



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Agrarias

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

MODALIDAD TESINA

TÍTULO: “Selección del inóculo óptimo para la producción de plántulas *in vitro* de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*”.

ALUMNO: VANESA CAROLINA SCHOFFEN.

DIRECTOR: Dra. Claudia Luna.

Año 2016

I-INTRODUCCIÓN:

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

En tal escenario, la provincia de Misiones cuenta actualmente con aproximadamente 400.000 ha, constituyéndose en la región más importante. Posee las mayores industrias del país, especialmente en las celulósicas y aserraderos. Las especies preponderantes son los pinos, esencialmente *Pinus elliottii* y *P. taeda*, y en menor medida, *P. caribaea* y *Araucaria angustifolia*. Posee una pequeña proporción de eucaliptos (*Eucalyptus dunnii*, *E. saligna* y *E. grandis*), y pequeñas superficies implantadas con especies de mayor valor tales como toona o cedro australiano (*Toona ciliata*), paraíso (*Melia azedarach*), grevillea (*Grevillea robusta*) y kiri (*Pawlonia* sp.). Por su parte, Corrientes se constituyó en la provincia con mayor crecimiento en los últimos años, alcanzando una superficie de 330.000 ha implantadas mayoritariamente con pinos y eucaliptos. En pinos se tiene las mismas especies que en Misiones mientras que en eucaliptos predomina *E. grandis*. Asimismo, existen algunas plantaciones de grevillea y paraíso. La región se caracteriza por su deficiente industrialización por lo que posee un vasto potencial de crecimiento. En la provincia de Entre Ríos predominan las implantaciones de eucaliptos (90%), especialmente *E. grandis*. El 10 % de la superficie restante es complementada con especies de pinos, principalmente *Pinus elliottii* y *P. taeda*. En contraposición a Corrientes, posee una alta densidad de industrias relacionadas al sector (Sánchez Acosta y Vera, 2005).

El empleo de germoplasmas híbridos de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* ha tenido amplia aceptación en la región antes mencionada, adaptándose a una amplia variación de condiciones ambientales (Gauchat *et al.*, 2005) en donde las generaciones F1 y F2 han expresado su alto potencial de crecimiento y rectitud de fuste en plantaciones comerciales y ensayos instalados en diferentes sitios de la región mesopotámica.

Desde el punto de vista de sus cualidades tecnológicas, varias industrias locales han consumido y valorado positivamente su madera, en particular para el mercado internacional. En este sentido estudios realizados sobre germoplasmas de origen australianos indican que, en términos prácticos, el híbrido tiene mejores propiedades de la madera que las especies que le dan origen e indican que las diferencias halladas no presentan inconvenientes para su utilización en el mercado de la madera estructural (Niella *et al.*, 2000).

Esta entidad taxonómica ha sido desarrollada en Queensland (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, ya que combina caracteres deseables de los parentales, como ser: rectitud de fuste, resistencia al viento, tolerancia a suelos pobremente drenados y resistencia a heladas del *Pinus elliottii* var. *elliottii* y el rápido crecimiento, buena ramificación y uniformidad de la madera del *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. (Nikles 2000).

En 1955, se llevaron a cabo en Queensland (Australia) los primeros cruzamientos entre ambas especies, con el propósito de producir un híbrido con características superiores a ambos parentales; realizándose en el año 1958 las primeras plantaciones de la progenie F1 obtenida. Desde entonces se realizaron numerosos ensayos a campo, en los cuales se demostró que el nuevo híbrido es superior en crecimiento y rectitud de fuste con relación a sus progenitores, destacándose su aptitud agronómica en suelos pobremente drenados (Nikles 2000).

En la actualidad, la oferta de semillas comercializadas tradicionalmente por los centros de origen (Australia y Sudáfrica) es superada por la demanda mundial, atraída por las cualidades del germoplasma antes mencionadas. Este hecho, sumado a la imposibilidad de utilizar material genético local, ampliamente adaptado a las condiciones ambientales de la región, crea la necesidad de contar con un sistema de clonación eficiente a fines de su utilización por fitomejoradores en el contexto de sus planes de mejoramiento; como así también, por empresas privadas del sector forestal, posibilitando la rápida expansión del cultivo (Fortes, 2011).

En tal sentido, la propagación vegetativa, empleando el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es usada comercialmente para la multiplicación de un gran número de especies de plantas, incluido las de árboles, debido a que presenta una serie de ventajas comparado con los sistemas tradicionales de propagación, entre ellas, la posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual solo existan pocos individuos y la eventualidad de obtener plantas libres de enfermedades (Villalobos y Thorpe, 1991).

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio fue evaluar las condiciones *in vitro* que permitan el establecimiento aséptico de semillas y seleccionar el inóculo más adecuado para la producción de plántulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*.

II- MATERIALES Y MÉTODOS

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

Material Vegetal: Se trabajó con semillas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, cosecha 2014 correspondiente al Proyecto PIA 14025. 2015-2017.

Condiciones experimentales:

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

Las semillas fueron sometidas a un pre-tratamiento de escarificado químico mediante el uso de diferentes agentes desinfectantes:

T1-H₂O₂ 30 vol. en una concentración de 9 g.L⁻¹ por 30 minutos.

T2-NaClO en una concentración de 3 g.L⁻¹ por 30 minutos.

T3-Peroxosulfato ácido de Potasio o Persulfato de Potasio KHSO₅ en una concentración de 5 g.L⁻¹ por 30 minutos.

Cumplido el tiempo de exposición a los agentes desinfectantes, las semillas enteras fueron enjuagadas 3 veces con agua estéril, para luego proceder al acondicionamiento de los respectivos inóculos.

Los inóculos fueron cultivados individualmente en tubos de vidrio de 15 mL de capacidad conteniendo 4 mL de medio de cultivo.

El experimento se realizó ensayando dos medios de cultivo:

Medio de germinación (desprovisto de reguladores de crecimiento): compuesto por una solución nutritiva provista de las sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), en su concentración original (MS), semisólido (agar SIGMA® A-1296, 0.65 %), enriquecido con sacarosa 30 gr.L⁻¹ (Cantillo Ardebol *et al.*, 2006).

Medio de regeneración: compuesto por las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) reducidas a la mitad de su formulación original (MS_{1/2}), semisólido (agar SIGMA® A-1296, 0.65 %), complementado con sacarosa 30 gr.L⁻¹ y la adición de thidiazuron (TDZ, 0.1 mg L⁻¹), combinado con benciladenina (BA, 0.1 mg L⁻¹); dicho medio de cultivo se utilizó luego de observar que el medio de germinación limitaba el crecimiento de los explantes en cuestión (Fortes, 2011).

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5,8 con KOH o HCl antes de la adición del agente gelificante, esterilizándose por calor húmedo mediante autoclave a 1.46 kg.cm⁻² durante 20 minutos.

Se trabajó en el flujo laminar con pinza, bisturí y lupa. Los tubos conteniendo los explantes fueron tapados con papel Resinite AF-50® (Casco S.A.C. Company, Buenos Aires) e incubados durante 30 días en condiciones de luz (116 μmol.m⁻². s⁻¹, radiación PAR, fotoperíodo 14 h) y temperatura (27±2 °C) controladas. A los 7, 14, 21 y 28 días se contabilizaron los inóculos vivos.

– Selección del inóculo óptimo:

Los inóculos evaluados se detallan en la Tabla1 y figura 1.

– Métodos de determinación de la viabilidad de las semillas:

Se complementó el ensayo, mediante la metodología de tinción con Tetrazolio (ISTA, 1996) e Índigo Carmín, para evaluar la viabilidad de las semillas.

Prueba de Tetrazolio: la evaluación de la calidad de las semillas a través de esta prueba se basa en un cambio de coloración de los tejidos vivos en presencia de una solución de la sal de cloruro de 2, 3,5-trifenil Tetrazolio.

Se trabajó con 4 repeticiones de 25 semillas que se acondicionaron realizando una imbibición durante 48 h, para luego ser sumergidas en la solución de Tetrazolio 1%. Para realizar la tinción, se utilizaron frascos de vidrio de 100 mL con tapa hermética, donde se colocaron las semillas totalmente sumergidas en la solución de Tetrazolio. Estos frascos se incubaron durante un periodo mayor a 24 h en completa oscuridad a 28°C y 60% de humedad relativa. Una vez completada la tinción, las semillas se enjuagaron con abundante agua corriente y se realizaron las observaciones sobre cada semilla individualmente. Los resultados se expresaron en % de semillas viables (semillas mayormente teñidas) y semillas no viables (embrión sin tinción).

Prueba del índigo carmín: de forma contraria a la prueba de Tetrazolio, se produce una coloración de las partes no viables de la semilla. Se ha reportado como una técnica útil para especies de pináceas (Benito-Matías *et al.*, 2004).

También se tomaron 4 repeticiones de 25 semillas, y el índigo carmín se preparó añadiendo 0,15 g de índigo carmín en 100 mL de agua. Se sumergieron las semillas 18 h en agua destilada para reblandecer el endospermo. Posteriormente se incubaron en la preparación durante 3 horas a temperatura ambiente. Se lavaron y se clasificaron en viables sin daños (blancos) e inviables (totalmente teñido de azul).

– Parámetros de crecimiento evaluados

Se evaluó el poder germinativo (PG), el tiempo medio de germinación (TMG) y la contaminación visible en el cultivo establecido, principalmente el de origen fúngico.

Se utilizaron las siguientes fórmulas para evaluar los parámetros de crecimiento:

Variable	Fórmula
Porcentaje de germinación (PG)	$PG = \frac{\text{N}^\circ \text{ de semillas germinadas}}{\text{N}^\circ \text{ de semillas incubadas}}$
Velocidad media de germinación (VMG)	$VMG = \frac{P1/T1 + P2/T2 + \dots + Pn}{Tn}$
Tiempo medio de germinación (TMG)	$TMG = \frac{(x1.d1) + (x2.d2) + \dots (xn.dn)}{Xn}$
Frecuencia de germinación	$Frecuencia = Xi / Xn$

Dónde:

P= número de semillas germinadas;

T= tiempo de germinación;

n= día del último control;

$x_1, x_2, \dots =$ semillas germinadas día 1, 2, ..., día n ;

d_n = días de incubación;

X_i = semillas germinadas por día de revisión;

X_n = número de semillas germinadas el último día de control. (Ranal y García, 2006).

También se registró el porcentaje de organogénesis y/o neoformación de yemas adventicias a partir del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos, contabilizando el número de estructuras obtenidas.

Análisis estadístico:

Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento en todos los experimentos. Se cultivaron explantes individuales empleándose 30 por tratamiento, considerándose éste una unidad. En todos los casos, los datos fueron analizados empleando el análisis de variancia y pruebas de Tukey para las comparaciones de las medias de las variables: porcentaje de germinación (PG), velocidad media de germinación (VMG), tiempo medio de germinación (TMG) y frecuencia de germinación con el software Infostat (2012). El cumplimiento de los supuestos del análisis de la variancia se probó con el test de Shapiro-Wilks para normalidad. Al no cumplirse estos supuestos, se realizaron nuevos análisis de la variancia con variables obtenidas por transformaciones adecuadas, o se recurrió a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En todas las pruebas estadísticas se trabajó con un nivel de significación α del 5%.

III- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

– Establecimiento *in vitro* de los inóculos: desinfección de semillas.

La contaminación microbiana, es uno de los problemas más graves en la micropropagación de plantas, pudiendo ocasionar cuantiosas pérdidas de material. Los patógenos endógenos difíciles de detectar tempranamente, escapan a los efectos de la esterilización superficial de los explantes y se manifiestan luego del subcultivo, durante la fase de multiplicación (Digonzelli *et al.*, 2005).

De los agentes desinfectantes ensayados para la desinfección de las semillas, el Peróxido de Hidrógeno fue el tratamiento más eficiente en cuanto a control de la contaminación visible indiferentemente de portar o no la testa, proporcionando un 100% de cultivo establecido libre de contaminantes (Tabla 2, Figura 2).

Por su parte, los explantes tratados con Peroxosulfato ácido de Potasio o Persulfato de Potasio presentaron un $62,22\% \pm 18,36$ de contaminación, mientras que con el NaClO se observó un $72,21\% \pm 9,62$ de contaminación; ambos valores se registraron en semillas sin testa. Cabe destacar que en ninguno de los tratamientos se observó contaminación en semillas con testa (Tabla 2, Figura 2).

La remoción del pericarpio no solo ejerce un efecto benéfico sobre los parámetros evaluados por exclusión de una fuente de latencia (Amaral *et al.*, 1998; Fowler, 2001), sino que además, favorece el establecimiento *in vitro* de los cultivos disminuyendo la incidencia de los microorganismos, principalmente hongos causales de contaminación. En este caso, si bien no se registró contaminación en las semillas con testa, tampoco se logró germinación.

En cuanto a los agentes desinfectantes utilizados, el Peróxido de Hidrógeno ha sido empleado exitosamente en especies del género *Pinus* como promotor de la germinación y antimicrobiano previniendo la proliferación de algunos hongos (Muñoz López *et al.*, 2009; Mas I Gisbert *et al.*, 2011). También ha sido eficaz en la desinfección de semillas de *Pseudotsuga menziesii* (Dumroese *et al.*, 1988) y *Pinus ponderosa* reduciendo notablemente los niveles de incidencia de *Fusarium* (James y Genz, 1981), mientras que en *Abies religiosa* no solamente mostró la menor cantidad de semillas contaminadas sino también valores ínfimos de tejido necrosado (Álvarez-Moctezuma *et al.*, 2008).

El modo de acción del Peróxido de Hidrógeno se centraría en su capacidad de actuar como un agente oxidante energético, disociándose en agua y oxígeno molecular, sin dejar residuos tóxicos (Iáñez, 1998), lo que lo hace bactericida, viricida y fungicida (HRM, 1993), siendo más oxidativo que el cloro o ClO_2 (Barnett, 1998), y las bacterias no tienen enzimas para degradarlo (Iáñez, 1998) y se degrada en agua (ATSDR, 2004).

El Peroxosulfato ácido de Potasio o Persulfato de Potasio, se descompone en ácido acético y agua oxigenada, no deja residuos tóxicos, permanece efectivo aún en presencia de materia orgánica; en general es un desinfectante de nivel intermedio-bajo, una solución al 1% de persulfato potásico requiere 10-15 minutos para inactivar a estos microorganismos (Montserrat y Carlos, 2005).

Actúa por oxidación de las diferentes estructuras bacterianas, lo cual finalmente conlleva a la muerte celular; es efectivo en el control de bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos (Maimone y Castilla, 2012) y algunos virus. Tiene actividad esporicida a bajas temperaturas y su actividad micobactericida es muy escasa (Montserrat y Carlos, 2005).

Por su parte, el uso de NaClO es eficaz en la mayoría de las bacterias patógenas, pero es imprevisible contra hongos y virus (HRM, 1993); su inclusión en los procesos de desinfección es una técnica ampliamente generalizada con una acción comprobada en la eliminación de microorganismos resistentes (bacterias y hongos) debido a la liberación de oxígeno; o bien, por combinación directa del cloro con proteínas enzimáticas y componentes de membranas que provocan su desnaturalización (Mateos, 2004; Flores García *et al.* 2008).

Por los resultados positivos obtenidos de la inmersión de las semillas en la solución de H_2O_2 (T1), se ha seleccionado este agente desinfectante no solo por este efecto sino también por su ligera acción escarificante de origen químico (Jiménez *et al.*, 1996; Ramón, 2001).

– Selección del inóculo óptimo:

Al finalizar el ensayo, en los inóculos I2, I3, I4 e I6 se ha logrado medir los parámetros de crecimiento propuestos (Tabla 3, Figura 3). Al analizar los datos obtenidos, la prueba de Kruskal-Wallis mostró que existían diferencias altamente significativas entre los distintos tipos de inóculos ($p \leq 0,05$).

Ha sido notable que el I1 (semilla entera con testa) no ha registrado germinación, mientras que con el mismo tratamiento T1, el I6 con solo remover la testa, la semilla inició la germinación, por lo que se puede inferir que la misma puede constituir una barrera mecánica entre el embrión y el medio de germinación, limitando el proceso. En *Cordia trichotoma* se ha

determinado que la remoción del pericarpio promueve el proceso y mejora los indicadores de vigor evaluados (Duarte *et al.*, 2014), observándose que dicho procedimiento no solo ejerce un efecto benéfico sobre los parámetros evaluados por exclusión de una fuente de latencia (Amaral *et al.*, 1998; Fowler, 2001), sino que además, favorece el establecimiento de los cultivos disminuyendo la incidencia de los microorganismos (Duarte *et al.*, 2014).

Jasik *et al.* (1999) por su parte plantea también que un requisito indispensable para el correcto aprovechamiento de los recursos de los que está compuesto el medio de cultivo es el que exista un estrecho contacto entre el mismo y el explante, hecho que se lograría con la remoción de la testa.

El I2 es el inóculo con el que se logró un 100% de germinación (Tabla 3). Estos resultados se encuentran en correspondencia con los informados por otros autores para semillas del mismo género (Gupta y Timmis, 1999; Cantillo Ardebol *et al.*, 2006; Rocha y Niella, 2001; Saborio *et al.*, 1997; Valdez *et al.*, 2001).

El I3 consistente en la mitad superior del embrión, fue la fuente de explante que también mostró altos porcentajes de germinación, seguido del I4 (mitad inferior del embrión) con $83,33 \pm 5,77\%$ y $76,66 \pm 5,77 \%$ respectivamente (Tabla 3, Figura 3). El I5 (cotiledones disectados del embrión expuesto) fue una de las fuentes de explante menos eficiente, ya que no se logró medir ningún parámetro.

En cuanto al I6 (semilla sin testa/embriones con endosperma) el porcentaje de germinación fue de $36 \pm 11,54 \%$. Este comportamiento podría deberse a la presencia del endosperma, que limitaría la correcta absorción de los recursos del medio y su óptimo aprovechamiento, en concordancia a lo que plantean Jasik *et al.* (1999) de que el tejido del megagametofito puede proveer al embrión de algunos reguladores y/o inhibidores, ya que el proceso de germinación en la naturaleza depende fundamentalmente de las reservas endógenas las semillas.

Analizando los resultados obtenidos con el medio de cultivo propuesto por Fortes (2011), los datos sometidos a la prueba de Kruskal-Wallis también mostraron que hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$) para las variables PG y VMG, no así para TMG y FG.

Por su parte, se observó que hubo diferencias significativas entre medios de cultivos ($p \leq 0,05$) para los I2, I3 e I4, para las variables PG y VMG, no así para TMG y FG.

Cabe destacar que el I2, ha demostrado ser el tipo de inóculo con mayor respuesta a ambos medios de cultivo (Figura 4). Si bien I3 e I4 han demostrado valores de germinación mayores que en el medio de germinación, analizando la cantidad de estructuras neoformadas de I2 e I3 ($2,3 \pm 1,05$ y $1,36 \pm 0,49$ estructuras/embrión, respectivamente) en el medio de regeneración, aun es necesario ajustar el protocolo para aumentar la eficiencia (Tabla 3, Figuras 3 y 4).

Estos resultados concuerdan con trabajos previos, en los cuales se logró la regeneración de brotes adventicios en *Pinus radiata* (Valledor *et al.*, 2007), *P. pinea* (Sul y Korban, 2004) y *P. elliottii* (Pérez Bermúdez y Sommer, 1987) a partir del cultivo *in vitro* de embriones o cotiledones, adicionándose ambas citocininas al medio de inducción (Fortes, 2011). Ojeda (1992) y Lambardi *et al.* (1993) encontraron en *P. halepensis* y *P. pseudostrobus*, que conforme se incrementó la concentración de BA, la respuesta de los explantes fue mayor.

Los inóculos comúnmente usados para promover la regeneración de coníferas son ricos en almidón, como cotiledones, hipocótilos y embriones (Roca y Mroginski, 1991), y la principal fuente de inóculo para la inducción de callo son embriones aislados de semilla, ya que poseen un potencial embriogénico mayor comparado con cualquier otra parte de la planta adulta. Grahsl *et al.* (1991) utilizaron hipocótilos aislados de semillas y Schuller *et al.* (1989), embriones cortados longitudinal y transversalmente. Cotiledones de *P. pinea* se usaron para inducción de yemas (García *et al.*, 1994).

En cuanto a las demás variables evaluadas, la VMG expresa la velocidad en número de semillas germinadas por día. Por lo tanto, cuanto mayor es el valor de esta variable, mayor es la velocidad e indirectamente mayor el vigor del lote. El I2 fue el inóculo que presentó el mayor valor de VMG siendo de $0,09 \pm 0,005$ en T1 y $0,1 \pm 0$ en T2, respectivamente (Tabla 3).

Para el TMG, que indica el número de días necesarios para germinar, en el I4 fueron 7 ± 0 días para el T1, presentando éste el menor tiempo. En cambio para el T2, los inóculos I2 e I3 mostraron el menor tiempo, también de 7 ± 0 días (Tabla 3).

Aparicio Rentería *et al.* (1999) exponen en su trabajo que *Pinus patula* fue la especie que presentó la más baja velocidad de germinación (20,17 días) y requirió de 14 días para iniciar la germinación. *Pinus pseudostrobus* mostró una velocidad de 18,17 días y necesitó 10 días para empezar a germinar; y por último *Pinus montezumae* obtuvo la mayor velocidad de germinación de 12,7 días y necesitó 12 para iniciar la germinación, todo esto en condiciones de vivero.

Para el caso de este trabajo, el máximo valor de TMG fue de $15,81 \pm 7,63$ para el inóculo I4 de T2, mostrando menores valores que el trabajo antes expuesto para distintas especies del género *Pinus*. Esto se debe a que las condiciones en cultivo *in vitro* hace que los procesos sean más rápidos que en condiciones de vivero.

En cuanto a la FG, el inóculo I4 fue el que mayor valor presentó 1 ± 0 para el T1. En cambio para el T2, igual que para TMG, la FG fue mayor para los inóculos I2 e I3 obteniendo 1 ± 0 también en ambos.

El proceso germinativo, es un aspecto dependiente de la especie, del genotipo dentro de cada taxón y del conjunto de condiciones en las cuales se incuba la semilla (Lobo *et al.*, 2007). Cabe destacar que para la especie estudiada no se reportan valores de VMG, TMG y FG para germinación convencional y germinación *in vitro* para poder discutir los resultados obtenidos.

- Métodos de determinación de la viabilidad de las semillas

Al momento de analizar los resultados y no encontrar respuesta alguna a los parámetros evaluados en semillas enteras con testa y siendo tan baja en las semillas que se removió la testa, se decidió evaluar la viabilidad de las semillas.

A pesar de la estandarización de la técnica del Tetrazolio (ISTA, 1996), muchas especies de árboles y arbustos no se encuentran bien reflejadas en estas normas, o incluso ni aparecen (Savonen, 1999; Steiner *et al.*, 1999). En muchos casos se sustituyen las técnicas de

evaluación más complejas por ensayos de embriones extraídos, que mediante la visualización de los tejidos del embrión permiten valorar su estado (Moreno Álvarez *et al.*, 2001).

En cuanto a la lectura de la viabilidad del embrión con el test del Tetrazolio, podemos decir que es una técnica fácil (Ayma Romay, 2005), recordando que esta prueba se basa en un cambio de coloración de los tejidos vivos en presencia de una solución de la sal. Los resultados obtenidos arrojaron que el $63,5\% \pm 8,53$ (Tabla 4) de las semillas son viables, ya que pudo observarse una óptima tinción (Figura 5).

Para el índigo carmín, las partes teñidas son las muertas. La mejor respuesta que obtenemos del índigo carmín puede deberse a la facilidad para considerar los daños. En el ensayo realizado se observó que el $72,66\% \pm 12,50$ (Tabla 4, Figura 5) de las semillas son viables, sin daño aparente, ya que no mostraron tinción.

Moreno Álvarez *et al.* (2001) han utilizado esta prueba en *Pinus pinaster* y en *Pinus halepensis* e indican que ambos test pueden ser utilizados como predictores de la facultad germinativa, mientras que Benito-Matías *et al.* (2004) sostienen que al menos para ciertas especies de *Pinus* ambas técnicas necesitan mejoras para considerarlas como tal. El test de índigo-carmín presenta valores de fiabilidad tan buenos como el test de Tetrazolio, pudiendo utilizarse como alternativa al mismo. Calderón Guerrero (2009) ha ajustado el test de Tetrazolio para semillas de *Pinus nigra*, debido a que su correcta evaluación puede resultar subjetiva al estar basada en la tinción de los tejidos vivos, dependiendo en gran medida de la persona que lo analiza, su experiencia y su percepción del color entre otras características.

En ocasiones se recomienda el test de Tetrazolio como buen predictor de la germinación, tanto para semillas recalcitrantes como es *Quercus* como de otras especies forestales, aunque presenta algunos inconvenientes (Bonner, 1984; ISTA, 1996; Moreno-Álvarez *et al.*, 2001). Posiblemente la mayor dificultad es encontrar un protocolo adaptado, de forma que las tinciones sean lo suficientemente homogéneas para asegurar una buena interpretación de los resultados, que en ocasiones se ven afectados por la cantidad de lípidos, tiempo de tinción, condiciones de temperatura en las que se lleva a cabo la reacción, o incluso experiencia del analizador en dicha especie y en el método (Benito-Matías *et al.*, 2004).

Si bien esta prueba ha sido utilizada en numerosas especies forestales como ser *Bombacopsis quinata* y *Tabebuia rosea* (Cordero, 1994), *Enterolobium cyclocarpum*, *Gliricida sepium* y *Delonix regia* (Pivaral Leiva, 1999), *Pinus pinea* (Benito-Matías, 2004), *Schinopsis balansae* (Alzugaray *et al.*, 2005), *Acacia melanoxylon* (Velásquez, 2006), *Aspidosperma quebracho-blanco* (Alzugaray *et al.*, 2006), *Rubia fruticosa* (Marrero *et al.*, 2007) y *Maytenus vitis-idaea* (Bueno *et al.*, 2009) entre otras, para la especie en estudio no existen reportes acerca de su uso.

Teniendo estos test una fuerte carga de subjetividad en la interpretación de los resultados, basada principalmente en la experiencia del analizador, podemos suponer que es más difícil interpretar zonas de las semillas pobremente teñidas por el Tetrazolio. Siempre puede deberse a la falta de tonalidad o errores en la manipulación, siendo dificultoso interpretar la importancia de zonas que pueden ser básicas para el desarrollo del embrión y posterior

germinación de las semillas. Esta duda es menos frecuente en el caso del índigo. La tinción de las zonas muertas define claramente cómo se encuentra la semilla, y a pesar de que también pueden aparecer indefiniciones en el proceso de tinción, éstos ofrecen menos dudas en la interpretación ya que se considera que las zonas teñidas están claramente muertas (Moreno Álvarez *et al.*, 2001; Prieto Méndez *et al.*, 2011).

La precisión de las estimaciones se determinó mediante una matriz de confusión que es una forma de verificar la exactitud de los métodos utilizados; la coincidencia hace referencia al porcentaje de semillas que fue correctamente asignada a viables/no viables.

En la tabla 5 se presenta la evaluación de la clasificación final de las semillas con la matriz de confusión. Los resultados obtenidos muestran que la coincidencia en ambas técnicas es del 14,42% en semillas viables, lo que es considerado como deficiente para esta categorización ya que el principio de ambas técnicas radica en la tinción de distinto tejido. La coincidencia para semillas no viables fue solo del 25,10%, aunque es una mayor coincidencia con respecto al análisis anterior, igualmente deficiente.

Probablemente, para poder comparar resultados de distintas pruebas con similares principios, sea necesario llevar a cabo otras pruebas de viabilidad como ser, el sistema de diagnóstico por imágenes (rayos X) que es un método no destructivo para el análisis interno del tejido de la semilla. Aunque esta prueba en general es efectiva en aquellas semillas forestales que presentan cotiledones voluminosos o frutos como aquenios, sámaras o cariopses (Ottone, 1993; Pérez García, 2001; Alzugaray *et al.*, 2007), es muy útil para identificar daños en la simiente. Otro método que permite medir la viabilidad es la prueba colorimétrica del pH del exudado, donde la coloración en la solución de inmersión difiere en función de la calidad fisiológica de cada semilla; es decir la coloración de la solución de inmersión de semillas luego del agregado de la solución indicadora fenoltaleína se percibe como incolora (semilla no viable), o rosa intenso (semilla viable) (Aguirre y Peske, 1988).

IV-CONCLUSIÓN

En este trabajo se logró determinar que tratar las semillas *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* con H₂O₂ 30 vol. en una concentración de 9 g.L⁻¹ por 30 minutos, luego enjuagadas 3 veces con agua estéril, para luego proceder al acondicionamiento de los respectivos inóculos, permite obtener una óptima desinfección.

En cuanto al inóculo más idóneo para la producción de plántulas, los embriones aislados completos (disectado) han demostrado ser la mejor fuente de explante, lográndose un 100% germinación.

A partir de los resultados obtenidos, es posible continuar con experimentos que atañen el establecimiento de cultivos para la regeneración de plántulas *in vitro* a partir de yemas axilares, multiplicación de brotes y su posterior enraizamiento.

V-CUADROS Y FIGURAS

Tabla 1: Detalle e identificación de los inóculos evaluados.

Tipos de inóculos	Medio germinación	Medio regeneración
I1- Semilla completa.	X	
I2- Embriones aislados completos (disectado).	X	X
I3- Mitad superior del embrión aislado del embrión disectados.	X	X
I4- Mitad inferior del embrión aislado del embrión disectados.	X	X
I5- Cotiledones disectados del embrión expuesto.	X	X
I6- Semilla sin testa/embriones con endosperma.	X	

Tabla 2: Porcentaje de contaminación visible en los cultivos establecidos con los diferentes agentes desinfectantes.

KHSO₅		NaClO		H₂O₂	
Con Testa	Sin testa	Con Testa	Sin Testa	Con testa	Sin Testa
0%	62,22%±18,36	0%	72,21 %±9,62	0%	0%

Tabla 3: Parámetros de crecimiento en los diferentes inóculos estudiados.

Inóculos	PG (%)		VMG		TMG (días)		FG		Estructuras neoformadas	
	MG	MR	MG	MR	MG	MR	MG	MR	MG	MR
I1	0 a	----	0 a	----	0 a	----	0 a	----	----	----
I2	100±0 c	100±0 b	0,09±0,005 c	0,1±0 b	11,2 ± 7,27 b	7±0	0,98±0,03 b	1±0	----	2,3±1,05
I3	83,33±5,77 b	90±0 a	0,08±0,01 b	0,09±0 a	11,08±7,07 b	7±0	0,97±0,04 b	1±0	----	1,36±0,49
I4	76,66±5,77 b	90±0 a	0,07±0,05 b	0,09±0 a	7±0 b	15,81 ± 7,63	1±0 b	0,98±0,03	---	0
I5	0 a	0 c	0 a	0 c	0 a	0	0 a	0	---	----
I6	36±11,54 a	---	0,03±0,005 a	---	11,2±7,27 b	---	0,98±0,03 b	---	---	----

Referencias: PG: porcentaje de germinación; VMG: velocidad media de germinación; TMG: tiempo medio de germinación; FG: frecuencia de germinación; MG: medio de germinación; MR: medio de regeneración. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 4: Valores obtenidos en las diferentes pruebas colorimétricas.

Prueba de Tetrazolio		Prueba de Índigo Carmín	
V	NV	V	NV
63,5%±8,53	36,49%±8,52	72,66%±12,50	27,33%±12,53

Referencias: V: viables; NV: No viables.

Tabla 5: Evaluación de la clasificación final del sistema de determinación de viabilidad en semillas de Pino híbrido (viables/no viables).

Clasificación Tetrazolio		Clasificación Índigo		Coincidencia %
		Viables	No viables	
Viables	63,5%	72,66%	9,16%	14,42
No viables	36,49%	27,33%	9,16%	25,10

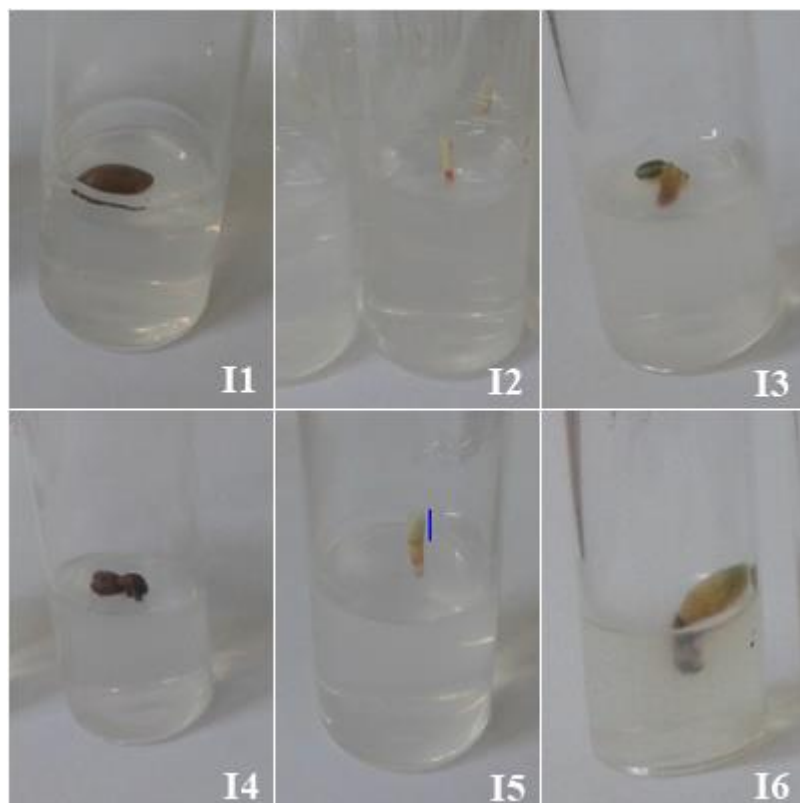


Figura 1: Detalle e identificación de los inóculos evaluados.

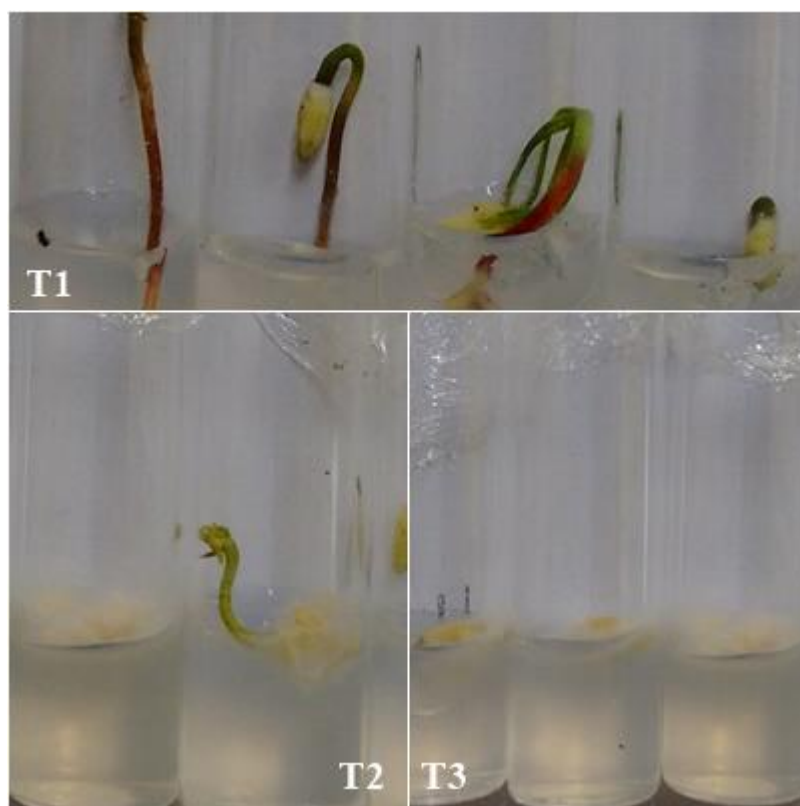


Figura 2: Detalle de la contaminación visible luego de los tratamientos de desinfección aplicados a las semillas.

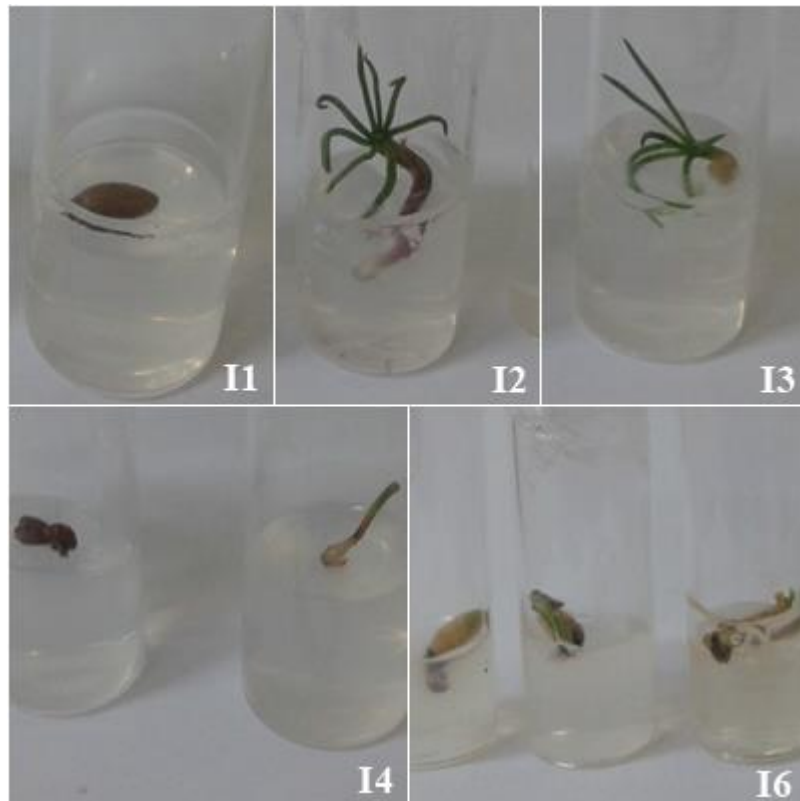


Figura 3: Respuesta de los inóculos ensayados. Los símbolos I1 a I6 representan a cada tipo de inóculo.



Figura 4: Detalle del inóculo con mejor respuesta a la regeneración. I2: Embriones aislados completos (disectados).



Figura 5: Detalle de la tinción de las semillas en las pruebas de viabilidad. Arriba: Prueba topográfica de Tetrazolio (Tz). Abajo: Prueba del Índigo Carmín (Ic).

VI-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, R. y Peske, S. (1988). Manual para el beneficio de semillas. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 277p.
- Álvarez Moctezuma, J., Flores García, A., J. Rodríguez de la O & A. Corona Ambris. (2008). Germinación in vitro de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. Foresta Veracruzana 10: 27-33.
- Alzugaray, C., Carnevale, N., Salinas, A. y Pioli. R. (2005). Observations on Seed Quality of *Schinopsis balansae* Engl, a Tree Species Endemic to South America. Seed Technology. 27 (1): 49-58.
- Alzugaray, C., Carnevale, N., Salinas, A. y Pioli. R. (2006). Calidad de semillas de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht. Quebracho (Santiago del Estero) n.13 Santiago del Estero 2006.
- Alzugaray, C., Carnevale, N. & Salinas, A. (2007). Evaluación de la calidad de las semillas de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht. y *Schinopsis balansae* Engl. mediante la prueba de rayos X. Revista de Investigación, Facultad de Ciencias Agrarias UNR 11: 51-59.
- Amaral, D., N. Alcalay, & M. Antonio. (1988). Armazenamento de sementes de quatro espécies florestais do Rio Grande do Sul. In: Anais Congresso Florestal Estadual, 6. Nova Prata. Nova Prata: Prefeitura Municipal de Nova Prata I Meridional. p: 373- 397.

- Aparicio Rentería, A; Cruz Jiménez, H; Alba Landa, J. (1999). Efecto de seis sustratos sobre la germinación de *Pinus patula* Sch. et Cham., *Pinus montezumae* Lamb. y *Pinus pseudostrobus* Lindl. en condiciones de vivero. *Foresta Veracruzana* 1: 31-34 pp.
- ATSDR. (2004). Peroxide of hydrogen. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Atlanta. Pp 1-2.
- Ayma Romay, A. (2005). Estudio de propagación sexual de Pino de monte (*Podocarpus glomeratus*) en la comunidad de Sailapata (Cochabamba, Bolivia). Tesis de licenciatura. Escuela de Ciencias Forestales. Universidad Mayor de San Simón. 75 p.
- Barnett, J. P. (1998). Disinfecting seeds with hydrogen peroxide. Auburn University.
- Benito-Matías, L.; Herrero Sierra, N.; Jiménez, I. y Peñuelas Rubira, J. (2004). Aplicación de métodos colorimétricos para la determinación de la viabilidad en semillas de *Pinus pinea*: test de tetrazolio e índigo carmín. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales, ISSN 1575-2410, N°. 17, págs. 23-28.
- Bonner, F. (1984). Testing of seed quality in Southern Oaks. Research Note SO-306.
- Braier, G. (2004). Tendencias y perspectivas del sector forestal al año 2020 – Argentina. FAO 236 p.
- Bueno, M.; Alzugaray, C.; Giubileo, G.; Severina, C. y Carnevale, N. (2009). Evaluación de la calidad fisiológica de semillas de *Maytenus vitis-idaea* cultivadas *in vitro*. *Bosque* 30(3): 146-150.
- Calderon Guerrero, C. (2009). Estudio para la evaluación digitalizada del test de viabilidad al tetrazolio en semillas forestales sometidas a distintos niveles de desecación. Actas V Congreso Forestal Español. ISBN 978-84-936854-6-1.
- Cantillo Ardebol, R.; Rodríguez de Francisco, L.; Rosales, Y.; Alvarado, O. (2006). Germinación *in vitro* de *Pinus cubensis* Griseb. *Ciencias Holguín*, XII (3): 1-12.
- Cordero, C. (1994). Determinación de la viabilidad en semillas de *Bombacopsis quinata* y *Tabebuia rosea* y comparación con resultados de viveros. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Tesis de especialidad. 64 p.
- Digonzelli, P.; Díaz, L.; Carrizo de Bellone, S. (2005). Uso de PPM (Plant Preservative Mixture) para controlar contaminantes *in vitro* de caña de azúcar. *Revista de la Facultad de Agronomía –LUZ* 22: 23-33.
- Duarte, E; Acevedo, M; Sansberro, P; Luna, C. (2014). Detección de daño del coleóptero *Amblycerus longesuturalis* para la selección y germinación *in vitro* de semillas de Peteribí (*Cordia trichótoma* [Vell.] Arrab. ex Steudel). *Rev. Fac. Agron.* Vol 113 (1): 18-27
- Dumroese, R. K.; James, R. L.; Wenny, D. L.; Gilligan, C.J. (1988). Douglas-fir seed treatments: effects on seedborne organisms and germination. In: Landis, T.D. (ed). USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep. RM-167. p. 155–160.
- Fortes, N. (2011). Clonación de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* mediante el uso de birreactores de inmersión temporal”. Tesis para optar al grado de Magíster en Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. 80p.

- Fowler, J. (2001). Manejo de semillas de especies forestales. Eds: João Antonio Pereira Fowler, Emerson Gonçalves Martins.- Colombo: Embrapa Florestas, Documentos 58. 76 p.
- García, F. L.; Serrano, L.; Pardos, J. A. (1994). In vitro shoot organogenesis from excised immature cotyledons and microcuttings production in Pine. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 36: 135–140.
- Gauchat, M.; Rodriguez, G.; Belaber, E.; Bischoff, D. (2005). Híbridos de alta productividad. Combinando crecimiento y forma. *IDIA* 21: 162-164.
- Grahl, A.; Schmidt, J.; Wilhelm, E. (1991). Somatic embryogenesis and organogenesis of embryonic explants of *Abies alba* & *Acer pseudoplatanus*. In: Ahuja, M. (ed) *Woody Plant Biotechnology*. Plenum. New York: 201–203.
- Gupta, PK, Timmis RT (1999) Conifer somatic embryo production for liquid culture. En: Altman, G (Ed) *Plant Biotechnology and In vitro Biology in the 21st Century*, pp 49-52. Kluwer Academic Publishers.
- HRM. (1993). Esterilización, desinfección, antisépticos y desinfectantes. Hospital Ramos Mejía. Arg.
- Iáñez, P. (1998). Metabolismo energético. In: Curso de microbiología general. Facultad de Ciencia Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes República, Arg.
- ISTA. (1996). International Rules for Seed Testing. Rules 1996. International Seed Testing Association, Zürich, 335 pp.
- James, R. L.; Genz, D. (1981). Ponderosa pine seed treatments: effects on seed germination & disease incidence. Missoula. North. Reg. Report 81-16, 13p.
- Jasik, J., Salajová, T., Kormuťák, A., Salaj, J. (1999). Somatic embryogenesis in hybrid firs. In: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers 4: 505-523, 550 pp.
- Jiménez P., Jurado, Y.; Trejo, H.; Plácido de la C. (1996). Inducción a la germinación de *Chamaedorea radicalis* Mart. (“palmilla”), con tratamientos físicos y químicos. *Revista Biotam* 8(1): 41-44.
- Lambardi, M.; Sharma, K.; Thorpe, T. (1993). Optimization of in vitro bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill) *In vitro cell Dev Biol* 29: 189.
- Lobo, M., O. Delgado, J.R. Cartagena, E. Fernández y C.I. Medina. (2007). Categorización de la germinación y la latencia en semillas de chirimoya (*Annona cherimola* L.) y guanábana (*Annona muricata* L.), como apoyo a programas de conservación de germoplasma. *Agron. Colomb.* 25(2), 231-244.
- Maimone, S., Castilla, A. (2012). Desinfectantes de uso hospitalario. Infección hospitalaria segunda edición. CODEINEP. Pp 10.
- Marrero P, Padilla D, Valdés F, Nogales M. (2007). Comparison of three chemical tests to assess seed viability: the seed dispersal system of the Macaronesian endemic plant *Rubia fruticosa* (Rubiaceae) as an example. *Chemoecology* 17 (1): 47-50
- Mas I Gisbert, H., E. Pérez-Laorga Arias, M. Pitxer, P. Veintimila & E. Campos. (2011). Influencia del tratamiento por inmersión en peróxido de hidrógeno para el control químico de *Fusarium circinatum* en la viabilidad y el almacenamiento de las semillas

- del género *Pinus*. Acta de II Reunión de Sanidad Forestal de la Sociedad Española de Ciencias Forestales. 20 p.
- Mateos, P. (2004). Control de las poblaciones microbianas: Esterilización y desinfección. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Salamanca.
- Montserrat, S., Carlos, C. (2005). Limpieza, desinfección y esterilización en el ámbito hospitalario. Sociedad Catalana de farmacia clínica. Pp 232-235.
- Moreno-Álvarez, M.; Benito-Matías, L.; Herrero Sierra, N.; Domínguez, S. y Peñuelas Rubira, J. (2001). Estudio de nuevos métodos de determinación de la viabilidad de las semillas forestales: Test de electroconductividad e índigo carmín. Comparación con el test del tetrazolio y su aplicación a *Pinus pinaster* y *Pinus halepensis*. Actas del III Congreso Forestal Español, Mesa 3, pp. 653-658.
- Muñoz López, C., E. Cuervo Sánchez, M. Ampudia Díaz, A. Gastón González, J. Peñuelas Rubira, S. Iglesias Sauce & N. Herrero Sierra. (2009). Control químico de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell en semillas del género *Pinus*. 5º Congreso Forestal Español. Ref: 5CFE01-503. 12 p.
- Murashige, T; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Niella, F. y Rocha, P. (2000). En: Actas de la Reunión SilvoArgentina: avances en el establecimiento de plantaciones de coníferas subtropicales en el Mercosur. Virasoro 12-14 Sept. 2000. Pp: 33-39.
- Niella, F. y Rocha, P. (2001). Research and development of vegetative propagation techniques for *Pinus* sp. In the Northeast region of Argentina. En: Jeffrey F D (Ed.) Proceedings of the 26th. Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference. June 26-29, 2001, pp. 32-38. Dean-Georgia University. Athens.
- Nikles D G (2000). Experience with some *Pinus* hybrids in Queensland, Australia. En: Dungey H S, Dieters M J, Nikles D G (Eds.). Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees. Proceedings of QFRI/CRC-SPF Symposium, Queensland, Australia. Pp: 27-43.
- Ojeda, M. (1992). Inducción de Organogénesis y Embriogénesis Somática de *Pinus cembriodes* y *Pinus halepensis*. Tesis de Maestría, FA-UANL. Mty. México 44.
- Ottone, J. (1993). Árboles forestales. Prácticas de cultivo. Ed. Agro Vet. S.A, Buenos Aires. 573 p.
- Pérez Bermúdez, P. y Sommer, H E. (1987). Factors affecting adventitious bud induction in *Pinus elliotti* (Engelm.) embrios cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 11: 25-35.
- Pérez García, F. y Pita Villamil, J. (2001). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Eds: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. España. ISBN: 84-491-0503-X. 16 p.
- Pivaral Leiva, L. (1999). Desarrollo de patrones de tinción de tetrazolio e índigo carmín, para determinar viabilidad en semilla de *Enterolobium cyclocarpum*, (Jacq) Griseb. (Conacaste), *Gliricida sepium* (jacquin) Kunth ex Walper (Madrecacao) y *Delonix regia* (Bojer) Raf. Fl. Tellur. (Flamboyán). Tesis para optar al grado de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola. Universidad de San Carlos de Guatemala. 92 p.

- Prieto Méndez, J.; Prieto García, F.; Hernández Cervantes, N. Domínguez Soto, J.; Román Gutiérrez, A. (2011). Métodos comparativos del poder germinativo en *Hordeum distichon* L. calidad maltera. Multiciencias, 11 (2): 121-118.
- Ramón, J. (2001). Estudio de la germinación y desarrollo de palma camedor (*Chamaedorea elegans* Mart.) bajo condiciones controladas. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto de Recursos Naturales. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méxco. 62 p.
- Ranal, M.A. y D. Garcia De Santana. (2006). How and why to measure the germination process? Rev. Bras. Bot. 29(1), 1-11.
- Roca, W. M. y Mroginski, L.A. (1991). Cultivo de Tejidos en la agricultura, Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. Pp: 143–172.
- Saborio, F.; Dvorak William, S.; Donahue Jeffrey, K. y Thorpe Trevor, A. (1997). *In vitro* regeneration of plantlets from mature embryos of *Pinus ayacahuite* Ehrenb. Tree Physiology 17 (12): 787-796.
- Sánchez Acosta, M.; Vera, L. (2005). Actas del III Simposio Ibero-Americano de Gestión y Economía Forestal. Ubatuba, San Pablo. Pp: 1-23.
- Savonen, E. (1999). An improvement to the topographic tetrazolium testing of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seeds. Seed Science and Technology, 26: 49–5.
- Schuller, A.; Reuther, G.; Geier, T. (1989). Somatic embryogenesis from seed explants of *Abies alba*. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 60: 23–31.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. (2002). Inventario Nacional de Plantaciones Forestales. SAGPyA. Buenos Aires, Argentina. 63 p.
- Steiner, A.; Kruse, M.; Fuchs, H. (1999). A reassessment of the comparison of tetrazolium viability testing and germination testing. Seed Science and Technology, 27: 59–65
- Sul, W. y Korban, 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.
- Valdéz, A.; Ordas, R.; Fernández, B. y Centeno, M. (2001). Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* L cotyledons. Plant Physiology and Biochemistry 39: 377-384.
- Valledor, L.; Rodríguez, R.; Sánchez, P.; Fraga, M.; Berdasco, M.; Hasbún, R.; Rodríguez, J.; Pacheco, J.; García, I.; Uribe, M.; Ríos, D.; Sánchez-Olate, M.; Materán, M.; Walter, C. y Cañal, M. (2007). Propagation of selected *Pinus* genotypes regardless of age. En: Jain S M, Häggman H (Eds.), Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Springer. Dordrecht, The Netherlands. Pp: 137–146.
- Velásquez, L. (2006). Caracterización del banco edáfico de semillas de *Acacia melanoxylon* R. Brown en dos sitios de la provincia de Concepción. Tesis (Ing For). Universidad de Concepción. Fac. de Ciencias Forestales. Chile. 34 p.
- Villalobos, V M ; Thorpe, T A (1991). En: W M Roca y L M Mroginski (Eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Colombia. Pp: 127-141.