

MUPLICACIÓN IN VITRO DE BROTES AXILARES *DE Pinus elliottii* var. *Elliottii* x *Pinus caribaea* var. *Hondurensis*

IN VITRO AXILLARY SHOOT MULTIPLICATION FOR *Pinus elliottii* var. *Elliottii* x *Pinus caribaea* var. *Hondurensis*

Patricia Rocha¹
Fernando Niella¹

Fecha de recepción: 01/10/2010
Fecha de aceptación: 27/09/2011

1. Ing. Ftal – M.Sc. Docente- Investigador Laboratorio de Propagación Vegetativa. Facultad de Ciencias Forestales (U.Na.M.). Bertoni 124 (3380) Eldorado, Misiones, Argentina. Email: fniella@arnet.com.ar / lpv@facfor.unam.edu.ar

SUMMARY

Pinus elliottii x *caribaea* (hybrid pine) is an exotic tree species highly required by local foresters in Misiones, Argentina, because of its superior growth, few lateral small branches, excellent form and wood quality, and good local adaptation. Due to its high demand and given the fact that its seed should be imported from Australia, a shortage of plants availability for reforestation programs is common. The present study was therefore undertaken with the objective to develop an in vitro axillary multiplication protocol to increase local availability of pinus hybrid genetic material. At the establishment stage a disinfection method with 87 % of explant free of contamination was achieved. At the multiplication stage an average of 4 shoot per explant was achieved when using WV5 as nutrient media and axillary segments as explant. At the elongation phase the shoots reached an average height of 3 to 4 cm after 45 days of being subcultured. 50 % rooting was obtained when in vitro root induction with ANA and ex vitro root development was done under humidity controlled conditions in greenhouse.

Key Words: Hybrid pine; nutrient medium; organogenesis; micropropagation; tissue culture

RESUMEN

El *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (P. híbrido), posee características que son altamente requeridas por los productores forestales, como ser, crecimiento rápido, fuste recto, escasas ramificaciones, diámetro de las mismas reducido, ángulo de inserción cercano o igual a 90 grados y muy permeable a la luz. En el noreste de la Argentina (Misiones y norte de Corrientes), los forestadores se inclinaron masivamente a la plantación de este híbrido, elevando la demanda de plantines por encima de la oferta, generándose así en la actualidad, un marcado descenso en la disponibilidad de semilla de P. híbrido para pequeñas y medianas empresas. En la actualidad la semilla de P. híbrido se importa casi en su totalidad desde Australia a un costo muy elevado. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una metodología de micropropagación vía axilar para P. híbrido como forma alternativa de atenuar la dependencia externa de material seminal de este híbrido. En la etapa de establecimiento se desarrolló un protocolo de desinfección con un 87% de explantos vigorosos, libres de contaminación; en la fase de multiplicación se determinó el medio de cultivo y el explanto apropiado, con una producción promedio de 4 brotes/explanto. En la fase elongación, los brotes

alcanzaron una longitud promedio de 3-4 cm a los 45 días del subcultivo. La inducción de raíces se efectuó *in vitro* en medio nutritivo suplementado con ANA, y el desarrollo de las mismas *ex vitro* en condiciones controladas de humedad, obteniéndose un 50% de explantos enraizados y rustificados.

Palabras claves: Pino híbrido; medios de cultivo; organogénesis; micropropagacion; cultivo de tejidos.

INTRODUCCION

El *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (P. híbrido), fue desarrollado en la década del 50' en Australia e introducido en Argentina en la década del 70' en las experimentales del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) para evaluar su comportamiento en el nordeste del país. A escala comercial en Argentina, las primeras introducciones se realizan en la década del 90, dando origen a unas 6000 hectáreas de plantaciones comerciales en la región nordeste de Argentina (Misiones y norte de Corrientes). Mayores crecimientos de P. híbrido frente a materiales de *Pinus taeda* y *Pinus elliottii* son reportados por PEZZUTTI (2004), RODRÍGUEZ (2003) y BÁEZ *et al.* (2003). La industria maderera en esta región, ya

ha iniciado su consumo como madera sólida con resultados muy satisfactorios. En Australia, determinaron que el P. híbrido posee mejores propiedades de la madera que las especies que le dan origen, utilizándose sin inconvenientes para la producción de madera estructural (GAUCHAT y BELABER 2005). Por estas razones, en Misiones y norte de Corrientes, los forestadores se inclinaron masivamente a la plantación de esta especie, elevando la demanda de plantines por encima de lo que los viveros locales pueden ofertar, generándose así en la actualidad, un marcado descenso en la disponibilidad de semilla de P. híbrido para pequeñas y medianas empresas.

En realidad, son varias las razones que comprometen la disponibilidad de material seminal de esta especie, siendo relevantes las siguientes: a) no se puede acceder a semillas del mejor material genético correspondiente a material seminal de primera generación (F1) proveniente de los programas de polinización controlada existentes en Australia; b) la semilla que se importa desde ese país corresponde a material seminal de segunda generación (F2) a costos cada vez mayores, siendo en la actualidad, superiores a los 1200 U\$S / Kg.; c) en forma creciente, el proceso de importación de esta semilla se dificulta dado la falta de material disponible en Australia para compradores externos; e) aún cuando existen huertos de producción local de F2 y el INTA iniciará un programa de producción de F1 de P. híbrido, la demanda actual y potencial seguirá insatisfecha; e) la colecta de semilla de árboles pertenecientes a la F2 del P. híbrido implica riesgos dado que es común la segregación y reaparición de características (Ej.: sensibilidad a las heladas) de las especies que le dieron origen perdiéndose así sus ventajas comparativas.

La primera regeneración de propágulos vegetativos (plantlets) *in vitro* de coníferas, fue desarrollada por SOMMER *et al.* (1974), vía *organogénesis somática* a partir de embriones maduros de *Pinus palustris*. En general, en coníferas se han utilizado explantos de distinto origen, como ser acículas, meristemas apicales, hipocótilos, epicótilos, embriones, yemas y fascículos para la inducción de yemas adventicias y posterior formación de plantlets (JOHN 1983; THORPE y BIONDI 1984). Un estudio realizado en *Pinus monticola* demuestra la posibilidad de la utilización de segmentos de yemas (de sólo 2 mm de grosor) como explanto para la formación de brotes adventicios. Se obtuvieron hasta 400 brotes a partir de 100 segmentos de yema de árboles de 1 a 7 años de edad (LAPP *et al.* 1996). La mayoría de las regeneraciones exitosas en el género *Pinus* han sido el resultado de la utilización de embriones maduros y cotiledones (SEN *et al.* 1989; MOTT y AMERSON 1981; SOMMER *et al.* 1975; MEHRA PALTA 1983; AITKEN CHRISTIE *et al.* 1988; STANGE *et al.* 1998). No obstante, la proliferación de brotes axilares y/o

fasciculares *in vitro* en coníferas ha sido posible, con explantos provenientes de plantas donantes de juveniles a adultas, en varias especies de *Pinus*, tales como: *Pinus radiata* (AITKEN-CHRISTIE and THORPE 1984), *Pinus taeda* (ABO EL NIL 1982; AMERSON *et al.* 1987; HANDLEY *et al.* 1996; ROCHA y NIELLA 2001a); *Pinus elliottii*, *Pinus sylvestris* (TORIBIO and PARDOS 1989); *Pinus brutia* (ABDULLAH *et al.* 1986).

Es así que, con la finalidad de aumentar y satisfacer la demanda creciente de plantines de P. híbrido, el presente trabajo de investigación, resume los estudios efectuados para el desarrollo de la micropropagación vía axilar a partir de segmentos axilares obtenidos de brotes adventicios vía organogénesis y rebrote de plantas madres juveniles que crecen en macetas a pleno sol. La integración de las técnicas de cultivo *in vitro*, como las descritas en este trabajo, con los protocolos de macropropagación que ya están en aplicación en Misiones y norte de Corrientes (NIELLA y ROCHA 2004; PEZZUTTI 2004), es una estrategia viable para potenciar ambas técnicas y aumentar el número de plantas disponibles para atender la creciente demanda de P. híbrido.

MATERIALES Y METODOS

Producción de brotes adventicios

Para la producción de brotes adventicios, se utilizaron semillas de *P. híbrido* F2, de origen comercial suministrado por la empresa DKM S. A. Estas semillas, fueron esterilizadas en solución de lavandina® 50% y estratificadas en frío a 4°C por un periodo de 30-45 días. Como fuente de explanto se utilizaron embriones maduros pre-germinados y disectados de acuerdo a las especificaciones descritas por NIELLA y ROCHA (2003).

El medio de cultivo utilizado para la inducción de brotes adventicios fue el medio WV5 básico (COKE, 1996) suplementado con benzyl amino purina (BAP) (5 mg/l), ácido absícico (ABA) (0.026 mg/l) (NIELLA y ROCHA 2002), 30 g/l de sacarosa (Sigma) y 8 g/l de agar (Sigma). El pH fue ajustado a 5.75 ± 0.05 con OHNa o ClH 1 N, previo a ser esterilizado en autoclave por 25 minutos a 121°C.

Los cultivos se mantuvieron en cámara de cría con un fotoperíodo de 16 horas, con intensidad lumínica de 61 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (lámpara fluorescente Philips 84) y una temperatura constante de $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Micropropagación vía axilar

Material vegetal

Se utilizaron brotes adventicios obtenidos mediante el proceso de organogénesis arriba descrito y rebrote juveniles obtenidos del rebrote de plantas madre (de semillas F2 comercial) de 7 meses de edad, (decapitadas a los 4 meses), criadas en setos en macetas.

Medio de cultivo

En todos los casos, el medio de cultivo básico utilizado fue WV5 básico (COKE 1996) que según el estudio y etapa, fue suplementado con 20 g/l de sacarosa (Sigma), y 8 g/l de agar (Sigma). En la etapa de multiplicación y elongación al medio de cultivo se le adicionó 5 g/l de carbón activado. El pH fue ajustado a 5.75 ± 0.05 con OHNa o CIH 1 N, previo a ser esterilizado en autoclave por 25 minutos a 121 °C.

Condiciones de cultivo

En general, los cultivos se mantuvieron en cámara de cría con un fotoperíodo de 16 horas, con intensidad lumínica de 61 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (lámpara fluorescente Philips 84) y una temperatura constante de 24 ± 2 °C.

Etapas de la micropropagación axilar estudiadas:

1. **Establecimiento de segmentos axilares provenientes de rebrote de plantines juveniles:** El objetivo general de este estudio fue elaborar un protocolo de desinfección de los explantos que aseguren un porcentaje de explantos libres de contaminación no menor a un 80%, vigorosos, susceptibles de ser usados en la las etapas subsiguientes del proceso de micropropagación. Los explantos desinfectados (segmentos axilares de 0.5-1 cm de longitud) fueron cultivados verticalmente en tubos de ensayos de 110 mm x 116 mm, conteniendo 10 ml de medio de cultivo básico WV5. Los tratamientos de desinfección de los brotes se describen a continuación:

a. **E1: Con Pre-tratamiento de la planta madre** con aplicaciones semanales (spray) con una solución de 3 g/l de CAPTAN® (fungicida) + 0.6 g/l AGRIMICINA® (Bactericida), durante tres semanas previa a la cosecha de los explantos. Posteriormente los explantos fueron desinfectados en cámara de flujo laminar mediante la inmersión de los mismos en una solución de 30% lavandina® (55g/l NaOCl), durante 30 minutos. Seguido de enjuagues con agua destilada estéril.

b. **E2: Sin Pre-tratamiento de la planta madre.** Los explantos fueron desinfectados en cámara de flujo laminar mediante la inmersión de los mismos en una solución de 30% lavandina® (55g/l NaOCl), durante 30 minutos. Seguido de enjuagues con agua destilada estéril.

c. **E3: Sin Pre-tratamiento de la planta madre.** Los explantos fueron desinfectados en cámara de flujo laminar mediante la inmersión de los mismos en una solución de 0.25% Cloruro de mercurio (Cl_2Hg), durante 10 minutos. Seguido de enjuagues con agua destilada estéril.

d. **E4: Sin Pre-tratamiento de la planta madre.** Los explantos fueron desinfectados en cámara de flujo laminar mediante la inmersión de los mismos en una solución de 0.5% Cl_2Hg , durante 10 minutos. Seguido de enjuagues con agua destilada estéril.

e. **E5: Sin Pre-tratamiento de la planta madre.** Los explantos fueron desinfectados en cámara de flujo laminar mediante la inmersión de los mismos en una solución de 0.25% Cl_2Hg , durante 10 minutos. Seguido de enjuagues con solución de 3g/l de Cloruro de calcio (Cl_2Ca) estéril.

f. **E6: Sin Pre-tratamiento de la planta madre.** Los explantos fueron desinfectados en cámara de flujo laminar mediante la inmersión de los mismos en una solución de 0.5% Cl_2Hg , durante 10 minutos. Seguido de tres enjuagues con solución de 3g/l de Cl_2Ca estéril.

Variables evaluadas Se efectuaron observaciones semanales y a los 30 días de establecido el ensayo se evaluaron las siguientes variables: número de explantos contaminados; número de explantos vigorosos (verdes); número de explantos de color marrón (tejido necrótico) y porcentaje de explantos sobrevivientes establecidos. Para cada tratamiento el número de repeticiones fue de 60 explantos, siendo el explanto la unidad experimental.

2. **Multiplicación a partir de segmentos axilares obtenidos de brotes adventicios y rebrote de plantines juveniles:** el objetivo fue elaborar un protocolo de multiplicación de los explantos que asegure una frecuencia de producción de brotes no menor al 80% y una producción promedio de brotes mayor o igual a 3 brotes por explanto en un período no mayor a los 60 días. Se utilizaron brotes con una longitud original de 2 cm, a los que se les extrajo el ápice y se realizó un corte fresco de las bases previo a su cultivo, obteniéndose un explanto final de 1 cm de longitud. Este explanto fue cultivado verticalmente en tubos de ensayos de 110 mm x 116 mm, conteniendo 10 ml de medio de cultivo básico (WV5 y WV3 básico (COKE 1996); DCR (GUPTA y DURZAN 1985) y GD1 (GRESSHOFF y DOY 1972)) según los tratamientos que a continuación se describen:

a. **M1:** Segmentos axilares de brotes adventicios, cultivados en medio WV3

b. **M2:** Segmentos axilares de brotes adventicios, cultivados en medio WV5

c. **M3:** Segmentos axilares de rebrote de plantines juveniles, cultivados en medio WV3

d. **M4:** Segmentos axilares de rebrote de plantines juveniles, cultivados en medio WV5

e. **M5:** Segmentos axilares de brotes adventicios, cultivados en medio GD1;

f. **M6:** Segmentos axilares de rebrote de plantines juveniles, cultivados en medio GD1;

g. **M7:** Segmentos axilares de brotes adventicios, cultivados en medio DCR;

h. **M8:** Segmentos axilares de rebrote de plantines juveniles, cultivados en medio DCR

Variables evaluadas A los 60 días de establecido el ensayo se evaluaron las siguientes variables:

Frecuencia de formación de brotes [(Número explantos con brotes / Número total de brotes cultivados) x 100], y número de brotes por explantos. Para cada tratamiento el número de repeticiones fue de 30 explantos, siendo el explanto la unidad experimental.

3. **Elongación:** Con el objetivo de elaborar un protocolo de elongación de los explantos que asegure un 80% de los brotes alcancen una altura no menor a 3 cm de longitud final, susceptibles éstos de ser enraizados *ex vitro*, se utilizaron los brotes obtenidos de la etapa de multiplicación, que habían alcanzado una longitud de 0.5-1 cm. Estos brotes fueron cultivado verticalmente en cubetes Magenta A7, conteniendo 70 ml de medio de cultivo básico según el tratamiento en estudio que a continuación se describen:

- a. **EL1:** Medio de cultivo **WV5** en su concentración **completa (WV5)**
- b. **EL2:** Medio de cultivo **WV5** en su concentración **diluida a la mitad la concentración de sus macronutrientes (WV5^{1/2})**

Variables evaluadas A los 45 días de establecido el ensayo se evaluó la longitud del explanto. Para cada tratamiento el número de repeticiones fue de 40 explantos, siendo el explanto la unidad experimental.

4. **Enraizamiento:** con el objetivo de lograr un protocolo de enraizamiento de propágulos, que contemple el crecimiento de raíces *ex vitro*, en condiciones de invernáculo y asegure un porcentaje de enraizamiento mayor al 50% para su posterior crecimiento individual como plantlets (planta de origen *in vitro*), se efectuaron los tratamiento inductivos de raíces que a continuación se describen:

- a. **R1:** Inducción en medio sólido (WV5), conteniendo ácido naftalen acético (ANA) (2.5 µM)
- b. **R2:** Inducción en medio sólido (WV5), conteniendo ANA (1.34 µM), BAP (0.4 µM), e ácido indol butírico (IBA) (1.23 µM)
- c. **R3:** Inducción en medio sólido (WV5), libre de reguladores de crecimiento
- d. **R4:** Inducción en solución acuosa de ANA (2.5 µM)

En todos los casos la inducción se realizó en la oscuridad, por un período de 10 días. El crecimiento de raíces se efectuó *ex vitro*, en bandejas Hiko conteniendo sustrato mezcla de corteza y perlita (3:1), y transferido a condiciones de invernáculo con humedad mayor a 70%, e irrigación controlada (microaspersión).

Variables evaluadas A los 10 días de iniciado el tratamiento inductivo se evaluó la frecuencia de inducción, mediante la observación de hinchamiento y agrietamiento de epidermis de las bases de los

brotes; a los 60 días de transferidos los brotes a condiciones *ex vitro*, se evaluó la frecuencia de formación de raíces de los brotes cultivados. Para cada tratamiento el número de repeticiones fue de 30 brotes, siendo el brote la unidad experimental.

Diseño y análisis estadístico

En general, se utilizó el diseño completamente aleatorizado, y en las situaciones requeridas se realizó un arreglo factorial de los tratamientos. Los datos fueron analizados con el análisis de la varianza (SAS Institute, Cary-USA). La variación entre los tratamientos fue analizada por el test de Fisher's Least Significant Difference (LSD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de segmentos axilares provenientes de rebrote de plantines juveniles:

Para sobrevivir y crecer apropiadamente los cultivos *in vitro* deben estar libres de hongos e infecciones bacterianas. La contaminación puede causar grandes pérdidas en la micropropagación y su control es un problema frecuente en los laboratorios de cultivo de tejidos. La combinación de tratamientos más efectivos en una especie en particular sólo puede ser determinada por la experimentación (GEORGE 1993). El análisis de los resultados del presente trabajo indicó que el pretratamiento de la planta madre y la utilización de lavandina al 30 % no fue suficiente para eliminar la contaminación del explanto. La utilización del Cl₂Hg al 0.25% con enjuagues posteriores con Cl₂Ca demostró ser el tratamiento más efectivo para la obtención de explanto libre de contaminación y vigorosos con un 87 % de explantos sobrevivientes a los 60 días del establecimiento (Tabla 1). La utilización de soluciones desinfectantes que contengan metales pesados como Cl₂Hg fue necesaria para el establecimiento exitoso de P. híbrido, en concordancia con los resultados obtenidos en especies leñosas tropicales y subtropicales y específicamente en coníferas (GUPTA *et. al.* 1996 y GEORGE 1993). Dado que se observara que la aplicación de Cl₂Hg inducía a la necrosis de los tejidos en las concentraciones utilizadas, se procedió a adicionar el enjuague posterior con soluciones de Cl₂Ca, el cual actúa secuestrando el Hg⁺⁺ en solución y la total eliminación del mismo de los tejidos del explanto. El Cl₂Ca resultó efectivo en la disminución de la necrosis del tejido, permitiendo que el Cl₂Hg actuara como un desinfectante efectivo. Obteniéndose de esta manera, un protocolo de desinfección eficiente para el establecimiento *in vitro* de brotes de P. híbrido a partir de material vegetal proveniente de campo.

Multiplicación a partir de segmentos axilares obtenidos de brotes adventicios y rebrote de plantines juveniles

Los medios nutritivos comúnmente utilizados en coníferas y específicamente en el género *Pinus* incluyen: GD1 (GRESSHOFF y DOY 1972); SH (SHENCK y HILDEBRANDT 1972); DCR (BECWAR *et al.* 1990); y LP (AITKEN CHRISTIE *et al.* 1988). Sin embargo, cuando estos fueron utilizados en *Pinus taeda* (COKE 1996; ROCHA y NIELLA 2001b) y en *P. híbrido* (ROCHA y NIELLA 2001b) los medios nutritivos mencionados no demostraron resultados deseables en lo que respecta a tasas de sobrevivencia, producción de brotes y

enraizamiento. COKE (1996) desarrolló dos medios de cultivo (WV3 y WV5) para *Pinus taeda*, los cuales fueron evaluados en el presente estudio. La frecuencia de formación de brotes presentó diferencias estadísticamente no significativas para los tratamientos estudiados, origen del explanto (brotes adventicios y rebrote de plantines juveniles) y los medios de cultivo (GD1, DCR, WV3 y WV5). Se observan diferencias estadísticamente significativas para la variable número de brotes por explantos, obteniéndose valores mayores en el número de brotes por explanto, cuando los mismos fueron cultivados en medio de cultivo WV5, tanto para explantos obtenidos de brotes adventicios (M2) y rebrotes de plantas juveniles (M4) (Tabla 2).

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos de tratamientos de desinfección en segmentos axilares provenientes del rebrote de plantas juveniles de *P. híbrido*.

Table 1. Summary table showing results of disinfection treatments of axillary segments obtained from hybrid pine juvenile stock plants

Tratamientos	Repeticiones	Numero. Explantos contaminados	Numero Explantos vigorosos	Numero Explantos necróticos	Porcentaje Explantos sobrevivientes
E1	60	60	0	0	0
E2	60	54	6	0	10
E3	60	6	38	16	63
E4	60	8	26	26	43
E5	60	4	52	4	87
E6	60	0	46	14	77

E1: Con Pre-tratamiento de la planta madre; **E2:** Sin Pre-tratamiento de la planta madre + lavandina 30%; **E3:** Sin Pre-tratamiento de la planta madre + Cl₂Hg 0.25%; **E4:** Sin Pre-tratamiento de la planta madre + Cl₂Hg 0.50%; **E5:** Sin Pre-tratamiento de la planta madre + Cl₂Hg 0.25% + enjuagues Cl₂Ca; **E6:** Sin Pre-tratamiento de la planta madre + Cl₂Hg 0.50% + enjuagues Cl₂Ca

Tabla 2. Frecuencia formación de brotes (%); Promedio número de brotes por explanto y error estándar (ES) en función al origen del explanto y medio de cultivo utilizado en la multiplicación de *P. híbrido*.

Table 2. Explant origin and nutrient media effect on hybrid pine multiplication variables: frequency of axillary bud formation and average number of shoot per explant.

Tratamiento	Repeticiones	Frecuencia de brotes (%) ± ES	Promedio número de brotes por explanto ± ES
M1	30	73.07± 8.87 ^a	1.93±0.151 ^{bc}
M2	30	82.61±8.16 ^a	3.76±0.243^a
M3	30	80.00±7.21 ^a	2.07±0.287 ^b
M4	30	90.15±3.84 ^a	4.00±0.236^a
M5	30	80.00±7.12 ^a	1.50±0.188 ^d
M6	30	82.14±8.22 ^a	1.60±0.156 ^d
M7	30	78.05±7.84 ^a	2.50±0.194 ^b
M8	30	83.00±8.21 ^a	2.25 ± 0.24 ^b

Valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (test de Fisher's Least Significant Difference (LSD), p>0.05).

M1: brotes adventicios, medio WV3; **M2:** brotes adventicios, medio WV5; **M3:** rebrote de plantines juveniles, medio WV3; **M4:** rebrote de plantines juveniles, medio WV5; **M5:** brotes adventicios, medio GD1; **M6:** rebrote de plantines juveniles, medio GD1; **M7:** brotes adventicios, medio DCR; **M8:** rebrote de plantines juveniles, medio DCR

Elongación

Los brotes producidos en la etapa de multiplicación en general no presentan un vigor adecuado para su enraizamiento *ex vitro*. Por lo tanto, la etapa de elongación es necesaria para obtener un tamaño y morfología adecuada de brotes para su posterior enraizamiento *ex vitro*. En *Pinus taeda*, cuando se utilizaron brotes de 20 mm de largo el porcentaje de enraizamiento fue de 6 a 15 % (COKE 1996). La elongación de brotes se realiza frecuentemente en el medio utilizado en el establecimiento y multiplicación generalmente libre de hormonas y diluido a la mitad o a un cuarto de su concentración original. El análisis de los resultados indicó diferencias significativas en la longitud de brotes en función de la concentración del medio utilizado (p-value: 0.0001). La longitud promedio fue de 3.85 cm± 0.15 cuando los brotes fueron cultivados en el medio de cultivo WV5 y de 2.37±0.16 cuando se cultivaron en WV5 ½ (Tabla 3). Demostrándose que el medio de cultivo WV5 sin diluir es apropiado para la elongación de los brotes provenientes de la etapa de elongación.

Enraizamiento

En líneas generales, el enraizamiento se produce cuando los propágulos son expuestos, por un periodo de tiempo específico a auxinas tales como: ácido-3-

indol acético (AIA), ácido naftalen acético (ANA), ácido-indol-3-butírico (IBA) o la combinación de algunos de ellos (GRONROOS *et al.*1993). Los propágulos son luego transferidos a medios libre de hormonas o a sustrato en condiciones *ex vitro*, para el crecimiento de raíces. El análisis de los resultados indicó diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de inducción de raíces (p values: 0.0001) y frecuencia de enraizamiento *ex vitro* (p-value: 0.0001) para los diferentes tratamientos inductivos. El promedio de brotes inducidos fue de un 86.7±9.08 % y la frecuencia de enraizamiento fue de un 70.00±9.28% cuando los brotes fueron inducidos *in vitro* en medio WV5 con 2.5 µM de ANA. Mientras que los brotes inducidos en medio libre de hormonas o en agua con 2.5 µM de ANA presentaron un 0% de brotes inducidos y 0 % de enraizamiento (Tabla 4). Según THETFORD *et al.* (1996), la aplicación de tratamientos inductivos, con bajas concentraciones de auxinas, previo al enraizamiento *ex vitro* de *Pinus taeda* incrementa el número de raíces primarias por brote; y entre las auxinas, el ANA genera el mejor resultado. Los resultados del presente estudio, demostraron que la inducción en medio WV5 suplementado con 2.5 µM de ANA por un periodo de 10 días fue suficiente para la inducción de raíces y el posterior desarrollo de raíces *ex vitro*.

Tabla 3. Longitud promedio de brotes obtenidos (cm) y error estándar (ES) en la etapa de elongación para P. híbrido.

Table 3. Average Shoot length and standard error obtained at the elongation stage for hybrid pine.

Tratamientos	Repeticiones	Longitud promedio en cm±ES
WV5	40	3.85±0.149 ^a
WV5 1/2	40	2.374±0.159 ^b

Valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (test de Fisher's Least Significant Difference (LSD), p>0.05).

Tabla 4. Frecuencia de inducción (%) y enraizamiento (%) y error standard (ES) obtenido en brotes de P. híbrido

Table 4. Hybrid pine rooting and Root induction frequency and standard error.

Tratamientos	Repeticiones	Frecuencia de inducción ± ES	Frecuencia de enraizamiento ± ES
R1	30	86.77±9.08 ^a	70.0±9.28 ^a
R2	30	79.00±10.69 ^a	55.6±9.08 ^a
R3	30	0.00 ^b	0.00 ^b
R4	30	0.00 ^b	0.00 ^b

Valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (test de Fisher's Least Significant Difference (LSD), p>0.05).

R1: Inducción en medio sólido (WV5), con ANA (2.5 µM); **R2:** Inducción en medio sólido (WV5), con ANA (1.34 µM), BAP (0.4 µM), e IBA (1.23 µM); **R3:** Inducción en medio sólido (WV5), libre de reguladores de crecimiento; **R4:** Inducción en solución acuosa de ANA (2.5 µM)

CONCLUSION

El presente trabajo resume los lineamientos de un protocolo de multiplicación vía axilar *in vitro* para producción de plantas de P. híbrido que contempla la utilización de brotes adventicios obtenidos a partir de embriones maduros vía organogénesis directa y de brotes provenientes de plantas madres juveniles, decapitadas criadas a pleno sol. La conformación de un sistema de multiplicación vegetativa *in vitro* que integre las técnicas *in vitro* de organogénesis directa- multiplicación vía axilar y *ex vitro* de enraizamiento de estacas o macropropagación, resulta en una alternativa viable de producción de plantas a escala comercial para satisfacer la demanda local de P. híbrido.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Forestales, y las empresas DKM S. A, y Forestal Bosques del Plata S.A. por los fondos aportados para el desarrollo del presente trabajo.

REFERENCIAS

- ABDULLAH, A.; Grace J. y Yeoman M. 1986. Rapid micropropagation of Calabrian Pine from primary and secondary bud on shoot explant. Canadian Journal of Forest Research. 16 (3) 2: 637-641.
- ABO EL-NIL, M. M. 1982. Method for asexual reproduction of coniferous trees. US Patent # 4,353,184.
- AITKEN CHRISTIE, J. y Thorpe T. 1984. Clonal propagation: Gymnosperm. In: Vasil, I.K. Ed. Cell culture and somatic cell genetics of plants. Laboratory procedures and their application. New York Academic Press: 81-95.
- AITKEN CHRISTIE, J.; Singh A. y Davies H. 1988. Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiata pine. In: Genetic Manipulation of Woody Plants. Eds: Hanover J. y Keathley D. Plenum Press-NY. Pp.: 413-432.
- AMERSON, H. V.; Frampton L. J.; Mott R. L.; y Spaine, P.C. 1987. Tissue culture of conifers using Loblolly pine as a model. In: Genetic Manipulation of Woody Plants. Eds: Hanover J. y Keathley D. Plenum Press-NY. Pp.: 117-138.
- BAEZ, M., Austin, R. y Dalprá, L. 2003. Implementación y mantenimiento de *Pinus taeda* y *Pinus elliottii* var *elliottii* en suelos arenosos del centro este de la provincia de corrientes. 10ma Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Eldorado, Misiones. 10 p.
- BECHWAR, M. R.; Nagmani, R.; y Wann, S. R. 1990. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) Can. J. For. Res. 20: 810-817
- COKE, J. E. 1996. Basal nutrient medium for *in vitro* cultures of loblolly pines. USA Patent 5,534,433 y 5,534,434.
- GAUCHAT, M. y Belaver H. 2005. *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *Hondurensis*: Híbridos de Alta Productividad Combinando Crecimiento y Forma. IDIA XXI. Pp. : 162-164.
- GEORGE, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd., England. 1361 pag.
- GRESSHOFF, P.M. y Doy C. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta 107: 161-170.
- GRONROOS, R; Flygh, G; Khar, M. y Von Arnold, S. 1993. Growth analysis on *in vitro*, *ex vitro* and auxin-rooted hypocotyls cuttings of *Pinus contorta* Dougl. Ex Loud. New Phytology 125: 829-836.
- GUPTA, P. K. et al. 1996. Clonal Propagation of Conifers vía Somatic Embryogenesis. In: Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Trees. Eds.: Ahuja, M., Boerjan, W. and Neale, D. Kluwer Academic Publishers. Pp.3-10.
- GUPTA, P.K. y Durzan D. J. 1985. Shoot multiplication from mature Douglas fir and sugar pine. Plant cell Rpts. 4:177-179
- HANDLEY, L. W.; Becwar, M. R.; Chesick, E.; Coke J.; Godbey, A. P.; y Rutter, M. 1995. Research and development of commercial tissue culture systems in loblolly pine. Tappi Journal, Vol 78, No 5: 170-175.
- JOHN, A. 1983. Tissue culture of coniferous trees. In: Dodds, J.H., ed. Tissue culture of trees. Wesport, CT: The AVI publishing company, Inc: 6-21.
- LAPP, M.; Malinek J. y Coffey M. 1996. Microculture of western white pine (*Pinus Monticola*) by induction of shoots on bud explants from 1 to 7 year old trees.
- MEHRA-PALTA, A. 1983. Clonal Propagation of Gymnosperms. US Patent # 4,417,417.
- MOTT, R. L. y Amerson H. V. 1981. A tissue culture process for the clonal production of Loblolly pine plantlets. North Carolina Agricultural Research Service Tech. Bull No: 271.
- NIELLA, F. y Rocha, P. 2003. Factores que afectan la formación de brotes adventicios a partir de embriones maduros de *Pinus taeda* l. Vía organogénesis. YVYRARETA 12 – Pp.: 41-45. ISSN: 0328-8854
- NIELLA, F. y Rocha, P. 2004. Biotecnologías aplicadas a los programas de mejoramiento genético de *Pinus* sp. en la región. Actas Jornadas De Mejoramiento Genético Para Productores Forestales, Posadas, Misiones- Paginas: 32-41
- PEZZUTTI, R. 2004. El mejoramiento genético forestal en Bosque del Plata. Actas Jornadas De

- Mejoramiento Genético Para Productores Forestales, Posadas, Misiones. Pp.: 52-58
- ROCHA, P. y Niella, F. 2001a. Research and Development of Vegetative Propagation Techniques for Pinus Sp. In the Northeast Region of Argentina. Proceedings of the 26th. Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference. June 26-29, 2001. Ed.: Jeffrey F. D. Dean-Georgia University, Athens, GA, USA. Pp.: 32-38.
- ROCHA, P. y Niella, F. 2001b. Manual de procedimientos: Técnica de micropropagación para el establecimiento in vitro y multiplicación vegetativa de Pinus taeda y Pinus elliottii x caribaea. Presentado en: Seminario interno Julio 2001. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional de Misiones. Eldorado, Misiones. 25 p.
- ROCHA, P. y Niella, F. 2002. Manual de procedimientos: Técnica de organogénesis para la formación in vitro de brotes adventicios para Pinus taeda y Pinus elliottii x caribaea. Presentado en: Seminario interno Junio 2002. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional de Misiones. Eldorado, Misiones. Circulación interna. 15 p.
- RODRIGUEZ, G. 2003. Jornadas técnicas foresto-industriales. Híbrido de PEE x PCH. INTA EEA. Montecarlo. Ensayo Comparativo de Pinos Mejorados
- SEN, S.; Newton R. J.; Fong, F.; y Neuman P. 1989. Abscisic acid: a role in shoot enhancement from loblolly pine (Pinus taeda L.) cotyledon explants. Plant Cell Report (1989) 8: 191-194.
- SOMMER, H.; Brown C. y Kormanik P. 1974. Differentiation of planlets in longleaf pine tissue culture in vitro. Botanical Gazette. 136(2):196-200.
- STANGE, C., Prehn, D., Gebauer, M., Mercado, A. Norero, A. y Arce-Johnson P. 1998. Optimización de las condiciones de cultivo in vitro de mebriones de Pinus radiata y caracterización de los brotes regenerados. XI SILVOTECNA: Biotecnologías aplicadas a la silvicultura de especies forestales de rápido crecimiento. Concepción, Chile
- SCHENK, R. y Hildebrandt, A. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany 50: 199-204.
- THORPE, T. A. y Biondi S. 1984. Conifers. In: Sharp W.; Evans D.; Ammirato, P; Yamada Y; eds. Handbook of plant cell culture. Crop Species. New York: Macmillan Publishing Company: 435-470. Vol. 2.
- HETFORD, M y Blazich, F. 1996. Auxin source influences root system quality of loblolly pine stem cuttings. SNA Research Conference Vol. 41: 235
- TORIBIO, M.; y Pardos J. A. 1989. Scots pine (Pinus sylvestris L.), In: Bajaj, Y.P.S., ed. Biotechnology in agriculture and forestry. 2. Trees. Berlin: Springer-Verlag Publishers: 507-525. Vol. 5.