

17- Ciencia, Tecnología e Innovación

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

Barone, Javier Orlando; Luna, Claudia Verónica\*; Oberschelp, Gustavo Pedro Javier\*

\*Orientadores

[javier\\_barone16@hotmail.com](mailto:javier_barone16@hotmail.com)

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional del Nordeste

**Resumen**

El éxito de la propagación *in vitro* vegetal depende en gran parte de la naturaleza y concentración de los nutrientes minerales del medio de cultivo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes medios basales sobre la regeneración de yemas adventicias a partir de embriones cigóticos maduros de *Pinus taeda*. Se evaluaron los medios basales MS, DCR, LP, WV3 y WV5 al 100 y al 50 % de su concentración original. A los 35 días de incubación se midió la tasa de regeneración, tasa de oxidación, número de yemas por explante e índice de capacidad de formación de yemas (BFC). Los datos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y test de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Usando análisis CHAID se determinó el componente del medio que tuvo mayor influencia en la regeneración. Se realizaron estudios anatómicos mediante microscopía óptica para determinar el origen de las yemas. La tasa de regeneración fue menor en los medios MS y LP al 100% como en el medio WV3 al 50 y 100%. Se observaron altas tasas de oxidación con MS y LP al 100%. El número de yemas por explante y el índice BFC fue mayor en el medio MS al 50%. La componente con mayor influencia en la regeneración fue la concentración de amonio. A partir del análisis anatómico se pudo observar que la formación de yemas adventicias fue directa.

**Palabras clave:** cultivo *in vitro*, nutrición mineral, regeneración

**Introducción**

El éxito del cultivo de tejidos vegetales como un medio de propagación de plantas está fuertemente influenciado por la naturaleza del medio de cultivo utilizado

(George *et al.* 2008).

Tradicionalmente, las formulaciones nutritivas fueron desarrolladas en base a experimentos factoriales donde se analizaba de uno a tres factores a la vez

(Murashige y Skoog, 1962; Driver y Kuniyuki, 1984). Como resultado de ello, el medio basal de Murashige y Skoog (1962) en su formulación original o diluido, es utilizado ampliamente en el cultivo de tejidos de la mayoría de las especies; a la vez que se lo referencia para modificar otras formulaciones (Driver y Kuniyuki, 1984).

En *P. taeda* se han utilizado formulaciones químicamente definidas como ser, el medio basal DCR (Gupta y Durzan 1987) para la generación de embriones somáticos (Becwar *et al.* 1990) y para la proliferación de brotes axilares en micropropagación (Francisco de Oliveira *et al.*, 2012); o el medio LP para la producción de embriones somáticos (Li *et al.*, 1998).

Por otra parte, se han desarrollado medios específicos como el WV5 y WV3 con combinaciones de sales que optimizan las respuestas *in vitro* de *P. taeda* (Coke 1996a, 1996b).

### Objetivos

Evaluar el efecto de diferentes medios basales sobre la regeneración de yemas adventicias a partir de embriones cigóticos maduros de *Pinus taeda*. Identificar el componente del medio con mayor influencia en la formación de yemas. Evaluar si la organogénesis fue directa o indirecta (a partir de previa formación de callo).

### Materiales y Métodos

Se evaluaron los medios basales MS (Murashige y Skoog, 1962), DCR (Gupta y Durzan 1987), LP (Aitken-Christie *et al.*, 1988), WV3 y WV5 (Coke, 1996) al 100 y al 50 % de su concentración original; en todos los casos contenían 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa; 6,5 g.L<sup>-1</sup> de agar A-1296 Sigma®; 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina y 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de thidiazuron. El pH del medio fue ajustado a 5,8 antes de la adición del agente gelificante. Luego se esterilizó el medio de cultivo en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

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

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado compuesto por cinco repeticiones por tratamiento, la unidad experimental estuvo compuesta por diez embriones cultivados. A los 35

días de incubación se evaluó la tasa de regeneración (porcentaje de embriones cigóticos maduros que produjeron yemas), tasa de oxidación, número de yemas por explante regenerado y el índice de capacidad de formación de yemas (BFC). Los datos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y test de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Usando algoritmo de minería de datos CHAID (Chi-square automatic interaction detector) según Akin *et al.* (2017) se determinó el componente del medio que tuvo mayor influencia en la regeneración partir de la composición de cada medio. Se realizaron estudios anatómicos mediante microscopia óptica, para lo cual los embriones regenerados fueron fijados, deshidratados usando series Biopur<sup>®</sup> (Gonzalez y Cristóbal, 1997) e incluidos en parafina. Los cortes transversales de 10–12  $\mu\text{m}$  de sección fueron coloreados con Safranina-Astra blue y montados en bálsamo de Canadá. Las microfotografías fueron tomadas usando un microscopio Leica DM LB2 equipado con una cámara Leica ICC50 HD.

## Resultados y Discusión

La tasa de regeneración estuvo influenciada por el medio basal (Fig.1-A), disminuyendo fuertemente en los medios MS y LP al 100% (12,44 $\pm$ 4,26 y 22 $\pm$ 13,04% respectivamente); y siendo el

medio DCR al 100 y 50%, los que expresaron los mayores valores (89,78 $\pm$ 12,26 y 88 $\pm$ 8,37 % respectivamente). A su vez en los primeros, se observaron altas tasas de oxidación, registrándose 52,44 $\pm$ 9,73% en MS y 44 $\pm$ 8,94% en LP (Fig. 1-B). La alta concentración de nitrógeno total en el MS puede tener efectos tóxicos para algunas especies (George *et al.* 2008), tales como el ennegrecimiento tisular y/u oxidación; resultado que también puede observarse en el medio LP.

El número de yemas por explante y el índice BFC fue mayor en el medio MS al 50%, con 19,53 $\pm$ 0,9 yemas por explante y un índice BFC de 15,22 $\pm$ 2,48 (Fig. 1-C y 1-D).

A partir de análisis CHAID se determinó que el componente con mayor influencia en la regeneración fue el  $\text{NH}_4^+$  (amonio) (Fig.2). Concentraciones de este ion mayores a 10,31 mM disminuyeron la regeneración, probablemente debido a la toxicidad que presenta al ser utilizado en altas concentraciones.

George *et al.* (2008) describen que la concentración de  $\text{NH}_4^+$  presente en el medio de cultivo afecta la actividad de los reguladores de crecimiento y que el requerimiento de citoquininas para la actividad meristemática es menor cuando el contenido de nitrógeno reducido es razonablemente alto. Esto explicaría la menor capacidad de regeneración de los

medios DCR, WV3 y WV5; debido a que presentan menor contenido de  $\text{NH}_4^+$  en su composición, con respecto al MS.

A partir del análisis anatómico se pudo determinar que la formación de yemas

adventicias fue directa a partir de células subepidérmicas que formaron regiones meristemáticas globulares (Fig. 3).

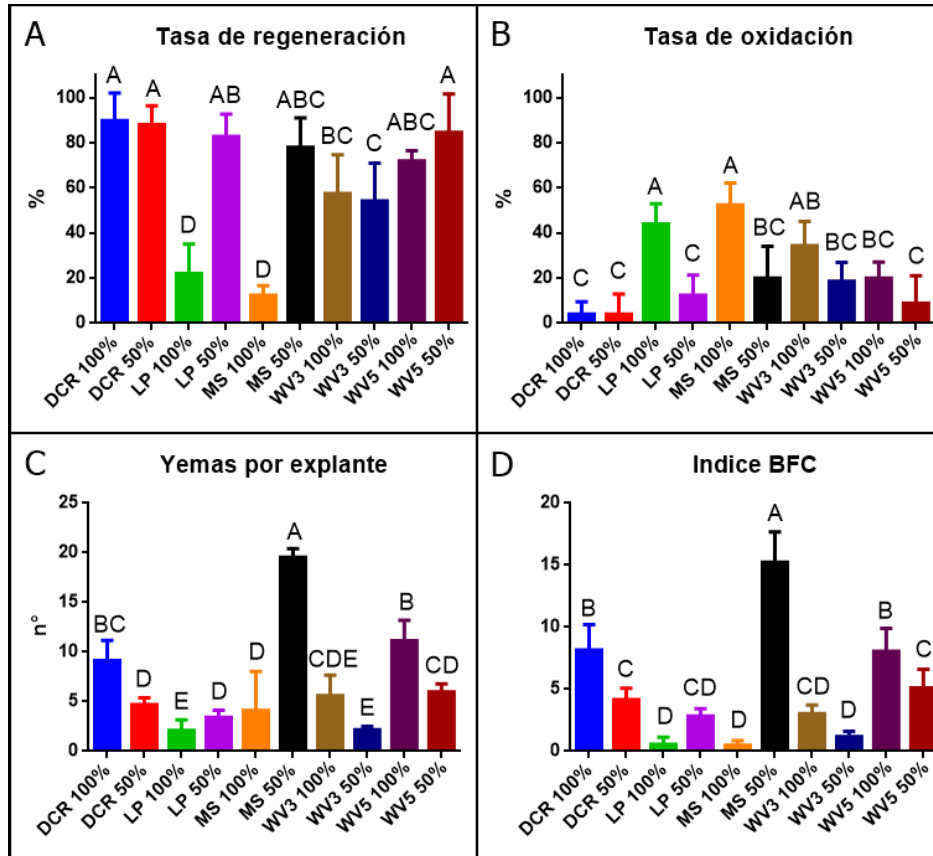


Figura 1. Respuestas en función al medio basal utilizado. A-Tasa de regeneración (%). B-Tasa de oxidación (%). C- Número de yemas por explante. D- Índice BFC

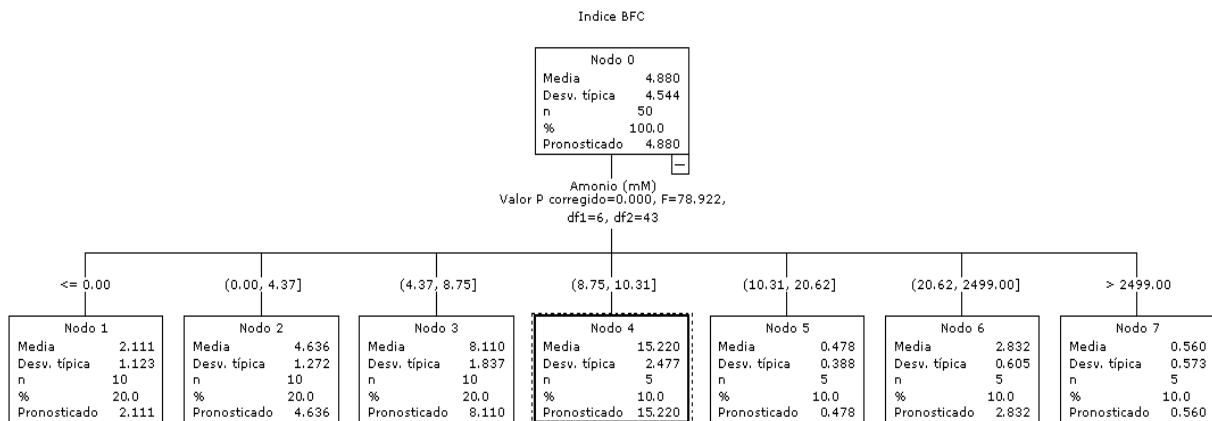


Figura 2. Efecto de la concentración de amonio sobre el índice BFC.

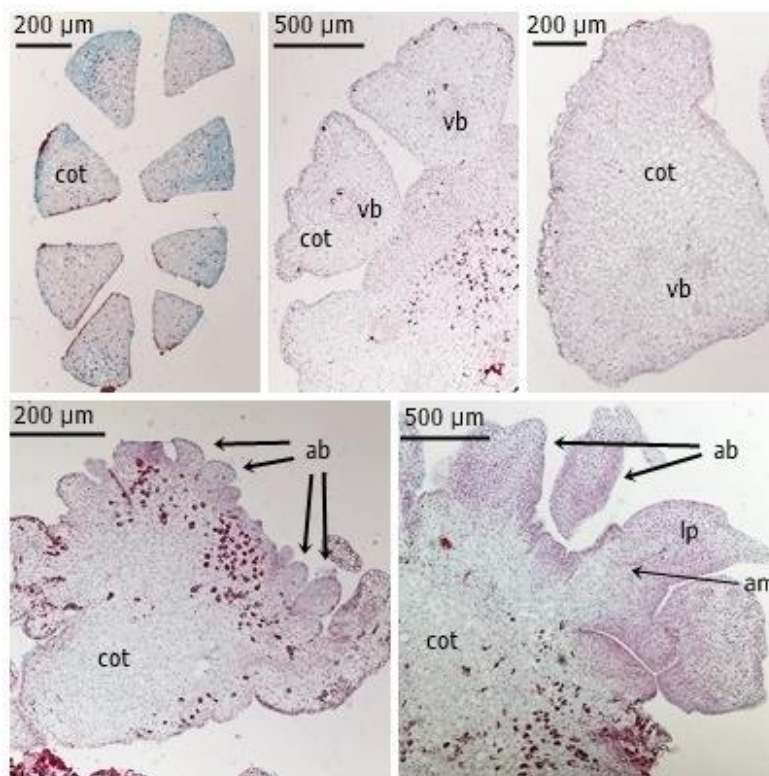


Figura 3. Corte transversal de embriones regenerados. **cot**, cotiledon; **vb**, vasos vasculares; **ab**, yemas adventicias; **am**, meristema apical; **lp**, primordio foliar.

### Conclusiones

La composición del medio basal influyó en la regeneración de yemas adventicias de *Pinus taeda*, observándose mayor

producción de yemas cuando los embriones fueron cultivados en medio MS al 50% de su concentración original. La concentración de amonio en el medio de

cultivo fue la variable de mayor influencia en la organogénesis. La organogénesis fue directa.

### Bibliografía

- Aitken-Christie, J., Singh, A. P., & Davies, H. (1988). Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiata pine. In *Genetic manipulation of woody plants* (pp. 413-432). Springer, Boston, MA.
- Akin, M., Eyduran, E., & Reed, B. M. (2017). Use of RSM and CHAID data mining algorithm for predicting mineral nutrition of hazelnut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(2), 303-316.
- Becwar, M. R., Nagmani, R., & Wann, S. R. (1990). Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Canadian Journal of Forest Research*, 20(6), 810-817.
- Coke, J.E (1996a). USA Patent 5.534.433. Available online: <http://www.freepatentsonline.com/5534433.pdf>
- Coke, J.E (1996b) USA Patent 5.534.434. Available online: <http://www.freepatentsonline.com/5534434.pdf>
- De Oliveira, L. F., Ribas, L. L. F., Quoirin, M., Koehler, H. S., Amano, E., & Higa, A. R. (2012). Micropropagation of *Pinus taeda* L. from juvenile material. *Tree For Sci Biotechnol*, 6, 96-101.
- Driver, J. A., & Kuniyuki, A. H. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut rootstock [*Juglans hindsii* X *Juglans regia*, tissue culture]. *HortScience (USA)*.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 65-113). Springer, Dordrecht.
- González, A. M., & Cristóbal, C. L. (1997). Anatomía y ontogenia de semillas de *Helicteres lhotzkyana* (Sterculiaceae). *Bonplandia*, 287-294.
- Gupta, P. K., & Durzan, D. J. (1987). Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Nature Biotechnology*, 5(2), 147.
- Li, X. Y., Huang, F. H., & Gbur Jr, E. E. (1998). Effect of basal medium, growth regulators and Phytigel concentration on initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Plant Cell Reports*, 17(4), 298-301.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

## Financiamiento

Este trabajo se realizó con fondos provenientes del proyecto: 16A001 aprobado por Resol. Res. Nº 970/16 (C.S. UNNE). Título: “Desarrollo de sistemas de propagación clonal de especies de interés forestal e industrial mediante el uso de biorreactores de inmersión temporal”.