$ de los brotes brindaran 3 ± 0.6 raíces de 8.2 ± 3.7 mm longitud en medios de expresión gelificados con Phytigel® (Fig. 9 B). Finalmente, el empleo de vermiculita como sustrato durante la etapa de expresión restringió considerablemente los parámetros evaluados, observándose la formación de raíces adventicias en menos del 15% de los brotes (Fig. 9 C). En todos los casos, las raíces se originaron mediante un proceso morfogénico directo, sin formación de callos.

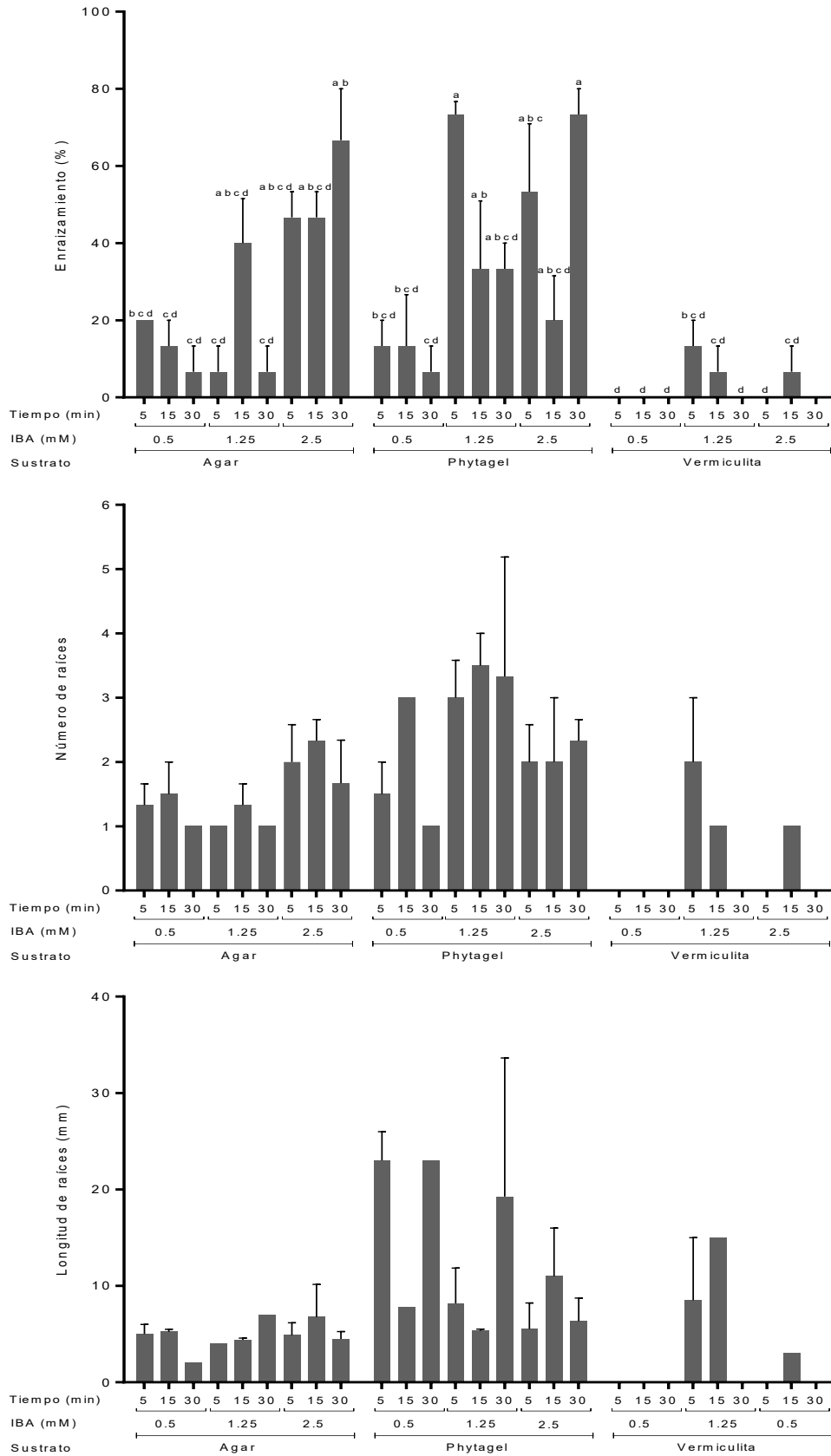


Figura 8 | Efecto de la interacción entre el pretratamiento de inducción con IBA y el uso de diferentes soportes físicos durante la etapa de expresión del enraizamiento adventicio de PEE × PCH. Los valores expresan el promedio de 5 repeticiones ± SEM (n=5). Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el Test de Comparaciones Múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$).



Figura 9 | Diferenciación y crecimiento de raíces adventicias en brotes de PEE × PCH en medios de expresión con agar (A), Phytigel® (B) o vermiculita (C). En todos los casos, la barra indica 5 mm.

A partir de los resultados obtenidos, se eligió el pretratamiento de los brotes con 1.25 mM de IBA durante 5 min y transferencia a $\frac{1}{4}$ MS adicionado con 0.045 M sacarosa y gelificado con Phytigel®, a fin de evaluar la sobrevivencia y crecimiento durante la aclimatación. En este contexto, las observaciones realizadas de las vitroplantas durante la etapa mencionada evidenciaron un notable incremento de la longitud caulinar. Las plántulas iniciaron esta etapa con un promedio de 2.2 ± 0.3 cm de longitud alcanzando 3.4 ± 0.4 cm y 6.4 ± 0.6 cm, transcurridos 30 y 60 días de aclimatación, respectivamente. En cuanto al diámetro determinado a la altura del cuello (DAC), el incremento fue leve durante los primeros 30 días donde pasó de 0.13 ± 0.002 mm a 0.14 ± 0.01 mm y fue más notorio a los 60 días donde ascendió a 0.21 ± 0.02 mm (Tabla 8).

Tabla 8 | Incremento en altura y diámetro de las vitroplantas durante los primeros 60 días de la etapa de aclimatación.

Determinaciones	Altura (cm)	DAC (mm)
Inicio	2.2 ± 0.27^b	0.13 ± 0.0024^b
30 días	3.41 ± 0.36^b	0.14 ± 0.01^b
60 días	6.41 ± 0.56^a	0.21 ± 0.02^a

Los valores expresan el promedio de 5 repeticiones \pm el desvío estándar de la media (n=45). Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas según el Test de Comparaciones Múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$). **DAC**: diámetro altura del cuello.

5.1.4. Análisis morfo-fisiológicos de respuestas a déficit hídrico en plantas obtenidas por germinación de semillas, macropropagación y organogénesis

A fin de evaluar la aptitud de las vitroplantas obtenidas respecto al manejo de agua durante la etapa de implantación, se condujo un experimento comparativo de estrés por sequía entre individuos genéticamente similares e idéntica edad (12 meses). Pese a que se hicieron considerables esfuerzos para contar con material vegetal de tamaño similar, las plantas obtenidas por cultivo de tejidos fueron significativamente más pequeñas que las restantes al inicio del experimento; hecho por el cual, se optó por evaluar parámetros de crecimiento relativo. Las plantas obtenidas a partir de semilla, organogénesis y esquejes enraizados se sometieron a un tratamiento de deshidratación durante 60 días, en el cual el agua disponible del suelo descendió gradualmente a causa de la transpiración. Este enfoque en condiciones ambientales controladas ayudó a evitar las respuestas fisiológicas inducidas por tensiones simultáneas que se producen

en el campo. El CRA de las acículas de las plantas de semilla no varió en respuesta a la escasez de agua en el suelo (Fig. 10 A). Sin embargo, se redujo ligeramente en las propagadas asexualmente cuando el contenido hídrico del suelo disminuyó al 50% (Estrés1, E1) y 60% (Estrés 2, E2) de la capacidad de campo (Figs. 10 B-C). En todos los casos, el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (PSII-Fv/Fm) se mantuvo estable, variando entre 0.76 ± 0.02 y 0.81 ± 0.004 (Figs. 10 D-F). Como resultado, no se observaron variaciones significativas en la altura y en el diámetro del tallo. En efecto y a pesar de la situación desfavorable, todas las plantas continuaron su crecimiento durante el ensayo. La altura se incrementó entre 5.4 ± 1.43 mm y 18 ± 4.55 mm observándose el mínimo en las plantas de semillas (E2) y el máximo para el control proveniente de macropropagación (Figs. 10 G-I). El aumento del DAC fue promovido en las plantas propagadas *in vitro*, las cuales crecieron entre 0.37 ± 0.14 mm y 0.46 ± 0.06 mm durante el experimento; mientras que el máximo incremento en las plántulas de semillas y la macropropagación fue de 0.37 ± 0.12 mm y 0.3 ± 0.11 mm, respectivamente (Figs. 10 J-L). La dinámica del crecimiento de las raíces mostró una ligera diferencia entre el sistema radicular pivotante, propio de las plantas provenientes de semillas y el sistema adventicio, característico del material obtenido por macropropagación y organogénesis. En este sentido, el crecimiento de las raíces fue ligeramente superior en los sistemas adventicios, manifestando una clara señal de respuesta ante la limitante hídrica. Los esquejes enraizados aumentaron la masa radical de 0.42 ± 0.15 gr PS (control) a 0.8 ± 0.21 gr PS (E2). Del mismo modo, las vitroplantas variaron de 0.49 ± 0.09 gr PS a 0.71 ± 0.1 gr PS en respuesta a la disminución del agua disponible del suelo. Si bien, las plántulas respondieron favorablemente transcurridas 48 h de la rehidratación, en condiciones de estrés el crecimiento de raíces fue mínimo variando de 0.43 ± 0.07 gr PS (capacidad de campo) a 0.45 ± 0.1 gr PS cuando el contenido de agua edáfico disminuyó 60% (Figs. 10 M-O). No obstante, las diferencias no fueron significativa y, en consecuencia, la relación peso seco de brote/raíz se mantuvo estable entre los distintos materiales. En efecto, los valores fluctuaron de 1.52 ± 0.08 a 1.87 ± 0.14 ; de 1.50 ± 0.09 a 1.80 ± 0.08 y de 1.47 ± 0.11 a 1.62 ± 0.27 en las plantas de semilla, macropropagación y organogénesis, respectivamente (Figs. 10 P-R).

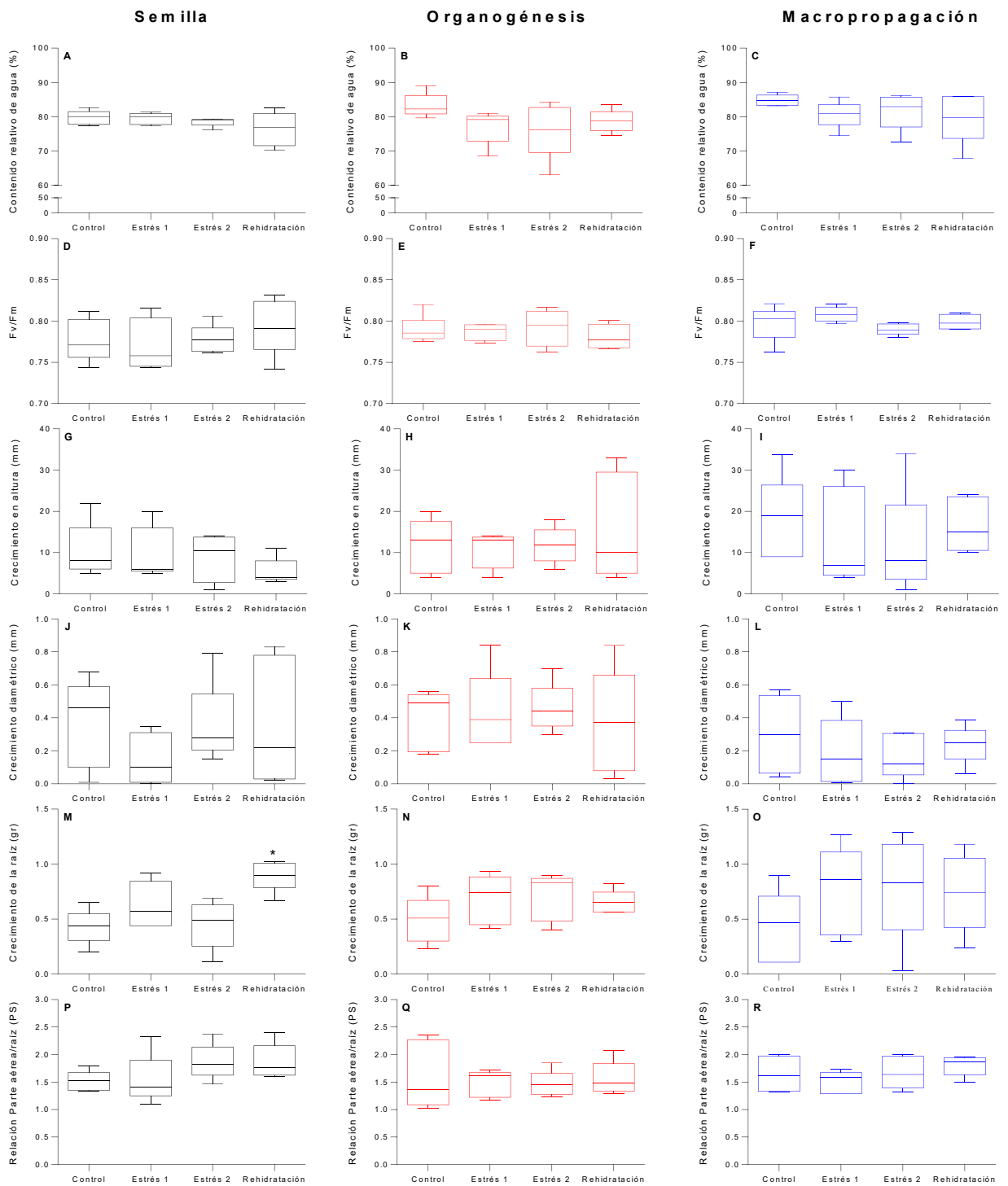


Figura 10 | Ensayo comparativo de respuesta a sequía en plantas de PEE × PCH de 12 meses obtenidas por germinación de semilla, organogénesis y macropropagación.

El diagrama de cajas y bigotes representa los valores mínimo, medio y máximo de cinco réplicas. Asteriscos indican diferencias estadísticas significativas respecto al tratamiento control (Tukey, $P \leq 0.05$).

5.1.5. Análisis del crecimiento e incremento en altura, diámetro y masa radical de plantas obtenidas por germinación de semillas, macropropagación y organogénesis durante la implantación del dosel forestal

Plantas de 16 meses de edad obtenidas por germinación de semillas, macropropagación y organogénesis fueron implantadas en condiciones de campo. El análisis de los resultados obtenidos al finalizar el experimento demostró un comportamiento similar en el establecimiento de la plantación entre las plantas provenientes de los distintos orígenes. Transcurridos 60 días, el $78\pm 9\%$ de las plantas propagadas *in vitro* superó la etapa de implantación, siendo este valor levemente superior al observado para las plantas de semilla ($76.7\pm 2\%$) y macropropagación ($75.7\pm 6.9\%$) (Fig. 11 A). El índice de mortandad fue cercano al 23% durante los primeros 60 días de establecimiento, disminuyendo a menos del 5% a los 120 días siendo nula al cabo de 180 días. La tasa promedio de sobrevivencia fue del $74.22\pm 3.9\%$, incrementándose al $77\pm 3.93\%$ en plantas provenientes de organogénesis. A pesar de que el crecimiento en diámetro y altura de las vitroplantas fue menor, estos valores no fueron significativamente diferentes respecto a los restantes tratamientos (Figs. 11 B-C). Transcurridos 180 días de la plantación, el diámetro a la altura del cuello de las plantas varió entre 10.2 ± 0.4 mm y 14.0 ± 1.7 mm, mientras que la altura promedio osciló entre 36.7 ± 0.8 cm y 47.6 ± 4.5 cm. Si bien, el crecimiento de raíces de las vitroplantas fue significativamente menor (1.01 ± 0 gr) durante la primera etapa del establecimiento, éste se equiparó (4.9 ± 0.8 gr) con el crecimiento radicular de las plantas obtenidas por germinación de semillas (5.3 ± 0.4 gr) y macropropagación (5.43 ± 0.99 gr) transcurridos 180 días de la plantación (Fig. 11 D). Independientemente del sistema de propagación del cual provenían, las plantas mostraron un fenotipo similar (Figs. 12 B-E).

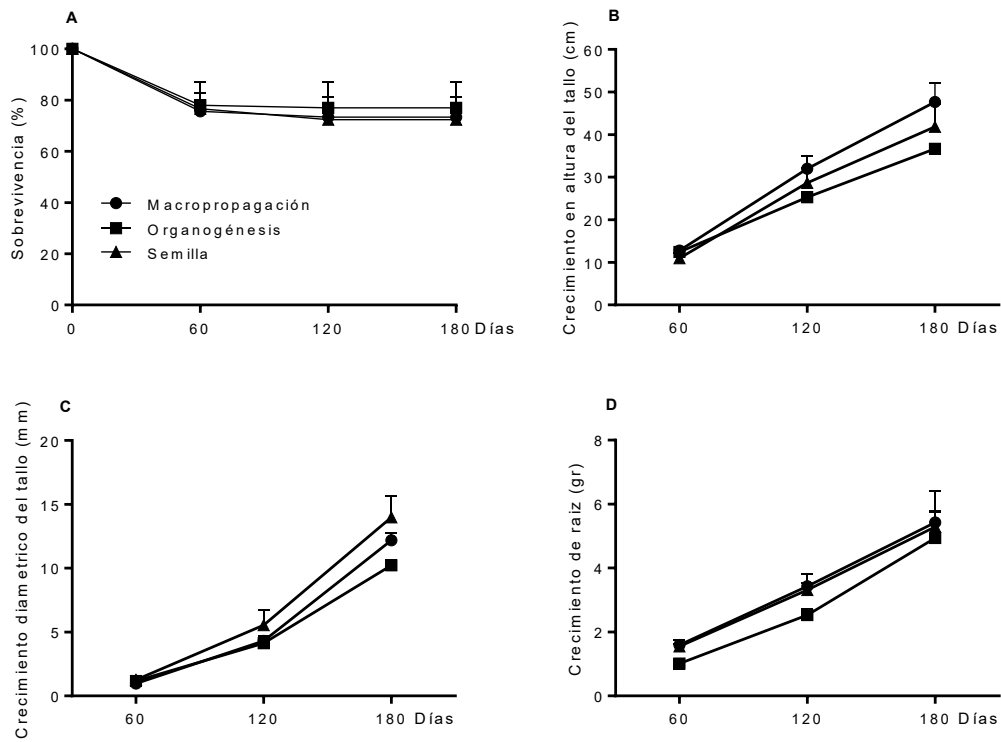


Figura 11 | Establecimiento en campo de las plantas híbridas PEE × PCH obtenidas por germinación de semillas, organogénesis y macropropagación. Los valores expresan el promedio de 3 repeticiones ± SEM.

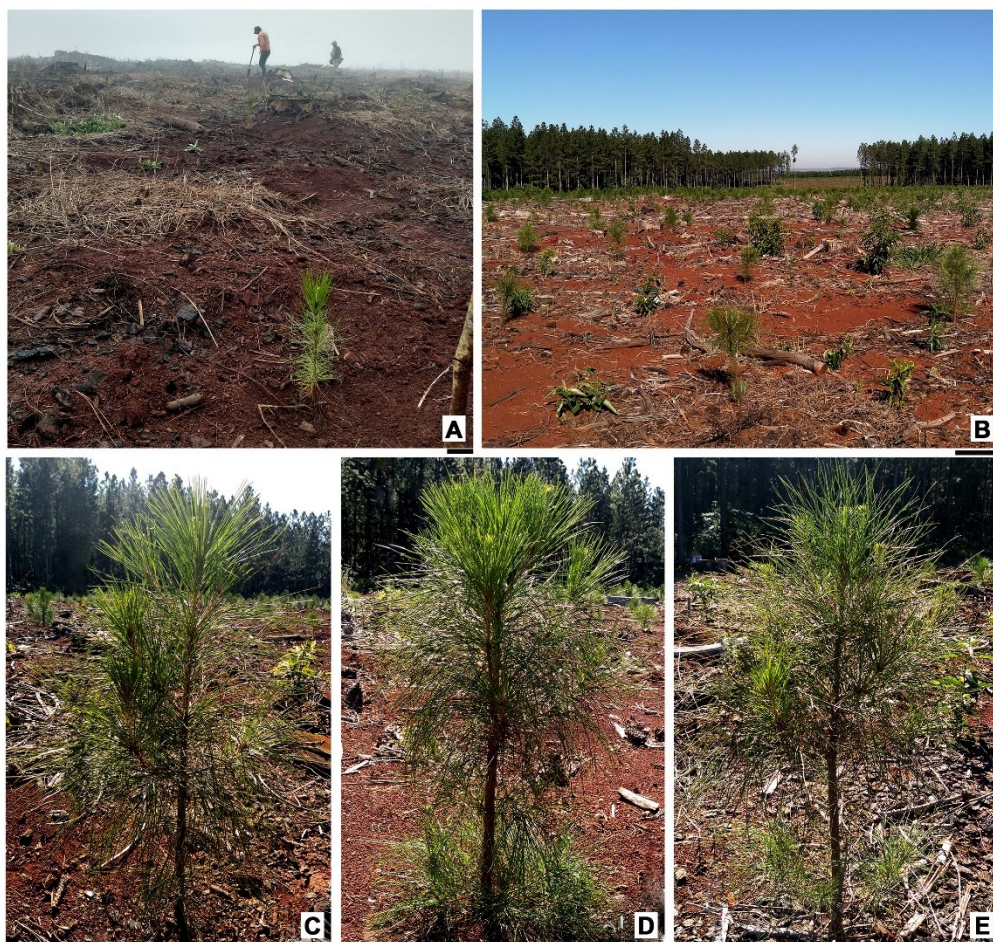


Figura 12 | Establecimiento de PEE × PCH en condiciones de cultivo comercial.

A: Implantación del cultivo. **B:** Estado de crecimiento transcurridos seis meses de la implantación, **C, D y E:** Plantas provenientes de semillas, organogénesis y macropropagación, respectivamente. Las barras indican 5 cm (A, C, D y E) y 20 cm (B).

5.2. Crioconservación de embriones cigóticos maduros (explantes)

5.2.1. Experimento 1: Evaluación de la técnica convencional

No se observó sobrevivencia en los tratamientos ensayados evidenciándose síntomas de ennegrecimiento tisular en todos los casos (Fig. 13).

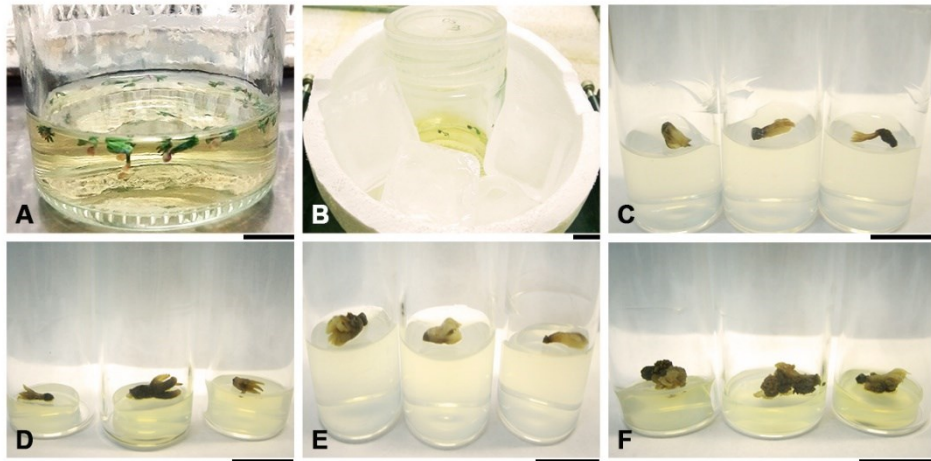


Figura 13 | Técnica convencional.

A: Explantes sumergidos en la solución de sacarosa y DMSO; **B:** Inicio el descenso térmico mediante incubación a temperaturas cercanas a 0°C; **C, D, E y F:** Ennegrecimiento tisular de los explantes provenientes de 10, 20, 30 y 45 días de incubación en el medio de regeneración, respectivamente. Las barras indican 1 cm.

5.2.2. Experimento 2: Evaluación de la técnica de vitrificación

El uso de la técnica de vitrificación no favoreció la sobrevivencia del germoplasma objeto del estudio a su exposición a bajas temperaturas. Transcurridos 7 días del congelamiento, se observó una necrosis generalizada del material vegetal (Fig. 14).

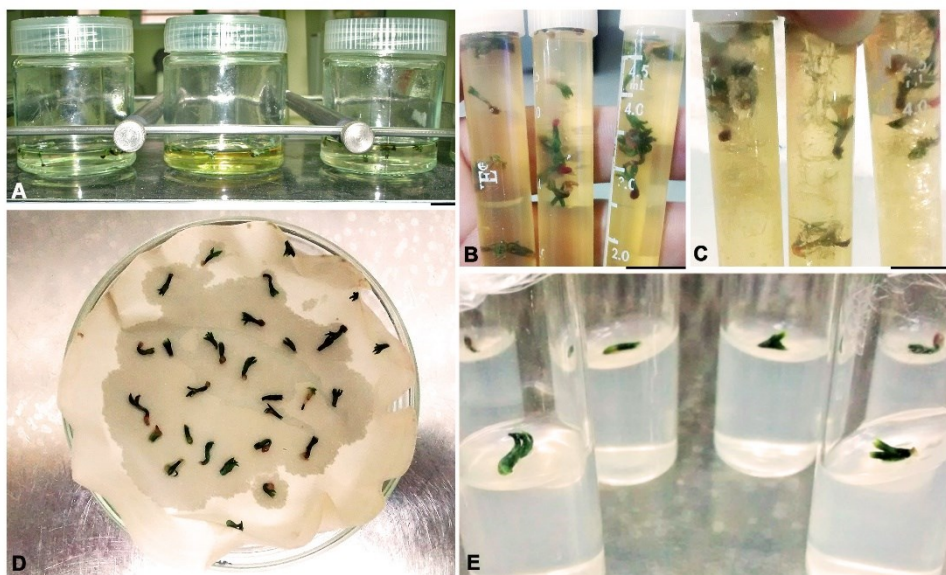


Figura 14 | Técnica de vitrificación.

A: Explantes en solución de carga; **B:** Transferencia a la solución vitrificadora; **C:** Inmersión en nitrógeno líquido; **D:** Fase de escurrimiento; **E:** Incubación en condiciones de luz y temperatura controlada. Las barras indican 1 cm.

5.2.3. Experimento 3: Evaluación de la técnica de desecación

Con el objeto de reducir el contenido de humedad de los embriones previo al tratamiento térmico, se ensayaron distintos procedimientos que incluyeron el uso de agentes osmóticos en el medio de cultivo semisólido, como así también la exposición directa del explante a la corriente de aire estéril del flujo laminar. Transcurridos 30 días del descongelamiento el ennegrecimiento tisular varió entre $10 \pm 0\%$ y $44 \pm 4\%$ siendo menor cuando los embriones fueron expuestos a un proceso de desecación directa. El precultivo en $\frac{1}{2}$ MS suplementado con concentraciones crecientes de sacarosa y sin desecación no favoreció la sobrevivencia de los embriones. En contraposición, el $96.7 \pm 3.3\%$ de los explantes expuestos a la corriente de aire en flujo laminar mostraron signos de viabilidad luego del descongelamiento. No obstante, solo el $53.3 \pm 3.3\%$ brindó yemas adventicias, evidenciándose que la sobrevivencia del embrión no garantiza la regeneración posterior y que el método de deshidratación influye directamente sobre esta respuesta. El mayor porcentaje de explantes con brotes adventicios se alcanzó cuando, previo a la congelación, los embriones cigóticos fueron aislados e inmediatamente deshidratados bajo el flujo de aire laminar. En estas condiciones, el 90% de los explantes sobrevivió a la criopreservación, de los cuales, el $86.7 \pm 3.3\%$ brindó 17.9 ± 0.8 yemas adventicias (Tabla 9).

Tabla 9 | Efectos de distintos pretratamientos de deshidratación osmótica y física a los explantes sobre la sobrevivencia al congelamiento y producción de yemas adventicias transcurridos 30 días de cultivo en $\frac{1}{2}$ MS, semisólido, adicionado con $0.5 \mu\text{M}$ BA y $0.5 \mu\text{M}$ TDZ.

Tratamiento	Explantes ennegrecidos (%)	Sobrevivencia (%)	Explantes sin respuesta (%)	Regeneración (%)	Número de yemas adventicias por explante
Control	44 ± 4^a	44 ± 4^c	3 ± 3^b	40.9 ± 4.5^b	12.2 ± 1.7^{ab}
S1	43.3 ± 12^a	50 ± 11.5^c	13.3 ± 6.7^b	36.7 ± 17.6^b	6.2 ± 1.8^b
S1+S2	30 ± 0^{ab}	66.7 ± 3.3^{bc}	16.7 ± 3.3^b	50 ± 5.8^{ab}	9.8 ± 2.2^b
S1+S2+D	3.3 ± 3.3^b	96.7 ± 3.3^a	43.3 ± 3.3^a	53.3 ± 3.3^{ab}	9.5 ± 1^b
D	10 ± 0^b	90 ± 0^{ab}	3.3 ± 3.3^b	86.7 ± 3.3^a	17.9 ± 0.8^a

Los valores expresan el promedio de 3 repeticiones \pm SEM (n=10). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$). **Control:** Sin desecar; **S1:** sacarosa 0.5 M; **S2:** sacarosa 1 M; **D:** desecación en flujo laminar (120 minutos).

5.2.4. Experimento 4: Influencia del tiempo de desecación sobre el contenido de humedad, sobrevivencia y capacidad de regeneración de los explantes

Considerando los procedimientos de precultivo en $\frac{1}{2}$ MS suplementado con concentraciones crecientes de sacarosa (0.5 y 1 M) con desecación y de desecación durante 120 min en flujo laminar, se determinaron los contenidos críticos de humedad para la tolerancia a la deshidratación, la congelación y la recuperación de embriones aislados, elaborándose una curva de desecación estándar. Los resultados obtenidos confirmaron que la sobrevivencia del material

vegetal está determinada por el contenido de humedad del explante al momento de la inmersión en nitrógeno líquido.

El precultivo de los embriones en un medio basal con concentraciones crecientes de sacarosa, combinado con la desecación, redujo 53% el contenido de humedad del explante durante los primeros 30 minutos de exposición a la corriente de aire del flujo laminar. En el mismo periodo la sobrevivencia se incrementó de manera significativa de $26.7 \pm 3.3\%$ a $83 \pm 3\%$. Asimismo, la tasa de regeneración aumentó de 16.7 ± 8.8 a $65.3 \pm 7.4\%$ y el número de yemas diferenciadas por explante se incrementó de 5.8 ± 3.9 a 16.1 ± 2.7 . Si bien, no se observaron diferencias estadísticas significativas, una exposición mayor a 30 minutos al tratamiento de desecación afectó negativamente los parámetros evaluados (Fig. 15).

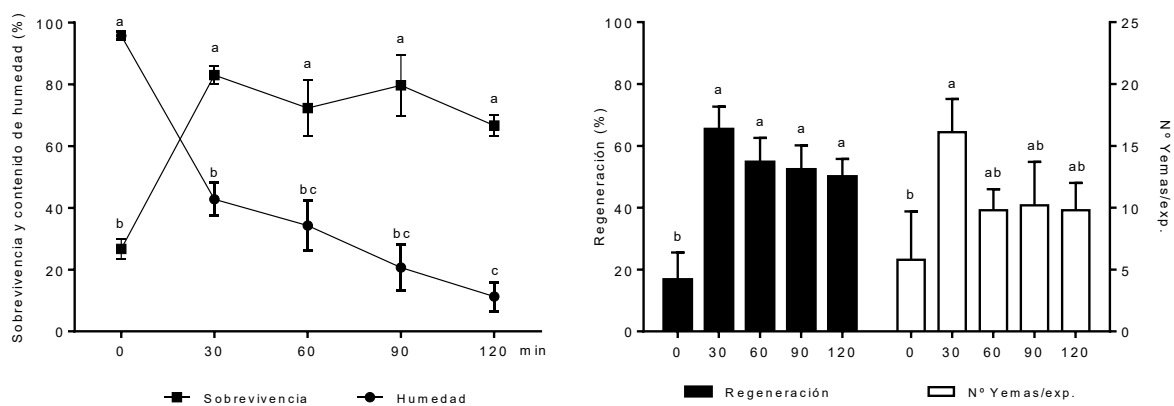


Figura 15 | Técnica de deshidratación osmótica + desecación en flujo laminar. Influencia del contenido de humedad del explante en la sobrevivencia, regeneración y número de yemas por explante post crioconservación.

Los valores expresan el promedio de 3 repeticiones \pm el SEM (n=10). Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos según el test de Comparaciones Múltiples de Tukey ($P \leq 0.05$).

Implementar la técnica de desecación como herramienta para disminuir el contenido de agua no solo significó una simplificación del procedimiento anterior; sino que, además, mejoró considerablemente la tolerancia de los embriones a la crioconservación. Si bien, la tasa máxima de disminución del contenido de agua de los tejidos ocurre durante los primeros 30 minutos (42%), éste descendió gradualmente hasta alcanzar $23.7 \pm 7.3\%$ transcurridos 120 minutos de exposición. Aunque no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ensayados, este contenido de humedad ($23.7 \pm 7.3\%$) permitió que el 100% de los embriones sobreviva tras la crioconservación. En consecuencia, el $86.7 \pm 3.3\%$ de los explantes recuperados produjeron 16.1 ± 0.7 yemas adventicias cada uno. Por otra parte, la tasa de sobrevivencia de los embriones sujetos al tratamiento control (sin desecación) descendió a $44 \pm 4\%$ y el porcentaje de regeneración a $40.9 \pm 4.5\%$, formándose 12.2 ± 1.7 yemas por explante (Fig. 16).

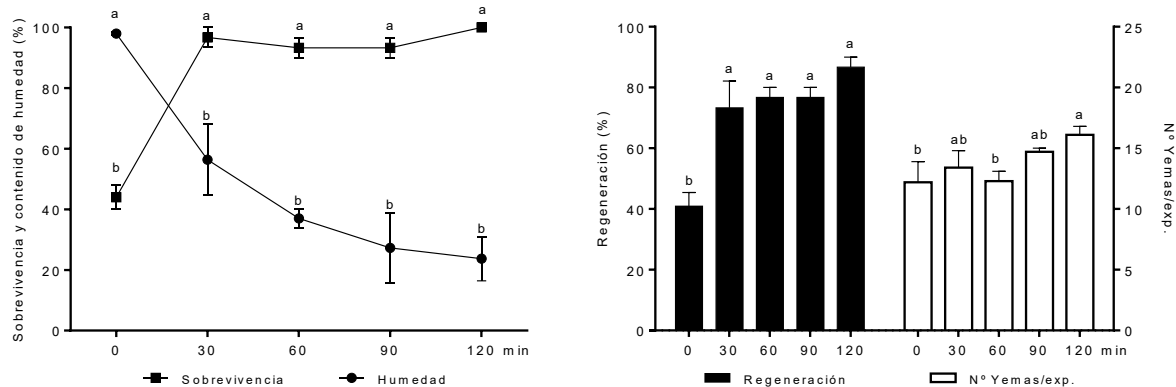


Figura 16 | Técnica de desecación en flujo laminar. Influencia del contenido de humedad del explante en la sobrevivencia, regeneración y número de yemas por explante post crioconservación.

Los valores expresan el promedio de 3 repeticiones \pm el desvío estándar de la media (n=10). Letras iguales no representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos según el test de Tukey ($P \leq 0.05$).

Ajustado el procedimiento de crioconservación, se evaluó el efecto del congelamiento sobre la tasa de regeneración y el número de yemas adventicias diferenciadas por explante. A tal fin, los embriones cigóticos maduros que fueron secados, congelados y luego descongelados se cultivaron en $\frac{1}{2}$ MS suplementado con sacarosa 0.09 M y adicionado con distintas combinaciones de BA y TDZ. Transcurridos 45 días de cultivo, no se detectaron diferencias significativas en la respuesta de los explantes con y sin crioconservación ante las diferentes concentraciones y combinaciones de citoquininas (Tabla 10). Si bien, se observó la proliferación de yemas adventicias en todos los tratamientos ensayados, los mejores resultados se obtuvieron cuando se suplementó al medio basal con 0.5 μ M de BA y TDZ, donde el $86.7 \pm 3.3\%$ de los explantes brindaron 16.1 ± 0.7 yemas adventicias cada uno.

Tabla 10 | Efecto de la crioconservación sobre la capacidad de regeneración y proliferación de yemas adventicias.

BA (μ M)	TDZ (μ M)	Explantes con yemas adventicias (%)		Número de yemas adventicias diferenciadas por explante	
		+NL	-NL	+NL	-NL
0.5	-	20 \pm 5.8	23.3 \pm 12	4.7 \pm 0.9	6.5 \pm 3.7
2	-	40 \pm 5.8	76.67 \pm 12	8.7 \pm 0.9	9.2 \pm 0.1
5	-	53.3 \pm 8.8	66.7 \pm 8.8	10.1 \pm 1.6	9.7 \pm 1.1
15	-	56.7 \pm 3.3	63.3 \pm 3.3	5.4 \pm 0.4	10.4 \pm 0.3
20	-	56.7 \pm 3.3	53.3 \pm 3.3	8.2 \pm 1.2	7.7 \pm 0.9
0.5	0.5	86.7 \pm 3.3	86.7 \pm 8.8	16.1 \pm 0.7	15.5 \pm 2.8
2	0.5	53.3 \pm 6.7	53.3 \pm 8.8	11.3 \pm 0.8	14.9 \pm 1.9
5	0.5	50 \pm 5.8	53.3 \pm 3.3	7.7 \pm 0.9	11.1 \pm 1.3
15	0.5	36.7 \pm 3.3	63.3 \pm 16.7	9.3 \pm 2	9.4 \pm 1.5
20	0.5	26.7 \pm 6.7	60 \pm 11.5	7.2 \pm 0.6	7.3 \pm 0.6

Los valores expresan el promedio de 3 repeticiones \pm SEM. No se observaron diferencias significativas entre los explantes con y sin crioconservar para cada uno de los tratamientos. +NL y -NL, con y sin crioconservación, respectivamente.

Por otra parte, se determinó, la sobrevivencia, altura y DAC de las plántulas obtenidas *in vitro*, crioconservadas o no, durante la etapa de aclimatación. En este sentido, a los 60 días de iniciada

la aclimatación, no se observaron diferencias significativas entre los materiales. La sobrevivencia de las plantas con antecedentes de conservación en nitrógeno líquido fue del $65 \pm 7.6\%$, con una altura de 6.4 ± 0.1 cm y un diámetro a la altura del cuello de 0.21 ± 0.02 mm; los valores para las mismas variables en el material sin crioconservar fueron $61 \pm 6.7\%$, 6.4 ± 0.5 cm y 0.23 ± 0.04 mm, respectivamente.

5.2.5. Experimento 5: Determinación de viabilidad por métodos bioquímicos

Se evidenciaron diferencias en las estimaciones de la prueba TZ según la concentración de la solución, el tiempo de tinción y el material analizado (Tabla 11). Esto posibilitó la selección del procedimiento adecuado teniendo en cuenta los valores de sobrevivencia y regeneración conocidos. En este sentido, cuando se emplearon embriones deshidratados sin inmersión en NL, el procedimiento de tinción más adecuado se obtuvo al emplear una solución de TZ al 0.5% de concentración durante 18 h; para embriones deshidratados y criopreservados resulto apropiada la exposición del tejido por 24 h a una concentración de TZ de 0.1%; Asimismo, para embriones sin deshidratación y criopreservados, el método propicio consistió en la exposición del explante a una solución de TZ al 0.2% de concentración durante 18 h. Por otra parte, se observó que el test de IC fue altamente efectivo en todas las situaciones.

Tabla 11 | Efecto del tiempo de tinción, de la concentración de la solución de tetrazolio y del empleo de índigo carmín como estimadores de la sobrevivencia y regeneración a partir de la viabilidad de los embriones de PEE × PCH.

Tratamientos	Embriones con desecación y sin crioconservación	Embriones con desecación y crioconservación	Embriones sin desecación y con crioconservación
0.1% TZ × 18h	$73,3 \pm 3^{abc}$	$73,3 \pm 10^{ab}$	$46,7 \pm 3^a$
0.1% TZ × 24h	$83,3 \pm 9^{abc}$	$79,6 \pm 6^{ab}$	60 ± 6^a
0.1% TZ × 36h	$73,3 \pm 18^{abc}$	$63,3 \pm 20^{ab}$	$56,7 \pm 7^a$
0.2% TZ × 18h	100 ± 0^a	$63,3 \pm 3^{ab}$	$43,3 \pm 3^a$
0.2% TZ × 24h	60 ± 6^{bc}	$43,3 \pm 10^{ab}$	50 ± 6^a
0.2% TZ × 36h	$46,7 \pm 3^c$	$56,7 \pm 9^{ab}$	$46,7 \pm 3^a$
0.5% TZ × 18h	90 ± 6^{ab}	$63,3 \pm 9^{ab}$	50 ± 10^a
0.5% TZ × 24h	$76,7 \pm 9^{abc}$	$37,4 \pm 9^b$	50 ± 0^a
0.5% TZ × 36h	70 ± 6^{abc}	40 ± 20^{ab}	$66,7 \pm 19^a$
Índigo Carmín	90 ± 0^{ab}	$86,7 \pm 9^{ab}$	$36,7 \pm 7^a$
Sobrevivencia*	$93,3 \pm 3^{ab}$	90 ± 0^a	$43,7 \pm 4^a$
Regeneración*	$86,7 \pm 7^{ab}$	$83,3 \pm 9^{ab}$	$40,1 \pm 5^a$

Considerando el procedimiento de tinción para los embriones deshidratados y criopreservados, adicionalmente se evaluó la confiabilidad de clasificación establecida por los métodos bioquímicos mediante matrices de confusión generadas a partir de estos valores, el porcentaje de sobrevivencia y la tasa de regeneración (Tabla 12). En este sentido, la sensibilidad de la prueba TZ indicó que más del 88.9% de los embriones viables y el 66.7% de los no viables (especificidad) serían detectados tras la congelación. Además, la evaluación de las lesiones histológicas mediante la prueba del IC reveló una precisión de clasificación del 95.9% y 77.8%

para embriones viables (ausencia de lesiones) y no viables, respectivamente. Dado el alto porcentaje (>83.3%) de predicciones correctas (exactitud), ambas pruebas bioquímicas confirman la viabilidad de los embriones deshidratados en el flujo de aire laminar y criopreservados, y explican, en parte, su capacidad de regeneración.

Tabla 12 | Análisis de las predicciones de las pruebas de tetrazolio e índigo carmín en embriones con desecación y criopreservación.

Test de viabilidad	Sensibilidad		Especificidad		Exactitud	
	SOB	REG	SOB	REG	SOB	REG
TZ	88.9%	96.0%	66.7%	85.8%	83.3%	93.8%
IC	96.7%	95.9%	81.3%	77.8%	94.3%	93.1%

TZ: Tetrazolio; **IC:** índigo carmín; **REG:** regeneración; **SOB:** sobrevivencia;

5.3. Análisis histológico

Las observaciones histológicas confirmaron que las yemas adventicias se originan de manera directa, sin proliferación de tejidos indiferenciados, a partir de células subepidérmicas (Figs. 17 A-H). Luego de tres días de cultivo en el medio de regeneración, se observó un incremento del número de células a través de activas divisiones en planos periclinales y anticlinales en los cotiledones (Figs. 17 C, D) y, en menor medida, en otras partes del explante. Las regiones meristemáticas con células pequeñas, citoplasma denso, vacuolas pequeñas y núcleos prominentes se hicieron evidentes tras siete días de incubación (Figs. 17 E, F). Las sucesivas divisiones mitóticas definieron regiones morfológicas que originaron yemas adventicias al cabo de 15 a 21 días (Figs. 17 G, H). A continuación, se organizó el domo correspondiente al ápice vegetativo y los primordios foliares, siendo externamente visibles en la superficie después de 30 días de incubación. Finalmente, se formaron varias yemas adventicias por cotiledón y no se observó organogénesis secundaria a partir de las yemas neoformadas. Tampoco se detectaron alteraciones celulares en los explantes criopreservados (Figs. 17 A, B) y en consecuencia no se evidenciaron diferencias ontogénicas entre ambos tratamientos.

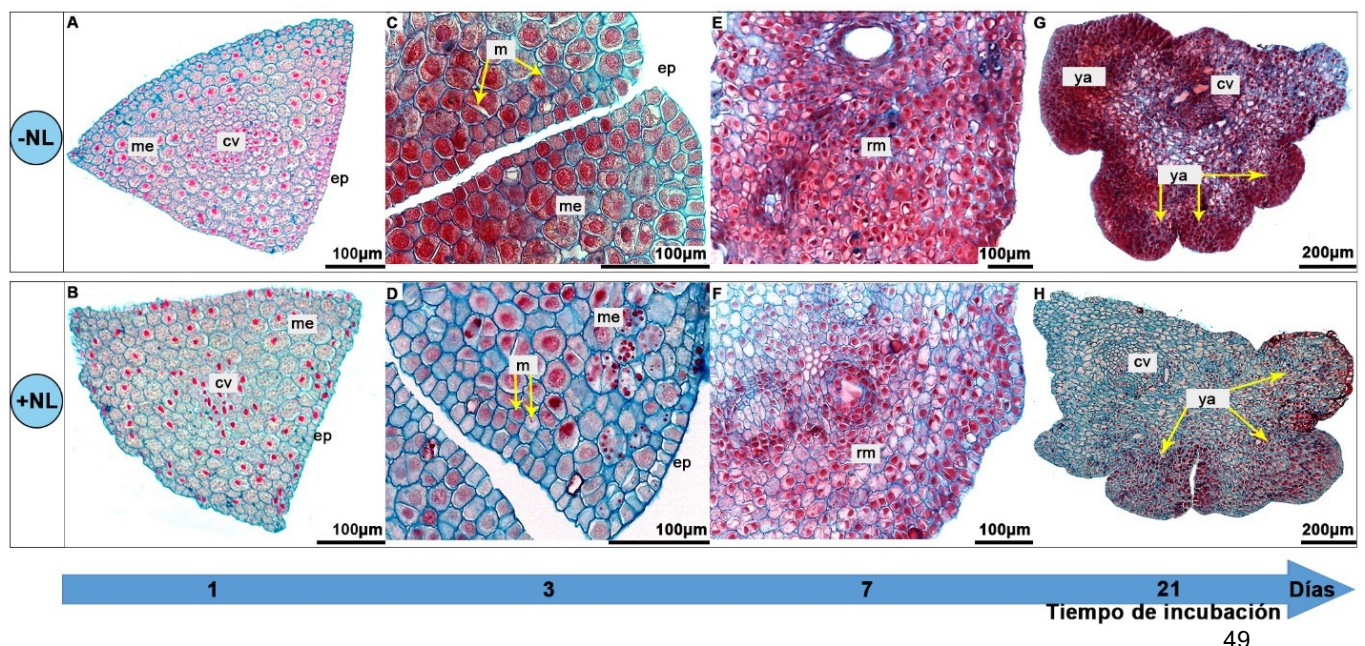


Figura 17 | Formación de yemas adventicias a partir de embriones cigóticos de PEE x PCH, crioconservados (+NL) y sin crioconservar (-NL).

Abreviaturas: **ya**, yemas adventicias; **ep**, epidermis; **m**, mitosis; **me**, mesófilo; **rm**, región meristemática; **cv**, cilindro vascular

5.4. Estabilidad genética de las vitroplantas

Todos los cebadores ensayados (11) amplificaron bandas definidas y reproducibles en las muestras de ADN extraído de las plantas de PEE x PCH obtenidas *in vitro*. El análisis descriptivo de los datos obtenidos muestra que el contenido de información polimórfica para siete marcadores varió de 0.09 ± 0.3 a 0.29 ± 0.00001 . Se generaron un total de 52 bandas de 250 a 3000 pb; de las cuales, sólo 22 (42.3%) resultaron polimórficas (Tabla 13). El análisis de coordenadas principales representa casi el 55% de la variabilidad total en sus componentes más importantes (coordenadas 1 y 2). Si bien, el nivel de variabilidad entre las vitroplantas fue superior al de las plantas de semilla, la distancia genética promedio fue baja (0.17). Las plántulas procedentes de embriones cigóticos maduros no congelados y crioconservados mostraron una variabilidad reducida y mayor estabilidad genética (Fig. 18). Los resultados del índice de disimilitud de Jaccard (1-S) indicaron que los coeficientes de distancia variaron entre 0.00 y 0.19 (Fig. 19). Asimismo, se observaron cuatro conglomerados, donde uno de ellos contuvo a 36 de los 40 individuos analizados, incluyendo algunos individuos sin distancia genética o con una distancia genética muy baja (<0.16). Estos resultados demuestran que los procedimientos desarrollados para la conservación y obtención de brotes organogénicos no afectó la estabilidad genética del germoplasma objeto de estudio.

Tabla 13 | ISSR caracterización molecular de plantas provenientes de semillas y organogénesis con y sin crioconservar.

Cebador	PM	MM	TM	PPL	PIC±SE
(AG)8-C	0	1	1	0	sd
(AGAC)4-GC	0	4	4	0	sd
(CAG)7-CA	0	3	3	0	sd
(CA)8-T	0	4	4	0	sd
(GA)8-T	1	3	4	25	0.13 ± 0.2
(GT)8-G	1	3	4	25	0.09 ± 0.3
(CT)8-G	2	3	5	40	0.19 ± 0.02
(GAG) 7-AC	3	2	5	60	0.29 ± 0.00001
(AC)8-T	3	4	7	43	0.16 ± 0.02
(AC)8-G	4	2	6	67	0.29 ± 0.000003
(AG)8-GC	8	1	9	56	0.15 ± 0.0003
Total	22	30	52		

MM: Marcadores monomórficos; **PIC**. Información polimórfica contenida; **PM**: Marcadores polimórficos; **PPL**: Porcentaje de loci polimórfico; **TM**: Marcadores totales; **sd**: sin dato.

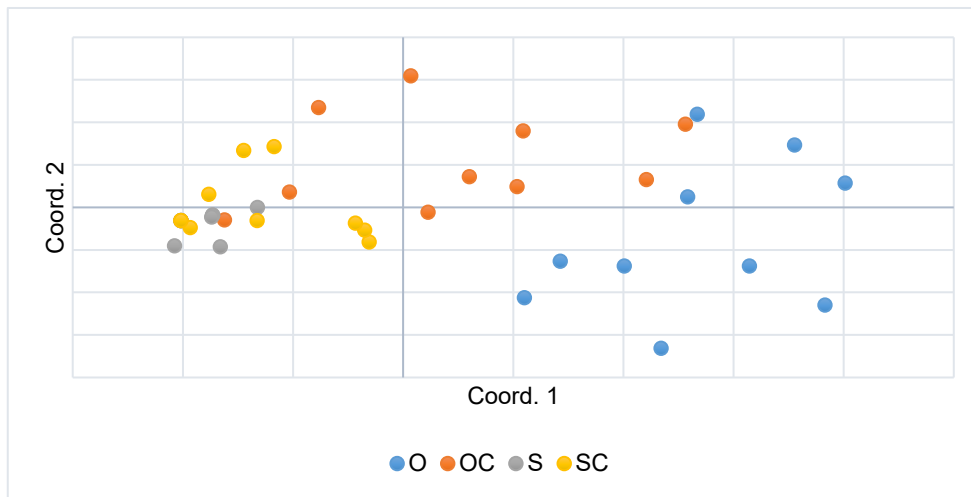


Figura 18 | Análisis de coordenadas principales. Variabilidad genética de plantas provenientes de organogénesis (O) y germinación de semillas (S).
 OC y SC: Plantas de organogénesis y semillas expuestas al tratamiento criogénico.

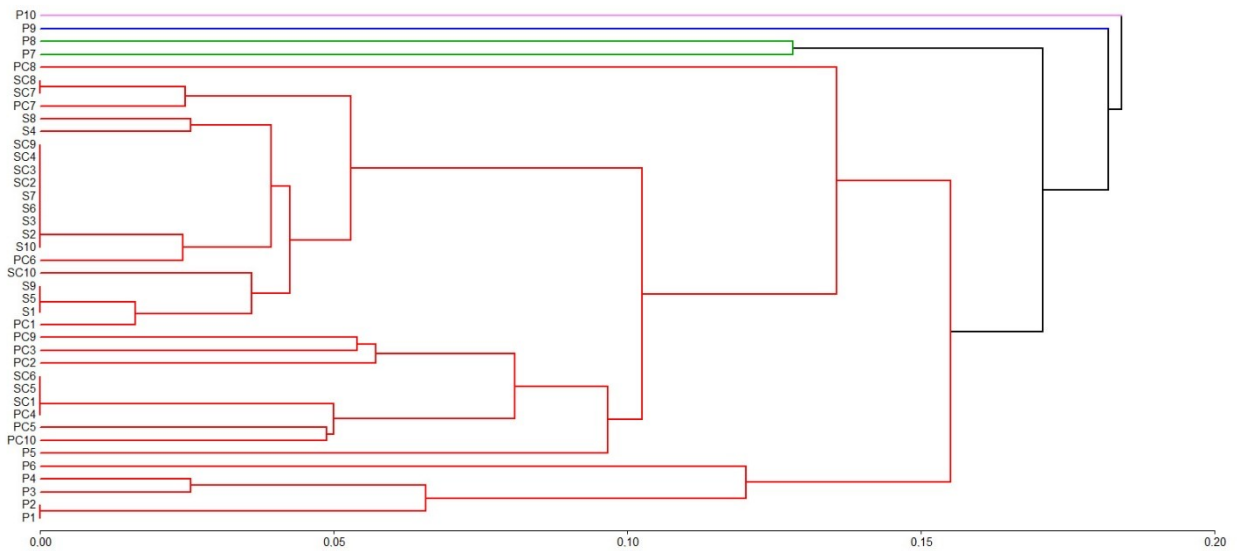


Figura 19 | Dendrograma UPGMA obtenido mediante el coeficiente de disimilitud de Jaccard. Distancia genética entre las plántulas de semilla y vitroplantas obtenidas por organogénesis directa.
P, PC: vitroplantas procedentes de organogénesis a partir del cultivo in vitro de embriones cigóticos no congelados y crioconservados. **S, SC**: plántulas procedentes de embriones cigóticos no congelados y crioconservados.

DISCUSIÓN



6. DISCUSION

La propagación vegetativa de especies coníferas puede llevarse a cabo con éxito mediante la aplicación de numerosas técnicas que incluyen el enraizamiento de estacas, la organogénesis y la embriogénesis somática. Esta última, es considerada la metodología más propicia para obtener ganancia genética dado que, en conjunto con la criopreservación, brinda la posibilidad de mantener líneas celulares en estado juvenil indefinidamente (Bonga, 2016). De este modo, es posible realizar pruebas de campo a largo plazo de diferentes líneas clonales y mantener parte del material genético en un estado fisiológico juvenil hasta que, a partir de la evaluación los ensayos, se determinen las mejores líneas clonales para la producción masiva de propágulos (Park et al., 2016). Nunes et al. (2018) informaron por primera vez la posibilidad de propagar el híbrido PEE × PCH mediante embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros; sin embargo, la corta ventana de tiempo para la iniciación de masas embriogénicas dificulta el uso de esta técnica a escala masiva. Para superar esta limitación, en el marco de la presente tesis desarrollamos un método alternativo para la propagación y crioconservación del pino híbrido basada en la diferenciación *de novo* de yemas adventicias a partir de embriones cigóticos maduros. Asimismo, evaluamos las características anatómicas y la estabilidad genética del material sometido o no al proceso de crioconservación. Finalmente, examinamos la competencia de las plantas obtenidas por cultivo de tejidos para adaptarse a las condiciones adversas que se presentan durante el establecimiento de la forestación, proporcionando un análisis comparativo con esquejes enraizados y plántulas.

6.1. Propagación vegetativa *in vitro* vía organogénesis

La propagación de pinos mediante organogénesis fue obtenida por primera vez en *Pinus palustris* (Sommer et al., 1975) mediante el empleo de embriones cigóticos maduros como fuente de explantes. Desde entonces, se desarrollaron sendos protocolos que permitieron la regeneración de plantas de *Pinus radiata* (Aitken-Christie et al., 1988; Montalbán et al., 2011), *Pinus pinea* (Moncaleán et al., 2005), *Pinus halepensis* (Lambardi et al., 1993; Pereira et al., 2021) así como el híbrido resultante del cruzamiento entre *Pinus elliottii* × *Pinus caribaea* (Meyer, 1998). Sin embargo, aunque la organogénesis de brotes ha sido muy eficaz en algunos casos, esta tecnología rara vez alcanzó una fase de aplicación comercial debido, entre otras causas, a una baja tasa de formación de plantas, enraizamiento deficiente, mano de obra excesiva y costos elevados (Bonga, 2014).

La respuesta morfogénica de un explante cultivado *in vitro* depende de su constitución genética, del ambiente que lo rodea y de la composición del medio de cultivo (Bhojwani y Dantu, 2013b). Este último proporciona a los tejidos y órganos vegetales los nutrientes necesarios para el crecimiento (George et al., 2008) y por tal motivo, su adecuada determinación condiciona en gran medida el éxito de un experimento de propagación (Bhojwani & Dantu, 2013b). En este

sentido, se demostró que la multiplicación *in vitro* del género *Pinus* spp. es altamente dependiente de la formulación nutritiva empleada durante las diferentes etapas de la micropropagación (Álvarez et al., 2009; Calixto y Pais, 1997). Acorde a lo expuesto, nuestros resultados reafirman que la respuesta morfogénica varía conforme lo hace la composición de la solución nutritiva, siendo la formulación del MS propicia para todas las etapas del proceso organogénico. Sin embargo y al igual que lo observado previamente en *Pinus elliottii* (Pérez-Bermúdez y Sommer, 1987) y *Pinus pinea* (Sul y Korban, 2004), resulta necesario realizar diluciones de la solución para inducir organogénesis adventicia, elongar las yemas diferenciadas y enraizar los brotes resultantes.

El control de la formación de brotes adventicios combina la acción de reguladores de crecimiento vegetal con múltiples vías de señalización y actividades reguladoras de genes (Alvarez et al., 2020; Díaz-Sala, 2019; Duclercq et al., 2011). En los últimos años, muchos artículos y revisiones literarias contribuyeron al conocimiento que actualmente se dispone acerca del proceso morfogénico. Estos incluyen el control de la reprogramación del destino celular hacia la organogénesis de brotes *de novo* (Sang et al., 2018; Tian et al., 2018), la señalización hormonal (Bidabadi y Jain, 2020; Raspor et al., 2021) y la regulación transcripcional (Bueno et al., 2021; Motte et al., 2014). Los resultados obtenidos en el marco de esta tesis indican que el medio MS reducido a la mitad de su concentración original, suplementado con sacarosa y una combinación de citoquininas (BA y TDZ), sin auxinas, promueve la proliferación de brotes adventicios mediante un patrón de formación directa. Teniendo en cuenta que las hormonas vegetales deben ser absorbidas del medio y transportadas por los tejidos de la planta antes de emitir una señal molecular que desencadena el acontecimiento morfogénico, su absorción provocará cambios en los niveles endógenos de otras hormonas vegetales. Este efecto es más relevante que su concentración en el medio de regeneración (Raspor et al., 2021). En consecuencia, se demostró que la elevación de los niveles locales de auxina endógena inducida por citoquinina, en lugar de la aplicación de auxina exógena, está relacionada con la eficacia de la regeneración de brotes adventicios (Kakani et al., 2009). Moncaleán et al. (2005), utilizando un medio de inducción enriquecido con 8-[14C]BA, examinaron la concentración endógena de las formas activas y conjugadas de BA, zeatina y dihidrozeatina en cotiledones de *Pinus pinea*; estos autores identificaron que el pico de absorción de BA caracterizaba la fase de adquisición de competencia y la inducción de la formación de yemas por los explantes y que el restablecimiento de la homeostasis de la citoquinina marcó la transición de la fase de inducción a la de desarrollo de los brotes. El porcentaje de regeneración y el número de yemas diferenciadas en PEE × PCH dependió considerablemente del contenido de BA adicionado al medio de inducción. Una baja concentración posibilitó que la mayoría de los embriones cigóticos continuaran el proceso ontogénico desarrollándose en plántulas, mientras que, solo unos pocos formaron yemas adventicias. El incremento de su concentración tuvo un efecto positivo sobre la tasa de regeneración y el número de yemas adventicias diferenciadas por explante. Sin embargo,

los niveles elevados de citoquininas restringieron el crecimiento de los brotes durante la fase de elongación. Resultados similares fueron informados para *Pinus elliotti* (Pérez-Bermúdez y Sommer, 1987), *Pinus massoniana* (Zhang et al., 2006) y *Pinus peuce* (Stojičić et al., 2012). Por su parte, numerosos trabajos demostraron la acción promotora de TDZ en la formación de yemas adventicias *in vitro*, ya sea solo o en combinación con BA (Meyer, 1998; Murthy et al., 1998). Este derivado de la urea se describió como una de las sustancias de crecimiento, de acción similar a las citoquininas, más activas para el cultivo de tejidos. Debido a su capacidad para estimular la regeneración de yemas adventicias, el TDZ ha sido empleado en la regeneración de numerosas especies leñosas (Huetteman y Preece, 1993). En este sentido, el TDZ potenció la proliferación de yemas adventicias en ejes embrionarios y cotiledones de *Pinus strobus* (Pijut, 1991), *Pinus pinea* (Sul y Korban, 2004), *Pinus sylvestris* (Sul y Korban, 1998), *Pinus pinaster* (Humánez et al., 2011) y otras coníferas, incluyendo *Cunninghamia lanceolata* (Zhu et al., 2007). Por lo tanto, la combinación de BA y TDZ mostró un efecto sinérgico en la regeneración de *Pinus wallichiana* (Mathur y Nadgouda, 1999) y *Pinus elliottii* (Tang et al., 2006) evitando la descomposición de las purinas al inhibir la actividad de la citocinina oxidasa (Guo et al., 2011). Los embriones maduros de PEE × PCH cultivados en un medio de inducción con BA y TDZ, iniciaron el proceso morfogénico transcurridos tres días de incubación, observándose un cambio en la coloración del explante, de blanco a verde, y expansión de los cotiledones. Por lo general, no se observó crecimiento de la radícula, mientras que, el capuchón (cofia o caliptra) de la raíz se tornó inicialmente rojo, luego marrón hasta su necrosis. Transcurridas tres semanas de cultivo, se observaron estructuras nodulares en la superficie del explante, principalmente en los cotiledones y con menor frecuencia en la zona del hipocótilo. A partir de éstas, posteriormente se diferenciaron las yemas adventicias. Existen numerosas evidencias en la literatura internacional que avalan el rol fundamental que tendría la duración de la fase de inducción en la sobrevivencia y posterior elongación de las yemas neoformadas. En este sentido, Halos & Go (1993) informaron que la sobrevivencia de los embriones de *Pinus caribaea* disminuyó significativamente al incrementarse el periodo de inducción atribuyendo este hecho a un efecto tóxico de la citoquinina debido a una continua y prolongada absorción de BA. En este sentido, Motyka y Kamínek (1990) relacionaron el fracaso en la estimulación a la diferenciación de órganos adventicios tras la aplicación externa de citoquininas con el incremento en la actividad de la citoquinina oxidasa que, ante la presencia continua de BA, eleva marcadamente sus niveles impidiendo la formación de yemas adventicias. Por otra parte, Lambardi et al. (1993) y Alonso et al. (2006) trabajando con *Pinus halepensis* y *Pinus pinea*, respectivamente, determinaron bajos índices de regeneración en periodos breves de inducción; a la vez que, exposiciones prolongadas incrementaron el número promedio de yemas diferenciadas por explante, estimulando la formación de callos que restringieron la elongación de los brotes. En el contexto de esta tesis pudimos observar un marcado efecto del tiempo de inducción sobre la neoformación de yemas adventicias de PEE × PCH. La tasa de mortalidad fue elevada transcurridos 60 días

de cultivo y si bien, se obtuvieron numerosos brotes a los 45 días de incubación, éstos no prosperaron durante la etapa de elongación. Este resultado fue revertido al reducir el periodo de inducción a 30 días y realizar subcultivos sucesivos de individualización. El mismo efecto se observó para *Pinus wallichiana*, donde el agregado de TDZ al medio nutritivo resultó en una elevada tasa de organogénesis. Sin embargo, los brotes resultantes presentaron entrenudos muy cortos que no respondieron al tratamiento de elongación (Mathur y Nadgauda, 1999). Según Huetteman y Preece (1993), el TDZ al igual que otras citoquininas derivadas de la fenilureas, es menos susceptible a la actividad de la citoquinina oxidasa que aquellas derivadas de las purinas, evidenciando su acción fisiológica a concentraciones más bajas que éstas. Para contrarrestar esta respuesta no deseada, Humánez et al. (2011) sugieren implementar el procedimiento de cultivo en dos etapas consistentes en la inducción del proceso organogénico con TDZ y ulterior subcultivo a medios de cultivos con menor concentración o desprovistos de éste a fin de promover el crecimiento de los brotes.

El crecimiento de las yemas neoformadas de PEE × PCH fue posible mediante el subcultivo de los explantes en un medio de idéntica composición química, libre de reguladores de crecimiento, gelificado con Phytigel® y provisto de ventilación forzada. El empleo de biorreactores de inmersión temporal elevó sustancialmente la mortandad de los explantes por necrosis tisular. Si bien, la gelificación del medio nutritivo con agar mejoró la sobrevivencia del material, no estimuló el crecimiento de las yemas. Sin embargo, la respuesta fue significativamente superior cuando se empleó Phytigel®. Este efecto fue observado tempranamente por Harry y Thorpe (1994) trabajando con *Pinus banksiana*, en donde el uso de Phytagar® fue más efectivo para la elongación de yemas adventicias que el Bactoagar® o Gelrite®, favoreciendo la proliferación de brotes elongados y saludables. Según los autores, estas diferencias podrían deberse al nivel de impurezas que podría contener la fuente y presentación comercial. Sumado a esto, Debergh (1983) encontró que tanto la marca comercial como concentración del agente gelificante no solo afecta el estado físico y químico del medio; sino que, además, el nivel de impurezas altera la composición química de la solución. Asimismo, Feito et al. (2021) demostraron que el estado físico del medio de cultivo además tiene efecto sobre el transporte y la distribución de BA a lo largo del explante. En este sentido, concluyeron que el medio líquido favorece la distribución eficaz de BA y una inactivación es más lenta, que conduce a altos niveles de actividad de citoquinina; mientras que, un medio solidificado con agar puede, servir como depósito de BA con una liberación bastante lenta, pero continua, del compuesto.

Por otra parte, hemos observado que el tamaño del frasco y el número de explantes cultivados por recipiente afectó el crecimiento de los brotes adventicios de PEE × PCH. En este sentido, Islam et al. (2005) y Amoo et al. (2009) demostraron que el desarrollo del cultivo de *in vitro* está influenciado por el tipo de recipiente empleado. Esto puede deberse a las variaciones de la composición gaseosa en el espacio aéreo dentro del contenedor, como así también, a las

diferencias en la tasa de difusión gaseosa causada por la variación en la proporción explante: medio de cultivo, explante: volumen aéreo y medio de cultivo: volumen aéreo. Nuestros resultados indican que, a volumen fijo del medio de cultivo (50 mL), el aumento en el número de explantes cultivados por recipiente favorece la elongación de los brotes, revelando que el efecto de competencia por agua y nutrientes es suplido satisfactoriamente por el volumen de medio nutritivo y repercute favorablemente en el crecimiento de los brotes. Rodríguez Beraud y Morales Ulloa (2015), informaron que la elongación de brotes de arándano (*Vaccinium corymbosum*) fue favorecida por el aumento de la densidad de cultivo siempre que el volumen del medio nutritivo sea por lo menos de 40 mL; sin embargo, a densidades menores (10 explantes por recipiente) la influencia del volumen del medio deja de ser significativa y la altura no se ve favorecida. La importancia de determinar experimentalmente la densidad de explantes por frasco se relaciona directamente con la eficiencia del sistema de propagación; una baja densidad puede ocasionar pérdidas de espacio y medio de cultivo, y con ello la subutilización de los recipientes, mientras que una alta densidad propiciaría un crecimiento limitado de los brotes (Orellana, 1998). A medida que las yemas adventicias de PEE × PCH brotaron y continuaron su crecimiento, el efecto de competencia se evidenció fuertemente. La dominancia se manifestó en unos pocos brotes afectando el desarrollo de los restantes. En este sentido, la implementación de subcultivos de individualización¹ permitió optimizar el procedimiento. Así, la combinación de un periodo de elongación de los clústeres de yemas adventicias durante 60 días, un subcultivo de individualización parcial de los brotes de mayor longitud y el fraccionamiento en porciones más pequeñas del explante, estimuló la elongación de yemas codominantes que pudieron ser individualizadas 30 días después (90 días de iniciada la fase de elongación), duplicando el número de brotes aptos para el enraizamiento. Según George et al. (2008), la separación de los brotes y el cultivo en medio fresco, puede optimizar la producción de brotes adventicios a partir de un determinado explante; mientras que, si el clúster se deja en el medio de elongación original, sin separación de los brotes dominantes y transferencia a medios frescos, el número total de brotes puede ser pequeño. Adicionalmente, existen varios antecedentes en la literatura que son compatibles con nuestros resultados. Por ejemplo, la cosecha periódica de los brotes evitó que se suprima el desarrollo de las yemas más pequeñas de *Pinus elliottii* × *Pinus caribaea* en la etapa de elongación (Meyer, 1998). Sul y Korban (2004) estimularon el crecimiento de yemas adventicias de *Pinus pinea* a través de la subdivisión de los explantes en varias secciones (cada una conteniendo 3-5 yemas adventicias) y el cultivo en medio semisólido. La realización de dos subcultivos mensuales en medio semisólido libre de reguladores de crecimiento, permitió separar los brotes de *Pinus pinea* del explante original y estimular su crecimiento (Alonso et al., 2006). Por su parte, Montalbán y colaboradores (2011) estimularon el crecimiento de las yemas de *Pinus radiata* al cultivar los explantes en frascos de vidrio conteniendo un medio basal desprovisto de

¹ Se separan los brotes de mayor longitud para beneficiar el crecimiento de yemas codominantes transfiriéndolos a medios frescos.

citoquininas y subcultivos a medios frescos de igual composición química en intervalos de treinta días. Resultados similares se observaron en explantes de *Pinus pinaster* inducidos inicialmente en medios suplementados con TDZ durante 40 días y transferencia periódica a medios frescos sin reguladores del crecimiento (Humánez et al., 2011). Finalmente, cabe mencionar que en *Pinus peuce*, un mayor número de brotes elongados fueron obtenidos cuando se realizaron subcultivos a medio fresco y cuando en cada uno de ellos, los explantes fueron divididos en piezas más pequeñas (Stojičić et al., 2012).

A diferencia del procedimiento de rizogénesis adventicia desarrollado por Meyer (1998) consistente en la exposición continua de los brotes de *Pinus elliottii* × *Pinus caribaea* a un medio semisólido suplementado con IBA, en el contexto de esta tesis se desarrolló un protocolo basado en un pretratamiento de los brotes (porción basal) en una solución acuosa de IBA 1.25 mM, seguida de la transferencia a ¼ MS, semisólido y adicionado con 0.045 M sacarosa, posibilitando que el 73±6.7% de los brotes brindaran raíces a través de un patrón de formación directa. La efectividad de los pretratamientos inductivos fue demostrada en otras especies cogenéricas. Por ejemplo, Stojičić et al. (2012) obtuvieron plantas enraizadas de *Pinus peuce*, al tratar los brotes en una solución de IBA 0.2 mg·L⁻¹ por un periodo de 2 h. Por su parte, Lambardi et al. (1993) y Mathur y Nadgouda (1999), emplearon un pretratamiento hormonal de 6 h para estimular el proceso morfogénico en estacas de *Pinus halepensis* y *Pinus wallichiana*. Finalmente, Ojeda-Zacarías (2015) y colaboradores, promovieron el enraizamiento adventicio de *Pinus maximartinezii* mediante un pretratamiento con IBA 2 mg·L⁻¹ durante 24 h.

6.2. Análisis comparativo de respuesta a déficit hídrico y establecimiento a campo de las plantas obtenidas por germinación de semillas, macropropagación y organogénesis.

Independientemente del método de obtención utilizado, las plantas experimentan déficit hídrico durante el establecimiento del cultivo debido a que éstas provienen de una etapa de crecimiento en contenedores rellenos de sustratos con elevado nivel de nutrientes y provistos de riego periódico. La sobrevivencia de la planta en su nuevo hábitat estará condicionada básicamente a la eficiencia en el uso de agua donde prima un adecuado control estomático para disminuir la pérdida de agua por transpiración y un rápido crecimiento de las raíces a fin de captar recursos (Dias et al., 2022). En este sentido, el procedimiento desarrollado permitió obtener plantas con un sistema radicular eficiente capaz de superar el estrés por deshidratación y establecerse tras la plantación. Los resultados obtenidos indican que, ante un déficit hídrico severo, el comportamiento de las plantas obtenidas por organogénesis es similar al de aquellas provenientes de la germinación de semillas y macropropagación. Si bien, en muchos casos, las condiciones de limitación de agua inducen en las plantas respuestas que afectan su morfología, fisiología y metabolismo, las determinaciones realizadas bajo condiciones ambientales controladas indicaron que, pese a la situación desfavorable, todas las plantas de PEE × PCH continuaron su crecimiento, no presentaron alteraciones en el fenotipo y los valores de CRA y

PSII-Fv/Fm se mantuvieron estables entre las plantas estresadas y las plantas control, así como entre las plantas de origen sexual y asexual. Por tales motivos, se considera que el empleo de vitroplantas en lugar de materiales provenientes de las fuentes usualmente utilizadas no afectara la tasa de sobrevivencia durante la implantación.

Asimismo, los resultados provenientes de los ensayos establecidos en condiciones de campo confirmaron que el comportamiento de las plantas de PEE × PCH obtenidas por cultivo de tejidos es similar al de las plántulas de semilla y los esquejes enraizados. En este sentido, tanto la tasa de sobrevivencia como el crecimiento diamétrico y de altura no varió significativamente entre los distintos materiales. Resultados similares fueron informados para *Morus alba*, donde la sobrevivencia de las plantas procedentes de cultivo *in vitro* en medio semisólido, inmersión temporal y estacas enraizadas *ex vitro*, no presentó diferencias significativas transcurridos 12 meses de la implantación del cultivo (Salas-Barboza et al., 2006).

Existe escasa información en la literatura respecto a la sobrevivencia y establecimiento a campo de plantas de coníferas producidas *in vitro*. En este sentido, Menzies et al. (2001) informaron que plantas de *Pinus radiata* propagadas *in vitro* presentaron valores significativamente menores de DAP y altura a los 4 años de su implantación, respecto de aquellas plantas provenientes de la germinación de semillas y macropropagación; a pesar de que, al inicio de la plantación, la altura de las vitroplantas era significativamente superior. Según los autores, las plantas cultivadas *in vitro* se comportaron como si estuvieran fisiológicamente envejecidas a pesar de haberse iniciado a partir de explantes juveniles. Resultados similares fueron observados en un ensayo establecido en 1995 por los mismos autores, donde el crecimiento en altura de las plantas propagadas vegetativamente fue comparativamente menor respecto a las plantas de semillas y macropropagación. Por otra parte, Hargreaves y Menzies (2007) mencionaron que, transcurridos 23 años de la implantación forestal, las plantas de *Pinus radiata* provenientes de cultivo de tejidos no diferían en DAP respecto a aquellas provenientes de semillas y macropropagación.

6.3. Crioconservación de embriones cigóticos maduros (explantes)

Mediante pruebas bioquímicas con TZ e IC fue posible confirmar que el pretratamiento de desecación de los embriones por exposición a la corriente de aire del flujo laminar y la inmersión de los crioviales directamente en nitrógeno líquido no afectaron la viabilidad de los embriones cigóticos maduros de PEE × PCH. A través de este procedimiento se abre la posibilidad de prolongar el almacenamiento de este genotipo, preservando sus características juveniles, hasta obtener los resultados de las pruebas de progenie. Pese a que existen numerosos procedimientos de regeneración de brotes en coníferas que utilizan embriones cigóticos maduros, ejes embrionarios o cotiledones como fuente de explantes, existe escasa información relacionada con su criopreservación. En este contexto, Toivonen y Kartha (1989) tratando los

cotiledones de *Picea glauca* con una solución crioprotectora compuesta por sorbitol 0.4 M, DMSO 5% y sacarosa 2% en combinación con un descenso térmico programado ($-0.5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) previo a la inmersión en nitrógeno líquido (-196°C), lograron que el 35% de los explantes sobrevivieran y permanecieran verdes; sin embargo, éstos no prosperaron una vez descongelados y cultivados en un medio para inducir organogénesis. A diferencia de estos resultados, Hargreaves et al. (1999) informaron que el 61% de los cotiledones de *Pinus radiata* brindaron yemas adventicias después de la crioconservación, mediante el empleo de una solución crioprotectora compuesta por 0.4 M sorbitol y 15% DMSO. Posteriormente, estos autores (Hargreaves et al., 2004) desarrollaron un procedimiento descartando el uso de soluciones crioprotectoras e informaron que el 66% de los cotiledones de *Pinus radiata*, produjeron yemas adventicias al ser cultivados en el medio de inducción y desecados por exposición a la corriente de aire del flujo laminar previo a la inmersión en nitrógeno líquido. En el contexto de este trabajo de tesis, la técnica de desecación permitió que la tasa de regeneración y el número de yemas diferenciadas por explante de PEE × PCH se mantuviera estable tras la crioconservación permitiendo que más del 80% de los explantes produjeran brotes adventicios, sin diferenciarse estadísticamente del tratamiento control, sin congelar. Considerando que el híbrido es naturalmente menos tolerante al frío que el *Pinus radiata* debido al origen de sus parentales, principalmente *Pinus caribaea* (Lopez-Upton et al., 1999; Greer et al., 2000; Roden et al., 2009; Cappa et al., 2013), es destacable que sobreviva a una inmersión directa en nitrógeno líquido. Sumado a esto, el desarrollo de procedimientos de baja complejidad y alta efectividad como el obtenido para PEE × PCH y *Pinus radiata*, significan un incentivo a la adopción de sistemas de regeneración de brotes adventicios a partir de embriones o cotiledones. La complejidad en su aplicación y la necesidad de mano de obra calificada para la implementación de los métodos descritos es baja en comparación con los métodos de embriogénesis somática, conserva la ventaja de una amplia captura del genotipo y el mantenimiento de la condición juvenil en nitrógeno líquido. Estos beneficios determinan que la organogénesis adventicia se considere una alternativa válida en el escalado comercial de un sistema de propagación (Hargreaves et al., 2004). Asimismo, desde el punto de vista industrial, la reducción del tiempo de los pretratamientos de criopreservación resulta crucial para mejorar la eficiencia del proceso (Nunes et al., 2017).

6.4. Análisis histológico y estabilidad genética de las vitroplantas

Las plantas de pino híbrido, al igual que la mayoría de las coníferas, son incapaces de producir brotes adventicios en condiciones *ex vitro*, es decir, no pueden naturalmente inducir la formación de nuevos órganos en tejidos que carecen de meristemas preexistentes. Sin embargo, en condiciones *in vitro* el análisis histológico confirmó la formación de yemas adventicias de PEE × PCH a través de un patrón organogénico directo, sin formación de tejido indiferenciado cuando los embriones cigóticos, crioconservados o no, son cultivados en medios de inducción

enriquecidos con citoquininas. Transcurridos tres días de incubación en presencia de luz, la combinación de BA y TDZ promovió la división celular en los tejidos epidérmico y subepidérmico del explante. En consecuencia, las regiones meristemáticas fueron prominentes al séptimo día originando yemas adventicias al cabo de 15 a 21 días. El proceso organogénico culminó con la aparición de los meristemas en forma de cúpula en la superficie transcurridos 30 días de incubación. Nuestros resultados concuerdan con aquellos descritos por George et al. (2008) en el sentido de que los meristemas que darán origen a las yemas adventicias se inician generalmente a partir de divisiones celulares después de unas 48 h de incubación. Como resultado de la división celular se forman nuevos primordios adventicios, compuesto por numerosas células que, en una fase temprana del proceso morfogénico, constituyen una masa esférica de células meristemáticas pequeñas con citoplasma densamente teñido y núcleos grandes que reciben el nombre de meristemoides. Asimismo, Campusano et al. (2019) en un interesante trabajo realizado con *Pseudotsuga menziesii*, describieron el inicio de la división celular a partir del cuarto día de cultivo y posteriormente, la aparición secuencial de pro-meristemoides, amplias zonas meristemáticas y nódulos meristemáticos en los tejidos en contacto con el medio, que dieron lugar a los brotes luego de 22 días de cultivo. Mediante el cultivo de embriones de *Abies amabilis* en presencia de citoquininas, Kulchetscki et al. (1995) observaron que el proceso de inducción de brotes se inició en la región subepidérmica de los cotiledones luego de 3 días de cultivo. Al cabo de 12 días, las zonas meristemáticas localizadas eran claramente visibles y se observaron pequeños brotes con meristemas apicales bien organizados tras 24 días. Por otra parte, los estudios histológicos sobre la ontogenia de la formación de brotes adventicios en embriones maduros de *Pinus halepensis* revelaron cambios estructurales en diferentes partes del explante. La inducción de divisiones mitóticas en el medio de cultivo se inició entre los 3 y 5 días dando lugar a la formación de meristemoides en las capas epidérmicas y subepidérmicas del explante transcurridos 11 días de incubación. Numerosas yemas adventicias se observaron en la periferia del hipocótilo y en las axilas de cotiledones adyacentes a los 22 días de cultivo (Lambardi et al., 1993).

Por otra parte, la fidelidad genética de las plantas de pino propagadas por organogénesis ha sido escasamente estudiada (Cuesta et al., 2010). En este sentido, en programas de mejoramiento genético, la variación somaclonal puede constituirse en un recurso importante que genera variabilidad; sin embargo, durante la micropropagación y en bancos de germoplasma *in vitro*, su aparición es indeseable (Chiang y Jiménez, 2009). Por tal motivo, la evaluación de la estabilidad genética de las plantas obtenidas por cultivo de tejidos, que asegure que el material regenerado es genéticamente idéntico al material donante, es un requisito indispensable para integrar con éxito la propagación vegetativa en la silvicultura operativa (Marum et al., 2018). Los mecanismos por los cuales ocurre la variación somaclonal no han sido completamente dilucidados. Sin embargo, se han propuesto varias causas de posible incidencia en la ocurrencia de ésta. Entre ellas se incluyen: el genotipo, la fuente de explante, el tiempo en cultivo, las

condiciones y composición del medio de cultivo y la vía de regeneración (Cardone et al., 2010). Según Varshney et al. (2001), las vitroplantas derivadas de brotes adventicios formados directamente de tejidos del explante cultivado, son más resistentes a los cambios genéticos que el material obtenido de manera indirecta a partir de callos indiferenciados. Cuando ocurre un desarrollo directo hacia regeneración a partir de yemas apicales, axilares y embriones, la mayoría de los cultivos organizados mantienen una estricta estabilidad genotípica y fenotípica en condiciones de cultivo *in vitro* (Chiang & Jiménez, 2009). En efecto, para evaluar la uniformidad de las plantas obtenidas por organogénesis, con y sin pretratamiento de crioconservación empleamos el análisis ISSR. Aunque se observó cierta variabilidad entre individuos, era de esperar una diversidad genética natural atribuida al empleo de semillas F₂ como fuente de explante. En este sentido, el análisis de agrupamiento basado en la distancia genética de Jaccard reveló que el 90% de los individuos, independientemente del tratamiento recibido, presentaban una distancia genética inferior a 0.16. Esto sugiere que la formación directa de yemas adventicias a partir de embriones cigóticos maduros podría utilizarse para la propagación clonal del pino híbrido, minimizando el riesgo de estimular variantes somaclonales. Resultados similares fueron reportados en plantas de *Pinus pinea* obtenidas por organogénesis directa, sin evidencias de alteraciones morfológicas y con resultados de los análisis ISSR y RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) que indican ausencia de variación genética durante el cultivo *in vitro* (Cuesta et al., 2008, 2010). Asimismo, Takagi et al. (2011), obtuvieron plantas de *Titanotrichum oldhamii* con el mismo nivel de ploidía que las plantas madre por regeneración directa, mientras que, detectaron duplicación cromosómica cuando las yemas adventicias se originaron de manera indirecta a través de la proliferación de un tejido indiferenciado o callo. De igual modo, la neoformación de yemas a través de un patrón indirecto constituyó una fuente de variabilidad genética en dos especies de *Agave* (Martínez Velazco et al., 2022). Según Cardone et al. (2010), la desdiferenciación que ocurre durante la inducción del callo, altera procesos celulares que resultan en cambios genómicos importantes; siendo uno de los más frecuentes la inestabilidad cromosómica. Sin embargo, tras la verificación individual de variantes somáticas de *Picea glauca*, el conteo de cromosoma reveló el número normal para la especie ($2n = 24$) y fue necesario realizar un análisis molecular exhaustivo para la identificación de la secuencia de nucleótidos de ADN asociada a dichas variantes (Isabel et al., 1996). Por otra parte, DeVerno y colaboradores detectaron variación somaclonal en cultivos embriogénicos de *Larix spp* (1994) y *Picea glauca* (1999) pero no en las plantas regeneradas a partir de estos; concluyendo que el tejido indiferenciado, puede estar compuesto por una mezcla de células genéticamente alteradas y no alteradas, y que pueden o no ser evidentes en los árboles regenerados.

La variación somaclonal es un problema muy complejo que necesita varios enfoques para ser apreciado correctamente (Fourre et al., 1997). En el contexto de esta tesis, el análisis de estabilidad genética se complementa con un estudio morfo-fisiológico comparativo entre vitroplantas, plántulas de semilla y plántulas obtenidas por macropropagación, como así también,

con una evaluación del comportamiento a campo, todas valiosas herramientas que permiten definir a este, como un sistema propicio para la propagación de PEE×PCH.

CONCLUSIONES



7. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un procedimiento sencillo y fiable para preservar y propagar el germoplasma de *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis* utilizando la regeneración adventicia de brotes a partir de embriones cigóticos maduros. El mismo permite obtener plantas aptas para el establecimiento a campo en 16 meses a través de un proceso que considera 7 meses de cultivo en condiciones *in vitro*, seguido de 9 meses de aclimatación y rustificación en vivero.
2. La criopreservación de embriones cigóticos maduros fue posible mediante la exposición del explante durante 120 minutos a la corriente de aire del flujo laminar y la posterior inmersión en nitrógeno líquido.
3. La formación de yemas adventicias se optimizó al cultivar los embriones cigóticos en el medio $\frac{1}{2}$ MS suplementado con sacarosa 0.09 M, 0.5 μ M BA, 0.5 μ M TDZ y 6.5 gr·L⁻¹ de agar, durante 30 días.
4. Las observaciones histológicas confirmaron que las yemas adventicias se originan de manera directa a partir de células subepidérmicas, sin evidenciarse diferencias ontogénicas entre los explantes con y sin crioconservar.
5. El crecimiento de las yemas diferenciadas se estimuló al transferir los explantes inducidos a recipientes de 200 mL de capacidad provisto de un sistema de aireación asistida conteniendo el mismo medio nutritivo, sin reguladores de crecimiento vegetal y solidificado con 3.5 gr·L⁻¹ de Phytigel®.
6. El enraizamiento *in vitro* de los brotes elongados fue promovido utilizando un pretratamiento durante 5 minutos con 1.25 mM de IBA, seguido de la transferencia a $\frac{1}{4}$ MS desprovisto de hormonas y con aireación asistida.
7. Las vitroplantas sometidas a una situación de déficit hídrico, como así también, las establecidas a campo presentaron un comportamiento similar al de las plantas obtenidas por métodos convencionalmente utilizados en la región (macropropagación y germinación de semillas).
8. El análisis de variación somaclonal de las plántulas obtenidas por organogénesis y germinación *in vitro* de embriones no congelados y crioconservados demostró que los procedimientos desarrollados para la conservación y obtención de brotes organogénicos no afectaron la estabilidad genética del germoplasma objeto de estudio.

BIBLIOGRAFÍA



8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aitken-Christie, J., Singh, A. P., Davies, H. (1988). Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiata pine. In: Hanover, J.W., Keathley, D.E., Wilson, C.M., Kuny, G. (eds) Genetic manipulation of woody plants. Basic Life Sciences, vol 44. Springer, Boston, MA. pp: 413-432. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1661-9_26

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.). Annals of Forest Science 63: 879-885. <https://doi.org/10.1051/forest:2006071>

Alvarez, J. M., Bueno, N., Cuesta, C., Feito, I., Ordás, R. J. (2020). Hormonal and gene dynamics in *de novo* shoot meristem formation during adventitious caulogenesis in cotyledons of *Pinus pinea*. Plant Cell Reports 39: 527-541. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02508-0>

Alvarez, J. M., Majada, J., Ordás, R. J. (2009). An improved micropropagation protocol for maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) isolated cotyledons. Forestry 82: 175-184. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpn052>

Amoo, S.O., Finnie, J.F., Van Staden, J. (2009). Effects of temperature, photoperiod and culture vessel size on adventitious shoot production of in vitro propagated *Huernia hystrix*. Plant Cell Tiss Organ Cult 99: 233-238. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9592-0>

Balzarini, M. G., Di Rienzo, J. A. (2013). InfoGen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. versión 2013. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <https://www.info-gen.com.ar/>

Barrett, W. H. G., Danner, S. M., Hennig, A. (1991). Híbridos de *P. elliotii* var. *elliottii* × *P. caribaea* var. *hondurensis* en cultivo en el norte de Corrientes. Jornadas sobre *Pinus Caribaea*. Eldorado, Misiones (Argentina). 25-26 de abril 1992.

Benson, E. E., Johnston, J., Muthusamy, J., Harding, K. (2008). Physical and engineering perspectives of *in vitro* plant cryopreservation. In: Gupta, S.D., Ibaraki, Y. (eds) Plant Tissue Culture Engineering. Focus on Biotechnology, vol 6. Springer, Dordrecht. pp: 441-476. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3694-1_24

Bhojwani, S. S., Dantu, P. K. (2013^a). Micropropagation. In: Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer, India. pp: 245-274. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_17

Bhojwani, S. S., Dantu, P. K. (2013^b). Culture Media. In: Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer, India. pp: 27-37. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_3

Bidabadi, S. S., Jain, S. M. (2020). Cellular, molecular, and physiological aspects of in vitro plant regeneration. Plants 9: 702. <https://doi.org/10.3390/plants9060702>

Bonga, J. M. (2014). A comparative evaluation of the application of somatic embryogenesis, rooting of cuttings, and organogenesis of conifers. *Canadian Journal of Forest Research* 45: 379-383. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2014-0360>

Bonga, J. M. (2016). Conifer clonal propagation in tree improvement programs. In: Yill-Sung Park, Jan M Bonga, Heung-Kyu Moon (eds) *Vegetative Propagation of Forest Trees*. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, Korea. pp: 3-31.

Brugnoli, E. A., Urbani, M. H., Quarin, C. L., Martínez, E. J., Acuña, C. A. (2013). Diversity in diploid, tetraploid, and mixed diploid–tetraploid populations of *Paspalum simplex*. *Crop Science* 53: 1509-1516. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.08.0497>

Bueno, N., Cuesta, C., Centeno, M. L., Ordás, R. J., Alvarez, J. M. (2021). In vitro plant regeneration in conifers: the role of WOX and KNOX gene families. *Genes* 12: 438. <https://doi.org/10.3390/genes12030438>

Bunse, G. (2003). Pinos híbridos en la provincia de Corrientes. Jornada Técnica Foresto-industrial Híbridos de PEE× PCH. INTA EEA.

Calixto, F., Pais, M. S. (1997). Adventitious shoot formation and plant regeneration from *Pinus pinaster* Sol. ex Aiton. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 33: 119-124. <https://doi.org/10.1007/s11627-997-0008-8>

Cappa, E. P., Marcó, M., Nikles, D. G., Last, I. S. (2013). Performance of *Pinus elliotii*, *Pinus caribaea*, their F₁, F₂ and backcross hybrids and *Pinus taeda* to 10 years in the Mesopotamia region, Argentina. *New Forests* 44: 197-218. <https://doi.org/10.1007/s11056-012-9311-2>

Cardone S., Olmos S., Echenique V. (2010). Variación Somaclonal. In: Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L. (eds) *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*, vol II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. pp: 229-241.

Cerrillo, R. M. N., Rodríguez, R. M., Mateos, D. A. (2004). Fluorescencia de la clorofila en cinco procedencias de "*Pinus halepensis*" Mill y su respuesta a estrés hídrico. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* 17: 69-74.

Chávez Milián, M. (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.

Chiang, N. S., Jiménez, V. M. (2009). Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana* 20: 135-151. <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4989>

Cortizo, S. (2011). Mejoramiento genético del álamo, una ciencia en apoyo a la producción forestal sostenible. Tercer Congreso Internacional de las Salicáceas en Argentina. Neuquén. (Argentina). 16 de marzo 2011.

Cregg, B. M., Zhang, J. W. (2001). Physiology and morphology of *Pinus sylvestris* seedlings from diverse sources under cyclic drought stress. *Forest Ecology and Management* 154: 131-139. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00626-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00626-5)

Cseresnyés, I., Szitár, K., Rajkai, K., Füzy, A., Mikó, P., Kovács, R., Takács, T. (2018). Application of electrical capacitance method for prediction of plant root mass and activity in field-grown crops. *Frontiers in Plant Science* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00093>

Cuesta, C., Ordás, R.J., Fernández, B. Rodríguez A. 2008. Clonal micropropagation of six selected half-sibling families of *Pinus pinea* and somaclonal variation analysis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 95: 125-130. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9412-y>

Cuesta, C., Ordas, R. J., Rodriguez, A., Fernández, B. (2010). PCR-based molecular markers for assessment of somaclonal variation in *Pinus pinea* clones micropropagated *in vitro*. *Biología Plantarum* 54: 435-442. <https://doi.org/10.1007/s10535-010-0079-y>

Dagla, H. R. (2012). Plant tissue culture. *Resonance* 17: 759-767. <https://doi.org/10.1007/s12045-012-0086-8>

Debergh, P. C. (1983). Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum* 59: 270-276. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1983.tb00770.x>

De Diego, N., Montalbán, I. A., Fernández de Larrinoa, E., Moncaleán, P. (2008). *In vitro* regeneration of *Pinus pinaster* adult trees. *Canadian Journal of Forest Research* 38: 2607-2615. <https://doi.org/10.1139/X08-102>

De Diego, N., Pérez-Alfocea, F., Cantero, E., Lacuesta, M., Moncaleán, P. (2012). Physiological response to drought in radiata pine: phytohormone implication at leaf level. *Tree Physiology* 32: 435-449. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps029>

DeVerno, L.L., Charest, P.J. Bonen, L. (1994). Mitochondrial DNA variation in somatic embryogenic cultures of *Larix*. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 727-732. <https://doi.org/10.1007/BF01253977>

DeVerno, L., Park, Y., Bonga, J., Barrett, J. (1999). Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss.]. *Plant Cell Reports* 18: 948-953. <https://doi.org/10.1007/s002990050689>

Dias, M. C., de Oliveira, J. M. P. F., Marum, L., Pereira, V., Almeida, T., Nunes, S., Araujo, M., Moutinho-Pereira, J., Correia, C. M., Santos, C. (2022). *Pinus elliottii* and *P. elliottii* × *P. caribaea* hybrid differently cope with combined drought and heat episodes. *Industrial Crops and Products* 176: 114428. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114428>

Díaz-Sala, C. (2019). Molecular dissection of the regenerative capacity of forest tree species: Special focus on conifers. *Frontiers in Plant Science* 9: 1943. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01943>

Dieters, M., Brawner, J. (2007). Productivity of *Pinus elliottii*, *P. caribaea* and their F₁ and F₂ hybrids to 15 years in Queensland, Australia. *Annals of Forest Science* 64: 691-698. <https://doi.org/10.1051/forest:2007049>

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., Robledo, C. W. (2011). InfoStat: Software para análisis estadístico de datos. Versión 2011. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <https://www.infostat.com.ar/>

Dirección Nacional de Desarrollo Foresto Industrial (2019). Inventario nacional de plantaciones Forestales por superficie. <https://datos.agroindustria.gob.ar/dataset/inventario-nacional-plantaciones-forestales-por-superficie>

Doyle, J. H., Verhoeven, R. L., Bester, C., Wingfield, B. D., Botha, A.-M., Bornman, C. H. (2002). Germ-furrow morphology and storage conditions determine the degree of viability of *Pinus caribaea* pollen. *South African Journal of Botany* 68: 457-463. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30374-4](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30374-4)

Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M., Sangwan, R. S. (2011). De novo shoot organogenesis: from art to science. *Trends in Plant Science* 16: 597-606. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.004>

Engelmann, F. (2011). Cryopreservation of embryos: an overview. In: Thorpe, T., Yeung, E. (eds) *Plant Embryo Culture, Methods in Molecular Biology*, vol 710. Humana Press. pp: 155-184. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8_13

Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18: 743-748. <https://doi.org/10.1007/s002990050653>

FAO. (2012). Estado de los Recursos Genéticos Forestales en el mundo. Informe Nacional, Argentina. pp: 6-13.

Feito, I., Gonzáles, A., Centeno, M. L., Fernández, B., Rodríguez, A. (2021). Transport and distribution of benzyladenine in *Actinidia deliciosa* explants cultured in liquid and solid media. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 909-916. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01309-2](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01309-2)

Ford, C. S., Jones, N. B., Van Staden, J. (2000). Cryopreservation and plant regeneration from somatic embryos of *Pinus patula*. *Plant Cell Reports* 19: 610-615. <https://doi.org/10.1007/s002990050781>

Fortes, N. B. (2011). Clonación de *Pinus elliottii* var. *elliottii* × *Pinus caribaea* var. *hondurensis* mediante el uso de biorreactores de inmersión temporal. Tesis para optar al grado de Magíster en Manejo de Recursos Forestales. Universidad Nacional del Nordeste. 92 páginas.

Fourré, J.L., Berger, P., Niquet, L., André P. (1997). Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 159-169. <https://doi.org/10.1007/s001220050395>

Ganapathi, A., Anbazhagan, V. R., Amutha, S., Anand, R. P. (2003). *In Vitro* Organogenesis. In: Jaiwal, P.K., Singh, R.P. (eds) *Improvement Strategies of Leguminosae Biotechnology. Focus on Biotechnology*, vol 10A. Springer, Dordrecht. pp: 65-85. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0109-9_3

García Campusano, F., Monjarás González, G., Galindo Flores, G., Ponce Mendoza, A., Chávez Ávila, V. M., Márquez Guzmán, J. (2019). Morfogénesis *in vitro* de brotes adventicios del pinabete mexicano *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 56: 113-135. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.545>

Gauchat, M., Rodríguez, G., Belaber, E., Bischoff, D. (2005). *Pinus elliotii* var. *elliotii* × *P. caribaea* var. *hondurensis*. Híbridos de Alta Productividad Combinando Crecimiento y Forma. *IDIA XXI Forestales* 8: 162-164.

George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, G.-J. (2008). Plant tissue culture procedure-background. In: George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.J.D. (eds) *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht. pp: 1-28. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_1.

Go, N. E., Perez-Orozeo, G. D., Halos, S. C. (1993). *In vitro* response of embryos from different provenances of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Morelet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 1-7. <https://doi.org/10.1007/BF00040109>

González, A. M., Cristóbal, C. L. (1997). Anatomía y ontogenia de semillas de *Helicteres lhotzkyana* (Sterculiaceae). *Bonplandia* 9: 287-294.

González, M., Engelmann, F. (2013). Consideraciones teóricas y prácticas para la crioconservación de germoplasma vegetal. En: González, M., Engelmann, F. (eds) *Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Costa Rica. pp: 38-51.

Greer, D. H., Robinson, L. A., Hall, A. J., Klages, K., Donnison, H. (2000). Frost hardening of *Pinus radiata* seedlings: effects of temperature on relative growth rate, carbon balance and carbohydrate concentration. *Tree Physiology* 20: 107-114. <https://doi.org/10.1093/treephys/20.2.107>

Guo, B., Abbasi, B. H., Zeb, A., Xu, L. L., Wei, Y. H. (2011). Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology* 10: 8984-9000. <https://doi.org/10.5897/AJB11.636>

Häggman, H. M., Rynänen, L. A., Aronen, T. S., Krajnakova, J. (1998). Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 45-53. <https://doi.org/10.1023/A:1006104325426>

Haines, R. J., Nikles, D. G. (1987). Mass propagation of superior families and individual genotypes of some conifers in Queensland. *Australian Forestry* 50: 106-111. <https://doi.org/10.1080/00049158.1987.10674502>

Halos, S. C., Go, N. E. (1993). Micropropagation of *Pinus caribaea* Morelet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 47-53. <https://doi.org/10.1007/BF00040115>

Harding, K. J., Copley, T. R. (2000). Wood property variation in Queensland-grown slash × caribaeian pine hybrids. Symposium: Hybrid breeding and genetics of forest trees. Proceedings of QFRI/CRC-SPF, Department of Primary Industries, Brisbane., Noosa, Queensland, Australia. pp: 160-167.

Hargreaves, Cathy., Foggo, Martin., Smith, Dale., Gordon, Margaret. (1999). Development of protocols for the cryopreservation of zygotic embryos of *Pinus radiata* and subsequent plant regeneration. *New Zealand Journal of Forestry Science* 29: 54-63.

Hargreaves, C., Grace, L., Maas, S. Van Der, Reeves, C., Holden, G., Menzies, M., Kumar, S., Foggo, M. (2004). Cryopreservation of *Pinus radiata* zygotic embryo cotyledons: effect of storage duration on adventitious shoot formation and plant growth after 2 years in the field. *Canadian Journal of Forest Research* 34: 600-608. <https://doi.org/10.1139/x03-226>

Hargreaves, C., Menzies, M. (2007). Organogenesis and cryopreservation of juvenile radiata pine. In: Jain, S.M., Häggman, H. (eds) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer, Dordrecht. pp: 51-65. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6352-7_6

Harry, I. S., Thorpe, T. A. (1994). Regeneration of plantlets through organogenesis from mature embryos of jack pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37: 159-164. <https://doi.org/10.1007/BF00043610>

Hossin, M., Sulaiman, M. N. (2015). A review on evaluation metrics for data classification evaluations. *International Journal of Data Mining & Knowledge Management Process* 5: 1-11. <https://doi.org/10.5121/ijdkp.2015.5201>

Huetteman, C. A., Preece, J. E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 105-119. <https://doi.org/10.1007/BF01983223>

Humánez, A., Blasco, M., Brisa, C., Segura, J., Arrillaga, I. (2011). Thidiazuron enhances axillary and adventitious shoot proliferation in juvenile explants of Mediterranean provenances of maritime pine (*Pinus pinaster*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47: 569-577. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9397-9>

Isabel, N., Boivin, R., Levasseur, C., Charest, P. M., Bousquet, J., Tremblay, F. M. (1996). Occurrence of somaclonal variation among somatic embryo-derived white spruces (*Picea glauca*, Pinaceae). *American journal of botany* 83: 1121-1130. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb13892.x>

Islam, M.T., Dembele, D.P., Keller, E.J. (2005). Influence of explant, temperature and different culture vessels on in vitro culture for germplasm maintenance of four mint accessions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 123-130. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-3307-3>

ISTA. (2007). Tetrazolium test. In: *International Rules for Seed testing*. Seed Science and Technology, Paris, France. pp: 6-10.

Kakani, A., Li, G., Peng, Z. (2009). Role of AUX1 in the control of organ identity during *in vitro* organogenesis and in mediating tissue specific auxin and cytokinin interaction in Arabidopsis. *Planta* 229: 645-657. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0846-6>

Kalita, V., Choudhury, H., Kumaria, S., Tandon, P. (2012). Vitrification-based Cryopreservation of Shoot-tips of *Pinus kesiya* Royle ex. Gord. *CryoLetters* 33: 58-68.

Kamra, S.K. (1972) Comparative studies on germinability of *Pinus silvestris* and *Picea abies* seed by the indigo carmine and X-ray contrast methods. *Stud for Suec* 99: 1–21

Kulchetscki, L., Harry, I. S., Yeung, E. C., Thorpe, T. A. (1995). *In vitro* regeneration of Pacific silver fir (*Abies amabilis*) plantlets and histological analysis of shoot formation. *Tree physiology* 11: 727-738. <https://doi.org/10.1093/treephys/15.11.727>

Laine, E., Bade, P., David, A. (1992). Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of *Pinus caribaea*. *Plant Cell Reports* 11: 295-298. <https://doi.org/10.1007/BF00235085>

Lambardi, M., Sharma, K. K., Thorpe, T. A. (1993). Optimization of *in vitro* bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 29: 189-199. <https://doi.org/10.1007/BF02632034>

Lopez-Upton, J., White, T. L., Huber, D. A. (1999). Taxon and family differences in survival, cold hardiness, early growth, and rust incidence of Loblolly pine, Slash pine and some Pine hybrids. *Silvae Genetica* 48: 303-312.

Loriaux, S. D., Avenson, T. J., Welles, J. M., McDermitt, D. K., Eckles, R. D., Riensche, B., Genty, B. (2013). Closing in on maximum yield of chlorophyll fluorescence using a single multiphase flash of sub-saturating intensity. *Plant, Cell & Environment* 36: 1755-1770. <https://doi.org/10.1111/pce.12115>

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* 49: 326-332.
<https://doi.org/10.1007/s11627-013-9500-5>

Lv, C., Huang, B. (2012). Stem Tissue Culture of *Pinus elliottii* × *Pinus caribaea*. 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology. Macau, Macao. 28-30 May 2012. pp: 1700-1703. <https://doi.org/10.1109/iCBEB.2012.366>

Marcó, M. (2005). Conceptos generales del mejoramiento genético forestal y su aplicación a los bosques cultivados de la Argentina. En: Mejores Árboles para más Forestadores (1º edición). Secretaría Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, Buenos Aires. pp: 9-17.

Marco Medina, A., Serrano Martínez, F. (2012). Crioconservación: herramienta para la conservación *ex situ* de material vegetal. Cuadernos de Biodiversidad 38: 9-12.
<http://dx.doi.org/10.14198/cdbio.2012.38.03>

Marcó, M., Gauchat, M. E., López, J. A., Cortizo, S. C., López Lauenstein, D., Fornés, L., Pastorino, M. J., Poltri, S. M., Pastorino, M. J. (2016). Domesticación y mejoramiento de especies forestales. Ministerio de Agroindustria. Unidad para el Cambio Rural. 201 páginas.

Marum, L., Nunes, S., Almeida, T., Pereira, V. T., Farinha, N., Dias, M. C., Santos, C. (2018). Cryopreservation of Hybrid *Pinus elliottii* × *P. caribaea*. In: Jain, S., Gupta, P. (eds) Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Forestry Sciences, vol 84. Springer, Cham. pp: 283-294. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89483-6_21

Mathur, G., Nadgouda, R. (1999). *In vitro* plantlet regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus wallichiana* AB Jacks. *Plant Cell Reports* 19: 74-80.
<https://doi.org/10.1007/s002990050713>

Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 247: 125-142. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>

Menzies, M. I., Holden, D. G., Klomp, B. K. (2001). Recent trends in nursery practice in New Zealand. *New Forests* 22: 3-17. <https://doi.org/10.1023/A:1012027013173>

Mesa de Competitividad Foresto Industrial. (2019). Plan Estratégico Forestal y Foresto Industrial Argentina 2030. Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca, Ministerio de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología. 180 páginas.

Meyer, H. J. (1998). *In vitro* formation of adventitious buds on mature embryos of *Pinus elliottii* Engelm. × *P. caribaea* Morelet hybrids. *South African Journal of Botany* 64: 220-225.
[https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30872-3](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30872-3)

Miller, L. K., DeBell, J. (2013). Current seed orchard techniques and innovations. National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations RMRS-P-69, pp: 80-86.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2010). Programa de Domesticación y Mejoramiento de Especies Forestales Nativas e Introducidas para Usos de Alto Valor. 6 páginas.

Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas (2019). Informes de Cadenas de Valor: Forestal, papel y muebles. 38 páginas.

Moncaleán, P., Alonso, P., Centeno, M. L., Cortizo, M., Rodríguez, A., Fernández, B., Ordás, R. J. (2005). Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. *Tree Physiology* 25: 1-9. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.1.1>

Montalbán, I. A., De Diego, N., Aguirre Igartua, E., Setién, A., Moncaleán, P. (2011). A combined pathway of somatic embryogenesis and organogenesis to regenerate radiata pine plants. *Plant Biotechnology Reports* 5: 177-186. <https://doi.org/10.1007/s11816-011-0171-6>

Motte, H., Vereecke, D., Geelen, D., Werbrouck, S. (2014). The molecular path to *in vitro* shoot regeneration. *Biotechnology Advances* 32: 107-121. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.002>

Motyka, V., Kamínek, M. (1990). Regulation of cytokinin catabolism in tobacco callus cultures. *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology: Proceedings of the VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam, The Netherlands, 24–29 June 1990*, pp: 492-497.

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

Murthy, B. N. S., Murch, S. J., Saxena, P. K. (1998). Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 34: 267-275. <https://doi.org/10.1007/BF02822732>

Nikles, D. G. (1996). The first 50 years of the evolution of forest tree improvement in Queensland. *Tree improvement for sustainable tropical forestry. QFRI-IUFRO Conference, Caloundra, Queensland, Australia, 27 October-1 November 1996*, pp: 51-64.

Nikles, D. G. (2000). Experience with some *Pinus* hybrids in Queensland, Australia. *Symposium: "Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees" Proceedings of QFRI/CRC-SPF. Noosa, Queensland, Australia. April, 9-14 2000.*

Nunes, S., Marum, L., Farinha, N., Pereira, V. T., Almeida, T., Dias, M. C., Santos, C. (2017). Plant regeneration from ploidy-stable cryopreserved embryogenic lines of the hybrid *Pinus elliottii* × *P. caribaea*. *Industrial Crops and Products* 105: 215-224. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.015>

Nunes, S., Marum, L., Farinha, N., Pereira, V. T., Almeida, T., Sousa, D., Mano, N., Figueiredo, J., Dias, M. C., Santos, C. (2018). Somatic embryogenesis of hybrid *Pinus elliottii* var.

elliottii × *P. caribaea* var. *hondurensis* and ploidy assessment of somatic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 132: 71-84. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1311-7>

Nunes, S., Sousa, D., Pereira, V. T., Correia, S., Marum, L., Santos, C., Dias, M. C. (2018). Efficient protocol for *in vitro* mass micropropagation of slash pine. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 54: 175-183. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9891-4>

Ojeda-Zacarías, M. C., Iracheta-Donjuan, L., López-Gómez, P., Zavala-García, F., García-Zambrano, E. A. (2015). Respuesta rizogénica en *Pinus maximartinezii* Rzedowski. *Polibotánica* 40: 127-135.

Orellana, P. (1998). Propagación vía organogénesis. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología* 1: 151-178.

Ozudogru, E. A., Lambardi, M. (2016). Cryotechniques for the long-term conservation of embryogenic cultures from woody plants. In: Germana, M., Lambardi, M. (eds) *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology*, vol 1359. Humana Press, New York, NY. pp: 537-550. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_32

Park, Y.-S., Beaulieu, J., Bousquet, J. (2016). Multi-varietal forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis. In Yill-Sung Park, Jan M Bonga, Heung-Kyu Moon (eds) *Vegetative Propagation of Forest Trees*. National Institute of Forest Science (NiFos). Seoul, Korea. pp: 302-322.

Pereira, C., Montalbán, I. A., Pedrosa, A., Tavares, J., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N., Canhoto, J., Moncaleán, P. (2021). Regeneration of *Pinus halepensis* (Mill.) through organogenesis from apical shoot buds. *Forests* 12: 363. <https://doi.org/10.3390/f12030363>

Pérez-Bermúdez, P., Sommer, H. E. (1987). Factors affecting adventitious bud induction in *Pinus elliottii* (Engelm.) embryos cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 11: 25-35. <https://doi.org/10.1007/BF00036573>

Pijut, P. M. (1991). Effect of embryo explant orientation, thidiazuron, and agar on eastern white pine (*Pinus strobes* L.) adventitious shoot initiation. *Symposium on Applications of Biotechnology to tree Culture, Protection and Utilization*. Columbus, Ohio. August, 5-8 1991.

Prism, G. (2014). GraphPad: Software para el análisis de datos para la investigación científica. Versión 6.0. <https://www.graphpad.com/features>

Raspor, M., Motyka, V., Kaleri, A. R., Ninković, S., Tubić, L., Cingel, A., Ćosić, T. (2021). Integrating the roles for cytokinin and auxin in de novo shoot organogenesis: from hormone uptake to signaling outputs. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 8554. <https://doi.org/10.3390/ijms22168554>

Roden, J. S., Canny, M. J., Huang, C. X., Ball, M. C. (2009). Frost tolerance and ice formation in *Pinus radiata* needles: ice management by the endodermis and transfusion tissues. *Functional Plant Biology* 36: 180-189. <https://doi.org/10.1071/FP08247>

Rodríguez Beraud, M., Morales Ulloa, D. (2015). Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedades Brigitta y Legacy. *Scientia Agropecuaria* 6: 31-40. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.03>

Salaj, T., Panis, B., Swennen, R., Salaj, J. (2007). Cryopreservation of embryogenic tissues of *Pinus nigra* Arn. by a slow freezing method. *CryoLetters* 28: 69-76.

Salas-Barboza, J. E. E., Agramonte-Peñalver, D., Jiménez, T. F., Collado, L. R., Pérez, P. M. (2006). Caracteres morfológicos de plantas de *Morus alba* L. derivadas del cultivo *in vitro* en condiciones de campo. *Ra Ximhai* 2: 469-479.

Sang, Y. L., Cheng, Z. J., Zhang, X. S. (2018). Plant stem cells and de novo organogenesis. *New Phytologist* 218: 1334-1339. <https://doi.org/10.1111/nph.15106>

Sansberro, P. A., Mroginski, L. A., Bottini, R. (2004). Foliar sprays with ABA promote growth of *Ilex paraguariensis* by alleviating diurnal water stress. *Plant Growth Regulation* 42: 105-111. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000017476.12491.02>

Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. (2017). Informe del Estado del Ambiente. 716 páginas.

Servicio Meteorológico Nacional, Argentina. <https://www.smn.gob.ar>

Sherif, N. A. (2018). Impact of plant tissue culture on agricultural sustainability. In: Negm, A., Abu-hashim, M. (eds) *Sustainability of Agricultural Environment in Egypt: Part II. The Handbook of Environmental Chemistry*, vol 77. Springer, Cham. pp: 93-107. https://doi.org/10.1007/698_2017_160

Slee, M. U. (1970). Crossability values within the slash-caribbean *Pinus* species complex. *Euphytica* 19: 184-189. <https://doi.org/10.1007/BF01902943>

Sommer, H. E., Brown, C. L., Kormanik, P. P. (1975). Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured *in vitro*. *Botanical Gazette* 136: 196-200. <https://doi.org/10.1086/336802>

Stojičić, D., Janošević, D., Uzelac, B., Čokeša, V., Budimir, S. (2012). Micropropagation of *Pinus peuce*. *Biologia Plantarum* 56: 362-364. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0099-x>

Sul, I. I. I. W., Korban, S. S. (2004). Effects of salt formulations, carbon sources, cytokinins, and auxin on shoot organogenesis from cotyledons of *Pinus pinea* L. *Plant Growth Regulation* 43: 197-205. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000046013.47892.4f>

Sul, I.-W., Korban, S. S. (1998). Effects of media, carbon sources and cytokinins on shoot organogenesis in the Christmas tree Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73: 822-827. <https://doi.org/10.1080/14620316.1998.11511054>

Takagi, H., Sugawara, S., Saito, T., Tasaki, H., Yuanxue L., Kaiyun G., Han D.S., Godo T., Nakano M. (2011). Plant regeneration via direct and indirect adventitious shoot formation and chromosome-doubled somaclonal variation in *Titanotrichum oldhamii* (Hemsl.) Solereder. *Plant Biotechnology Report* 5: 187-195. <https://doi.org/10.1007/s11816-011-0172-5>

Tang, W., Newton, R. J., Charles, T. M. (2006). Plant regeneration through multiple adventitious shoot differentiation from callus cultures of slash pine (*Pinus elliottii*). *Journal of Plant Physiology* 163: 98-101. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.04.030>

Tian, X., Zhang, C., Xu, J. (2018). Control of cell fate reprogramming towards de novo shoot organogenesis. *Plant and Cell Physiology* 59: 713-719. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx207>

Toivonen, P. M. A., Kartha, K. K. (1989). Cryopreservation of cotyledons of nongerminated white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] embryos and subsequent plant regeneration. *Journal of Plant Physiology* 134: 766-768. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(89\)80042-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80042-2)

Varshney, A., Lakshmikumaran, M., Srivastava, P. S., Dhawan, V. (2001). Establishment of genetic fidelity of *in vitro*-raised *Lilium* bulblets through RAPD markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 37: 227-231. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0040-z>

Velasco, I. M. y Fernández, A. M. A. (2022). Analysis of the somaclonal variation in two *in vitro* regenerated agave species. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 25: 1-12. <http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.3709>

Von Aderkas, P., Bonga, J. M. (2000). Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiology* 20: 921-928. <https://doi.org/10.1093/treephys/20.14.921>

Wendling, I., Trueman, S. J., Xavier, A. (2014). Maturation and related aspects in clonal forestry—part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. *New Forests* 45: 473-486. <https://doi.org/10.1007/s11056-014-9415-y>

Yamamoto, T., Iketani, H., Ieki, H., Nishizawa, Y., Notsuka, K., Hibi, T., Hayashi, T., Matsuta, N. (2000). Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports* 19: 639-646. <https://doi.org/10.1007/s002999900174>

Zhang, Y., 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. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9004-z>

Zhu, M., Wang, J., Yu, Y., Liu, S., Wei, Z. (2007). Efficient organogenesis and plantlet regeneration in the timber species *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 43: 449-455. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9092-z>