

Cultivo *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub y *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong

In vitro culture of *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub and *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong

Fernando Niella *

Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional de Misiones, Argentina

Patricia Rocha

Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional de Misiones, Argentina

Sandra Sharry

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata, Argentina
Universidad Nacional de Río Negro, Argentina

Revista de la Facultad de Agronomía

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

ISSN: 1669-9513

Periodicidad: Semestral

vol. 121, Esp., 2022

redaccion.revista@agro.unlp.edu.ar

Recepción: 20/09/2022

Aprobación: 02/10/2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/23/233546003/>

DOI: <https://doi.org/10.24215/16699513e103>

***Autor de correspondencia:** fernando.niella@fcf.unam.edu.ar



Resumen

Las especies *Peltophorum dubium* (Spreng.) (Caña fístula) y *Enterolobium contortosiliquum* (Vell.) Morong (Timbó), nativas de la selva misionera, son de interés para la foresto-industria, melíferas y de buena calidad para restauración de áreas degradadas y/o en sistemas consociados agroforestales de la región. El desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* para ambas especies es necesario para contar con herramientas para un programa de conservación *ex situ*. El objetivo del presente trabajo fue determinar el medio nutritivo, concentración y tipo de reguladores de crecimiento vegetal, y tipo de explantos necesarios para la proliferación *in vitro* de brotes axilares, adventicios y embriones somáticos de *P. dubium* y *E. contortisiliquum*. El 100% de los explantos obtenidos de plántulas germinadas *in vitro* de *P. dubium* formaron brotes axilares, con una producción promedio de dos brotes por explanto a partir de segmentos nodales cultivados en MS^{1/2}+0,1 mg/l BAP. El 65% de estos brotes formaron raíces cuando fueron subcultivados a medio MS^{1/2}, libre de RCV. Se reporta además en *P. dubium*, la formación de brotes adventicios y la inducción de embriones somáticos, que alcanzaron estadio acorazonado a partir de segmentos apicales, inducidos en MS^{1/2} suplementados con 2,4-D y BAP y diferenciados en MS^{1/2} en presencia de BAP. Por otro lado, también por primera vez, se obtuvo en *E. contortisiliquum*, la producción de brotes axilares a partir de segmentos nodales cultivados en MS+0,1 mg/l BAP en un 100% de los explantos y la producción de brotes adventicios (con un máximo de 6 brotes/explanto), a partir de segmentos apicales, inter-cotiledonares y nodales, cultivados en medio MS suplementados con BAP y ANA.

Palabras clave: micropropagación, leguminosas, organogénesis, embriogénesis, propagación

Abstract

The species *Peltophorum dubium* (Spreng.) (Caña fístula) y *Enterolobium contortosiliquum* (Vell.) Morong (Timbó), native to the interior atlantic forest, are of interest for the forestry industry, melliferous and of good quality for the restoration of degraded areas and/or in agroforestry systems in the region. The development of an *in vitro* propagation protocol for both species is necessary to have tools for an *ex situ* conservation program. The objective of the present work was to determine the nutrient medium, concentration and type of plant growth regulators, and type of explants necessary for the *in vitro* proliferation of axillary shoots, adventitious shoots, and somatic embryos of *P. dubium* and *E. contortisiliquum*. Hundred percent of explants obtained from *in vitro* germinated seedlings of *P. dubium* formed axillary buds, with an average production of two buds per explant from nodal segments grown in MS^{1/2}+0,1 mg/l BAP. Sixty-five percent of these shoots formed roots when subcultured to RCV-free MS^{1/2} medium. It is also reported in *P. dubium*, the formation of adventitious shoots and the induction of somatic embryos, which reached the heart stage from apical segments, induced in MS^{1/2} supplemented with 2,4-D and BAP and differentiated in MS^{1/2} in the presence of BAP. On the other hand, also for the first time, it was obtained in *E. contortisiliquum*, the production of axillary buds from nodal segments grown in MS+0,1 mg/l BAP in 100% of the explants and the production of adventitious shoots (with a maximum of 6 buds/explant), from apical, inter-cotyledonal and nodal segments, grown in MS medium supplemented with BAP and ANA.

Keywords: micropropagation, leguminous, organogenesis, embryogenesis, propagation

INTRODUCCION

Las especies leguminosas tropicales y subtropicales, son reconocidas como especies multipropósito por la calidad de la madera, producción de frutos, por ser melíferas, por sus propiedades medicinales, fuente de resinas, tinturas, forraje, alimento y leña (Hong & Bahtnagar, 2007). Particularmente en Misiones, las especies leguminosas incluidas en el presente trabajo, *Peltophorum dubium* (Spreng.) (Caña fístula) y *Enterolobium contortosiliquum* (Vell.) Morong (Timbó), no sólo para la foresto-industria por la calidad de su madera, sino también por el progresivo interés de los pequeños y medianos productores rurales en utilizarlas para plantación. Son especies identificadas como melíferas y de buena calidad para restauración de áreas degradadas y/o en sistemas consociados agroganaderos o silvícola. Los municipios las demandan en forma creciente como ornamentales y representativas de la selva misionera en proyectos de parqueización en áreas urbanas. Son consideradas especies multipropósito por las comunidades locales en la Provincia de Misiones, noreste de Argentina.

Aun cuando todavía existen importantes superficies continuas de monte nativo en una red de áreas protegidas en Misiones, la permanente tala selectiva de especies maderables nativas y el avance de la frontera agrícola en esta región, han llevado a la degradación de la selva remanente con consecuencias notorias reales y potenciales para las especies que la componen, como son, la pérdida de la variabilidad inter e intraespecífica y el proceso de erosión genética gradual, donde un alto porcentaje de ejemplares de calidad genética inferior son los que producen descendencia (Murawski & Hamrick, 1991; Zobel & Talbert, 1992; Murawski et al., 1994; Dayanandan et al., 1999; O'Neill et al., 2001; Mori et al., 2013; Thomas et al., 2014; Niella et al., 2022). La extensión de esta problemática a escala global ha quedado claramente reflejada en el marco de la Convención por la Biodiversidad de Río'92 ratificada por 182 países donde se ha consensuado que, para que la biodiversidad de las especies tropicales y subtropicales pueda ser preservada a largo plazo, debe disponerse de recursos que permitan no sólo desarrollar localmente estrategias de conservación complementarias *in situ* y *ex situ*, sino también utilizar las especies vegetales nativas en forma sustentable evitando de esta forma su degradación o eventualmente su extinción (GSPC 2020). Es este un factor, que compromete a los países firmantes entre otras cosas, al uso de biotecnologías, como las técnicas de propagación vegetativa que, interactuando con programas de mejoramiento genético, permitan no sólo aumentar y facilitar la disponibilidad de plantines, sino también gradualmente obtener germoplasma de una calidad genética selecta (rápido crecimiento, rectitud de fuste, resistencia a heladas y enfermedades). Generándose en el proceso, un recurso más atractivo para los productores locales y promoviendo de esta forma su domesticación y utilización sostenible.

En este contexto, diferentes técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*, como el cultivo de meristemas, organogénesis y embriogénesis, han sido estudiadas en un número importante de especies leguminosas, demostrando que la selección adecuada del explanto, la combinación y concentración apropiada de reguladores del crecimiento, medios nutritivos y suplementos son un prerrequisito para el desarrollo de un sistema eficiente de propagación *in vitro* para estas especies (Hong & Bahtnagar, 2007; Goyal et al., 2012; Gantait et al., 2018; Ahmad & Anis, 2019; Ho et al., 2022). La regeneración de propágulos (vía micropropagación, organogénesis y/o embriogénesis), en especies leguminosas tropicales y subtropicales, es amplia, pudiéndose citar como ejemplos los resultados obtenidos en *Acacia mangium* (Bon et al., 1998; Hong & Bahtnagar, 2007); *Acacia catechu* (Kaur & Kant, 2000); *Acacia caven*, *Parkinsonia aculeata*, *Gleditsia amorphoides* y *Erythrina crista-galli* (Marinucci et al., 2004); *Tamarindus indica* (Farooq & Farooq, 2003); *Acacia mearnsii*, (Beck et al., 1998a y 1998b); *Acacia senegal* (Rathore et al., 2012); *Robinia ambigua* (Guo et al., 2006); *Pterocarpus marsupium* (Husain et al., 2007; Ahmad et al., 2019); *Dalbergia retusa* (Cerdas & Guzman, 2004) y otras especies leguminosas pertenecientes a los géneros: *Prosopis*, *Cersis*, *Gleditsia*, *Leucaena* (Hong & Bhatnagar, 2007; Boeri & Sharry, 2018). Sin embargo, al momento, son aún escasas o inexistentes las publicaciones para el cultivo *in vitro* de *P. dubium* y *E. contortosiliquum*. En el caso particular del género *Peltophorum*, podemos mencionar el trabajo publicado por Uddin et al. (2005) y Bassan et al. (2006), quienes demostraron la capacidad de producción de brotes *in vitro* de *P. pterocarpum* y *P. dubium* partiendo de segmentos nodales, brotes apicales y cotiledones de plántulas germinadas *in vitro*. En el género *Enterolobium* existen escasos reportes de multiplicación *in vitro*; pudiéndose mencionar los estudios desarrollado en *Enterolobium cyclocarpum* a partir de segmentos nodales de plántulas germinadas *in vitro* (Sahagún et al., 2007; Thirunavoukkarasu et al., 2007; Akinropo et al., 2020).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el medio nutritivo, concentración y tipo de reguladores de crecimiento vegetal, y tipo de explantos necesarios para la proliferación *in vitro* de brotes axilares, adventicios y embriones somáticos de *P. dubium* y *E. contortisiliquum*. El desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* para ambas especies es necesario para contar con herramientas de apoyo para un programa de conservación *ex situ* y domesticación de estas especies leguminosas emblemáticas de la selva paranaense.

MATERIALES Y METODOS

EFFECTO DEL MEDIO NUTRITIVO Y LA PRESENCIA DE BAP EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO EN ALTURA DE PLANTINES *IN VITRO* DE *P. DUBIUM* Y *E. CONTORTISILIQUEUM*

Las semillas utilizadas fueron obtenidas de una muestra de semillas de polinización abierta de *P. dubium* y *E. contortisiliquum* cosechadas de plantas ubicadas en la ciudad de Eldorado, Misiones-Argentina (latitud 26° 24' 23" Sur y longitud 54° 37' 25" Oeste).

El procesamiento de las semillas contempló diferentes etapas, desde la escarificación mecánica mediante lijado del extremo opuesto a la radícula, con lija No. 120, seguido de una desinfección fuera de la cámara de cultivo, con inmersión en solución de 30 g/l del bactericida Agrigen Plus® y fungicida Chemisor®. Luego, un segundo tratamiento de desinfección, en condiciones de asepsia en cámara de cultivo, con inmersión en solución de etanol al 70% y posteriormente en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% seguido de cuatro enjuagues con agua destilada estéril.

Las semillas desinfectadas, fueron cultivadas en tubos de vidrio, base plana de 25x95 mm, que contenían 15 ml de los siguientes medios de cultivo: MS (Murashige & Skoog, 1962); y MS $\frac{1}{2}$ (medio MS, con la mitad de la concentración de macro y micronutrientes), suplementados con 0,1 mg/l de 6-benzylaminopurina (BAP) (Tabla 1). Todos los medios fueron enriquecidos con 30 g/l de sacarosa. El pH se ajustó a 5,8 con NaOH o HCl 0,1 N y se agregó 7 g/l del gelificante agar. El medio fue esterilizado en autoclave a 1 atm y 120°C por 20 minutos. Las semillas cultivadas, individualmente, en tubos con los medios nutritivos mencionados, se mantuvieron en sala de cultivo, bajo un fotoperiodo de 16 horas (120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a 24±2°C, durante 60 días.

EFFECTO DEL BAP Y ANA EN LA MULTIPLICACIÓN VÍA AXILAR DE *P. DUBIUM* Y *E. CONTORTISILIQUEUM*

Los segmentos uninodales utilizados como explantos, se obtuvieron de plántulas de 60 días, germinadas *in vitro*, provenientes del estudio arriba mencionado. Estos explantos fueron cultivados, en medio MS o MS $\frac{1}{2}$ (según la especie), solos o suplementados con 0,1 mg/l BAP o 0,1 mg/l BAP + 0,05 mg/l Ácido 1-naftalenacético (ANA) (Tabla 2). Todos los medios fueron enriquecidos con 30 g/l de sacarosa. El pH se ajustó a 5,8 con NaOH o HCl 0,1 N y se agregó 7 g/l del gelificante agar. El medio fue esterilizado en autoclave a 1 atm y 120 °C por 20 minutos. Los explantos fueron cultivados en cubetes Magenta GA 7-3® conteniendo 50 ml de medio y cubiertos con tapas Magenta GA-7®; se colocaron en una sala de cultivo, permaneciendo bajo un fotoperiodo de 16 horas (120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a 24±2°C. Luego de 90 días de cultivo, se evaluó el número de explantos con brotes, el número de brotes por explantos, la longitud promedio de los brotes en cm y el número de explantos con callos.

ENRAIZAMIENTO DE BROTES OBTENIDOS DE MULTIPLICACIÓN VÍA AXILAR DE *P. DUBIUM* Y *E. CONTORTISILIQUEUM*

A los 90 días de cultivo en medio de multiplicación, los brotes formados se subcultivaron en medio MS y MS $\frac{1}{2}$, según la especie, libres de reguladores de crecimiento que contenía 30 g/l de sacarosa, y 7 g/l del gelificante agar y pH 5,8. El medio fue esterilizado en autoclave a 1 atm y 120 °C por 20 minutos. Los explantos fueron cultivados en cubetes Magenta GA 7-3® conteniendo 50 ml de medio y cubiertos con tapas Magenta GA-7®; se colocaron en una sala de cultivo, permaneciendo bajo un fotoperiodo de 16 horas (120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a 24±2°C. Luego de 45 días de cultivo, se evaluó sobrevivencia, número de brotes con raíces y número de brotes con callos en la base.

EFFECTO DEL 2,4 D Y BAP EN LA INDUCCIÓN DE CALLOS Y BROTES ORGANOGÉNICOS DE *P. DUBIUM* **INDUCCIÓN**

Los segmentos apicales obtenidos de plántulas de 30 días germinadas *in vitro* de *P. dubium* (según metodología descrita arriba), se cultivaron a un medio MS $\frac{1}{2}$ conteniendo 30 g/l de sacarosa; y diferentes tipos, combinaciones y concentraciones de los reguladores del crecimiento vegetal: BAP y Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Tabla 3). El pH se ajustó a 5,8 con NaOH o HCl 0,1 N y se agregaron 7 g/l del gelificante agar. El medio fue esterilizado en autoclave a 1 atm y 120 °C por 20 minutos. Los explantos fueron cultivados, en frascos de vidrio (220 cm³) conteniendo 50 ml de medio y cubiertos con una doble capa de filme adherente; se colocaron en una sala de cultivo, bajo un fotoperíodo de 16 horas (30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a 24±2°C. A los 60 días se evaluó el número de explantos con callo y brotes organogénicos.

DIFERENCIACIÓN

A los 60 días, los explantos inducidos (con presencia de callos), se subcultivaron en medio MS $\frac{1}{2}$, conteniendo 0; 0,5 y 2 mg/l BAP, dependiendo del tratamiento (Tabla 3). Ambos enriquecidos con 30 g/l de sacarosa y 7 g/l del gelificante agar. El subcultivo se realizó en frascos de vidrio con capacidad de 150 ml y cubiertos con una doble capa de película adherente, conteniendo 50 ml del medio de cultivo de diferenciación, bajo un fotoperíodo de 16 horas (120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a 24±2°C. A los 60 días se evaluó el número de explantos con callo y brotes organogénicos.

EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y EL TIPO DE EXPLANTO EN LA INDUCCIÓN DE CALLOS Y BROTES ORGANOGÉNICOS DE *E. CONTORTISILIQUM*

Los segmentos apicales, nodales e inter-cotiledonares, obtenidos de plántulas de 30 días germinadas *in vitro* de *E. contortisiliquum*, fueron inducidos en medio MS conteniendo 30 g/l de sacarosa, y diferentes combinaciones de los reguladores del crecimiento vegetal: 6-benzylaminopurina (BAP) y ANA (Tabla 4). El pH se ajustó a 5,8 con NaOH o HCl 0,1 N y se agregó 7 g/l del gelificante agar. El medio fue esterilizado en autoclave a 1 atm y 120 °C por 20 minutos. Los explantos fueron cultivados, en frascos de vidrio (220 cm³) conteniendo 50 ml de medio y cubiertos con una doble capa de filme adherente; se colocaron en una sala de cultivo, bajo un fotoperíodo de 16 horas (30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), a 24±2°C. A los 60 días se evaluó el número de explantos con callos. Para la diferenciación de brotes, los explantos fueron subcultivados a medio de cultivo MS, libre de reguladores de crecimiento vegetal, suplementado con 30 g/l de sacarosa, y preparado y cultivados según procedimiento arriba descrito. Luego de 45 días en medio de diferenciación, se evaluó el número de brotes organogénicos por explanto.

DISEÑO Y ANÁLISIS DEL EXPERIMENTO

EFFECTO DEL MEDIO NUTRITIVO Y LA PRESENCIA DE BAP EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO EN ALTURA DE PLANTINES IN VITRO DE *P. DUBIUM* Y *E. CONTORTISILIQUM*

El experimento de germinación se implementó en un diseño completamente aleatorizado con 25 repeticiones/tratamiento, siendo el explanto (semilla) la unidad experimental. A los 60 días de la siembra, se evaluó la capacidad germinativa (G%), definida como el número de semillas germinadas/número de semillas sembradas *100; y la altura de las plántulas (AP), medida con regla, desde el cuello de la raíz, hasta el ápice de la plántula, expresada en cm.

EFFECTO DEL BAP Y ANA EN LA MULTIPLICACIÓN VÍA AXILAR DE *P. DUBIUM* Y *E. CONTORTISILIQUM*

El experimento se implementó en un diseño completamente aleatorizado con 20 repeticiones/tratamiento, siendo el explanto (segmentos nodales) la unidad experimental. A los 90 días de la siembra, se evaluaron las siguientes variables: frecuencia de brotación (FB): (número de explantos con brotes/número de explantos cultivados) *100; número de brotes/explantos (NB); longitud promedio de los brotes en cm (LB) y frecuencia de callogénesis (FC): (número de explantos con callos/número de explantos cultivados) *100.

ENRAIZAMIENTO DE BROTES OBTENIDOS DE MULTIPLICACIÓN VÍA AXILAR DE *P. DUBIUM* Y *E. CONTORTISILIQUEUM*

El experimento se implementó en un diseño completamente aleatorizado con 20 repeticiones/tratamiento, siendo el explanto (brotes) la unidad experimental. A los 45 días, se evaluó la frecuencia de enraizamiento (FE): (número de brotes sobrevivientes con raíces/número de brotes cultivados) *100; y frecuencia de callos en la base del brote (FC): (número de brotes con callos en la base/número de brotes cultivados) *100.

EFEECTO DEL 2,4 D Y BAP EN LA INDUCCIÓN DE CALLOS E INDUCCIÓN DE BROTES ORGANOGÉNICOS DE *P. DUBIUM*

El experimento se implementó en un diseño completamente aleatorizado con 25 repeticiones/tratamiento, siendo el explanto (segmentos apicales) la unidad experimental. A los 60 días del cultivo en medio inductivo, se evaluó la frecuencia de callogénesis (FC): (número de explantos con callos/número de explantos cultivados) *100 y posteriormente a los 60 días del subcultivo de los explantos con callos en medio de diferenciación, se evaluó la frecuencia de inducción de brotes organogénicos (FBO): (número de explantos con brotes organogénicos/número de explantos cultivados) *100.

EFEECTO DE LA COMBINACIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y EL TIPO DE EXPLANTO EN LA INDUCCIÓN DE CALLOS Y BROTES ORGANOGÉNICOS DE *E. CONTORTISILIQUEUM*

El experimento se implementó en un diseño completamente aleatorizado, con una distribución factorial de los tratamientos, 8 combinaciones de reguladores de crecimiento x 3 tipo de explantos (Tabla 4), con 20 repeticiones/tratamiento, siendo el explanto (segmento apical, nodal o inter-cotiledonar) la unidad experimental. A los 60 días del cultivo en medio inductivo, se evaluó la frecuencia de callogénesis (FC): (número de explantos con callos/número de explantos cultivados) *100. A los 45 días de haber subcultivados los explantos, a medio de diferenciación, se evaluó el número de explantos con brotes (NB).

Los datos, de cada uno de los estudios descriptos, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), empleando un modelo lineal, utilizando el software de análisis de datos Infostat versión profesional (Di Rienzo et al., 2020). Se utilizó la prueba de Tukey para comparar las medias de los tratamientos con una diferencia crítica (P) de $\leq 0,05$. Los resultados se presentan en Tablas como media \pm error estándar.

RESULTADOS

EFEECTO DEL MEDIO NUTRITIVO Y LA PRESENCIA DE BAP EN LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO EN ALTURA DE PLANTINES *IN VITRO* DE *P. DUBIUM* Y *E. CONTORTISILIQUEUM*

La capacidad germinativa y el crecimiento en altura de las plántulas germinadas, de *P. dubium* y *E. contortisiliquum* presentaron diferencias estadísticamente significativas en función al medio nutritivo en el cual fueron sembradas (p-valor: 0,0001). Se observó, en *P. dubium*, que tanto la capacidad germinativa ($96 \pm 0,40$ y $100 \pm 0,00\%$), así como también la altura de las plántulas ($2,28 \pm 0,15$ y $2,49 \pm 0,14$ cm), a los 60 días de su germinación en los medios MS $\frac{1}{2}$ y MS $\frac{1}{2}$ con 0,1 mg/l de BAP, eran significativamente superiores a los valores observados, para ambas variables, en los segmentos nodales cultivados en el medio MS solo o suplementado con 0,1 mg/l de BAP (Tabla 1, Figura 1a). Mientras que, en *E. contortisiliquum*, la capacidad germinativa, así como también la altura de las plántulas a los 60 días de su germinación, en los medios MS y MS con 0,1 mg/l de BAP, $100 \pm 0,00$ y $88 \pm 0,70\%$; $2,47 \pm 1,80$ y $2,25 \pm 0,17$ cm, respectivamente, significativamente superior a los segmentos nodales cultivados en MS $\frac{1}{2}$, solo o suplementado con 0,1 mg/l de BAP (Tabla 1, Figura 2a).

EFEECTO DEL BAP Y ANA EN LA MULTIPLICACIÓN VÍA AXILAR DE *P. DUBIUM* Y *E. CONTORTISILIQUEUM*

Los resultados indicaron que los segmentos nodales de *P. dubium* y *E. contortisiliquum*, pueden ser multiplicados *in vitro*. Para ambas especies, todas las variables estudiadas, frecuencia de brotación, producción de brotes/explantos, la longitud promedio de brotes y callogénesis, presentaron diferencias estadísticamente significativas en función al medio nutritivo en el cual fueron cultivados (Tabla 3).

Tabla 1

Efecto del medio nutritivo y la presencia de BAP en la capacidad germinativa (G%) y crecimiento en altura (AP) de *P. dubium* y *E. contortisiliquum* después de 60 días de cultivo. Cada tratamiento tenía 25 repeticiones. Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Se presenta promedio de G% y AP \pm Error Estándar.

Especie	Medio de cultivo	G%	AP cm
<i>P. dubium</i>	MS	88 \pm 7,00b	0,64 \pm 0,09c
	MS+0,1 mg/l BAP	60 \pm 10,00c	1,36 \pm 0,17b
	MS $\frac{1}{2}$	96 \pm 4,00ab	2,28 \pm 0,15a
	MS $\frac{1}{2}$ +0,1 mg/l BAP	100 \pm 0,00a	2,49 \pm 0,14a
<i>E. contortisiliquum</i>	MS	100 \pm 0,00a	2,47 \pm 1.80a
	MS+0,1 mg/l BAP	88 \pm 7,00b	2,25 \pm 0,17a
	MS $\frac{1}{2}$	48 \pm 10,00d	1,22 \pm 0,13b
	MS $\frac{1}{2}$ +0,1 mg/l BAP	52 \pm 10,00cd	0,66 \pm 0,14b

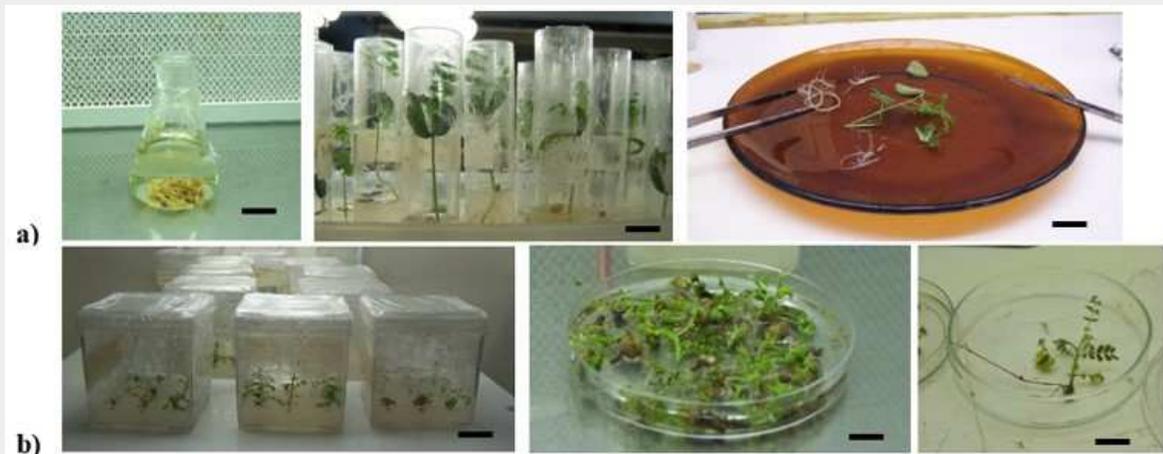


Figura 1

a) Semillas, plántulas germinadas in vitro y explantos utilizados en los estudios de multiplicación in vitro y organogénesis/embriogénesis somática de *P. dubium*. b) Multiplicación in vitro de segmentos nodales de *P. dubium* cultivados en MS $\frac{1}{2}$ suplementado con 0,1 mg/l de BAP y enraizados in vitro en MS $\frac{1}{2}$ libre de reguladores de crecimiento vegetal (Barra: 0,5 cm).

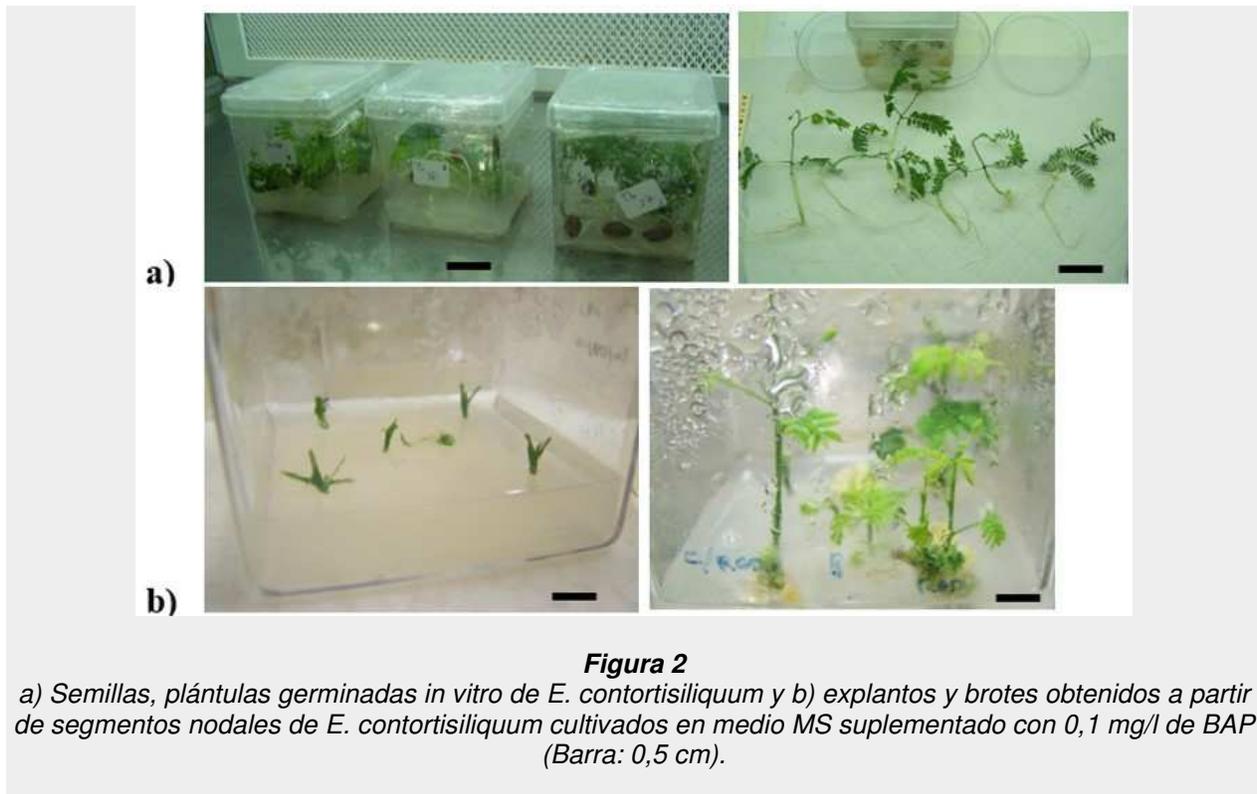


Figura 2

a) Semillas, plántulas germinadas in vitro de *E. contortisiliquum* y b) explantos y brotes obtenidos a partir de segmentos nodales de *E. contortisiliquum* cultivados en medio MS suplementado con 0,1 mg/l de BAP (Barra: 0,5 cm).

En *P. dubium*, la diferencia en la frecuencia de explantos con brotes, el número de brotes por explantos y la longitud promedio de brotes fue estadísticamente no significativa en los segmentos nodales cultivados en MS $\frac{1}{2}$ solo o suplementado con 0,1 mg/l de BAP. En ambos medios el 100% de los segmentos nodales cultivados produjeron brotes, con un promedio de 1,95 y 2,20 brotes por explantos, y una longitud de brotes promedio de 2,21 y 1,87 cm, respectivamente. También, estos medios presentaron una frecuencia de formación de callos (45 y 65%), significativamente menor al 100% observado en los medios MS sin RCV (reguladores de crecimiento vegetal) y MS $\frac{1}{2}$ +0,1mg/l BAP + 0,05mg/l ANA (Tabla 2, Figura 1b)

En el caso de *E. contortisiliquum*, el 100% de los explantos cultivados en el medio MS suplementado con 0,1 mg/l de BAP produjeron brotes, con un promedio de $2,10 \pm 0,23$ brotes por explantos, significativamente superior a los segmentos nodales cultivados en medio MS o MS $\frac{1}{2}$ sin RCV o MS suplementado con 0,1mg/l BAP+0,05 mg/l ANA. La longitud promedio de los brotes, no fue significativamente diferente entre los medios MS, MS $\frac{1}{2}$ y MS suplementado con 0,1 mg/l de BAP. El menor porcentaje de explantos con callos, se observó en el medio MS solo o suplementado con 0,1 mg/l de BAP ($69 \pm 1,20$ y $75 \pm 10,00\%$, respectivamente) (Tabla 2, Figura 2b).

El medio MS o MS $\frac{1}{2}$ suplementado con BAP y ANA, fue el que presentó los valores menores para todas las variables estudiadas en ambas especies, excepto para el porcentaje de explantos con callos en *P. dubium* ($100 \pm 0,00$) (Tabla 2)

ENRAIZAMIENTO DE BROTES OBTENIDOS DE MULTIPLICACIÓN VÍA AXILAR DE *P. DUBIUM* Y *E. CONTORTISILIQUUM*

Los resultados indicaron que los brotes de *P. dubium* obtenidos por multiplicación vía axilar pueden ser enraizados en medio MS $\frac{1}{2}$, sin reguladores de crecimientos, con una sobrevivencia del $90 \pm 5,30\%$ y un $65 \pm 1,10\%$ de enraizamiento de los brotes sobrevivientes (Tabla 4, Figura 1b). Mientras que en *E. contortisiliquum* no se observaron explantos enraizados, y el 100% de ellos presentaron callos en la base (Tabla 4, Figura 2b).

Tabla 2

Efecto del medio nutritivo en la frecuencia de brotación (FB); número de brotes/explantos (NB); longitud promedio de los brotes en cm (LB); frecuencia de callogénesis (FC) de *P. dubium* y *E. contortisiliquum*, a los 90 días de cultivo de segmentos nodales obtenidos de plántulas germinadas in vitro. Tratamiento con 20 repeticiones. Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Se presentan valores promedio \pm Error Estándar.

Especie	Medio de cultivo	FB %	NB	LB cm	FC%
<i>P. dubium</i>	MS	50 \pm 11,0b	0,90 \pm 0,23b	0,53 \pm 0,10b	100 \pm 0,00b
	MS½	100 \pm 0,00a	1,95 \pm 0,20 ^a	2,21 \pm 0,20a	45 \pm 11,00a
	MS½ +0,1mg/l BAP	100 \pm 0,00a	2,20 \pm 0,22 ^a	1,87 \pm 0,13a	65 \pm 12,00b
	MS½ +0,1mg/l BAP + 0,05mg/l ANA	25 \pm 10,00c	0,25 \pm 0,10c	0,62 \pm 0,14b	100 \pm 0,00b
<i>E. contortisiliquum</i>	MS	75 \pm 10,00b	1,40 \pm 0,21b	2,73 \pm 0,24a	69 \pm 12,00b
	MS½	60 \pm 11,00b	1,05 \pm 0,23b	1,95 \pm 0,22a	100 \pm 0,00a
	MS+0,1mg/l BAP	100 \pm 0,00a	2,10 \pm 0,23 ^a	2,08 \pm 0,29a	75 \pm 10,00b
	MS+0,1mg/l BAP + 0,05mg/l ANA	30 \pm 11,00c	0,35 \pm 0,13c	0,73 \pm 0,08b	100 \pm 0,00a

Tabla 3

P-valor de las variables frecuencia de explantos con brotes; brotes por explantos; longitud promedio de brotes y frecuencia de explantos con callos.

Variables	<i>P. dubium</i> P-valor	<i>E. contortisiliquum</i> P-valor
Frecuencia explantos con brotes (%)	0,0001	0,0001
Brotes/explantos	0,0001	0,0001
Longitud promedio de brotes	0,0001	0,0021
Frecuencia explantos con callos (%)	0,0190	0,0831

Tabla 4

Sobrevivencia (SB), capacidad de enraizamiento/FE y formación de callos (FC) en la base de brotes obtenidos por multiplicación vía axilar de *P. dubium* y *E. contortisiliquum*, a los 45 días de cultivo. Cada tratamiento tenía 20 repeticiones. Se presentan valores promedio \pm Error Estándar.

Especie	Medio de cultivo	SB%	FE%	FC%
<i>P. dubium</i>	MS½	90 \pm 5,30	65 \pm 1,10a	0,00 \pm 0,00
<i>E. contortisiliquum</i>	MS	100 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	100 \pm 0,00

EFFECTO DEL 2,4 D Y BAP EN LA INDUCCIÓN DE CALLOS Y BROTES ORGANOGÉNICOS DE *P. DUBIUM*

El 100% de los segmentos apicales, obtenidos de plántulas de 30 días germinadas *in vitro* de *P. dubium*, fueron inducidos a la formación de callos cuando fueron cultivados en medio MS en todas las combinaciones de 2,4 D y BAP presentes estudiadas, mientras que sólo el 40% de los segmentos nodales cultivados en medio MS $\frac{1}{2}$ sin RCV formaron callos (Tabla 5). Los explantos con callos, al ser subcultivados a medio de diferenciación, formaron brotes organogénicos, solamente en los medios suplementados con 2 mg/l de BAP, inducidos tanto en 0,10; 0,50 o 0,75 mg/l 2,4-D +0,22 mg/l BAP mg/l (65±11; 10±9,00 y 55±10% de explantos con brotes organogénicos, respectivamente). Solamente se indujo a la diferenciación de embriones somáticos en estado acorazonado cuando los segmentos apicales fueron cultivados en medio MS $\frac{1}{2}$, suplementado con 1 mg/l de 2,4-D y 0,22 mg/l de BAP, y diferenciados en medio con 2 mg/l de BAP (Tabla 5, Figura 3), sin desarrollo posterior.

Tabla 5

Efecto del medio inductivo y de diferenciación, en la frecuencia de callogénesis (FC) y frecuencia de inducción de brotes organogénicos (FBO); y frecuencia de formación embriones somáticos (FEMB) en segmentos apicales cultivados in vitro de P. dubium. Cada tratamiento tenía 25 repeticiones. Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (P<0,05). Se presentan valores promedio ± Error Estándar.

Medio inductivo	FC%	Medio diferenciación	FBO%	FEMB%
Control MS $\frac{1}{2}$ sin RCV	40±0,98	0,0 mg/l BAP	0,00±0,00c	0,00±0,00
Control MS $\frac{1}{2}$ sin RCV		0,5 mg/l BAP	0,00±0,00c	0,00±0,00
Control MS $\frac{1}{2}$ sin RCV		2 mg/l BAP	0,00±0,00c	0,00±0,00
0,10 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l	100±0,00	0,0 mg/l BAP	0,00±0,00c	0,00±0,00
0,10 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l		0,5 mg/l BAP	0,00±0,00c	0,00±0,00
0,10 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l		2 mg/l BAP	65±11a	0,00±0,00
0,25 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l	100±0,00	0,0 mg/l BAP	0,00±0,00c	0,00±0,00
0,25 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l		0,5 mg/l BAP	0,00±0,00c	0,00±0,00
0,25 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l		2 mg/l BAP	0,00±0,00c	0,00±0,00
0,50 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l	100±0,00	0,0 mg/l BAP	0,00±0,00c	0,00±0,00
0,50 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l		0,5 mg/l BAP	0,00±0,00c	0,00±0,00
0,50 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l		2 mg/l BAP	10±9,00c	0,00±0,00
0,75 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l	100±0,00	0,0 mg/l BAP	0,00±0,00c	0,00±0,00
0,75 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l		0,5 mg/l BAP	0,00±0,00c	0,00±0,00
0,75 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l		2 mg/l BAP	55±10a	0,00±0,00
1,00 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l	100±0,00	0,0 mg/l BAP	0,00±0,00c	0,00±0,00
1,00 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l		0,5 mg/l BAP	0,00±0,00c	0,00±0,00
1,00 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l		2 mg/l BAP	0,00±0,00c	85±8,00

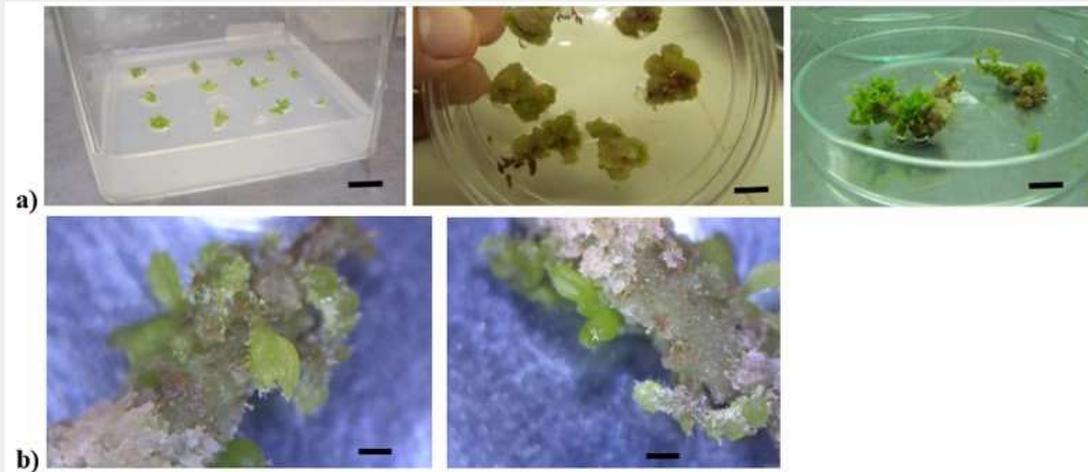


Figura 3

a) Organogénesis indirecta de brotes adventicios de *P. dubium*, a partir de segmentos apicales inducidos *in vitro* en medio MS $\frac{1}{2}$ suplementados con 0,10 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l y diferenciados en medio MS $\frac{1}{2}$ con 2 mg/l de BAP (Barra: 0,5 cm). b) Embriones somáticos de *P. dubium* en estadio acorazonado, inducidos en medio MS $\frac{1}{2}$ suplementados con 0,75 mg/l 2,4-D + 0,22 mg/l BAP mg/l y diferenciados en medio MS $\frac{1}{2}$ con 2 mg/l de BAP (Barra: 1 mm).

EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y EL TIPO DE EXPLANTO EN LA INDUCCIÓN DE CALLOS Y BROTES ORGANOGÉNICOS DE *E. CONTORTISILIQUUM*

Los resultados indicaron diferencias estadísticamente significativas, para las dos variables analizadas, número de brotes por explantos y frecuencia de explantos con callos, tanto para los medios de cultivos con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, como para el tipo de explanto (Tabla 7). Mientras que la interacción entre combinación de reguladores de crecimiento y tipo de explanto, no fue significativa (Tabla 7). De la combinación de reguladores de crecimiento utilizadas, el medio de cultivo suplementado con 1,00 mg/l BAP y 0,1 mg/l ANA, fue el que indujo a la mayor producción de brotes por explantos, en los tres tipos de explantos cultivados, cotiledonar, nodal y apical, con una producción promedio de $6,00 \pm 0,00$; $5,25 \pm 1,25$ y $4,80 \pm 0,73$ brotes por explantos, respectivamente. Mientras que para la variable porcentaje de explantos con callos, no presento un patrón definido en función a las combinaciones de reguladores de crecimiento y tipo de explanto. Observándose, el menor porcentaje de explantos con callos, en medio sin reguladores de crecimiento, coincidiendo esto también con la menor producción de brotes en el tipo de explanto cotiledonar y nodal (Figura 4). En general los explantos apicales se caracterizaron por presentar la menor frecuencia de explantos con callos y el menor número de brotes por explantos, en la mayoría de las combinaciones de reguladores de crecimiento (Tabla 6).

Tabla 6

Efecto de la combinación de reguladores de crecimiento y el tipo de explanto en la frecuencia de formación de callos (FC) y número de brotes (NB) en explantos obtenidos de plantines germinados in vitro de *E. contortisiliquum*. Cada tratamiento tenía 20 repeticiones. Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Se presentan valores promedio \pm Error Estándar.

Medio inductivo	Explanto	FC%	NB
0,00 mg/l BAP+ 0,0 mg/l ANA	Apical	0,00 \pm 0,00e	1,25 \pm 0,25b
	Inter-cotiledonar	67 \pm 21bc	0,50 \pm 5,00 b
	Nodal	22 \pm 1,10cd	2,50 \pm 0,67b
0,25 mg/l BAP+ 0,0 mg/l ANA	Apical	17,0 \pm 10cd	1,17 \pm 0,31b
	Inter-cotiledonar	83 \pm 17abc	1,25 \pm 0,95b
	Nodal	78 \pm 16abc	2,17 \pm 0,48b
0,50 mg/l BAP+ 0,0 mg/l ANA	Apical	83 \pm 17abc	0,80 \pm 0,37b
	Inter-cotiledonar	100 \pm 0,00a	2,00 \pm 1,05b
	Nodal	78 \pm 16abc	1,20 \pm 0,49b
1,00 mg/l BAP+ 0,0 mg/l ANA	Apical	67 \pm 21bc	1,75 \pm 1,50b
	Inter-cotiledonar	100 \pm 0,00a	1,00 \pm 0,00b
	Nodal	100 \pm 0,00a	1,60 \pm 0,24b
0,00 mg/l BAP+ 0,1 mg/l ANA	Apical	33 \pm 2,10cde	1,20 \pm 0,20b
	Inter-cotiledonar	50 \pm 22cd	2,00 \pm 0,08b
	Nodal	38 \pm 11cde	1,33 \pm 0,21b
0,25 mg/l BAP+ 0,1 mg/l ANA	Apical	62 \pm 20bc	1,25 \pm 0,20b
	Inter-cotiledonar	83 \pm 17ab	2,0 \pm 0,12b
	Nodal	64 \pm 0,23b	2,00 \pm 0,32b
0,50 mg/l BAP+ 0,1 mg/l ANA	Apical	67 \pm 0,22bc	1 \pm 0,00b
	Inter-cotiledonar	83 \pm 24bc	3 \pm 0,00ab
	Nodal	83 \pm 12,0bc	4,20 \pm 1,16ab
1,00 mg/l BAP+ 0,1 mg/l ANA	Apical	67 \pm 21bc	4,80 \pm 0,73 ^a
	Inter-cotiledonar	100 \pm 0,00a	6,00 \pm 0,00a
	Nodal	95 \pm 5,00ab	5,25 \pm 1,25 ^a

Tabla 7

P-valor de las variables brotes por explantos y frecuencia de explantos con callos, según la combinación de reguladores de crecimiento (RCV), tipo de explanto y la interacción entre RCV y tipo de explanto de *E. contortisiliquum*.

Variables	RCV P-valor	Explanto P-valor	RCV x Explanto P-valor
Brotos/explantos	0,0001	0,0001	0,0184
Frecuencia de explantos con callos %	0,0001	0,0001	0,5744



Figura 4

Organogénesis indirecta de brotes adventicios de *E. contortisiliquum*, a partir de segmentos intercotiledonares y nodales inducidos *in vitro* en medio MS suplementado con 1,00 mg/l BAP+ 0,1 mg/l ANA (Barra: 0,5 cm).

DISCUSIÓN

Una forma de simplificar los métodos de obtención de explantos axénicos y de acortar el período necesario para la obtención de clones, es utilizar las semillas como explantos primarios, de esta manera las células embrionarias pueden exponerse directamente a un estímulo hormonal (Nikolić et al., 2006). Entre la diversidad de hormonas o reguladores de crecimiento vegetal, podemos mencionar a las citoquininas, implicadas en la regulación de diversos procesos de crecimiento y desarrollo, comprobándose además que su aplicación exógena, tienen diversos efectos sobre la germinación de las semillas en diferentes especies. Akram & Aftab (2015) estudiando el efecto de varias citoquininas (adenina, Ad; 6-benzylaminopurina, BAP; kinetina, Kn; thidiazuron, TDZ y zeatina, Zn) en la germinación de semillas de *Tectona grandis*, observaron la máxima germinación, longitud de brotes y raíces en semillas cultivadas en MS suplementado con 0,05 mg/l BAP, en comparación al medio libre de RCV y demás citoquininas estudiadas. En nuestro trabajo, los resultados indicaron una respuesta diferencial en la germinación y crecimiento en altura de las plántulas germinadas *in vitro*, en función a la especie, el medio de cultivo y la presencia de BAP. En *P. dubium*, la máxima frecuencia de germinación y altura promedio de las plántulas se obtuvo en las semillas germinadas en medio MS $\frac{1}{2}$ en presencia de 0,1 mg/l de BAP; mientras que en *E. contortisiliquum* los valores máximos de germinación y altura de plántulas se observó en medio MS libre de BAP. En *P. dubium* pudimos observar un efecto positivo de la presencia del BAP en el medio de germinación, tanto en la capacidad germinativa, como en el desarrollo posterior de las plántulas *in vitro*, en concordancia a lo demostrado por Asif et al. (2001); Nikolić et al. (2006); Akram & Aftab (2015); y Hira & Bijaya (2019). Sin embargo, en la mayoría de las publicaciones específicas en *P. dubium*, la germinación *in vitro* de las semillas se realizó en agar-agua sin macro, micronutrientes, ni RCV (Bassan et al., 2006; Curti, 2011; Flôres et al., 2011; Candido, 2013; Gomes, 2017; Andreolla, 2019), solamente Fruet (2018) menciona el uso de MS $\frac{1}{2}$ enriquecido con 30 g/l de sacarosa en la germinación de las semillas de *P. dubium*; pero ninguno abordó el estudio del efecto del medio nutritivo en la germinación. Para el género *E. contortisiliquum* y *E. cyclocarpum*, se reporta germinación *in vitro* en MS sin reguladores de crecimiento (Thirunavoukkarasu et al., 2007; Rezende et al., 2022). En nuestra línea de estudio, cuando los segmentos nodales, obtenidos de plántulas germinadas *in vitro* de *P. dubium*, fueron cultivados en medio de multiplicación, se observó la misma tendencia que en la germinación. La máxima frecuencia de formación de brotes, el número de brotes/explanto y la longitud del brote principal se obtuvo en medio MS $\frac{1}{2}$ solo o combinado con 0,1 mg/l de BAP con un promedio de 80% de explantos con brotes y 2 brotes/explantos. Mientras que Candido (2013), con resultados similares también en *P. dubium*, concluye que la frecuencia de formación de brotes y número de brotes/ explantos, no son afectadas por concentración y tipo de reguladores de crecimiento utilizados (N6- (2-Isopentenyl) adenina, 2ip. BAP; Kn; ANA y TDZ), en la multiplicación de segmentos nodales, cultivados en medio MS. Destaca también, el efecto perjudicial de estos RCV en la senescencia de las hojas de los brotes cultivados *in vitro*, en las condiciones estudiadas. Curti (2011), estudia el efecto de los medios de cultivo (MS-Murashigue-Skoog y WPM-Woody Plant

Medium), y la combinación de diferentes concentraciones y tipos de RCV, en la multiplicación de epicótilos y segmentos cotiledonares, obtenidos de plántulas de *P. dubium* germinadas *in vitro* con una producción inferior a 1 brote/explanto, en medio MS suplementado con TDZ o 2ip, combinados con ANA, mientras que en presencia de BAP no se indujo a la formación de brotes. A diferencia de nuestro trabajo en ambos casos, se utilizó la formulación MS con las concentraciones de macro y micronutrientes sin dilución. Bassan et al. (2006), estudiaron el efecto del medio de cultivo (MS y WPM), el tipo de explanto (apical y nodal) y la presencia de luz, en la oxidación de los explantos cultivados *in vitro* de *P. dubium* y observaron, que el medio base MS es más eficaz que el WPM en el establecimiento *in vitro*, sin diferencias entre los explantos apicales y nodales. El único trabajo publicado en el cual se comparó el medio de cultivo MS en diferentes concentraciones (50; 75; 100; 125 y 150% MS), es el realizado por Flôres et al. (2011), quienes demostraron que la sobrevivencia de segmentos apicales de *P. dubium*, cultivados *in vitro*, no es afectada por la concentración del medio MS. Sin embargo, observan que el número de hojas y presencia de callos son afectados por la concentración de MS, siendo máxima la formación de callos, en una concentración de 150% de MS. Por esta razón concluyen que, el uso de MS en su concentración original es apropiado para disminuir la formación de callos y aumentar la producción de hojas, nuevamente, a diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

La propagación *in vitro* vía proliferación de brotes adventicios (organogénesis) y embriones somáticos (embriogénesis somática) ha sido demostrada en especies leñosas latifoliadas y coníferas a partir de diferentes tipos de explantos (cotiledones; hipocótilos, epicótilos, segmentos de hojas, embriones maduros e inmaduros y meristemas apicales), en forma directa (sin fase de callo previa) y en forma indirecta (formación previa de callo) con distinto grado de éxito. Sin embargo, la producción de brotes organogénicos y/o embriones somáticos, en *P. dubium* y *E. contortisiliquum*, no ha sido reportada a la fecha.

El genotipo, estado fisiológico y tipo de explanto, son factores que influyen la respuesta *in vitro*, además del medio nutritivo, reguladores de crecimiento, suplementos y condiciones ambientales como la intensidad lumínica y la temperatura. La inducción de brotes adventicios se inicia mediante la aplicación de citoquininas (BAP; 2iP; Kn y TDZ), solas o en combinación con auxinas (ANA; ácido indol butírico, IBA; 2,4-D); y otras hormonas como es el caso de ácido abscísico (ABA). Candido (2013), utilizando diferentes explantos (segmentos de cotiledones, hipocótilos y raíces), obtenidos de plántulas de *P. dubium* germinadas *in vitro*, y cultivados en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D (2,2; 4,4 y 8,8 mg/l), observó formación de callos en el 100% de los segmentos de cotiledones e hipocótilo, cultivados en 4,4 mg/l de 2,4-D, en presencia de luz, y la formación de raíces en segmentos de cotiledones cultivados en la oscuridad. No obstante, no obtuvo formación de brotes organogénicos y/o embriones somáticos en ninguno de los explantos, concentraciones de 2,4-D y/o condiciones lumínicas estudiadas. Mientras que, en nuestro estudio, hemos logrado la formación de brotes adventicios y de embriones somáticos, en segmentos apicales, inducidos en medio MS^{1/2} suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP, y diferenciados en medio MS^{1/2} con BAP.

En lo que respecta al enraizamiento *in vitro* de brotes de *P. dubium*, Reiniger et al. (2016) y Gomes (2017) reporta un 36% de enraizamiento en brotes micropropagados, cultivados en medio WPM^{1/2} libre de auxinas y sacarosa, solidificado con 7 g/l de agar. En el presente trabajo, reportamos un 65% de enraizamiento cuando los brotes generados por multiplicación vía axilar fueron cultivados en MS^{1/2} con 30 g/l de sacarosa libre de hormonas. Comparativamente, Andreolla (2019) reporta 95% de enraizamiento en *P. dubium*, en condiciones similares a Curti (2014), Curti & Reiniger (2014) y Reiniger et al. (2016) adjudicando el incremento del porcentaje de enraizamiento a la calidad del lote de semillas utilizado y subcultivos frecuentes de los brotes micropropagados previo al enraizamiento. A su vez, Curti (2014), destaca que el uso de pulsos de 4 mg/l de ácido indol-3-butírico (IBA), mejora formación de raíces.

Como mencionamos más arriba, las publicaciones relacionadas a la multiplicación vía axilar, organogénesis y/o embriogénesis somática en *E. contortisiliquum*, es inexistente, con excepción al trabajo publicado por Rodrigues et al. (2022), quienes describen el cultivo de cotiledones de *E. contortisiliquum* en medio MS suplementado con 0,5 mg/l 2,4-D + 2,0 mg/l picloram + 0,5 mg/l Kn + 2,0 mg/l BAP, para estudiar la curva de crecimiento *in vitro* de la especie, reportando solamente la formación de callos y su evolución. Mientras que en *E. cyclocarpum*, Akinropo et al. (2020), observaron que los segmentos nodales cultivados en un medio MS suplementado con 0,5 mg/l de BAP y ANA, generaron la mayor frecuencia de callos. Cuando cultivaron segmentos cotiledonares y nodales en 2 mg/l de BAP combinados con 0,5 mg/l de ANA, produjeron 3,98 brotes adventicios/explantos y el 10% brotes de estos brotes fueron enraizados. Los explantos de hoja no respondieron a estos tratamientos. Thirunavoukkrasu et al. (2007) lograron la multiplicación de brotes a partir de segmentos de cotiledones e hipocótilos de plántulas de *E.*

cyclocarpum germinadas *in vitro* en el medio MS con BAP (0,5-2,0 mg/L) y ácido indol-3-acético-AIA (0,1-0,3 mg/L). Un 80% de los cotiledones formaron 4 brotes/explantos en MS suplementado con 1,5 mg/l de BAP en combinación con 0,2 mg/AIA, con una longitud promedio de brotes de 2,7 cm. Por otro lado, Sahagún et al. (2007), reportan la producción de 4,75 brotes/explantos en segmentos nodales cultivados en MS suplementado con 0,5 mg/l de ANA y 2 mg/l de BAP, logrando un 100% de enraizamiento y 90% de sobrevivencia de las plántulas obtenidas. En nuestro trabajo pudimos determinar el efecto del medio de cultivo y la presencia de BAP en la frecuencia de formación directa de brotes, el número de brotes/explanto y longitud del brote principal, en segmentos nodales de *E. contortisiliquum*, con un 100% de explantos con brotes y promedio de dos brotes/explanto en segmentos nodales cultivados en MS + 0,1 mg/l de BAP. A su vez, obtuvimos formación de brotes organogénicos en los tres tipos de explantos estudiados (segmentos apicales, inter-cotiledonares y nodales), en todas las combinaciones de BAP y ANA estudiadas, obteniendo la máxima frecuencia de explantos con callos (100%) y 6 brotes/explanto, cuando los segmentos inter-cotiledonares fueron cultivados en MS suplementado con 1 mg/l de BAP+0,1 mg/l de ANA. Estos son valores comparables a los obtenidos por Sahagún et al. (2007); Thirunavoukkarasu et al. (2007) y Akinropo et al. (2020) en *E. cyclocarpum*.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos y en las condiciones estudiadas, podemos concluir:

1) El medio de cultivo y la presencia de BAP, afecta la germinación *in vitro* y desarrollo posterior de las plántulas de *P. dubium* y *E. contortisiliquum*.

2) La multiplicación vía axilar es posible en *P. dubium* y *E. contortisiliquum* cuando se cultivan segmentos nodales en medio MS $\frac{1}{2}$ y MS respectivamente, suplementado con 0,1 mg/l de BAP.

3) Los brotes micropropagados de *P. dubium* enraízan en MS $\frac{1}{2}$ libre de RCV.

4) Se reporta por primera vez, la producción de brotes adventicios a partir de organogénesis indirecta en *P. dubium* y *E. contortisiliquum*; y la formación de embriones somáticos en estadio acorazonado en *P. dubium*.

Agradecimientos

Los estudios descriptos en el presente trabajo, fueron financiados por el Proyecto Manejo Sustentable de Recursos Naturales, del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, al Banco Internacional de Reconstrucción y Fomento (BIRF 7520 AR)/Proyecto PIA10031, la Secretaría General de Ciencia y Tecnología y la Facultad de Ciencias Forestales (FCF) de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM), Misiones, Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmad A. & M. Anis (2019). Meta-topolin improves *in vitro* morphogenesis, rhizogenesis and biochemical analysis in *Pterocarpus marsupium* Roxb.: a potential drug-yielding tree. *Journal of Plant Growth Regulation* 38(3): 1007-1016.

Akinropo, M.S.; B.E. Ayisire & E.R. Ogbimi (2020). *In vitro* callus and shoot regeneration in *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. a fast timber yielding species. *Notulae Scientia Biologicae* 12(1): 74-89.

Akram, M. & F. Aftab (2015). Effect of cytokinins on *in vitro* seed germination and changes in chlorophyll and soluble protein contents of teak (*Tectona grandis* L.). *Biochem Physiol* 4: 166.

Andreolla, T.L. (2019). Rizogênese *in vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. M. Sc. Tesis. Santa Catarina, Brasil. UFSM. 62 pp.

Asif, M.J.; C. Mak & R.Y. Othman (2001). *In vitro* zygotic embryo culture of wild *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* and factors affecting germination and seedling growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67(3): 267-270.

Bassan, J.S.; L.R. Reiniger; B.H. Rocha; C.R. Severo & A.V. Flôres (2006). Oxidação fenólica, tipo de explanto e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). *Ciência Florestal* 16: 381-390.

- Beck, S.L.; R. Dunlop & J. Van Staden (1998a).** Micropropagation of *Acacia mearnsii* from ex vitro material. *Plant growth regulation* 26(3): 143-148.
- Beck, S.L.; R. Dunlop & J. Van Staden (1998b).** Rejuvenation and micropropagation of adult *Acacia mearnsii* using coppice material. *Plant Growth Regulation* 26(3): 149-153.
- Boeri, P., & S. Sharry (2018).** Somatic embryogenesis of alpataco (*Prosopis alpataco* L.). In: *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants* Springer, Cham. pp. 189-198.
- Bon, M.C.; D. Bonal; D.K. Goh & O. Monteuiis (1998).** Influence of different macronutrient solutions and growth regulators on micropropagation of juvenile shape *Acacia mangium* and shape *Paraserianthes falcataria* explants. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 53(3): 171-177.
- Candido, D.F. (2013).** Cultivo in vitro de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert: multiplicação, senescência foliar e calogênese. M. Sc. Tesis. Santa Catarina, Brasil. UFSM. 120 pp.
- Cerdas, L.V. & L.A. Guzmán (2004).** In vitro organogenesis in *Dalbergia retusa* (Papilionaceae). *Revista de biologia tropical* 52(1): 41-46.
- Curti, A.R. (2011).** Contribuições para a Micropropagação de *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) Taubert. M. Sc. Tesis. Santa Catarina, Brasil. UFSM. 94 pp.
- Curti, A.R. (2014).** Rizogênese in vitro e ex vitro em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. PhD. Tesis doctoral, Universidad Federal de Santa Maria, Brasil. UFSM. 133 pp.
- Curti, A.R. & L.R. Reiniger (2014).** In vitro rhizogenesis in *Peltophorum dubium* the effect of different culture media/Formacao in vitro de raízes em canafistula: o efeito de diferentes meios de cultivo. *Ciência Rural* 44(2): 314-321.
- Dayanandan, S.; J. Dole; K.S. Bawa & R. Kesseli (1999).** Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Molecular Ecology* 8(10): 1585-1592.
- Di Rienzo J.A.; F. Casanoves; M.G. Balzarini; L. Gonzalez; M. Tablada; C.W. Robledo (2020).** InfoStat, Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar> Último acceso: junio 2022
- Farooq, S.A. & T.T. Farooq (2003).** Rapid clonal propagation of *Tamarindus indica* L. using explants from adult trees. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6(18): 1591-1592.
- Flôres, A.V.; L. Reiniger; A. Curti; A. Paim; J. Bassan & A. Cunha (2011).** Estabelecimento in vitro de *Peltophorum dubium* ((Spreng.) Taub.) em função das concentrações do meio MS. *Cerne* 17: 549-553.
- Fruet, S.F.T. (2018).** Comportamento de duas espécies florestais arbóreas cultivadas in vitro e in vivo em função do cobre. M. Sc. Tesis. Santa Catarina, Brasil. UFSM. 51 pp.
- Gantait, S.; S. Kundu & P.K. Das (2018).** Acacia: An exclusive survey on in vitro propagation. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 17(2): 163-177.
- Global Strategy for Plant Conservation. GSPC (2020).** A strategy for plant conservation as part of the Post 2020 Global Biodiversity Framework. Disponible en <https://www.plants2020.net> Último acceso: julio 2022
- Gomes, C.S. (2017).** Qualidade de sementes e rizogênese in vitro em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. M. Sc. Tesis. Santa Catarina, Brasil. UFSM. 60 pp.
- Goyal, P.; S. Kachhwaha & S.L. Kothari (2012).** Micropropagation of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth—a multipurpose leguminous tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using molecular markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 18(2): 169-176.
- Guo, W.; Y. Li; L. Gong; Y. Dong & B. Liu (2006).** Efficient micropropagation of *Robinia ambigua* var. *idahoensis* (Idaho Locust) and detection of genomic variation by ISSR markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84(3): 343-351.
- Hira, A., & P. Bijaya (2019).** In vitro seed germination and seedling growth of the orchid *Dendrobium primulinum* Lindl. *African Journal of Plant Science* 13(12): 324-331.
- Ho, W.J.; Y.K. Huang; W. Huang; Y.C. Huang & J.P. Chung (2022).** Effective in vitro culture using dormant bud of nodal sections from a mature *Acacia* tree. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 58(3): 437-446.
- Hong, Y. & S. Bahtnagar (2007).** Tropical Tree Legumes II. 4. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 60, Transgenic Crops V. E.C. Pua & M.R. Davey, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 407-431.
- Husain, M.K.; M. Anis & A. Shahzad (2007).** In vitro propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using thidiazuron. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 43(1): 59-64.

- Kaur, K. & U. Kant (2000).** Clonal propagation of *Acacia catechu* Willd. by shoot tip culture. Plant growth regulation 31(3): 143-145.
- Marinucci, L.; M. Ruscitti & W. Abedini (2004).** Morfogénesis in vitro de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía 105 (2): 27-36.
- Mori, E.; A. Sebbenn; E. Tambarussi & R. Gurie (2013).** Sistema de reprodução em populações naturais de *Peltophorum dubium*. Sci For, Piracicaba 41(99): 307-317
- Murashige, T. & F. Skoog (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Murawski, D.A. & J.L. Hamrick (1991).** The effect of the density of flowering individuals on the mating systems on nine tropical tree species. Heredity 67(2): 167-164.
- Murawski, D.A.; I.N. Gunatilleke & K.S. Bawa (1994).** The effects of selective logging on inbreeding in *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) from Sri Lanka. Conservation Biology 8(4): 997-1002.
- Niella, F.; P. Rocha; A.M. Tuzinkievicz; R. Buchweis; C. Bulman Hartkopf; P. Thalmayr; J. Gonzalez; F. Montagnini & S. Sharry (2022).** Contribution to the Domestication and Conservation of the Genetic Diversity of Two Native Multipurpose Species in the Yabotí Biosphere Reserve, Misiones, Argentina. In Biodiversity Islands: Strategies for Conservation in Human-Dominated Environments. Springer, Cham. pp. 461-483.
- Nikolić, R.; N. Mitić; R. Miletić & M. Nešković (2006).** Effects of cytokinins on in vitro seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. Journal of plant growth Regulation 25(3): 187-194.
- O'Neill, G.A.; I. Dawson; C. Sotelo-Montes; L. Guarino; M. Guariguata; D. Current & J.C. Weber (2001).** Strategies for genetic conservation of trees in the Peruvian Amazon. Biodiversity & Conservation 10(6): 837-850.
- Rathore, J.S.; M.K. Rai & N.S. Shekhawat (2012).** Induction of somatic embryogenesis in gum arabic tree [*Acacia senegal* (L.) Willd.]. Physiology and Molecular Biology of Plants 18(4): 387-392.
- Reiniger, L.R.; A.R. Curti; D.P. Golle; A.F. Paim & M.F.B. Muniz (2016).** In vitro rhizogenesis and acclimatization of *Peltophorum dubium* shoots: effect of adding agar to a WPM/2 medium with vermiculite. Scientia Forestalis (111): 691-700.
- Rezende, R.; F.A. Rodrigues; V.D. Ramos; A.D. Martins; M. Pasqual; R.A Braga Júnior & J. Dória (2022).** Trypsin inhibitor in *Enterolobium contortisiliquum* calli grown in the presence of plant growth regulators. Pesquisa Agropecuária Brasileira 57.
- Rodrigues, F.A.; V. Cavalcanti; J. Dória & M. Pasqual (2022).** Curva de crescimento de calos de *Enterolobium contortisiliquum* induzidos in vitro. Research, Society and Development 11(1).
- Sahagún, A.R.; O. Hernández & G. Hernández (2007).** In vitro propagation of *Enterolobium cyclocarpum* (guanacaste) from nodal explants of axenic seedlings. e-Gnosis (5): 1.
- Thirunavoukkarasu, M.; S. Parida; S. Rath & A. Behera (2007).** Micropropagation of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. Journal of Sustainable Forestry 23(4): 1-12.
- Thomas E.; R. Jalonen; J. Loo; D. Boshier; L Gallo; S. Cavers; S. Bordacs; P. Smith & M. Bozzano (2014).** Genetic considerations in ecosystem restoration using native tree species. Forest Ecology and Management 333: 66-75.
- Uddin, M.S.; K. Nasirujjaman; S. Zaman & M.A. Reza (2005).** Regeneration of multiple shoots from different explants viz. Shoot tip, Nodal segment and Cotyledonary node of in vitro grown seedlings of *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Backer ex K. Heyne. Biotechnology 4(1): 35-38.
- Zobel, B. & J. Talbert (1992).** Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Noriega eds. México – España – Venezuela – Colombia. 545 pp.