



XXIV Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CA-031 (ID: 1222)

Autor: Barone, Javier Orlando

Título: Efecto del medio basal en la organogénesis directa de Pinus taeda L.

Director:

Palabras clave: nutrición mineral, regeneración, cultivo in vitro

Área de Beca: Cs. Agropecuarias

Tipo Beca: Conicet

Periodo: 01/04/2015 al 01/04/2020

Lugar de trabajo: Ibone - Inst. De Botánica Del Nordeste

Proyecto: (16A001) Desarrollo de Sistemas de Propagación Clonal de Especies de Interés Forestal e Industrial mediante el uso de Biorreactores de Inmersión Temporal

Resumen:

El éxito del cultivo de tejidos vegetales como un medio de propagación de plantas está fuertemente influenciado por la naturaleza del medio de cultivo utilizado. Tradicionalmente, las formulaciones nutritivas fueron desarrolladas en base a experimentos factoriales donde se analizaba de uno a tres factores a la vez. Como resultado de ello, el medio basal de Murashige y Skoog en su formulación original o diluido, es utilizado ampliamente en el cultivo de tejidos de la mayoría de las especies; a la vez que se lo referencia para modificar otras formulaciones. En *P. taeda* se han utilizado formulaciones químicamente definidas como ser, el medio basal DCR para la generación de embriones somáticos y para la proliferación de brotes axilares en micropropagación; o el medio LP para la producción de embriones somáticos.

Por otra parte, se han desarrollado medios específicos como el WV5 y WV3 con combinaciones de sales que optimizan las respuestas in vitro de *P. taeda*. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes medios basales sobre la regeneración de yemas adventicias a partir de embriones cigóticos maduros de *Pinus taeda*.

Se evaluaron los medios basales medios MS, DCR, LP, WV3 y WV5 al 100 y al 50 % de su concentración original; en todos los casos contenían 30 g.L⁻¹ de sacarosa; 6,5 g.L⁻¹ de agar A-1296 Sigma®; 0,1 mg. L⁻¹ de 6-bencilaminopurina y 0,1 mg. L⁻¹ de thidiazuron. El pH del medio fue ajustado a 5,8 antes de la adición del agente gelificante. Luego se esterilizó el medio de cultivo en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

Los embriones cigóticos maduros fueron aislados de semillas de *P. taeda* Livingston (Código INASE: 19W6016KP, cosecha 2016), previamente escarificadas en H₂O₂ 30 volúmenes durante 12 h en agitación, desinfectadas en una solución de etanol 70° durante un minuto, posteriormente transferidas a una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 2,2% y TRITON® 0,1%. Finalmente, enjuagadas con agua destilada estéril tres veces; para luego ser cultivados en flujo laminar e incubados en condiciones de luz (116 µmol m⁻² s⁻¹, 14 h de fotoperíodo) y temperatura (27±2 °C) controlada.

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado compuesto por cinco repeticiones por tratamiento, la unidad experimental estuvo compuesta por diez embriones cultivados. A los 35 días de incubación se evaluó la tasa de regeneración (% de embriones cigóticos maduros que produjeron yemas), tasa de oxidación, número de yemas por explante regenerado y el índice de capacidad de formación de brotes (BFC). Los datos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y test de Tukey (alfa=0.05). Usando algoritmo de minería de datos CHAID (Chi-square automatic interaction detector) se determinó el componente del medio que tuvo mayor influencia en la regeneración partir de la composición de cada medio. Se realizaron estudios anatómicos mediante microscopía óptica, para lo cual los embriones regenerados fueron fijados, deshidratados usando series Biopur® e incluidos en parafina. Los cortes transversales de 10–12 µm de sección fueron coloreados con Safranina-Astra blue y montados en bálsamo de Canadá. Las microfotografías fueron tomadas usando un microscopio Leica DM LB2 equipado con una cámara Leica ICC50 HD.

La tasa de regeneración estuvo influenciada por el medio basal, disminuyendo fuertemente en los medios MS y LP al 100% (12,44±4,26 y 22±13,04%, respectivamente); y siendo el medio DCR al 100% o diluido, los que expresaron los mayores valores (89,78±12,26 y 88±8,37 % comparativamente). A su vez en los primeros, se observaron altas tasas de oxidación, registrándose 52,44±9,73% en MS y 44±8,94% en LP. El número de yemas por explante y el índice BFC fue mayor en el medio MS al 50%, con 19,53±0,9 yemas por explante y un índice BFC de 15,22±2,48.

A partir de análisis CHAID se determinó que el componente con mayor influencia en la regeneración fue el NH₄⁺ (amonio). Concentraciones de este ion mayores a 10,31 mM disminuyeron la regeneración, probablemente debido a la toxicidad que presenta al ser utilizado en altas concentraciones.

A partir del análisis anatómico se pudo determinar que la formación de yemas adventicias fue directa a partir de células subepidérmicas que formaron regiones meristemáticas globulares.

En conclusión, la composición del medio basal influyó en la regeneración de yemas adventicias de *Pinus taeda*, observándose mayor producción de yemas cuando los embriones fueron cultivados en medio MS al 50% de su concentración original.