

FACTORES QUE AFECTAN LA FORMACION DE BROTES ADVENTICIOS A PARTIR DE EMBRIONES MADUROS DE *Pinus taeda* L. VIA ORGANOGENESIS

FACTORS CONTRIBUTING TO ADVENTITIOUS SHOOT INDUCTION VIA ORGANOGENESIS IN *Pinus taeda* L. MATURE EMBRYOS

Fernando Niella¹

Patricia Rocha¹

Fecha de recepción: Setiembre de 2002.

Fecha de aceptación: Abril de 2004.

1 - Investigador Laboratorio de Propagación Vegetativa - Facultad de Ciencias Forestales - Universidad Nacional de Misiones - Bertoni 124. 3382 Eldorado, Misiones-Argentina. (Tel: 0054 —3751 – 431780 Int. 115) Email: FNIELLA@arnet.com.ar .

SUMMARY

The morphogenic capacity of mature embryos of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) was studied. Three factors were tested: 1) embryo developmental stage, 2) explant type; and 3) 6-Benzyladenine (BA) concentrations as well as Abscisic acid (ABA) presence in the induction media. The results indicated that the factors above cited influenced the morphogenic capacity and the adventitious shoot differentiation. The highest induction and differentiation frequencies were obtained when cotyledon with hypocotile were used as explant (dissected from mature embryos with a radicle length between 2 – 5 mm) and cultured on BA (5 mg/l) and ABA (0.026 mg/l) WV5 induction media. An average number of 20 harvested shoots per explant were obtained over a 10 weeks period.

Key words: *Pinus*, cotyledon, micropropagation, BA 6-Benzyladenine, ABA Abscisic acid

RESUMEN

La capacidad de formación de brotes adventicios, a partir de embriones maduros de *Pinus taeda*, fue estudiada en función de: 1) estadio de desarrollo del embrión; 2) el explanto utilizado (cotiledones separados y cotiledones con hipocotile); y 3) la concentración de BA (Benzilamino purina) y presencia de ABA (ácido abscísico) en el medio inductivo. Los resultados presentados en este estudio demuestran que tanto el estadio de desarrollo del embrión, el tipo de explanto, la concentración de BA en el medio inductivo, tienen influencia en la respuesta morfogénica y posterior desarrollo de brotes adventicios. La mayor frecuencia de inducción y diferenciación se obtuvo cuando cotiledones con hipocotile disectados de embriones con una longitud de radícula de 2-5 mm fueron utilizados como explantos y cultivados en medio inductivo WV5 suplementado con BA (5 mg/l) y ABA (0,026 mg/l). En estas condiciones se obtuvo una producción promedio de 20 brotes/explanto en un periodo de 10 semanas.

Palabras clave: *Pinus*, micropropagación, cotile-

don, BA 6-Benziladenina, ABA ácido abscísico.

INTRODUCCIÓN

Pinus taeda L. es una de las especies de coníferas de mayor importancia económica en Norte y Sur América. En Argentina, se ha desarrollado un programa de mejoramiento genético para pino taeda (*Pinus taeda* L.), comenzando a partir del año 2002 la producción local de semillas de polinización controlada a partir de poblaciones selectas. Con el objetivo de aumentar la disponibilidad de este material genético mejorado de alto costo y en general escaso, se ha propuesto un sistema de propagación vegetativa que integra las técnicas de *organogénesis*, *micropropagación* y la *macropropagación* (ROCHA y NIELLA, 2001a). En el caso de la organogénesis directa, la mayoría de las regeneraciones *In vitro* 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; y SOMMER, 1987; MEHRA PALTA, 1983; AITKEN, 1988; ROCHA y NIELLA, 2001a y 2001b). La *in-*

ducción de brotes adventicios vía organogénesis se inicia mediante la aplicación de citoquininas, solas o en combinación con auxinas y otras hormonas como es el caso del ácido abscísico (ABA) (SEN et al., 1989; MOTT y AMERSON, 1981; y SOMMER, 1987; MEHRA PALTA, 1983).

El presente estudio explora la influencia del explanto, y el tipo y concentración de reguladores de crecimiento, en la capacidad de formación de brotes adventicios a partir de embriones maduros de *Pinus taeda* cultivados in vitro. El objetivo de este trabajo, fue determinar la capacidad de formación de brotes adventicios en función a: i) estadio de desarrollo del embrión; ii) el explanto utilizado (cotiledones separados y cotiledones con hipocótilo); y iii) la concentración de BA (6-Benzyladenine) y presencia de ABA (ácido abscísico) en el medio inductivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Semillas de *Pinus taeda* de origen comercial fueron suministradas por las empresas Bosques del Plata S.A y PeCom Forestal S.A. Las semillas fueron esterilizadas en solución de lavandina® 50%, y estratificadas en frío a 4°C por un período de 30-45 días.

Diseción del explanto

Como fuente de explanto se utilizaron embriones maduros, germinados y clasificados en función al estadio de desarrollo del embrión y tipo de explanto.

1. *Estadio de desarrollo del embrión*: una vez iniciada la germinación de la semilla, los embriones fueron disecados asépticamente y clasificados de acuerdo al estadio de desarrollo de los mismos: 1) *Embrión tipo 1*: embriones cuya radícula, al momento de la escisión comienza a emerger y su longitud es de 1-2 mm; y 2) *Embrión tipo 2*: embriones cuya radícula emergió al momento de la escisión y su longitud es de 2-5 mm.

2. *Tipo de explanto*: 1) Cotiledones separados, 2) Cotiledones con hipocótilo

Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el medio WV5 básico (COKE, 1996) suplementado con 30 g/l de sacarosa (SIGMA), y 8 g/l de agar (SIGMA). El pH fue ajustado a $5,75 \pm 0,05$ con OHNa o CIH 1 N, previo a ser esterilizado en autoclave por 25 minutos a 121 °C.

Reguladores de crecimiento

Para determinar la concentración óptima de BA con o sin la presencia de ABA, se adoptó un arreglo factorial de los tratamientos (para este ensayo se utilizaron embriones en estadio tipo 2, y los explan-

tos fueron cotiledones con hipocótilo): 1) Control WV5 libre de hormonas; 2) WV5 + 5 mg/l de BA + 0 mg/l ABA; 3) WV5 + 10 mg/l de BA + 0 mg/l ABA; 4) WV5 + 5 mg/l de BA + 0,026 mg/l de ABA; y 5) WV5 + 10 mg/l de BA + 0,026 mg/l de ABA

Condiciones de cultivo

Los cultivos se mantienen en cámara de cría con un fotoperiodo de 16 horas, intensidad lumínica de 4500 lux (lámpara fluorescente Philips 84) y una temperatura constante de 24 ± 2 °C.

Colecta de datos y análisis estadístico

La frecuencia de embriones inducidos (verdes, brillantes, hinchados y con emergencia de yemas adventicias < a 2mm) y embriones no inducidos (amarronados), fueron evaluados después de 45 días posteriores al cultivo inicial. El promedio de brotes adventicios/embriones se evaluó a los 75 días posteriores al cultivo inicial. Cada tratamiento (estadio de desarrollo del embrión, tipo de explanto) fue repetido 5 veces y cada repetición consistió de 10 explantos. Se utilizó el diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial de los tratamientos. Los datos fueron analizados con el análisis de la varianza (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary-USA). La variación entre los tratamientos fue analizada por el test de Fisher's Least Significant Difference (LSD).

RESULTADOS

1. Estadio de desarrollo del embrión

Ambos tipos de explantos, independientemente del estadio de desarrollo del embrión respondieron a la inducción a los 10-15 días, presentando color verde brillante e hinchados y coloración verde rojiza en los cotiledones con hipocótilo en algunos casos. Los resultados indicaron que los embriones maduros en los dos estadios de desarrollo (tipo 1 y 2) poseen capacidad morfogénica. No obstante la frecuencia de inducción fue significativamente mayor en embriones tipo 2 (Tabla 1) para explanto cotiledon + epicótilo ($85,00 \pm 8,16$) comparado a la frecuencia de inducción en embriones tipo 1 para explanto cotiledon y explanto cotiledon + hipocótilo ($50,00 \pm 10,00$ y $64,00 \pm 9,79$ respectivamente). En embriones tipo 2 no se observó diferencias significativas entre los dos tipos de explantos utilizados, cotiledones ($70,00 \pm 9,18$) y cotiledones con hipocótilo ($85,00 \pm 8,16$), aunque la frecuencia de inducción fue mayor cuando se utilizó como explanto a cotiledones con hipocótilos. Además en embriones tipo 1 con explanto cotiledones la frecuencia de amarramiento fue significativamente mayor ($35,00 \pm 9,79$) comparado a la frecuencia de amarramiento obtenida con embriones tipo 2 con explanto cotiledon + hipocótilo ($8,00 \pm 5,53$).

Tabla 1: Frecuencia de inducción y amarronamiento en función del estadio de desarrollo del embrión y tipo de explanto, a partir de embriones maduros de *Pinus taeda*.**Table 1: Induction frequency and browning from *Pinus taeda* mature embryo at different stages of development and explant type.**

| Embrión | Explanto | N | Inducción±SE | Amarronamiento±SE |
|---------|------------------------|-----|----------------|-------------------|
| Tipo 1 | Cotiledones | 100 | 50,00±10,00bcd | 35,00±9,79a |
| | Cotiledón + hipocotile | 100 | 64,00±9,79bc | 18,00±7,48ab |
| Tipo 2 | Cotiledones | 100 | 70,00±9,18ab | 12,00±6,66bc |
| | Cotiledon+hipocotile | 100 | 85,00±8,16a | 8,00±5,53bcd |

1: Fisher LSD, tratamientos con la misma letra no son significativamente distintos

2 Concentración de BA y presencia de ABA en el medio inductivo

La máxima respuesta morfogénica se observó en medio con BA y ABA, después de 6 semanas de cultivo. La frecuencia de inducción fue afectada por la concentración de BA en el medio nutritivo. Las frecuencias de inducción, aún cuando no significativa, fue mayor cuando los cultivos se efectuaron en medio suplementado con la menor concentración de BAP (5mg/l) irrespectivamente de la presencia o no de ABA en el medio nutritivo (80,00±10,00 y 68,00±9,52 respectivamente). Si bien la presencia

de ABA en el medio no demostró incrementar significativamente la formación de tejido meristemático, cuando el ABA se adicionó al medio se observó que los explantos presentaban, posteriormente, una frecuencia mayor de diferenciación y número de brotes adventicios promedios por explanto (24,00±3,00) (Tabla 2). En el tratamiento control sin reguladores del crecimiento no se observó inducción y los explantos se amarronaron o permanecieron estancados en su desarrollo, hasta su eliminación del ensayo (10 semanas posteriores al cultivo).

Tabla 2: Frecuencia de inducción, amarronamiento y número de brotes adventicios promedio/explanto (estadio tipo 2, cotiledon+hipocotile), en función de la concentración de BA y presencia o ausencia de ABA en el medio inductivo (WV5), a partir de embriones maduros de *Pinus taeda*.**Table 2: Induction frequency, browning and shoot number per explant (stage 2, cotyledon + hypocotyle) from *Pinus taeda* mature embryo cultured on WV5 nutrient medium supplemented with BA and ABA.**

| ABA mg/l | BA mg/l | N | Inducción ±SE ¹ | Amarronamiento±SE ¹ | Brotes/explanto ±SE ¹ |
|----------|---------|----|----------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 0 | 5 | 50 | 68,00±9,52ab | 20,00±8,16abc | 18,00±4,00ab |
| | 10 | 50 | 60,00±10,00abcd | 32,00±9,52a | 12,00±3,00bc |
| 0.026 | 5 | 50 | 80,00±10,00a | 18,00±9,00abcd | 24,00±3,00a |
| | 10 | 50 | 65,00±8,53abc | 20,00±9,60ab | 16,00±6,00abc |

1: Fisher LSD, tratamientos con la misma letra no son significativamente distintos

DISCUSION

Los resultados presentados en este estudio indican que tanto el estadio de desarrollo del embrión, el tipo de explanto y la concentración de BA y ABA en el medio inductivo, tienen influencia en la respuesta morfogénica y posterior desarrollo de brotes adventicios. Esto ha sido también demostrado en otras especies de pinos (THORPE, 1987; ABDULLAH et al., 1985; AITKEN et al., 1984). Particularmente, en las condiciones de estudio del presente trabajo, se demuestra la importancia de usar como explanto a cotiledones no separados, unidos a su respectivo hipocotile, como forma de aumentar la frecuencia de inducción, y formación de brotes adventicios y al mismo tiempo disminuir el amarronamiento. Es esta una diferencia importante con otras publicaciones, que utilizan cotiledones separados del embrión como ex-

planto adecuado (MOTT Y AMERSON, 1981; SEN, 1989; THORPE, 1988) y que en nuestras condiciones de estudio, evidenciaron un mayor porcentaje de amarronamiento y menor frecuencia de inducción. También se observó que cuando los cotiledones se cultivan *sin el hipocotile*, las yemas adventicias se iniciaban en su mayoría en el extremo del cotiledón, mientras que cuando se cultivan los cotiledones *con el hipocotile* las yemas adventicias se formaban en todo el explanto, con formación de un *cluster* de yemas adventicias, que subsecuentemente se desarrollan en brotes adventicios normales resultando así en una mayor tasa de rebrote.

Con respecto a los reguladores de crecimiento, el presente trabajo muestra la misma tendencia observada por (SEN et al., 1989), donde la presen-

cia de ABA (0,026 mg/l) en el medio inductivo combinada con bajas concentraciones de BA (5 mg/l) incrementa la frecuencia de inducción, posterior diferenciación y número de brotes adventicios obtenidos por explanto a partir de embriones maduros de *Pinus taeda*. Sin embargo, nuestros resultados indican que el incremento en la frecuencia de inducción obtenidos en presencia de ABA no fueron significativamente distintos a los resultados obtenidos en ausencia de ABA.

CONCLUSIÓN

Los resultados presentados en este estudio demuestran que tanto el estadio de desarrollo del embrión, el tipo de explanto y la concentración de reguladores de crecimiento en el medio inductivo, tienen influencia en la capacidad de formación de brotes adventicios a partir de embriones maduros de *Pinus taeda*. La mayor frecuencia de inducción y diferenciación se obtuvo cuando cotiledones con hipocotile disectados de embriones con una longitud de radícula de 2-5 mm fueron utilizados como explantos y cultivados en medio inductivo WV5 suplementado con BA (5 mg/l) y ABA (0,026 mg/l). En estas condiciones se obtuvo una producción promedio de 20 brotes/explanto en un periodo de 10 semanas. La tasa de formación de brotes por semilla obtenida mediante la técnica de organogénesis directa descrita en este trabajo y su integración con las técnicas de micropropagación para la multiplicación de estos brotes adventicios, demuestran la potencialidad de las técnicas de cultivo de tejidos para aumentar la disponibilidad de material genético elite.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Facultad de Ciencias Forestales – UNAM y las empresas Forestal Bosques del Plata S.A y Pérez Companc S.A. por el apoyo financiero a este proyecto.

BIBLIOGRAFIA

- ABDULLAH, A.; J. Grace and M. Yeoman. 1986. Rapid micropropagation of *Calabrian Pine* from primary and secondary bud on shoot explant. *Canadian Journal of Forest Research*. 16 (3) 2: 637-641.
- AITKEN CHRISTIE, J. and T. Thorpe. 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.; A. Singh and H. Davies. 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.
- COKE, J. E. 1996. Basal nutrient medium for in vitro cultures of loblolly pines. USA Patent 5,534,433 y 5,534,434.
- 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.
- 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. Informe técnico: Presentación de avances en técnicas de cultivo de tejido para *Pinus taeda* y *Pinus elliottii x caribaea*. Presentado en: Seminario interno Enero 2001. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional de Misiones. Eldorado, Misiones. Circulación interna. 173 p.
- ROCHA, P. y Niella, F. 2001C. 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. Circulación interna. 25 p.
- SEN, S.; Newton r. j.; Fong, f.; y J. Neuman. 1989. Abscisic acid: a role in shoot enhancement from loblolly pine (*Pinus taeda* L.) cotyledon explants. *Plant Cell Report* (1989) 8: 191-194.
- THORPE, T. A.; S. Harry.; and Kumar P. P. 1991. Application of micropropagation to forestry, In: *Micropropagation: Technology and Application*. Eds. P.C. Debergh and R.H. Zimmerman. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, pp. 311-336.
- THORPE, T. A.; and S. Biondi. 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.