

Ra Ximhai

Revista de Sociedad, Cultura y
Desarrollo Sustentable

Ra Ximhai

Universidad Autónoma Indígena de México

raximhai@uaim.edu.mx

ISSN: 1665-0441

México

2005

MICROPROPAGACIÓN CLONAL *in vitro* EN *Eucalyptus grandis* y *E. urophylla*

Rosa Martínez Ruiz; Hilda S. Azpíroz Rivero; José Luis Rodríguez De la O; Víctor M. Cetina Alcalá; M. A. Gutiérrez Espinosa; Jaime Sahún Castellanos

Ra Ximhai, enero-abril, año/Vol.1, Número 1

Universidad Autónoma Indígena de México

Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa

pp. 111-130

MICROPROPAGACIÓN CLONAL *in vitro* EN *Eucalyptus grandis* y *E. urophylla* CLONAL MICROPROPAGATION *in vitro* OF *Eucalyptus grandis* AND *E. urophylla*

Rosa Martínez-Ruiz¹; Hilda S. Azpíroz-Rivero²; José Luis Rodríguez-De la O³; Víctor M. Cetina-Alcalá⁴; M. A. Gutiérrez-Espinosa⁵; Jaime Sahagún-Castellanos⁶

¹Clarificador Educativo C. Ingeniería en Sistemas Forestales. Universidad Autónoma Indígena de México. Los Mochis, Sinaloa, México. Correo electrónico: ruizrosa@uaim.edu.mx. ² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Correo electrónico: s_azpiroz@yahoo.com. ³ Depto. de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. Correo electrónico: jrquez@taurus1.chapingo.mx. ⁴Especialidad Forestal, Colegio de Postgraduados, Montecillos, México. Correo electrónico: vicmac@colpos.mx. ⁵Especialidad de Fruticultura, Colegio de Postgraduados, Montecillos, México. Correo electrónico: alexge@colpos.mx. ⁶Depto. de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. Correo electrónico: jsahagun@taurus1.chapingo.mx.

RESUMEN

El árbol de eucalipto (*E. urophylla* y *E. grandis*) es un recurso importante, debido a su aprovechamiento industrial en la obtención de celulosa y hemicelulosa para la fabricación de papel en varias partes del mundo en general y en particular en el sureste de México. Varios alcances biotecnológicos han sido desarrollados para solucionar las dificultades de variabilidad genética en propagación por semilla que presentan las especies de eucalipto. Para ello, resulta necesario el estudio de diversas estrategias de micropropagación que permitan la obtención y multiplicación de clones de eucalipto. Por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer la tecnología para la micropropagación clonal *in vitro* de genotipos seleccionados, con el fin de obtener plantas de alta calidad destinadas a las plantaciones o a huertos clonales en el sureste de México. Para el establecimiento de los explantes a condiciones *in vitro* se evaluaron tiempos de desinfestación de los explantes, realizando la combinación de tres niveles de desinfección con antibiótico (terramicina 40 mg/100 ml) y con fungicida (cuprimicin 150 mg/100 ml) a 0, 10 y 30 minutos. Obteniéndose hasta un 90 % de cultivos libres de contaminación. Además se evaluó la multiplicación de brotes, la formación de callo y enraizamiento para ambas especies, combinando tres niveles de benziladenina (0.0, 1.0 y 3.0 mg L⁻¹) y de ácido naftalen acético (0.0, 1.0 y 3.0 mg L⁻¹) en un medio de cultivo Gamborg B5. Se obtuvo hasta 9 brotes por explante cultivados y una media de 5.5 raíces por explante, combinando 3 mg L⁻¹ de benziladenina y 1.0 y 3.0 mg L⁻¹ de ácido naftalen acético. Los protocolos para aclimatación de plantas fueron también establecidos.

Palabras claves: Eucalipto, *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, embriogénesis, organogénesis, propagación *in vitro*, aclimatación.

SUMMARY

The eucalyptus tree (*E. urophylla* and *E. grandis*) is an important resource which provides cellulose and hemicellulose used in paper manufacturing in various parts of the world, and particularly in southeastern Mexico. Several biotechnological advances have been developed to solve the difficulties resulting from genetic variability in seed propagation presented by the eucalyptus species. This requires the study of diverse strategies of micropropagation which permit the obtainment and multiplication of eucalyptus clones. Thus, the objective of this study was to establish the technology for the *in vitro* clonal micropropagation of selected genotypes, for the purpose of obtaining high quality plants for plantations or clonal orchards in southeastern Mexico. For the establishment of the explants to *in vitro* conditions, the disinfestation times of the explants were evaluated, employing a combination of three levels of disinfestations with antibiotic (terramycin 40 mg/100 ml) and with fungicide (cuprimycin 150 mg/100 ml) at 0, 10 and 30 minutes, thus obtaining up to 90% of the cultures free of contamination. In addition, an evaluation was made of the multiplication of shoots, callus formation and rooting for both species, combining three levels of benzyladenine (0.0, 1.0 and 3.0 mg L⁻¹) and of acetic naphthalene acid (0.0, 1.0 and 3.0 mg/L⁻¹) in a Gamborg B5 culture medium. As many as 9 shoots per cultivated explant were obtained, and an average of 5.5 roots per explant, combining 3 mg L⁻¹ of benzyladenine and 1.0 and 3.0 mg L⁻¹ of acetic naphthalene acid. The protocols were established for the acclimatization of the plants.

Key words: Eucalyptus, *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, embryogenesis, organogenesis, acclimation, *in vitro*, propagation.

INTRODUCCIÓN

La deforestación es uno de los problemas más graves que actualmente atraviesan las generaciones actuales, así en países de este continente se pierden hasta 300,000 ha por año de bosques nativos (FAO, 1994; Centeno, 1997), la necesidad de obtener recursos del bosque ha llevado al hombre a explotarlos en forma irracional. Esto ha obligado a los investigadores a buscar nuevas alternativas de reproducción vegetativa con altas tasas de multiplicación y buenas características tanto genotípicas como fenotípicas.

Los eucaliptos son árboles originarios de Australia con más de 600 especies, algunos de ellos comercialmente importantes para la producción de madera, pulpa para papel y aceites esenciales principalmente (Hartney, 1995). Estos han demostrado un gran potencial en plantaciones forestales comerciales por su rápido crecimiento y se cultivan en diferentes regiones tropicales del planeta, lo cual indica la bondad de su comportamiento y la adaptabilidad que tienen a condiciones ambientales muy diversas. Actualmente *E. urophylla* y *E. grandis* están siendo plantados en gran escala en regiones tropicales de México. Dada esta situación, a corto plazo podrían abastecer una gran parte de la demanda de los productos celulósicos para papel en México.

La propagación de plantas a través del uso de técnicas de cultivo de tejidos vegetales (micropropagación) constituye una de las líneas de trabajo más importante de la biotecnología moderna dada la magnitud de su aplicación práctica actual, la cual se fundamenta en la clonación del material vegetal élite. Los programas de mejoramiento genético en especies forestales de eucalipto no han sido tan efectivos como la genética de cultivos agrícolas, debido a problemas relacionados con la baja viabilidad de la semilla y los largos periodos de juvenilidad para alcanzar la madurez y floración de las plantas, las cuales impiden que las ganancias genéticas de mejoramiento sean más rápidas (McComb, 1994).

Los clones de *Eucalyptus grandis* (clon -246) y *Eucalyptus urophylla* (clon -141) presentan un bajo porcentaje de viabilidad de la semilla y un bajo porcentaje de enraizamiento de estacas en vivero, por lo que la micropropagación se perfila como una herramienta eficaz en la propagación de estos individuos selectos al permitir economizar tiempo y costos de producción de plantas forestales (Ahuja, 1993) y representa una posible solución a los problemas observados, ya que ha demostrado

incrementos sustanciales en los índices de multiplicación en períodos de tiempo relativamente cortos, lo que ofrece grandes ventajas con respecto a la captación de ganancias genéticas a través de la silvicultura clonal (Daquinta *et al.*, 2000).

Aunque resultados exitosos para la clonación *in vitro* han sido reportados para algunas especies de eucalipto (McCombo y Bennett, 1996), la fase de aclimatación y enraizamiento es frecuentemente un paso crítico y limitante (Hartney, 1995). Además, la regeneración de brotes a través de cultivo *in vitro* de tejidos u órganos extirpados es también difícil de controlar para la mayoría de las especies de eucalipto (Hartney, 1995). Excepto por los pocos casos en los cuales la regeneración fue exitosa con órganos maduros como hojas de *E. citriodora* (Muralidharan y Mascarenhas, 1987), hojas y tallos de *E. gunnii* (Teulières y Boudet, 1992) y callos de hoja y tallo de *E. tereticornis* (Subbaiah y Minocha, 1990); así como la regeneración de brotes en órganos juveniles que fue reportada en *E. gunni*, *E. marginata* y *E. diversicolor* (McComb, 1994), *E. camaldulensis* (Diallo y Dohoux, 1984) y *E. nova-anglica* (Mehra, 1982).

El desarrollo de procedimientos eficientes para la micropropagación, vía organogénesis, de clones superiores de *Eucalyptus grandis* (clon -246) y *Eucalyptus urophylla* (clon -141), cuyos clones se adaptan fácilmente a las condiciones tropicales y han presentado un excelente crecimiento y vigor en los programas de plantaciones forestales comerciales en el sureste de México, permitirán el escalado de las técnicas *in vitro*, con ventajas tecnológicas y económicas sobre los sistemas convencionales de la macropropagación. Estas técnicas biotecnológicas han sido utilizadas en muchas partes del mundo para la micropropagación de diversos árboles selectos (Monteuuis, 1994, Bon y Monteuuis, 1996, Monteuuis *et al.*, 1998), sin embargo, en estas especies de *Eucalyptus grandis* (clon -246) y *Eucalyptus urophylla* (clon -141), no se conocen referencias sobre investigaciones realizadas en este campo.

Aparece en la literatura una marcada diferencia en la habilidad de las diferentes especies de eucalipto para regenerar brotes y esta habilidad permanece muy limitada de acuerdo con la mayoría de los reportes publicados. Tomando en cuenta lo anterior, se realizó el presente trabajo con el objetivo de desarrollar una tecnología rápida y eficiente para la propagación clonal *in vitro* de árboles élite de las especies *Eucalyptus grandis* (clon -

246) y *E. urophylla* (clon -141), árboles particularmente interesantes para la producción de pulpa para papel en el sureste de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material donador de explantes

Se utilizaron plantas de *Eucalyptus grandis* del clon -246 y *E. urophylla* del clon-141, para la obtención de material vegetativo, proveídos por la empresa PLANFOSUR, S.A. de C.V. Estos clones presentan características de buen crecimiento y adaptabilidad en la región de las Choapas, Veracruz, México.

Después de 3 semanas de aclimatación de las plantas a condiciones de clima templado en el vivero forestal del Colegio de Postgraduados, se obtuvieron estacas —10 a 15 cm de longitud— con ápices y yemas axilares. Con el objetivo de disminuir la contaminación en condiciones *in vitro*, a los clones de eucalipto traídos de las Choapas se les aplicó en vivero un fungicida sistémico (cuprimicin 100[®] 600 mg L⁻¹), quince días antes de obtener los explantes, para iniciar el proceso de micropropagación en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo.

Medio de cultivo

Se empleó como medio básico el Gamborg B5 (Gamborg, 1991) y se ajustó a un pH de $5.7 \pm .1$. Para controlar la oxidación de los explantes se adicionó al medio de cultivo carbón activado 1g L⁻¹. Las sales se agregaron a un matraz Erlenmeyer que contenía agua desionizada en constante agitación incorporándose los compuestos previamente pesados. El medio de cultivo se vació en frascos de vidrio de 60 x 55 mm colocando 25 ml en cada frasco. Los frascos se taparon y se colocaron en una canastilla para su esterilización, la cual se realizó por 20 minutos en autoclave a una temperatura de 121 °C y 1 kg/cm² de presión. Posteriormente se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente.

Establecimiento del cultivo aséptico

Desinfestación del material vegetal

Después de disectar el material vegetal (estacas), se inmergieron en una solución jabonosa preparada con detergente comercial, para poder trasladarlo al laboratorio e iniciar su desinfestación. Ya en laboratorio, la desinfestación se realizó lavando y cepillando con detergente varias veces los ápices y secciones de tallo con yemas axilares. Posteriormente se lavaron los inóculos con agua esterilizada y se mantuvieron en solución antioxidante (ácido ascórbico 100 mg L⁻¹ y ácido cítrico 150 mg L⁻¹) en un vaso de precipitado hasta el momento de la siembra.

La desinfección de los explantes —en la cámara de flujo laminar— se realizó con el siguiente procedimiento, en el cual los explantes fueron inmersos inicialmente en una solución de agua oxigenada (10%) por 7 minutos, seguido de una inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (10%) por 10 minutos y finalmente se lavaron 5 veces con agua destilada esterilizada y se mantuvieron en un frasco con agua.

Siembra *in vitro*

Bajo condiciones asépticas las estacas desinfectadas superficialmente fueron cortadas en segmentos de 1.5 a 2 cm de longitud, los cuales incluyeron 2 yemas axilares cada uno, sembrando 5 segmentos en cada frasco de vidrio en el medio de cultivo, se taparon con tapones de polipropileno y se sellaron con parafilm.

Durante las diferentes etapas de los experimentos, los cultivos se mantuvieron en un cuarto de incubación bajo ambiente controlado a temperatura de 26 ± 2 °C durante el día y de 22 a 24 °C durante la noche, la iluminación fue proporcionada por lámparas fluorescentes DURO-TEST (LabLine) de 75 W y se ajustó a un fotoperíodo de 16 horas luz (con una intensidad luminosa de 2700-3200 lux) (Medero *et al.*, 1997) y 8 horas de oscuridad.

Diseño Experimental

Los experimentos realizados para el establecimiento de los cultivos asépticos tuvieron un arreglo factorial 3^2 (9 tratamientos) y una distribución completamente al azar para cada clon, en un diseño resultado de la combinación de tres niveles (tiempos) de desinfección (Cuadro 1) y los factores de antibiótico (terramicina 40 mg/100 ml) y fungicida (cuprimicin 150 mg/100ml), con 20 repeticiones, para un total de 180 unidades experimentales para *E. grandis* y *E. urophylla*. El período de cultivo fue de 45 días. El análisis estadístico se realizó con los datos obtenidos a los 45 días de desarrollo.

En este experimento la variable a evaluar fue la contaminación del número de los explantes debido a hongos y/o bacterias y/o oxidación de los explantes. Se realizó un análisis de varianza de un diseño completamente al azar con arreglo factorial completo. Se utilizó la prueba de rangos múltiples (Tukey, 0.05) para la comparación de medias, empleándose el paquete estadístico Statistics Analysis System (SAS, Institute Inc., 1992).

Cuadro 1. Factores y niveles utilizados en el ensayo factorial para el establecimiento aséptico del explante en *E. grandis* y *E. urophylla*.

Factores	Niveles
	Exposición en tiempo (min)
Antibiótico (terramicina 40 mg/100 ml)	0, 10 y 30
Fungicida (cuprimicin 150 mg/100ml)	0, 10 y 30

Multiplicación de propágulos

El material resultante sin contaminación obtenido durante el establecimiento aséptico se transplantó a medio de cultivo para inducir la formación de brotes, callos y raíces. Se empleó como medio básico Gamborg B5 (Gamborg, 1991) complementado con benziladenina (BA), ácido naftalen acético (ANA), tiamina 40 mg/l y ajustado a un pH de 5.7 ± 0.1

El experimento tuvo un arreglo factorial 3^2 (9 tratamientos) para cada clon de eucalipto en un diseño resultado de la combinación de 2 factores (BA y ANA) con 3 niveles de concentración (0,1 y 3 mg/L) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Factores y niveles utilizados en el ensayo factorial para multiplicación de explantes en clones de *E. urophylla* y *E. grandis*.

Factores (hormonas)	Niveles (mg/L)
BA	0, 1 y 3
ANA	0,1 y 3

Las variables evaluadas a los 45 días del experimento fueron el número de brotes, la producción de callo (gramos en peso fresco) y el número de raíces regeneradas. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza de un diseño completamente al azar con arreglo factorial completo. Se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey ($\alpha = 0.05$) para la comparación de medias, mediante el paquete estadístico SAS Institute Inc. (1992).

Aclimatación

Las plantas *in vitro* de *E. urophylla* y *E. grandis* de 5-7 cm de longitud, que poseían como promedio 3 raíces y que la raíz mayor medía entre 3-5 cm aproximadamente se extrajeron de los frascos de cultivo y se colocaron en bolsas de polietileno negro de 20 x 11 cm; que contenían un suelo constituido de 70 % tierra de monte y 30 % de agrolita, las plantas se establecieron en 70 % de sombra. El riego se aplicó diariamente durante 20 días, a partir de los cuales se redujo paulatinamente hasta los 40 días en que se sacaron las plantas a pleno sol, regándolas a partir de ese momento dos veces al día.

Se aplicó fertilizante triple diecisiete, diluido en agua a los 20 días de iniciada la aclimatación, a razón de 0.1 g/planta. Se realizaron aspersiones con oxiclورو de cobre 0.3 g/L, cada siete días, aplicando 0.005 g/planta aproximadamente hasta que las plantas se sacaron del umbráculo (González *et al.*, 1987).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento del cultivo aséptico para *E. urophylla* (clon-141) y *E. grandis* (clon-246)

A los 45 días de incubación, se establecieron los explantes libres de contaminación hasta un 90% para *E. urophylla*, el resto se perdió a causa de contaminación por: oxidación (5 %), hongos (3%) y bacterias (2%). Para el caso de *E. grandis* se estableció el 80.44% del total de los explantes libres de contaminación, el resto se perdió a causa de contaminación por: oxidación (9 %), hongos (8%) y bacterias (2.56%).

El análisis de varianza mostró que al menos uno de los tratamientos resultó estadísticamente diferente para las dos especies; es decir, que existen diferencias entre los tratamientos en el nivel de contaminación de los explantes (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de contaminación de los explantes para las dos especies de eucalipto

Tx	Tratamiento con 20 repeticiones cada uno	<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>
		Medias (explantes limpios)	Medias (explantes limpios)
1	Terramicina (10 min) y cuprimicin (10 min)	3.5 b	3.1 b
2	Terramicina (10 min) y cuprimicin (0 min)	2.8 c	2.4 c
3	Terramicina (10 min) y cuprimicin (30 min)	4.3 a	4.6 a
4	Terramicina (0 min) y cuprimicin (10 min)	3.4 b	3.2 b
5	Terramicina (0 min) y cuprimicin (0 min)	2.6 c	2.2 c
6	Terramicina (0 min) y cuprimicin (30 min)	2.4 c	2.1 c
7	Terramicina (30 min) y cuprimicin (10 min)	4.4 a	4.3 a
8	Terramicina (30 min) y cuprimicin (0 min)	2.6 c	2.2 c
9	Terramicina (30 min) y cuprimicin (30 min)	2.7 c	2.2 c

Valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey=0.05).

Para poder saber cuál o cuáles son los tratamientos que nos permiten tener mejor respuesta, respecto a la obtención de explantes asépticos, para la producción de plantas de *E. urophylla* y *E. grandis in vitro*, se realizó la prueba de Tukey. En el Cuadro anterior observamos que los tratamientos con antibiótico a 10 y 30 min en combinación con cuprimicin a 10 y 30 minutos de tiempo de exposición nos permite obtener más del 90% de material sin contaminación para *E. urophylla* y 80% para *E. grandis*.

Multiplicación de propágulos (Respuesta sobre la formación de callo para *E. urophylla* (clon-141) y *E. grandis* (clon-246))

Se encontraron diferencias entre los tratamientos en la formación y crecimiento del callo después de 45 días de incubación para las dos especies. Al realizar la prueba de Tukey para la comparación de medias para *E. urophylla*, se obtuvo mayor promedio en el tratamiento 8 (3.0 mg/l de BA y 0 mg/l de ANA) con una media de 1.980 g superando al resto de los tratamientos (Cuadro 5). Para la especie *E. grandis* la respuesta fue similar obteniéndose el mayor promedio en el tratamiento 8 (3.0 mg/l de BA y 0 mg/l de ANA) con una media de 2.050 g (Cuadro 4).

Cuadro 4. Valores promedio de la cantidad de callo (peso fresco) para las 2 especies de eucalipto.

Número de tratamiento	Hormonas mg/L	<i>E. urophylla</i> Medias(g)	<i>E. grandis</i> Medias(g)
1	BA (1) y ANA (1)	0.350 c	0.650 c
2	BA (1) y ANA (0)	0.220 c	0.520 c
3	BA (1) y ANA (3)	0.400 c	0.620 c
4	BA (0) y ANA (1)	0.160 c	0.430 c
5	BA (0) y ANA (0)	0.120 c	0.370 c
6	BA (0) y ANA (3)	0.180 c	0.580 c
7	BA (3) y ANA(1)	1.300 b	1.700 b
8	BA (3) y ANA (0)	1.980 a	2.050 a
9	BA (3) y ANA (3)	1.200 b	1.600 b

Valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey = 0.05)

Número de brotes para *E. urophylla* (clon-141) y *E. grandis* (clon-246)

Los explantes establecidos y transferidos a los medios de cultivo desarrollaron brotes cuyos resultados aparecen en el Cuadro 5. En ellos se puede observar que los mejores resultados para *E. urophylla* y *E. grandis* fueron los tratamientos 7, 8 y 9.

Cuadro 5. Número de brotes por explante en *E. urophylla* y *E. grandis*.

Número de tratamiento	Hormonas mg/L	Brotes/explante (medias)	
		<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>
1	BA (1) y ANA (1)	3.45 b	2.04 b
2	BA (1) y ANA (0)	1.65 b	1.21 b
3	BA (1) y ANA (3)	2.89 b	1.74 b
4	BA (0) y ANA (1)	0.32 c	0.62 c
5	BA (0) y ANA (0)	0.17 c	0.46 c
6	BA (0) y ANA (3)	0.67 c	0.69 c
7	BA (3) y ANA(1)	6.98 a	4.88 a
8	BA (3) y ANA (0)	8.44 a	5.73 a
9	BA (3) y ANA (3)	5.31 a	3.18 a

Valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

Número de raíces *E. urophylla* (clon-141) y *E. grandis* (clon-246)

Los explantes establecidos y transferidos a los medios de cultivo desarrollaron raíces cuyos resultados aparecen en el Cuadro 6. Se puede observar que los mejores resultados para *E. urophylla* y *E. grandis* fueron los tratamientos 7, 8 y 9 donde se obtuvieron un buen número de raíces gruesas y no quebradizas (Figura 1a y 1b).

Cuadro 6. Número de raíces *E. urophylla* (clon-141) y *E. grandis* (clon-246).

Número de tratamiento	Hormonas mg/L	Raíces/explante (medias)	
		<i>E. urophylla</i>	<i>E. grandis</i>
1	BA (1) y ANA (1)	1.45 b	2.21 b
2	BA (1) y ANA (0)	1.55 b	1.31 b
3	BA (1) y ANA (3)	2.89 b	1.24 b
4	BA (0) y ANA (1)	0.26 c	0.72 c
5	BA (0) y ANA (0)	0.17 c	0.46 c
6	BA (0) y ANA (3)	0.67 c	0.69 c
7	BA (3) y ANA(1)	4.98 a	4.88 a
8	BA (3) y ANA (0)	5.43 a	4.73 a
9	BA (3) y ANA (3)	4.31 a	3.18 a

Valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

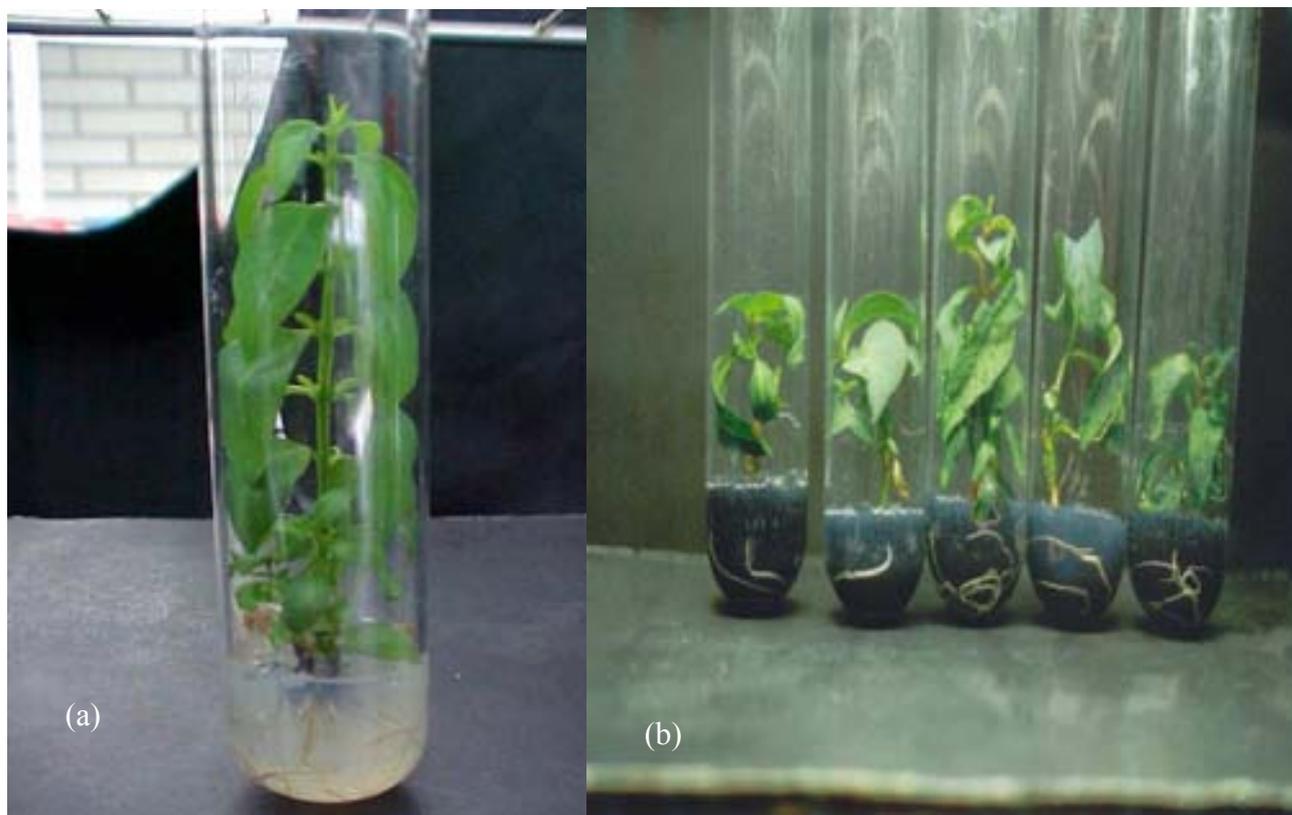


Figura 1. Enraizamiento *in vitro* de a) *E. urophylla* y b) *E. grandis*.

Aclimatación

Las plantas vigorosas y que medían aproximadamente 20 cm. de longitud se consideraron como establecidas y listas para ser llevadas a plantación, lo que ocurre aproximadamente a los 2 meses de iniciado el proceso de adaptación. Las plantas pueden mantenerse hasta 3 meses en las bolsas, si por alguna causa no pueden ser llevadas antes a plantar en lugar definitivo. Los porcentajes de sobrevivencia alcanzados para las dos especies de eucaliptos se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Porcentajes de sobrevivencia logrados para las dos especies de Eucaliptos

Especie	Porcentaje de sobrevivencia
<i>E. grandis</i>	75
<i>E. urophylla</i>	85

Durante el periodo de establecimiento aséptico en incubación se registraron altos niveles de contaminación en los tratamientos ensayados para lograr la primera etapa, lo que resultó en elevadas pérdidas en el número de explantes.

Los principales causantes de la contaminación fueron identificados como hongos de la clase Deuteromicetos como *Penicillium spp*, además de otras especies fungosas asexuales como *Dichotomthora* y *Cercospora*. En relación con la contaminación, Alvarado (1998), plantea que la superficie de los tejidos de las plantas constituyen un hábitat para los microorganismos, los que se pueden alojar en estomas, lenticelas o cualquier abertura natural, dificultando su eliminación.

En *Eucalyptus* y en general en los árboles perennifolios se hace difícil la desinfección, pues los ápices meristemáticos no están cubiertos, es decir, presentan yemas desnudas, sin pérulas protectoras como las de los árboles decíduos latifoliados de regiones templadas y frías.

Major y Krause (1995), durante el establecimiento *in vitro* de brotes epicórmicos de *E. grandis* obtuvieron un 11% de oxidación de los tejidos de los explantes. Además Castro (1998) en la propagación *in vitro* de árboles élites de *E. camaldulensis* y *E. tereticornis*

reportó un 10% de pérdidas por oxidación, en este trabajo se obtuvieron valores de 5% y 9% de oxidación para *E. urophylla* y *E. grandis*, respectivamente. Estos valores se consideran bajos, pues la oxidación puede en ocasiones constituir un serio problema en el establecimiento y sobrevivencia de explantes. Este fenómeno es más agudo en las especies leñosas y es reportado en una amplia gama de vegetales.

Durand *et al.* (1991), plantearon que para reducir la fenolización en *Eucalyptus*, es necesario incubar los tejidos en la obscuridad, lo que no favorece la síntesis de fenoles que ocasionan oxidación. Muhitch y Fleycher, (1985) sostienen que el control de las oxidaciones puede lograrse mediante pretratamientos de inmersión de los explantes en soluciones conteniendo antioxidantes, la reducción en la concentración de sales en el medio, el cultivo de explantes provenientes de las zonas en estado de crecimiento activo y realización adecuada de subcultivos frecuentes. Por lo que el enjuague con solución de antioxidantes, así como la adición de los mismos al medio de cultivo, como la L-cisteína (inhibidora de la polifenoloxidasas) y el carbón activado (absorbente de fenoles) — como se demuestra en esta investigación — previenen la oxidación de los tejidos. Aunado a esto, con la exposición del explante a la terramicina (40 mg/100 ml) se obtuvo hasta 42 % de desinfestación de explantes.

A los 45 días de sembrados los explantes en el medio Gamborg (1991) se incrementó el desarrollo de callo organogénico, observándose callos y formaciones globulares que son centros generativos de cadenas clonales proliferativas de alto potencial (Aloísio, 1997). La citocinina (BA) estimula la división celular y activa los puntos de crecimiento de los nuevos brotes (Castro, 1998). En el medio suplementado con BA se logró la máxima respuesta y los explantes formaron callos en su base, estos resultados concuerdan con Azmi *et al.* (1997) que trabajaron con *E. globulus*.

Los explantes que no brotaron se perdieron debido a la hipertrofia de las axilas de las hojas, que se fragmentaron en dos partes, formando un callo blanquecino disgregable. Resultados similares fueron observados por Aloísio (1997), en secciones de tallos y frutos de *Melia azadirach*, cultivadas *in vitro*, de acuerdo con el autor, esta deformación se debe a una hipertrofia lenticelar, que puede ser inducida por la presencia de reguladores del crecimiento o por la concentración de etileno en condiciones *in vitro*.

Los resultados de la presente investigación muestran organogénesis directa (formación diferenciada de brotes), inducida al colocar yemas axilares de *E. urophylla* (clon-141) y *E. grandis* (clon-246) en un medio básico Gamborg B5 (Gamborg, 1991) suplementados con BA (3.0 mgL^{-1}) y ANA (1.0 y 3.0 mgL^{-1}). En los trabajos realizados por Prabha *et al.* (1999) en especies del género *Eucalyptus* manifestaron resultados parciales tanto en el cultivo de células y cultivo de órganos, reportándose formación de callo y embriones utilizando preferentemente semilla y estructuras florales (anteras).

Los resultados obtenidos muestran en forma general una mayor respuesta de multiplicación de brotes y raíces en los tratamientos donde se utilizó BA. Comportamiento similares han sido reportados por Castro (1998) en *E. citriodora* y Durand *et al.*, (1991) en *E. camaldulensis*, aunque con menores concentraciones de BA (0.5 mgL^{-1}) a las utilizadas en esta investigación.

La sobrevivencia de las plantas *in vitro*, regeneradas durante el período de adaptación, depende fundamentalmente de las peculiaridades fisiológicas, estructurales y anatómicas que las plántulas presentan producto del desarrollo *in vitro*, el que permite una elevada humedad relativa en el interior de los frascos, baja intensidad luminosa, bajo intercambio gaseoso, abundante disponibilidad de nutrientes y carbono (generalmente en forma de sacarosa) y una pequeña variación de temperatura en un rango considerado óptimo para el cultivo (Preece y Sutter, 1991; Teixeira *et al.*, 1995).

Entre los principales problemas que presentan las plantas *in vitro* se encuentran: ineficiencia fotosintética debido a los bajos contenidos de pigmentos del aparato fotosintético y el desarrollo de cloroplastos con granas desorganizadas (Inoue *et al.*, 1990; Preece y Sutter, 1991); capacidad reducida de formar cutículas cerosas (Amar *et al.*, 1995), estomas poco funcionales debido a la alteración en la forma de las células oclusivas (Ziv, 1991); ineficiencia de los tejidos de sustento debido a la reducida presencia de colénquima y esclerénquima (Preece y Sutter, 1991); absorción y transporte de agua ineficiente debido a una conexión vascular incompleta o deficiente entre la raíz y el brote. Durante las primeras dos semanas después del trasplante, es necesario controlar adecuadamente los factores ambientales y prácticamente se requiere simular es este período las condiciones del ambiente *in vitro* hasta que las plantas se adapten a las nuevas condiciones. Para evitar el exceso de transpiración de las jóvenes

plantas, hasta que éstas logren un adecuado desarrollo de los estomas y la cutícula, es necesario mantener una alta humedad relativa (Ziv, 1991). El control de la intensidad de la luz en esta fase, es también importante ya que las plantas provienen de un ambiente con intensidad baja y son expuestas a uno con alta intensidad, por lo tanto ésta se debe regular para evitar la fotoinhibición del aparato fotosintético. Para atenuar el efecto de la luz durante las dos primeras semanas, se emplean mallas plásticas de diferentes porcentajes de sombra, generalmente entre 30-70 % dependiendo de las necesidades del cultivo (Agramonte *et al.*, 1998). Trindade y Pais (1997), lograron entre un 90 y un 95 % de sobrevivencia de *plantas in vitro* de *E. globulus* en la fase de aclimatación.

Por su parte Gill (1996), enraizó plántulas de *E. tereticornis* en medio líquido y en medio sólido obteniendo un 82 % de adaptación de las que provenían del medio líquido y un 38.5 % de las que provenían del medio sólido. De acuerdo con lo obtenido por los autores anteriormente citados, los porcentajes de sobrevivencia alcanzados en este trabajo para las dos especies de eucalyptus son aceptables.

CONCLUSIONES

Para la obtención de cultivo aséptico en la propagación de eucaliptos (*E. urophylla* clon-141 y *E. grandis* clon-246), los mejores tratamientos de desinfección son las combinaciones de los factores que llevan fungicida sistémico (cuprimicin 150 mg /100ml) y antibiótico (terramicina 40 mg /100ml), en el cual se deben exponer a los explantes de eucalipto durante 10 y 30 minutos, donde se obtuvo más del 80% de desinfección del total de explantes sembrados.

Además, de acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que el medio Gamborg B5 complementado con BA y ANA es un excelente medio para el cultivo *in vitro* de *E. urophylla* clon-141 y *E. grandis* clon-246, puesto que induce a la formación de callo en la base del tallo y de multiplicación de brotes y raíces en las dos especies del eucalipto experimentadas manteniendo respuestas positivas para el desarrollo de estructuras embriogénicas *in vitro*. Se logró la aclimatación de las plantas *in vitro* de *E. grandis* y *E. urophylla*, donde se alcanzan porcentajes de sobrevivencia aceptables de entre 75 y 85 %, respectivamente.

LITERATURA CITADA

Agramonte D., F. Jiménez y M. A. Dita

- 1998 **“Aclimatización en Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología”**. Pérez Ponce, J. N. (Ed), Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba, 400 pp.

Ahuja, M.

- 1993 **“Micropropagation of woody plants”**. Kluwer Acad. Publ. 356 pp.

Aloísio, X.

- 1997 **“Enraizamiento *in vitro* de gemas de *Eucalyptus* multiplicadas e alongados”**. Scientia Forestalis. 51: 29-26.

Alvarado, C. Y.

- 1998 **“Contaminación microbiana en el cultivo de plantas”**. In: Pérez Ponce, J. N. (de) propagación y mejora genética de plantas por biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. p.102-108.

Amar S, L.E.P. Pérez y G. B. Kerbaux

- 1995 **“Análisis comparativo del contenido de ceras en hojas de *Catsetum fimbriatum* (Morres Lindl) "in vitro" y "ex vitro"”**. En Congreso Nacional de Botánica, 44. Anais Ribeirao Preto. p. 267 - 268.

Azmi A., M. Noin, M. Landré, Proudret M., and Chriqui D.

- 1997 **“High frequency of plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. Hypocotyles: ontogenesis and plody level of the regenerants”**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51: 9-16.

Bon M. y Monteuuis O.

- 1996 **“Biotechnologies forestieres on Sabah”**. Bios et Forets des Tropiques 248: 32-42.

Castro, R. D.

- 1998 **“Propagación *in vitro* de árboles élitos adultos de *Eucalyptus camaldulensis* y *E. tereticornis*”**. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología vegetal. REDBIO '98. Resúmenes. FAO-CUBA. P.28-29 .

Ceneno, J. C.

1997 **“The management of Teak plantations”**. Tropical Forest update 7(2):1-5.

Daquinta G. M., L. Ramos, y Lezcano, R. Rodríguez y M. Escalona

2000 **“Algunos elementos en la micropropagación de la Teca”**. Biotecnología Vegetal. 1: 39-44.

Diallo N. Y E. Duhoux

1984 **“Organogenesis et multiplication in vitro chez l’Eucalyptus camaldulensis”**. J. Plant Physiol. 115: 177-182.

Durand C., R. Boulay y A. Franclet

1991 **“Vegetative propagation of Eucalyptus”**. In: Tissue Culture in Forestry. Bona J. M. y D.J. Durzan (Eds): The Hague Nijhoff. p. 150-181.

FAO

1994 **“El Eucalipto en la Población Forestal”**. Colección FAO: Montes, No. 11, Roma, Italia. 524 pp.

Gamborg, O.

1991 **“Plant tissue culture”**. In: Tissue Culture for crops. Project. Physiol Department, Colorado State University, Fort Collins, CO U.S.A. p. 1-24.

Gill R.S.I.

1996 **“Micropropagation of economically important tropical forest trees”**. Tree improvement for sustainable tropical forestry. QRFI-IUFRO Conference, Caloundra, Queensland, Australia. Vol. 1:230-233.

González A. N. Vera, M. Pérez y E. Rodríguez

1987 **“Obtención de posturas de *Eucalyptus saligna* Sm. en topes de collantes mediante el empleo de estaquillas”**. Centro Agrícola. XIV (1): 77 - 84.

Harney, V. J.

1995 **“Vegetative propagation of the eucalyptus”**. Aust. For. Res. 10:191-211.

Inoue, M. T., J. D. Vieira y G. Correa

- 1999 **“Estudio comparativo del desempeño fotosintético entre posturas micropropagadas y de estacas de cuatro clones del híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*”**. In: Congreso Forestal Brasileiro, 6. Campos de Jordao. Anais. P.493 - 496.

Major G. y M. Krause

- 1995 **“Micropropagación de árboles adultos de *Eucalyptus pellita*”**. Revista Uruguaya Forestal 18:16-20.

McComb, J. A.

- 1994 **“Clonal propagation of eucalyptus”**. In: Lindsey K. (ed) Plant Tissue Culture. Kluwer, Dordrecht. The Netherlands. p. 322-328.

McCombo J. A. y I. J. Bennett

- 1996 **“*Eucalyptus (Eucalyptus sp.)*”** In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 1. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg. p. 340-362.

Medero V., E. Rodríguez, R. Gómez, M. García, J. López, J. Ventura, M. Martínez, M. Álvarez

- 1997 **“Regeneración por embriogénesis somática en clones cubanos”**. Agrotécnia de Cuba 27(1): 92-96.

Mehra, P.

- 1982 **“Clonal propagation of *Eucalyptus* by tissue culture”**. Plant Sci. 26: 1-11.

Monteuuis, O.

- 1994 **“Recent advances in mass clonal propagation of Teak”**. Proceeding Workshop Biorefor, Kangar, Malasia p. 117-212.

Monteuuis O., M. Bon y D. Goh

- 1998 **“Teak propagation by *in vitro* culture”**. Bois et forets des tropiques. 226(2): 1-11.

Muhitch M. y J. Fleycher

- 1985 **“Influence of culture age and spermidine-treatment on the acumulation of phenolic compounds in suspension cultures”**. Plant Physiol. 78:25-28.

Muralidharan E. y A. Mascareñas

- 1987 **“In vitro plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis”**. In: *E. citriodora*. Plant Cell Rep. 6: 256-259.

Prabha B., V. Sharma, J. Ila, L. Kopoor.

- 1999 **“Micropropagation of Newly produced F1 hybrid of *eucalyptus* (*E. tereticornis* x *E. camaldulensis*)”**. *Silvae Genetica*. 48:20-28.

Preece J. E. and E. G. Sutter

- 1991 **“Acclimatization of micropropagated plant to the greenhouse and field”**. In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. Micropropagation technology and application. (Ed.) Dordrech Kluwer Academic Press. p. 71 - 93.

SAS Institute Inc.

- 1992 **“SAS User’s Guide: Statistics, Statistical versión 6”**. Cary, North Carolina, U.S.A. 95 pp.

Subbaiah M. y S. Minocha

- 1990 **“Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*”**. Plant Cell Rep. 9: 370-373.

Teixeira J. B., J. I. Lemos y M. C. Coelhe

- 1995 **“Micropropagação de espécies leñosas da mata atlântica”**. In: Congreso brasileiro de Fisiología Vegetal, 5. (Ed.) Lavras. Anais. p. 132.

Teulières C. y A. Boudet

- 1992 **“Obtention et explication de systèmes simplifiés (cellules protoplastes) chez le genre *Eucalyptus* en vue de l’étude et de l’amélioration de la résistances au froid”**. AFOCEL 1991. “Biotechnologies appliquées aux arbres forestiers”, Paris, p. 127-156.

Trindade H. and M. S. Pais.

- 1997 **“In vitro studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability”**. "In Vitro" Cellular and Developmental Biology Plant. 33:1, 1 - 5.

Ziv, M.

- 1991 **“Vitrification: morphological and physiological disorders of "in vitro" plant”**.
In: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. 1991. Micropropagation : Technology and application. (Ed.) Dordrecht, Kluwer Academic. p. 49 - 69.