

Organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos nodales, hojas y raíces de *Eugenia involucrata* DC

Direct and indirect organogenesis from nodal segments, leaves and roots of *Eugenia involucrata* DC

Karina Bustamante *

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

Miguel Guerra

Centro de Ciencias Agrarias, Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil

Fernando Niella

Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional de Misiones, Argentina

Revista de la Facultad de Agronomía

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

ISSN: 1669-9513

Periodicidad: Semestral

vol. 121 (Num. Esp. 2), 2022

redaccion.revista@agro.unlp.edu.ar

Recepción: 03/08/2022

Aprobación: 05/09/2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/23/233546002/>

DOI: <https://doi.org/10.24215/16699513e102>

*Autor de correspondencia: karina.bustamante@fcf.unam.edu.ar



Resumen

Eugenia involucrata DC. (Myrtaceae), conocida vulgarmente como “cerella”, es un árbol nativo de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay, con importante potencial económico. Su propagación y conservación están limitados por la característica recalcitrante de sus semillas, siendo el cultivo de tejidos un método eficiente para estos fines. En este trabajo se evaluó el efecto del tipo de explante y distintas combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal, 6-bencilaminopurina (BAP), tidiazurón (TDZ) y ácido 1-naftalen acético (ANA) en la formación de brotes adventicios, enraizamiento y formación de plántulas de *E. involucrata*. Se desarrollaron tres experimentos, i) inducción; ii) diferenciación de brotes y iii) aclimatización en invernáculo de las plántulas obtenidas. Las hormonas BAP y TDZ indujeron callos y brotes a partir de segmentos nodales, radiculares y foliares. El máximo porcentaje de formación de brotes por organogénesis directa se obtuvo en segmentos nodales cultivados en medio MS $\frac{1}{2}$ suplementado con 2,25 mg L⁻¹ de BAP y la máxima frecuencia de formación de callos se obtuvo en explantos nodales o radiculares cultivados en medio MS $\frac{1}{2}$ suplementado con TDZ, solo o combinado con ANA. La máxima formación de brotes adventicios, por organogénesis indirecta, se obtuvo en segmentos nodales, inducidos en medio MS $\frac{1}{2}$ suplementado con 1,1 mg L⁻¹ de TDZ+0,93 mg L⁻¹ de ANA y subcultivados en medio MS $\frac{1}{2}$ con 0,5 mg L⁻¹ de TDZ y 1 g L⁻¹ de carbón activado. Los ápices de los brotes obtenidos a partir de organogénesis directa e indirecta enraizaron *in vitro* en medio MS $\frac{1}{2}$ libre de reguladores de crecimiento vegetal (RCV), formando plántulas que luego se aclimataron en invernáculo, demostrando un alto porcentaje de supervivencia a los seis meses de trasplante.

Palabras clave: biotecnología vegetal, cultivo de tejidos, fitorreguladores, cerella, Myrtaceae

Abstract

Eugenia involucrata DC. (Myrtaceae), popularly known as “cerella”, is a native tree of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay, with an important economic potential. Its propagation and conservation are limited by the recalcitrant characteristic of its seeds, being tissue culture an efficient method for these purposes. In this work, the effect of explant type and different combinations of plant growth regulators, 6-benzylaminopurine (BAP), thidiazuron (TDZ) and 1-naphtalen acetic acid (NAA) on adventitious shoot formation, rooting and seedling formation of *E. involucrata* were evaluated. Three experiments were developed, i) induction; ii) shoot differentiation and iii) greenhouse seedling acclimatization. BAP and TDZ hormones induced callus and shoots from nodal, root and leaf segments. The maximum percentage of shoot formation by direct organogenesis was obtained in nodal segments grown on MS $\frac{1}{2}$ medium supplemented with 2.25 mg L⁻¹ BAP and the maximum frequency of callus formation was obtained in nodal or root explants grown on MS $\frac{1}{2}$ medium supplemented with TDZ, alone or combined with NAA. Maximum adventitious shoot formation, by indirect organogenesis, was obtained in nodal segments, induced on MS $\frac{1}{2}$ medium supplemented with 1.1 mg L⁻¹ TDZ+0.93 mg L⁻¹ NAA and subcultured on MS $\frac{1}{2}$ medium with 0.5 mg L⁻¹ TDZ and 1 g L⁻¹ activated charcoal. Shoot apices obtained from direct and indirect organogenesis rooted *in vitro* on Plant Growth Regulators (PGRs)-free MS $\frac{1}{2}$ medium, forming seedlings that were then acclimatized in greenhouses, showing a high survival rate six months after transplanting.

Keywords: vegetal biotechnology, plant tissue culture, phyto regulators, cerella, Myrtaceae

INTRODUCCIÓN

Eugenia involucrata DC. pertenece a la familia de las mirtáceas, distribuidas naturalmente en la Mata Atlántica (SE de Brasil), noreste de Argentina, y este de Paraguay (selva paranaense) y norte de Uruguay (Lorenzi, 2016). Es una especie arbórea, que ha llamado la atención en los últimos años como un valioso recurso fitogenético por sus frutos carnosos y comestibles aptos para su consumo fresco, preparación de dulces, licores, vinagres, aportando así, a una necesaria diversificación productiva y nuevas fuentes alimentos de alta calidad nutricional (Oliveira Junior, 2021). También es de uso maderable y valor ecológico como especie dispersada por animales, polinización por insectos, apropiada para contribuir en forma natural en la recuperación de áreas degradadas, facilitando y aumentando la presencia de polinizadores en el monte (Lorenzi, 2002; Carvalho, 2008; Silveira Reiniger et al., 2022). Sin embargo, su uso actual es mayormente extractivo y en un estado incipiente de domesticación, con escasa atención a su conservación y en estado de vulnerabilidad por la fragmentación y disminución creciente de su hábitat natural. Por esta razón, los recursos genéticos remanentes de esta especie requieren estrategias integradas de conservación (*in situ* y *ex situ*). Además, las semillas de *E. involucrata*, consideradas recalcitrantes con baja o nula tolerancia a la desecación, presentan limitaciones para el almacenamiento a largo plazo en bancos de semillas (Golle & Reiniger, 2013; Golle et al., 2017).

Las técnicas de propagación *in vitro* como la organogénesis o la embriogénesis somática ofrecen un gran potencial no solo para la multiplicación rápida del stock existente de especies de plantas, sino también como estrategia de conservación *ex situ* (George & Debergh, 2008) en la conformación de bancos de germoplasma. En particular la técnica de organogénesis representa un método eficiente no sólo como fuente de explantos para encapsulación y crioconservación, sino también para la propagación masiva de plantas en una estrategia que considere la remultiplicación *ex vitro* con técnicas como la miniestaquia. Considerando, además, la interacción con un programa de domesticación nos permitiría un aumento de la disponibilidad de material genético selecto en un esquema de manejo sostenible del recurso, significativamente distinto al manejo meramente extractivo de la actualidad.

Según el modo de ocurrencia, la organogénesis puede ser directa con la formación de brotes a partir del explanto utilizado, sin la intervención de la etapa de callo; o indirecta, en los que se observa la formación previa de callos en el explanto (desdiferenciación del tejido), y generación de brotes a partir de la diferenciación del tejido calloso (George & Debergh, 2008). Su éxito depende entre otros factores, del tipo de explante y medios de cultivo que contengan una combinación óptima de reguladores de crecimiento vegetal (RCV), y ha sido reportado con éxito, en diferentes especies de plantas leñosas (Canhoto & Gruz, 2000; Niella & Rocha, 2001; Singh et al., 2002; Malá et al., 2006; Sahai et al., 2010; Pérez Jimenez et al., 2014; Gentile et al., 2021). Particularmente en *E. involucrata*, la propagación *in vitro* se ha centrado en la multiplicación vía axilar utilizando segmentos nodales (Thalmayr et al., 2016; Golle et al., 2017; Stefanel et al., 2020; Kubiszen et al., 2021), y el efecto de distintas combinaciones de RCV en callogénesis y rizogénesis a partir de segmentos de hoja con resultados dispares, que indican, la necesidad de continuar investigando y generar el conocimiento necesario que resulte en un protocolo efectivo de propagación *in vitro* de la especie (Golle et al., 2020a; Oliveira Junior, 2021).

El presente estudio se desarrolló con el objetivo de estudiar el efecto del tipo de explante (segmentos nodales, radicales y de hojas) y distintas combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal, 6-bencilaminopurina (BAP), thidiazurn (TDZ) y ácido 1-naftalen acético (ANA) en la formación de brotes adventicios, enraizamiento y formación de plántulas de *E. involucrata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL, COMPOSICIÓN DEL MEDIO NUTRITIVO Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Los explantes se obtuvieron de plántulas germinadas *in vitro*, a partir de una muestra compuesta de semillas de *E. involucrata*, cosechadas de plantas ubicadas en la ciudad de Eldorado, Misiones-Argentina. Las semillas esterilizadas fueron cultivadas, individualmente, en tubos que contenían 15 ml de medio de cultivo MS ½ (con la mitad de la concentración de macro y micronutrientes, basados en Murashige & Skoog (1962) enriquecido con 25 g L⁻¹ de sacarosa. El pH se ajustó a 5,8 con NaOH o HCl 0,1 N y se agregó 5 g L⁻¹ del gelificante agar. El medio fue esterilizado en autoclave a 1 atm y 120°C por 20 minutos.

INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS DIRECTA E INDIRECTA

Los explantes, segmentos (0,5 cm) nodales (SN), radicales (SR), y foliares (ca. 1.0 cm²), posición abaxial (HAB) y adaxial (HAD), en contacto con el medio, obtenidos de plántulas de 45 días, se cultivaron en medio MS ½ conteniendo 25 g L⁻¹ de sacarosa, y diferentes tipos, combinaciones y concentraciones de RCV (Tabla 1): 6-benzylaminopurina (BAP), Thidiazurón (TDZ) y Ácido 1-Naftalen Acético (ANA) (Tabla 1 y Tabla 2). El pH se ajustó a 5,8 con NaOH o HCl 0,1 N y se agregó 1,5 g L⁻¹ del gelificante Phytigel (SIGMA®). El medio fue esterilizado en autoclave a 1 atm y 120°C por 20 minutos. Los explantes 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, permaneciendo los primeros 30 días en oscuridad, y luego bajo un fotoperiodo de 16 horas (30 μmol m⁻² s⁻¹), a 24±2°C, durante 60 días. Luego de 90 días de cultivo, en oscuridad y luz, se evaluó el número de explantes con callo, y brotes y número de brotes/explante.

DIFERENCIACIÓN DE BROTES ADVENTICIOS

A los 90 días, los explantes inducidos (con presencia de callos), se subcultivaron en medio MS ½, conteniendo 25 g L⁻¹ de sacarosa, y diferentes combinaciones de Thidiazurón (TDZ) y carbón activado, dependiendo del tratamiento (Tabla 3) y 1,5 g L⁻¹ gelificante Phytigel (SIGMA®). 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. Las condiciones de incubación en esta etapa fueron temperatura de 24±2°C, bajo un fotoperiodo de 16 horas y una intensidad lumínica de 30 μmol m⁻² s⁻¹ por siete días y de 340 μmol m⁻² s⁻¹ por 83 días, totalizando 90 días este periodo. Al finalizar se evaluó el número de brotes adventicios por explante.

FORMACIÓN DE PLÁNTULAS

A los 90 días de cultivo en medio inductivo o diferenciación, las porciones apicales de los brotes formados por organogénesis directa o indirecta se extirparon de la masa organogénica y se subcultivaron en medio MS ½ que contenía 25 g L⁻¹ de sacarosa, y 1,5 g L⁻¹ de Phytigel (SIGMA®) y pH 5,8, sin RCV. Los cultivos, en frascos de vidrio (220 cm³) que contenían 50 ml de medio y cubiertos con una doble capa de película adherente, se mantuvieron en una sala de cultivo, bajo un fotoperiodo de 16 horas (120 μmol m⁻² s⁻¹), a 24±2°C. A los 90 días se evaluó la frecuencia de brotes sobrevivientes y enraizados.

Los brotes enraizados *in vitro* se extrajeron de los frascos de cultivo, sus raíces se lavaron con agua tibia y se trasplantaron a macetas de 1 litro que contenían tres partes de sustrato, esterilizado en autoclave, de corteza de pino compostado y una parte de perlita, con 3 g L⁻¹ de fertilizante de liberación lenta Plantacote Plus®. Las plántulas, se criaron en invernáculo con riego por microaspersión hasta la evaluación de sobrevivencia a los 6 meses.

DISEÑO Y ANÁLISIS DE LOS EXPERIMENTOS

El experimento inductivo se implementó en un diseño completamente aleatorizado con una distribución factorial de los tratamientos (3x9), 3 fuentes de explantos (segmentos nodales, radicales y foliares) y 9 combinaciones de RCV, con 24 repeticiones por tratamientos, siendo la unidad experimental y observacional el explante. Se evaluó el número de explantos con callo y número de explantos con brotes adventicios. La frecuencia de inducción de brotes o callos (%) se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{número de explantos con brotes o callos}}{\text{número total de explantos}} * 100$$

En el experimento de diferenciación, también se utilizó un diseño completamente aleatorizado con una distribución factorial de los tratamientos (9x4x3) con 9 combinaciones de RCV en la fase inductiva, 4 combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal en la fase de diferenciación y 3 fuentes de explantos (segmentos nodales y radicales), con 6 repeticiones por tratamientos, siendo la unidad experimental el frasco con 3 explantos. Se evaluó el número de brotes por explante.

Los datos 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 Duncan's para comparar las medias de los tratamientos con una diferencia crítica (P) de $\leq 0,05$. Los resultados se presentan en tablas como $\text{media} \pm \text{error estándar}$.

RESULTADOS

INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS DIRECTA

Los datos demostraron que los segmentos nodales y radiculares obtenidos de plantines juveniles de *Eugenia involucrata* pueden ser propagados *in vitro*, con una frecuencia de inducción de brotes que varió de 0 a 84% vía organogénesis directa, y una producción promedio de hasta 10,29 brotes por cada explanto. Observándose una interacción significativa, entre la combinación de RCV y el tipo de explanto utilizado (p -valor: $< 0,0001$). Los segmentos nodales, cultivados en medio suplementado con 2,25 mg L⁻¹ de BAP combinado con 0,93 mg L⁻¹ de ANA, presentaron una frecuencia de inducción de brotes de $83 \pm 8\%$, significativamente superior a la observada en segmentos nodales y/o radiculares cultivados en presencia de 1,12 mg L⁻¹ de BAP y TDZ solo o combinado con ANA (Tabla 1).

Los segmentos nodales cultivados en medio suplementado con 2,25 mg L⁻¹ de BAP, formaron un promedio de $10,29 \pm 1,05$ brotes/explanto, diferenciándose significativamente de aquellos cultivados en 1,12 mg L⁻¹ de BAP o 2,25 mg L⁻¹ de BAP y 0,93 mg L⁻¹ de ANA, con una producción promedio de $6,65 \pm 0,96$; $7,00 \pm 0,19$ brotes/explanto, respectivamente (Tabla 1, Figura 1). Los segmentos radiculares (SR), también demostraron capacidad de inducción de brotes por organogénesis directa. Si bien en la mayoría de las combinaciones de RCV utilizadas la formación de brotes fue de 0%, los segmentos radiculares cultivados en 1,1 o 2,2 mg L⁻¹ de TDZ presentaron una frecuencia de inducción de brotes del 4% con una producción de $1,5 \pm 0,3$ brotes/explanto. Mientras que, en los segmentos de hojas, la frecuencia de inducción de brotes, por organogénesis directa, fue nula en todos los tratamientos inductivos estudiados.

Tabla 1

Efecto de la combinación de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) y tipo de explanto, segmentos nodales (SN) y radiculares (SR), en la frecuencia de inducción de brotes (FBROT%) y número de brotes/explanto (NBROT) en E. involucrata después de 90 días de cultivo. Cada tratamiento tenía 24 repeticiones. Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan's ($P < 0.05$). Se presenta la frecuencia de inducción de brotes \pm Error Estándar.

| RCV (mg L ⁻¹) | | | FBROT% (SN) | NBROT (SN) | FBROT% (SR) | NBROT (SR) |
|---------------------------|-----|------|----------------|-------------------|----------------|----------------|
| BAP | TDZ | ANA | | | | |
| - | - | - | 0 | | 0 | |
| 1,12 | - | - | $63 \pm 10b$ | $6,65 \pm 0,96b$ | 0 | |
| | 1,1 | | 0 | | $4 \pm 4a$ | $1,2 \pm 0,6b$ |
| - | - | 0,93 | 0 | | 0 | |
| 2,25 | - | - | $25 \pm 9c$ | $10,29 \pm 1,05a$ | 0 | |
| - | 2,2 | - | 0 | | $4 \pm 4a$ | $1,5 \pm 0,3b$ |
| 1,12 | - | 0,93 | $17 \pm 8c$ | 0c | 0 | |
| 2,25 | - | 0,93 | $83 \pm 8a$ | $7,00 \pm 0,19b$ | 0 | |
| - | 1,1 | 0,93 | 0 | | 0 | |
| - | 2,2 | 0,93 | 0 | | 0 | |

INDUCCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE BROTES VÍA ORGANOGÉNESIS INDIRECTA

La frecuencia de inducción de callos presentó un rango de 0 a 100%, siendo, afectada por la interacción entre la combinación de RCV y el tipo de explanto utilizado (p -valor: $<0,0001$). Los segmentos nodales y radicales cultivados en medios suplementados con 1,1 y 2,2 mg L⁻¹ de TDZ, solo o combinado con 0,93 mg L⁻¹ de ANA, o cultivados en 0,93 mg L⁻¹ de ANA, presentaron una frecuencia de inducción de callos significativamente superior a los explantos cultivados en 1,12 o 2,25 mg L⁻¹ de BAP (Tabla 2). Los segmentos foliares, tanto de posición adaxial o abaxial, presentaron formación de callos en todos los tratamientos, excepto en el tratamiento control, sin RCV (Tabla 2). Los segmentos foliares cultivados en posición adaxial, presentaron un 83±8% de explantos con callos, cuando fueron inducidos en medio suplementado con 1,1 mg L⁻¹ de TDZ, solo o combinado con ANA, siendo significativamente superior a la frecuencia de formación de callos en los segmentos cultivados en medio suplementado con BAP (1,12 o 2,25 mg L⁻¹) solo o en presencia de 0,93 mg L⁻¹ de ANA (Tabla 2).

Los explantos inducidos con callos, subcultivados a medio de diferenciación, demostraron que la producción de brotes, también, está influenciada por una interacción significativa entre el medio inductivo y de diferenciación y el tipo de explanto (p -valor: $<0,0001$). Los segmentos nodales inducidos en medio de cultivo suplementado con una combinación de 1,1 mg L⁻¹ de TDZ y 0,93 mg L⁻¹ de ANA, y subcultivados a medio de diferenciación suplementado con 0,5 mg L⁻¹ de TDZ en presencia de 1 g L⁻¹ de carbón activado, generaron la máxima producción de brotes, con un promedio de 13,83±0,54 brotes/explanto. A su vez, esta producción promedio de brotes/explanto, no se diferenció significativamente de la producción obtenida en los segmentos nodales inducidos en medio con 1,1 mg L⁻¹ de TDZ y subcultivados a medio de diferenciación con 1 g L⁻¹ de carbón activado sin RCV o suplementado con 0,5 mg L⁻¹ de TDZ y 1 g L⁻¹ de carbón activado, con una producción promedio de brotes/explanto de 10,5±0,56 y 10,83±0,7 respectivamente (Tabla 3 y Figura 1). Los segmentos radicales (SR), inducidos en medio suplementado con 2,2 mg L⁻¹ de TDZ y diferenciados en medios desprovistos de RCV o carbón activado, generaron una producción promedio de brotes de 7,5±0,67, significativamente superior al resto de las combinaciones de RCV tanto en el medio inductivo, como de diferenciación, observándose que la presencia de carbón activado no es necesaria. Los segmentos foliares, con callos, inducidos en medios con 1,1 mg L⁻¹ de TDZ solo o combinado con 0,93 mg L⁻¹ de ANA, fueron los únicos disponibles con el número de repeticiones suficientes para el estudio de diferenciación, formando brotes en el tratamiento de subcultivo, tanto en el control (sin carbón activado, ni RCV), como en presencia de 0,5 mg L⁻¹ de TDZ. La diferenciación de brotes fue significativamente superior en los segmentos foliares de posición adaxial, respecto a la posición abaxial, en los dos medios de subcultivo estudiados. Los segmentos de posición adaxial, subcultivados en el tratamiento control o en medios con 0,5 mg L⁻¹ de TDZ, presentaron diferencias estadísticamente no significativas, con una producción promedio de 4,30±0,23; 4,20±0,81; 4±0,76 y 3±0,86 brotes/explanto respectivamente, indistintamente si los callos fueron inducidos en medio suplementado con 1,1 mg L⁻¹ de TDZ solo o combinado con 0,93 mg L⁻¹ de ANA. Los segmentos foliares, subcultivados en posición abaxial, diferenciaron brotes en los callos provenientes de medio inductivo suplementado con 1,1 mg L⁻¹ de TDZ, sin diferencias significativas entre los medios de subcultivos, con una producción de 2,30±0,58 a 3,2±0,40 brotes/explanto (Tabla 3).

FORMACIÓN DE PLÁNTULAS

El 75% de los ápices de los brotes adventicios obtenidos, tanto por organogénesis directa o indirecta, al ser cultivados en medio MS ½ libre de RCV, elongaron y produjeron raíces espontáneamente, en un periodo de 60-90 días, generando plantines que fueron aclimatizados, con una sobrevivencia promedio del 80% a los 6 meses de su transferencia a invernáculo (Figura 2).

Tabla 2

Efecto de la combinación de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) y tipo de explanto, segmentos nodales (SN) y radiculares (SR), en la frecuencia de inducción de callos (%) en *E. involucrata*, después de 90 días de cultivo. Cada tratamiento tenía 24 repeticiones. Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan's ($P < 0.05$). Se presenta la frecuencia de inducción de callos \pm Error Estándar.

| RCV (mg L ⁻¹) | | | Explanto | | | |
|---------------------------|-----|------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| BAP | TDZ | ANA | SN | SR | HAD | HAB |
| - | - | - | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,12 | - | - | 0i | 4 \pm 4hi | 58 \pm 10def | 17 \pm 8cde |
| | 1,1 | | 100 \pm 0a | 100 \pm 0a | 83 \pm 8ab | 42 \pm 10c |
| - | - | 0,93 | 100 \pm 0a | 88 \pm 7abc | 75 \pm 9bc | 50 \pm 10bc |
| 2,25 | - | - | 13 \pm 7hi | 4 \pm 4hi | 42 \pm 10fg | 17 \pm 8cde |
| - | 2,2 | - | 83 \pm 8abc | 100 \pm 0a | 67 \pm 10cde | 42 \pm 13c |
| 1,12 | - | 0,93 | 79 \pm 8abc | 92 \pm 6ab | 50 \pm 10ef | 17 \pm 8cde |
| 2,25 | - | 0,93 | 0i | 83 \pm 8abc | 75 \pm 9bcd | 17 \pm 8bcd |
| - | 1,1 | 0,93 | 100 \pm 0a | 100 \pm 0a | 83 \pm 8ab | 42 \pm 10c |
| - | 2,2 | 0,93 | 92 \pm 6ab | 100 \pm 0a | 70 \pm 9bcd | 25 \pm 9bcd |

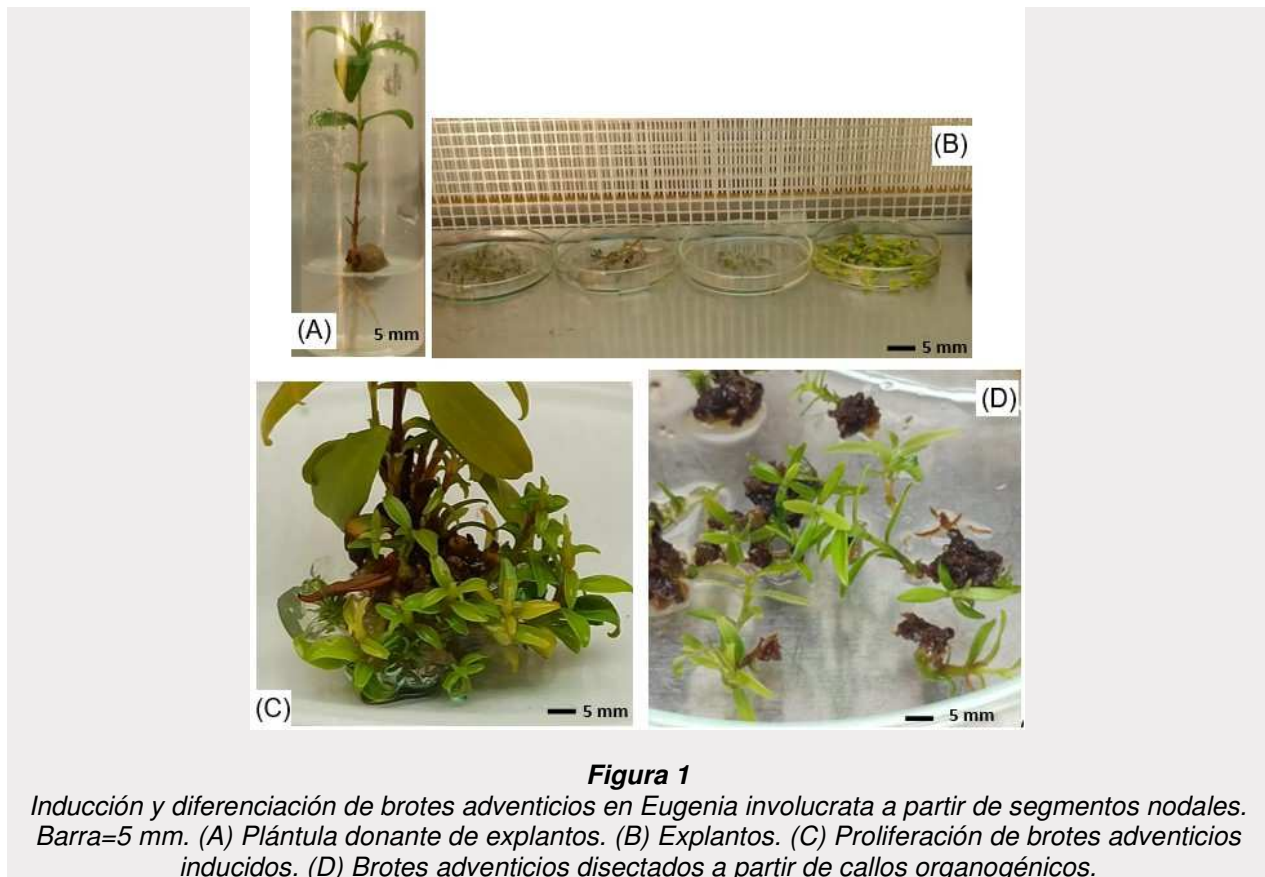
Tabla 3

Efecto de la combinación de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) en las etapas inductiva y de diferenciación y el tipo de explanto, segmentos nodales (SN) y radiculares (SR), en la producción promedio de brotes en *E. involucrata* después de 90 días de cultivo. Cada tratamiento tenía 6 repeticiones con 3 explantos cada uno. Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Duncan's ($P < 0.05$). Se presentan el promedio de número de brotes/explanto \pm Error Estándar. NE: tratamiento de subcultivo no estudiado.

| RCV INDUCCIÓN (mg L ⁻¹) | RCV DIFERENCIACIÓN | Explanto | | | |
|-------------------------------------|---|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | SN | SR | HAD | HAB |
| TDZ 1,1 | Carbón activado 1 g L ⁻¹ | 10,5 \pm 0,56a | 3,5 \pm 0,43c | NE | NE |
| TDZ 1,1 | Control (sin RCV ni carbón activado) | 4,17 \pm 0,6b | 3,67 \pm 0,33c | 4,20 \pm 0,81a | 2,30 \pm 0,58b |
| TDZ 1,1 | TDZ 0,5 mg L ⁻¹ | 1,67 \pm 0,33c | 5,33 \pm 0,33b | 4,30 \pm 0,23a | 3,2 \pm 0,40b |
| TDZ 1,1 | TDZ 05 mg L ⁻¹ + Carbón activado 1 g L ⁻¹ | 10,83 \pm 0,7a | 0,67 \pm 0,33c | NE | NE |
| ANA 0,93 | Carbón activado 1 g L ⁻¹ | 1,67 \pm 0,33c | 0,5 \pm 0,07d | 0 | 0 |
| ANA 0,93 | Control (sin RCV ni carbón activado) | 0c | 0d | NE | NE |

Continuación Tabla 3

| | | | | | |
|------------------------|---|-----------------|------------|---------|----|
| ANA 0,93 | TDZ 0,5 mg L ⁻¹ | 1,17±0,31c | 0e | NE | NE |
| ANA 0,93 | TDZ 05 mg L ⁻¹ + Carbón activado 1 g L ⁻¹ | 0d | 0c | NE | NE |
| TDZ 2,2 | Carbón activado 1 g L ⁻¹ | 5±0,73b | 1,33±0,21d | NE | NE |
| TDZ 2,2 | Control (sin RCV ni carbón activado) | 5±0,52b | 7,5±0,67a | 0 | 0 |
| TDZ 2,2 | TDZ 0,5 mg L ⁻¹ | 1,33±0,33b | 0,5±0,18e | NE | NE |
| TDZ 2,2 | TDZ 05 mg L ⁻¹ + Carbón activado 1 g L ⁻¹ | 3,83±0,00b | 4,17±0,00b | NE | NE |
| BAP 1,12 +ANA 0,93 | Carbón activado 1 g L ⁻¹ | 2,5±0,22c | 2,5±0,22c | NE | NE |
| BAP 1,12 +ANA 0,93 | Control (sin RCV ni carbón activado) | 1±0,37b | 0d | NE | NE |
| BAP 1,12 +ANA 0,93 | TDZ 0,5 mg L ⁻¹ | 1,67±0,33c | 0e | NE | NE |
| BAP 1,12 +ANA 0,93 | TDZ 05 mg L ⁻¹ + Carbón activado 1 g L ⁻¹ | 3,83±0,33c | 0c | NE | NE |
| TDZ 1,1+ANA 0,93 | Carbón activado 1 g L ⁻¹ | 1,83±0,31c | 0b | NE | NE |
| TDZ 1,1+ANA 0,93 | Control (sin RCV ni carbón activado) | 6,67±0,49b | 1,33±0,21c | 3±0,86a | 0 |
| TDZ 1,1+ANA 0,93 | TDZ 0,5 mg L ⁻¹ | 2,67±0,42c | 0c | 4±0,76a | 0 |
| TDZ 1,1+ANA 0,93 | TDZ 05 mg L ⁻¹ + Carbón activado 1 g L ⁻¹ | 13,83±0,54 a | 0,33±0,21d | NE | NE |
| TDZ 2,2+ANA 0,93 | Carbón activado 1 g L ⁻¹ | 2,67±0,33b | 0d | NE | NE |
| TDZ 2,2+ANA 0,93 | Control (sin RCV ni carbón activado) | 6±0,58b | 3,67±0,56d | NE | NE |
| TDZ 2,2+ANA 0,93 | TDZ 0,5 mg L ⁻¹ | 0,67±0,33c | 1,17±0,4d | NE | NE |
| TDZ 2,2+ANA 0,93 | TDZ 05 mg L ⁻¹ + Carbón activado 1 g L ⁻¹ | 2,5±0,34c | 0c | NE | NE |



DISCUSIÓN

La bibliografía indica que la proliferación de brotes por organogénesis directa o indirecta está influenciada por el tipo de explante utilizado y la combinación óptima de reguladores del crecimiento vegetal (RCV) utilizada en el medio de cultivo. Hecho que fue corroborado en los resultados obtenidos en el presente estudio, cuando los explantos obtenidos de segmentos nodales (SN), radiculares (SR) y foliares (HAD o HAB) de *E. involucrata*, fueron cultivados en medio inductivo con diferente combinación de RCV.

La propagación *in vitro* de *E. involucrata* fue documentada vía micropropagación de segmentos nodales obtenidos de plantines germinados *in vitro* o de plantas cultivadas a campo o invernáculo (Golle et al., 2017; Kubiszen et al., 2021; Oliveira Junior, 2021; Stefanel et al., 2021). Oliveira Junior (2021), observó diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de inducción y formación de brotes, en segmentos nodales provenientes, tanto de plántulas de *E. involucrata* germinadas *in vitro*, o de plantines de vivero comercial de dos años y cultivados en medio nutritivo MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP. En este caso, obtuvo un máximo de 46% de segmentos nodales con brotes y un promedio 1,9 brotes/explanto, cuando los segmentos nodales fueron cultivados en medio nutritivo suplementado con 2,5 mg L⁻¹ de BAP con o sin la combinación de 0.1 mg L⁻¹ de ANA. Golle et al. (2017), cuando utilizaron segmentos nodales provenientes de plantas cultivadas en vivero, obtuvieron valores similares a los arriba mencionados, con un máximo de 2 brotes/explanto en medio suplementado con 7 mg L⁻¹ de TDZ y 0,093 mg L⁻¹ de ANA. En nuestro trabajo, se observó una frecuencia de hasta un 83% de explantos con brotes, cuando los segmentos nodales de *E. involucrata* (obtenidos de plantines de 45 días germinados *in vitro*) fueron cultivados en medio MS ½, suplementado con 2,25 mg L⁻¹ de BAP y 0,93 mg L⁻¹ de ANA. Permanecieron los primeros 30 días en oscuridad en cámara de cultivo, y posteriormente, bajo

un fotoperiodo de 16 horas ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a $24\pm 2^\circ\text{C}$, durante 60 días. La máxima producción de brotes/explanto se obtuvo en presencia de $2,25 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, en ausencia de ANA, con un promedio de 10 brotes/explanto, pero con una reducción significativa en el porcentaje de explantos con brotes (25%). Esto indica que la organogénesis directa, puede ser inducida solamente con BAP, en concordancia con los resultados obtenidos por Oliveira Junior (2021), y aún, con valores significativamente superiores en frecuencia de explantos inducidos y número de brotes por explanto, como ocurrió comparativamente en nuestro caso. Como hipótesis, esta diferencia puede haber ocurrido dado que, en nuestro caso, los explantos fueron cultivados en primera instancia en oscuridad por 30 días, y posteriormente a 16 hs de fotoperiodo con una intensidad lumínica inferior ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a la utilizada por Olivera junior (2021) ($70 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), potenciándose de esta manera la capacidad organogénica de los explantos. Stefanel et al. (2021), también estudiaron la respuesta organogénica de segmentos nodales de *E. involucrata*, utilizando BAP solo o combinado con IBA (Ácido Indol 3-butírico). En contraposición a lo obtenido en este trabajo, no observaron respuesta significativa en la proliferación de brotes con las concentraciones de BAP utilizadas ($0,1$ y $0,2 \mu\text{M}$), ni tampoco interacción significativa de ambas fitohormonas.

Por otro lado, los explantos obtenidos de segmentos de raíces, demostraron capacidad organogénesis directa con un promedio de 4% de explantos con brotes y 1,5 brotes/explanto, cuando fueron cultivados en medio suplementado con $1,1$ o $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ. Es este, el primer reporte que demuestra la capacidad de formación de brotes adventicios en forma directa a partir de segmentos radiculares de *E. involucrata*. Resultados similares se han observado en diferentes especies vegetales. Según Liang et al. (2020), quienes estudiaron el efecto del BAP, TDZ, 2,4-D y ANA, observaron que solo el BAP y TDZ indujeron la formación de brotes a partir de raíces de *Scaevola sericea* y mencionan resultados similares en *Citrus mitis* Blanco, *Citrus aurantifolia* Christm; *Lotus corniculatus* L.

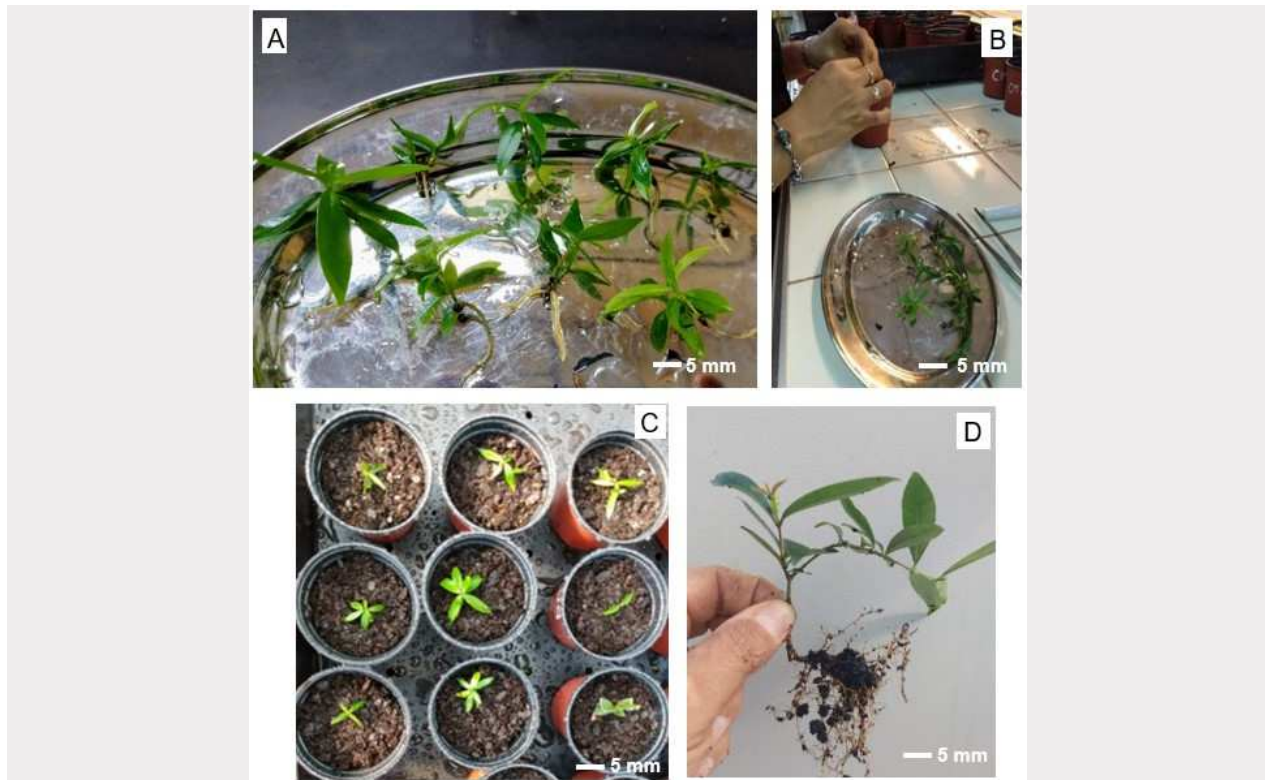


Figura 2

Formación de plántulas de *Eugenia involucrata* obtenidas por organogénesis a partir de segmentos nodales. Barra=5 mm. (A) Brotes adventicios enraizados. (B) Proceso de repique a macetas. (C) Plántulas en inicio de aclimatización. (D) Plántulas a los 6 meses en invernáculo.

Stefenon et al. (2020), estudiaron la capacidad de formación de callos a partir de segmentos nodales, radicales y de hojas de *E. uniflora*, observando que los segmentos nodales, de hojas y radicales mostraron una mayor capacidad de formación de callos en los tratamientos que contenían 0,93 y 1,86 mg L⁻¹ de ANA combinado con 1,1 mg L⁻¹ de TDZ. Siendo los segmentos nodales y de hojas los que mayor frecuencia de formación de callos presentaron. Mientras que en los segmentos radicales la callogénesis fue muy baja y con desarrollo lento.

Golle et al. (2020a y 2020b), en un estudio del efecto del cultivo segmentos de hojas de *E. involucrata* provenientes de plantines de vivero, en presencia y ausencia de luz y diferentes combinaciones de ANA, BAP y 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), observaron una interacción significativa entre el cultivo de los explantes en ausencia de luz y las combinaciones de ANA (0,93 mg L⁻¹), ANA (0,93 mg L⁻¹) + BAP (1,12 mg L⁻¹) y 2,4-D (1,1 mg L⁻¹) + BAP (1,12 mg L⁻¹). El cultivo en medio nutritivo suplementados sólo con 2,4-D (1,1 mg L⁻¹) o BAP (1,12 mg L⁻¹), no favorecieron a la callogénesis, mientras que el cultivo de callos en 10 mg L⁻¹ ANA indujo la formación de raíces en discos de hoja de *E. involucrata*. Comparativamente en nuestro caso, los resultados demuestran la capacidad de formación de brotes por organogénesis indirecta, utilizando explantos nodales, radicales y foliares, obtenidos de plantines germinados *in vitro* de *E. involucrata*. Los callos obtenidos a partir de segmentos nodales y radicales, subcultivados en medio de diferenciación, formaron brotes en la mayoría de los medios de subcultivo, excepto en los segmentos nodales que fueron inducidos en medio con 0,93 mg L⁻¹ de ANA, subcultivados a medio de diferenciación sin RCV, o en presencia de 0,5 mg L⁻¹ de TDZ+1 g L⁻¹ de carbón activado. La máxima producción de brotes/explanto se obtuvo en segmentos nodales, cultivados en medio inductivo con 1,1 mg L⁻¹ de TDZ, solo o combinado con 0,93 mg L⁻¹ de ANA, subcultivados a medio de diferenciación con 0,5 mg L⁻¹ de TDZ+1 g L⁻¹ de carbón activado.

Por otro lado, en nuestro trabajo los segmentos radicales, presentaron una mayor capacidad morfogénica por organogénesis indirecta, respecto a los resultados obtenidos por organogénesis directa. Con una producción de brotes/explanto, significativamente superior cuando los explantos fueron inducidos en presencia de 2,2 mg L⁻¹ de TDZ y subcultivados a medio libre de hormonas. Esto último, en acuerdo a lo observado por Vinocur et al. (2000), quienes estudiaron el efecto de varios niveles de BAP y TDZ en la regeneración de brotes a partir de explantos de raíz de *Populus tremula* L., donde el TDZ produjo 10 veces más brotes que el BAP.

Los segmentos foliares, tanto en posición adaxial o abaxial, formaron callos en todas las combinaciones de RCV estudiadas, en presencia de BAP solo o combinado con ANA, a diferencia de los observado por Golle et al. (2020a), quienes indicaron que el cultivo de segmentos foliares en medios suplementados solamente con BAP no indujeron a la formación de callos. Stefenon et al. (2020) reportaron que los segmentos foliares de *Eugenia uniflora* cultivados en posición adaxial y abaxial presentaron una respuesta diferencial a la formación de callos, donde los segmentos foliares de posición adaxial sólo formaron callos en medio suplementado con 10 mM de 2,4-D+5 mM de BAP, mientras que los segmentos en posición abaxial mostraron respuesta callogénica en medio suplementado con TDZ+ANA; TDZ+2,4-D y BAP+ANA. Si bien no pudimos estudiar en profundidad la diferenciación de brotes en todas las combinaciones, por no contar con suficientes repeticiones para demostrar significancia estadística, se pudo observar que los segmentos foliares cultivados en posición adaxial (HAD) en medio inductivo con 1,1 mg L⁻¹ de TDZ, solo o combinado con 0,93 mg L⁻¹ de ANA, generaron una producción de brotes, por organogénesis indirecta, superior a los cultivados en posición abaxial. Siendo ésta, la primera vez que se reporta la producción de brotes a partir de segmentos foliares en *Eugenia involucrata*.

CONCLUSIONES

Se estableció por primera vez en *Eugenia involucrata* un sistema de regeneración mediante organogénesis directa e indirecta de brotes a partir de explantes de segmentos nodales, radicales y foliares *in vitro*, concluyendo que: i) las hormonas BAP y TDZ, indujeron callos y brotes a partir de explantes de segmentos nodales, radicales y foliares; ii) el máximo porcentaje de formación de brotes por organogénesis directa se obtuvo en segmentos nodales cultivados en medio MS ½ suplementado con 2,25 mg L⁻¹ de BAP; iii) la máxima frecuencia de formación de callos se obtuvo en explantos nodales o radicales cultivados en medio suplementado con TDZ, solo o combinado con ANA; iv) la máxima formación de brotes adventicios, por organogénesis indirecta, se obtuvo en segmentos nodales, inducidos

en medio MS $\frac{1}{2}$, suplementado con 1,1 mg L⁻¹ de TDZ+0,93 mg L⁻¹ de ANA y subcultivados en medio MS $\frac{1}{2}$ en presencia de 0,5 mg L⁻¹ de TDZ y 1 g L⁻¹ de carbón activado; v) los segmentos radicales formaron brotes por vía organogénesis directa e indirecta; vi) los segmentos foliares demostraron capacidad de formación de brotes vía organogénesis indirecta; vii) los ápices de los brotes obtenidos tanto por organogénesis directa e indirecta, enraizaron *in vitro* en medio MS $\frac{1}{2}$ libre de RCV y formaron plántulas que se trasplantaron a un sustrato compuesto de corteza compostada de pino y perlita demostrando un alto porcentaje de supervivencia a los seis meses de cultivo en invernáculo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, convocatoria PICT 2018 cooperación internacional CABBIO y a la Facultad de Ciencias Forestales-Universidad Nacional de Misiones, por el financiamiento necesario para llevar adelante el presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- Canhoto, J. & G.S. Gruz (2000).** Micropropagation of pineapple guave through organogenesis and axillary shoot proliferation. *Acta Horticulturae* 520: 109-118.
- Carvalho, P.E. (2008).** Espécies arbóreas brasileiras, 1st ed., Brasília: Embrapa Informação Tecnológicas; Colombo: Embrapa Florestas, v.3. 593 pp. Disponible en: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/229490/1/Especies-Arboreas-Brasileiras-vol-3red.pdf> Último acceso: julio de 2022
- Di Rienzo, J.A.; F. Casanoves; M.G. Balzarini; L. Gonzalez; M. Tablada & C.W. Robledo. InfoStat versión 2020.** Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Gentile, A.; G. Urbinati & E. Caboni (2021).** Adventitious shoot regeneration from leaves of peach cultivars growing in vitro: the effect of cytokinins. *Acta Horticulturae* 1307: 285-290.
- George, E.F. & P.C. Debergh (2008).** Micropropagation: Uses and Methods. In: George, E.F., Hall, M.A. & Klerk, G.J D. (eds). *Plant propagation by tissue culture*. pp. 29-64. Disponible en: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4020-5005-3> Último acceso: julio de 2022
- Golle, D.P. & L.R.S. Reiniger (2013).** Phytoregulators and leaf explants position on callus induction in cerejeira-do-mato/Fitorreguladores e posicao de explantes foliares na inducao a calogenese em cerejeira-do-mato. *Ciência Rural* 43(10): 1759-1763.
- Golle, D.P.; L.R. Silveira Reiniger; C.M. Stefanel; M.F. Brião Muniz & K.B. da Silva (2017).** Combination of NAA and TDZ for in vitro multiplication of *Eugenia involucrata* DC. *Revista Árvore* 41(5): e410509.
- Golle, D.P.; L.R.S. Reiniger; C.M. Stefanel; C.M.L. Serrote; S.M.D.S. Rabaiolli & K.B.D. Silva (2020a).** Fitorreguladores e luminosidade na indução à calogênese em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. *Ciência Florestal* 30(3): 898-906.
- Golle, D.P.; L.R.S. Reiniger; C.M. Stefanel & C.M.L. Serrote (2020b).** Fitorreguladores na calogênese e rizogênese em *Eugenia involucrata*. *Pesquisa Florestal Brasileira* 40.
- Kubiszen, M.; P. Thalmayr; P. Rocha & F. Niella (2021).** Multiplicación in vitro de *Eugenia involucrata*. 41º Congreso Argentino de Horticultura. V Simposio de Aromáticas, Medicinales y Condimenticias. La Plata, 5 al 8 de octubre. pp. 148. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/128494/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y Último acceso: julio de 2022
- Liang, H.; Y. Xiong; B. Guo; H. Yan; S. Jian; H. Ren; X. Zhang; Y. Li; S. Zeng; K. Wu; F. Zheng; J.A. Teixeira da Silva; Y. Xiong & G. Ma (2020).** Shoot organogenesis and somatic embryogenesis from leaf and root explants of *Scaevola sericea*. *Scientific Reports* 10(1): 1-11.
- Lorenzi, H. (Ed). (2016).** Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 7 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 384 pp. Disponible en: [Arvores Brasileiras #1](http://ArvoresBrasileiras#1) (aeaesp.com.br) Último acceso: julio de 2022

- Lorenzi H. (2002).** Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 1 ed. Nova Odessa: Plantarum. 384 pp. Disponible en: Arvores Brasileiras #1 (aeaesp.com.br) Último acceso: julio de 2022
- Malá, J.; A. Gaudinová; P. Dobrev; J. Eder & M. Cvikrová (2006).** Role of phytohormones in organogenic ability of elm multiplied shoots. *Biologia plantarum* 50(1): 8-14.
- Murashige, T. & F. Skoog (1962).** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Niella, F. & P. Rocha (2001).** 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. Ed: Jeffrey FD, Dean-Georgia University, Athens, GA, USA. pp. 32-38.
- Oliveira Junior, M.A.D. (2021).** Cultivo in vitro de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) e de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo. 135 pp. Disponible en: <https://doi.org/10.11606/D.11.2021.tde-14092021-144425> Último acceso: julio de 2022
- Pérez-Jiménez. M.; E. Cantero-Navarro; F. Pérez-Alfocea; I. Le-Disquet; A. Guivarc'h & J. Coster (2014).** Relationship between endogenous hormonal content and somatic organogenesis in callus of peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivars and *Prunus persica*. *Prunus dulcis* rootstocks. *Journal of plant physiology* 171(8): 619-624.
- Sahai, A.; A. Shahzad & M. Anis (2010).** High frequency plant production via shoot organogenesis and somatic embryogenesis from callus in *Tylophora indica*, an endangered plant species. *Turkish Journal of Botany* 34(1): 11-20.
- Silveira Reiniger, L.R.S.; D.P. Golle; C.M.L. Serrote; L.S. da Costa; C.B. Bevilacqua & C.M. Stefanel (2022).** Genetic Structure and Gene Flow of *Eugenia involucrata* DC. Populations and Collections from Rio Grande do Sul, Brazil. *Biodiversidade Brasileira-BioBrasil* 12(2): 1-13.
- Singh, S.K.; P.R. Meghwal; H.C. Sharma & S.P. Singh (2002).** Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants from in vitro germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. *Scientia Horticulturae* 95(3): 213-221.
- Stefanel, C.M.; L.R.S. Reiniger; L.D. da Silva; S.M. dos Santos Rabaioli & K.B. da Silva (2020).** Diodos emissores de luz (LEDS) no cultivo in vitro de *Eugenia involucrata*. *Pesquisa Florestal Brasileira* 40.
- Stefanel, C.M.; L.R. Reiniger; S.M. Rabaioli; K.B. Silva & T.L. Andreolla (2021).** Antioxidante e giberelina no cultivo in vitro de *Eugenia involucrata* DC. *Revista de Ciências Agrárias* 44(1): 41-50.
- Stefanon, V.M.; M.V. Marques Pinheiro; F.R. de Freitas; V.J.B. da Silva; P. de Brum Vieira; D.D. dos Santos & M.P. Guerra (2020).** In vitro callogenesis for the induction of somatic embryogenesis and antioxidant production in *Eugenia uniflora*. *Biotecnología Vegetal* 20(2): 135-146.
- Thalmayr, P.N.; S.P. Rocha; F.O. Niella (2016).** Propagación in vitro y ex vitro de *Eugenia involucrata*. XVII Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Acta de Conferencias y Resumen. 17 al 19 de agosto. Posadas, Misiones, Argentina. Disponible en: https://www.jotefa.com.ar/storage/actas/2016/Acta_de_Resumenes_XVII_Jotefa_2016.pdf Último acceso: julio de 2022.
- Vinocur, B.; T. Carmi; A. Altman & M. Ziv (2000).** Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula*) roots cultured in liquid media. *Plant Cell Reports* 19: 1146-1154.