

Efecto de dos medios de cultivo en la elongación *in vitro* de brotes de *Pinus taeda* L.

Luciana Paula Imbrogno¹, Fernando Niella¹, Patricia Rocha¹, Rafael G. Kosky^{2*}. *Autor para correspondencia.

¹Facultad de Forestales. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones, Argentina.

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830. e-mail: kosky@ibp.co.cu

RESUMEN

Pinus taeda L. es una especie forestal de gran importancia a nivel internacional y en la Argentina. Las técnicas biotecnológicas puede constituir una alternativa para la propagación de esta especie, así como para la obtención de plantas madre. El objetivo de este trabajo fue lograr una adecuada elongación de los brotes *in vitro* antes de pasar a la fase de enraizamiento. A partir de plantas madre aclimatizadas fueron obtenidos brotes que se desinfectaron para su establecimiento *in vitro*. Se estudiaron dos tipos de medios de cultivo basal DCR y WV5. Los mejores resultados se alcanzaron con el empleo de las sales WV5 con 0.5% de carbón activado y 0.01 mg l⁻¹ de ANA. Los brotes fueron vigorosos y mayores de 40.0 mm de longitud.

Palabras clave: forestal, micropropagación, pino.

Effect of two culture media on *Pinus taeda* shoots elongation

ABSTRACT

Pinus taeda L. is a forest species of great international importance and in Argentina. Biotechnological techniques can provide an alternative to propagate this species, as well as for obtaining mother plants. The aim of this study was to achieve adequate elongation of *in vitro* shoots before transfer to the rooting stage. The shoots were obtained from acclimatized mother plants. It was disinfected for *in vitro* establishment. Two types of basal culture media: WV5 and DCR were studied. The best results were achieved with the combination of the WV5 salts supplement with 0.5% activated carbon, 0.01 mg l⁻¹ ANA to obtain vigorous and longer than 40.0 mm in length shoots.

Key words: forest, micropropagation, pine.

El sector forestal en la República Argentina cuenta con una superficie de 1 116 000 hectáreas. De estas el 76% pertenece a los bosques de las provincias de Misiones, Corrientes y Entre Ríos, localizadas en el noreste del país. Misiones, con el 35% y 400 000 ha forestadas, se presenta como la principal provincia forestal. El 82% de la superficie forestada está ocupada por las coníferas, principalmente con las especies *Pinus taeda* L. y *Pinus elliottii* L. (Braier, 2004). Estas especies alcanzan los mayores crecimientos de pinos del país, y del mundo, en ciertos casos de 35-40 m³ ha⁻¹ año⁻¹, con los turnos usuales de corte para aserrado de 16 a 20 años (Sánchez-Acosta, 2005).

La multiplicación vegetativa es el método más utilizado en la propagación de *Pinus taeda*. En este sistema, las escasas y costosas semillas

polinizadas en cruzamientos controlados se transforman en plantas donantes de brotes para multiplicación vegetativa, las que no son llevadas a campo, sino que permanecen en vivero como plantas madre (Andrejow y Higa, 2009).

La micropropagación en el pino es una alternativa atractiva porque con los propágulos vegetativos, la producción puede comenzar rápidamente después de que los resultados obtenidos de ensayos de progenies lleguen a estar disponibles. Estas plantas madre brindan brotes o estacas que luego de enraizadas y una vez que alcanzan los estándares de calidad, son plantadas en campo para integrar plantaciones operativas (Goldfarb *et al.*, 1999).

Dependiendo de la especie, los tratamientos con auxinas exógenas pueden estimular el potencial de enraizamiento *in vitro* y *ex vitro*

(Bonal y Monteuis, 1997). En el caso específico del *Pinus taeda* existen pocos trabajos en la literatura consultada que hagan referencia a la fase de elongación como fase previa al enraizamiento tanto *ex vitro* como *in vitro* (Tang *et al.*, 2000). Estos trabajos solo se refieren a utilizar el mismo medio de cultivo de la fase de multiplicación, para aumentar la longitud de los brotes, con su concentración de sales a la mitad y sin la adición de reguladores del crecimiento.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de dos medios de cultivo para la elongación de brotes *in vitro* previo a la fase de enraizamiento.

Se partió de brotes de plantas madre de *Pinus taeda* originadas por propagación *in vitro* y aclimatizadas.

Para la desinfección de los brotes se realizó un lavado con agua corriente durante diez minutos, luego se lavaron con agua destilada estéril con dos gotas de Tween 20 durante 10 minutos, seguido de tres enjuagues. En la cabina de flujo laminar se sumergieron en alcohol 70% durante 30 segundos y en hipoclorito de sodio (55 g l⁻¹, Lavandina®) al 2.5% (v/v) durante 10 minutos. Luego de realizarles cuatro lavados con agua destilada estéril, se sumergieron durante 20 minutos en bicloruro de mercurio (HgCl₂) 0.05 g l⁻¹, para después enjuagarse cuatro veces con agua destilada estéril. Se les practicó un corte basal limpio a cada brote y se redujeron a 20 mm antes de ser cultivados en tubos de ensayo y

se recortaron las acículas, para eliminar tejido dañado durante la desinfección y promover la multiplicación celular. Los brotes se establecieron en medio de cultivo DCR (Gupta y Durzan, 1985) con 0.1 mg l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP), 7 g l⁻¹ de agar y pH 5.6. Estos fueron incubados en cámara de crecimiento con luz artificial con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de aproximadamente 60 μmol m⁻² s⁻¹, con 16 h de fotoperíodo y 25±2°C durante 6 semanas. Posteriormente, se subcultivaron en el medio de cultivo de multiplicación WV5 con 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP, 20 g l⁻¹ de sacarosa y solidificado con agar 7 g l⁻¹.

Para la elongación de los brotes se compararon dos medios de cultivo: el DCR (Gupta y Durzan, 1985) y WV5 (Coke, 1996) con con 0.5% de carbón activado y 0.01 mg l⁻¹ de ANA. Estos se adicionaron a tubos de ensayo (55 ml de capacidad, 120 mm x 20 mm) a razón de 10 ml y en cada uno se colocó un brote. La incubación se realizó en similares condiciones. La evaluación de longitud de los brotes se llevó a cabo a los tres meses de cultivo sin haber realizado subcultivos.

El cultivo de los brotes en el medio basal WV5 produjo 72% de los brotes verdes, vigorosos, con acículas primarias y el ápice activo. Estos alcanzaron una longitud promedio de 47.5 mm con diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.01$) con respecto al medio de cultivo DCR, que arrojó 28% de brotes vigorosos y una menor longitud (22.5 mm) (Figura 1).

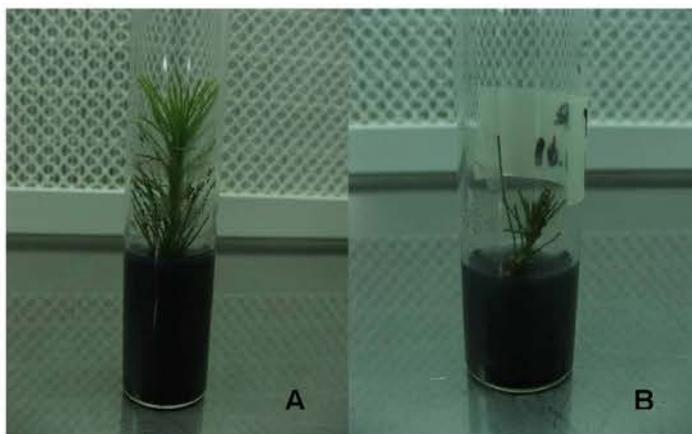


Figura 1. Brotes de *Pinus taeda* después de tres meses en medio de cultivo de elongación. (A) Medio basal WV5 (Coke, 1996); (B) Medio basal DCR (Gupta y Durzan, 1985).

Los medios de cultivo basales WV5 y DCR, no presentan diferencias en la mayoría de los micronutrientes, con la salvedad que el segundo contiene níquel, mayor concentración de manganeso y cinco veces menor cantidad de boro, elemento este muy importante en el desarrollo del pino, en lo que respecta a división celular y la síntesis y transporte de sacarosa (Araujo, 1995). Con respecto a los macroelementos, el WV5 tiene una mayor concentración. Se destaca la mayor provisión de potasio (que actúa en la síntesis de hidratos de carbono), nitrógeno (esencial para las proteínas) y magnesio (componente de la clorofila).

Siguiendo estos indicadores, es probable que para aumentar la longitud de los brotes de pino, se requieran mayores concentraciones de nutrientes, sobre todo nitrógeno. Probablemente las respuestas se asociaron a las distintas concentraciones de elementos específicos, la relación entre diferentes componentes del medio de cultivo o los distintos compuestos orgánicos utilizados. En este sentido, Nandwani *et al.* (2001) afirmaron que para la elongación, son importantes las concentraciones de sales, pero en el medio de cultivo de inducción previo, más que en el medio de cultivo de elongación, haciendo énfasis en el nitrógeno reducido y el calcio como elementos beneficiosos.

Además, se constató que el 71% de los brotes *in vitro* en el medio de cultivo DCR mostraron un nuevo brote axilar y solo el 30% con el WV5 lo cual pudo haber tenido un efecto en los resultados alcanzados respecto de la longitud del brote.

El hecho de haber logrado mejores resultados con el medio de cultivo basal WV5 coincide con lo que detalla Coke (1996) en su patente quien obtuvo los mejores valores de longitud de brote en este medio de cultivo en comparación con el MS (Murashige y Skoog, 1962), el SH (Schenk y Hildebrandt, 1972), el GD (Gresshoff y Doy, 1972), el GD_{mod} (Mehra-Palta *et al.*, 1978), LP (Aitken *et al.*, 1986) y el DCR (Gupta y Durzan, 1985). Este autor realizó la evaluación después de 6 semanas de cultivo con $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 16 h de fotoperíodo, y obtuvieron brotes de longitud ≥ 20 mm para pasar a enraizamiento *ex vitro*;

mientras que con 8 semanas de cultivo obtuvieron brotes de 38 mm. También Francisco de Oliveira *et al.* (2011) en su trabajo destacan que los mejores resultados para la elongación fueron alcanzados con el medio de cultivo WV5 con un 85.2% de elongación de los brotes *in vitro*.

En el presente trabajo se obtuvieron similares resultados aunque la evaluación se realizó a las 12 semanas de cultivo y los brotes alcanzaron mayor longitud. En este punto hay que considerar que es mucho más beneficioso brindarle a los brotes un mayor período de crecimiento *in vitro* para lograr brotes más largos y con buen desarrollo, antes que apresurarlos y arriesgar su supervivencia en vivero.

CONCLUSIONES

Con el cultivo de brotes *in vitro* de *Pinus taeda* en el medio de cultivo basal WV5 con 0.5% de carbón activado, 0.01 mg l^{-1} de ANA y 20 g l^{-1} de sacarosa es factible generar brotes vigorosos y mayores a 40 mm de longitud para lograr posteriormente mejores resultados en supervivencia y enraizamiento en la salida de plantas al vivero.

REFERENCIAS

- Aitken, Ch J, Singh A, Davies T (1986) Multiplication of meristematic tissue culture system for radiata pine. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol 1. Trees 1, pp. 413-432. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- Andrejow, GMP, Higa AR (2009) Potencial de enraizamiento de miniestacas de *Pinus taeda* L. *Revista Arvore* 31: 399-404
- Araujo Carneiro, JG (1995) Produção e controle de qualidade de mudas florestais. Editora Folha de Viscosa. UFPR Curitiba
- Bonal, D, Monteouis O (1997) *Ex vitro* survival, rooting and initial development of *in vitro* rooted vs unrooted microshoots from juvenile and mature *Tectona grandis* genotypes. *Silvae Genetica* 46: 5-10
- Braier, G (2004) Tendencias y perspectivas del sector forestal en América Latina al año 2020, Argentina. Informe Nacional Complementario. FAO. Roma
- Coke, J (1996) Basal nutrient medium for *in vitro* cultures of loblolly pines. USA Patent 5 534 433 y 5 534 434

- Francisco de Oliveira, Lopes FRL, Quoirin M, Soares HK, Rioyeh AH (2011) Micropropagation of *Pinus taeda* L via axillary buds. Proceedings 5 (suppl 7) IUFRO Tree Biotechnology Conference 2011. p.144. [En línea] En: <http://www.biomedcentral.com/1753-6561/5/57/p144>. Consultado: 22 de enero de 2013
- Goldfarb, B, LeBude A, Dougherty K, Newkirk S, Jetton R (1999) Effect of age on maturation of loblolly pine clones maintained by hedging and serial propagation. [En línea] En: <http://www.ces.ncsu.edu/nreos/forest/feop/Agenda2004/roots/program.pdf>. Consultado: 3 de diciembre 2012
- Gresshoff P, Doy C (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta 107:161-170
- Gupta P, Durzan, D (1985) Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Rep. 4: 177:179
- Mehra-Palta A, Smeltzer R, Mott R (1978) Hormonal control of induced organogenesis: Experiments with excised plant parts of loblolly pine. Tappi 61:37-40
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:473-497
- Nandwani D, Kumaria S, Tandon P (2001) Micropropagation of *Pinus kesiya* Royle ex Gord (Khasi pine). Gartenbauwissenschaft 66 (2): 68-71
- Sánchez-Acosta, M (2005) Situación foresto industrial de Argentina al 2005. III Simposio Ibero Americano de Gestión y Economía Forestal. Ubatuba, San Pablo, Brasil
- Tang W, Ouyang F (2000) Plant regeneration via organogenesis from six families of loblolly pine. Plant Cell, Tissue and Organ culture 58: 223-226

Recibido: 9-4-2013
Aceptado: 4-6-2013