

DESARROLLO DE UNA TÉCNICA PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETATIVO DE *Eucalyptus dunnii* APTO PARA LA MULTIPLICACIÓN *IN VITRO*

Rodríguez Reartes, S.¹; Bima, P.²; Joseau, J.¹

RESUMEN

Existen numerosos productores de la región central de la República Argentina interesados en cultivar eucaliptos adaptados a las condiciones edafo-climáticas de la región. Si bien existen plantaciones experimentales adaptadas, no se dispone de material reproductivo (semilla) que permita la producción de plantas. La micropropagación del material probado en terreno sería una valiosa herramienta, pero no se ha probado esta técnica en las especies de *Eucalyptus* de esta región. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una técnica que permita introducir en el laboratorio material vegetativo de *Eucalyptus dunnii* apto para la multiplicación *in vitro*.

Como material fuente de los explantes se utilizó ramas basales provenientes de renovos de un macizo. Se empleó el medio de cultivo Murashige & Skoog (1962), con pH entre 5,6 y 5,7. Se establecieron cinco tratamientos en base a distintas concentraciones del medio y cantidad de azúcar adicionada. En laboratorio, se retiraron las hojas y se seccionó las ramas en segmentos de 4 a 5 cm de longitud, con 1 ó 2 yemas, luego se les sumergió en alcohol de 70° por un minuto. En cámara de flujo laminar, se dispuso los explantes por 25 minutos en 100 ml de una solución en agua destilada estéril, compuesta de un 30% de cloro comercial más una gota de Twin 80 como tensioactivo. Los explantes fueron enjuagados tres veces en agua destilada estéril, se eliminó las porciones oxidadas y se les dispuso individualmente en tubos de vidrio, enterrando un tercio de su longitud en el medio de cultivo correspondiente. Los tubos fueron introducidos a una cámara de crecimiento con una temperatura de 24 +/-2°C. Cada tratamiento fue dividido en dos factores: (1) oscuridad total y (2) fotoperiodo de 16 horas. Los resultados indican que la desinfección fue apropiada para evitar la contaminación, no así la oxidación, recomendándose depurar este procedimiento para evitar la oxidación y senescencia de explantes debido al exceso de tiempo de remojo o concentración del agente desinfectante.

El tratamiento con 3% de sacarosa fue el único que mostró una respuesta favorable, con el 66% de los explantes brotados. La mantención de los frascos en condiciones de oscuridad por dos semanas sólo disminuyó la oxidación inicial de los fenoles, pero no produjo diferencias

¹ Silvicultura, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. E-mail: saroreartes@yahoo.com.ar; jajoseau@agro.uncor.edu

² Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. E-mail: pabima@agro.uncor.edu

posteriores respecto a los expuestos a fotoperiodo de 16 horas. Es posible conseguir material vegetativo de *Eucalyptus dunnii* apto para la multiplicación *in vitro* en un porcentaje aceptable. A pesar de ello, es necesario mejorar el protocolo para aumentar el porcentaje de explantes brotados.

Palabras clave: *Eucalyptus dunnii*, micropropagación.

DEVELOPMENT OF A TECHNIQUE TO OBTAIN VEGETATIVE MATERIAL OF *Eucalyptus dunnii* SUITABLE FOR *IN VITRO* MULTIPLICATION

SUMMARY

There are many forest producers of the central region of Argentina which are eager to cultivate eucalypts adapted to the edafo-climatic conditions of the zone. Although there are some experimental plantations adapted to the zone, actually there are not reproductive materials (seeds) available to seedling production. The *in vitro* culture technique has the potential to provide high multiplication rates of select tree genotypes, but this technique has not been proven in the *Eucalyptus* species of this region. The objective of the present work was to develop a technique that allows introducing *in vitro* vegetative material of *Eucalyptus dunnii* adapted for the multiplication *in vitro*.

The donor materials were basal branches of sprouts of a stand. In the laboratory, the leaves were removed and the branches were sectioned in segments of 4-5 cm in length with 1-2 buds. They were soaked in alcohol 70° by 60 seconds and then the explants were placed in a 30% hypochlorite of sodium solution with a drop of Twin 80 for 25 minutes. Then they were rinsed three times with sterile distilled water. The oxidized parts of the cuttings were cut, then they were placed individually, burying a third of their length, in culture medium MS (Murashige and Skoog), with 5,6-5,7 pH. Five treatments were arranged based on different medium and sugar concentrations. The tubes were placed in a growth chamber, at 24 +/- 2°C. Each treatment was divided in two factors: (1) total dark and (2) photoperiod of 16 hours light. The disinfection protocol was appropriate, not tube was discarded due to infection, but someone was thrown away by oxidation, product of the disinfection.

The treatment with 3% of saccharose was the only one that responded with 66% of the sprout explants. The tubes maintained in dark conditions for two weeks only diminished the initial oxidation of phenols, but there were not differences about the others in 16 hours light. The observations were made up to the 30 days. It is possible to establish *in vitro* vegetative material of *Eucalyptus dunnii* suitable for micropropagation in an acceptable percentage, but it will be needed to improve the technique in order to increase that percentage.

Key words: *Eucalyptus dunnii*, micropropagation



INTRODUCCIÓN

Existen numerosos productores de la región central de la República Argentina interesados en cultivar eucaliptos adaptados a las condiciones edafo-climáticas de la región. Si bien existe una plantación experimental con buenos resultados de adaptación, no se dispone de un rodal semillero que brinde material reproductivo (semilla) que permita la producción de plántulas de calidad. (Joseau *et al.*, 2000, 2001a, 2001b). La condición de hibridación impide la transformación de esta plantación en rodal semillero. Por lo mismo, multiplicar estas especies vegetativamente es una alternativa promisorias para los productores de la región.

Ensayos de evaluación clonal de *E. globulus* llevados a cabo en la provincia de Buenos Aires concluyeron que los clones ofrecen mayor rendimiento en volumen y peso seco de madera que el material procedente de semillas, dado la gran variabilidad de este material de reproducción y que la selección y propagación agámica de genotipos superiores es una estrategia adecuada para maximizar ganancias (Gelid *et al.*, 2001; Durand *et al.*, 1991).

Aunque se han reportado resultados exitosos para la clonación *in vitro* para algunas especies de eucalipto (Mc Comb 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 en la mayoría de las especies de eucalipto (Hartney, 1995).

La micropropagación vegetativa ha permitido lograr material inicial adecuado con el fin de encarar plantaciones forestales de buena calidad en la región mesopotámica de la Argentina. Se han generado más de 200 clones de *E. grandis* que incluyen híbridos interespecíficos, de esta especie con *E. camaldulensis* y *E. tereticornis*, en distintas etapas de evaluación en el marco del Subprograma Eucalipto en Mesopotamia (EEA Concordia y EEA Bella Vista) y estos materiales se han implantado constituyendo los primeros clones comerciales en el NE de Corrientes (Marcó *et al.*, 2005). Sin embargo, dicha técnica de propagación sólo se ha desarrollado para las especies de eucaliptos anteriormente mencionadas, y debido a la marcada influencia que ejerce el genotipo en el cultivo *in vitro*, es necesario desarrollar un protocolo de propagación agámica para las especies que se adapten a la región central del país.

Eucalyptus dunnii combina características de buen crecimiento, rectitud de fuste y tolerancia a las heladas. Sin embargo, la difusión de esta especie se ha visto limitada como consecuencia de su insuficiente producción de semillas (Zelener *et al.*, 2005). La micropropagación de material probado de *E. dunnii*, adaptado a las condiciones edafo-climáticas de la región central argentina, sería muy provechosa.

Las diferentes especies del género *Eucalyptus* presentan una marcada diferencia en la habilidad de regenerar brotes *in vitro*. 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 deciduos latifoliados de regiones templadas y frías (Martínez Ruiz *et al.*, 2005; Noda-Jiménez *et al.*, 2000).

El presente trabajo tiene por objetivo desarrollar una técnica que permita introducir en laboratorio material vegetativo de *E. dunnii* apropiado para cultivo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material con el cual se desarrolló este ensayo fueron ramas basales provenientes de renovos de un macizo de *E. dunnii*.

Se empleó el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), ajustando el pH entre 5,6-5,7. Se diluyó la solución madre en diferentes concentraciones para lograr distintas concentraciones del medio y de la azúcar adicionada, lo que determinó cinco tratamientos (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1
TRATAMIENTOS PARA LA INTRODUCCIÓN DE MATERIAL ASÉPTICO EN LABORATORIO

Variables	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	T5
Proporción de la formulación original del medio MS	¼	½	1	½	¼
Azúcar adicionada (% Sacarosa)	3	3	3	1,5	1,5

El medio de cultivo se fraccionó en tubos de ensayo, a razón de 4 ml/tubo, y se utilizó un total de 20 tubos por tratamiento. Los tubos se taparon y se esterizaron en autoclave por 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión. Posteriormente se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente.

Antes de la desinfección de los explantes, se retiraron las hojas de las ramas y se seccionaron en segmentos nodales de 4-5 cm de longitud con 1-2 yemas; luego se sumergieron en alcohol de 70° por un minuto. A continuación, en cámara de flujo laminar, se colocaron los explantes en una solución que contenía una gota de Twin 80 (tensioactivo) disueltos en 100 ml de agua destilada esterilizada a la cual se le agregó lavandina al 30% del producto comercial (1,65% de NaClO). Se dejó los explantes en dicha preparación por 25 minutos, en agitación. Posteriormente se enjuagaron los mismos tres veces en agua destilada estéril. A los segmentos nodales se les cortó las partes oxidadas y se descartaron aquellos que durante la desinfección evidenciaron oxidación o necrosis. Se insertó individualmente los segmentos nodales en los medios descritos, enterrando un tercio de su longitud y conservando la polaridad de los explantes. Se selló la boca del tubo con polietileno termocontraíble.

Finalmente los cultivos se incubaron en una cámara de cultivo, a una temperatura de 24 +/-2 °C, en dos modalidades: Luz (16 hs de fotoperíodo) y oscuridad.

El establecimiento de los cultivos asépticos tuvo un arreglo factorial. Las variables evaluadas fueron la contaminación de los explantes debido a hongos y/o bacterias; la oxidación debido a la fenolización de los tejidos; y el porcentaje de brotación de los explantes. Se dispusieron 10 tubos por cada uno de los cinco tratamientos considerados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El procedimiento de desinfección fue adecuado, no se descartó ningún tubo por infección, aunque sí algunos por oxidación (Cuadro N° 2). Martínez Ruiz *et al.* (2005), obtuvieron valores de 5 y 9% de oxidación para *E. urophylla* y *E. grandis*, respectivamente. Estos valores son considerados bajos, pues la oxidación puede en ocasiones constituir un serio problema en el establecimiento y sobrevivencia de explantes, fenómeno más agudo aún en especies leñosas. Noda-Jimenez *et al.* (2000) señalan que tras 21 días de incubación en oscuridad de explante *in vitro* de *E. pellita*, perdieron el 61,7% de los mismos a causa de la fenolización, contaminación y daños provocados por el agente desinfectante.

Los resultados obtenidos sugieren suavizar el protocolo de desinfección ya que se presentaron algunos casos de oxidación y senescencia de explantes por el exceso de tiempo/concentración de agentes desinfectantes (alcohol, cloro, tween). El tiempo de exposición de los explantes al desinfectante es un factor que debe tenerse en cuenta, cuando se aumenta la concentración del producto activo en la solución desinfectante, el tiempo de exposición debe disminuirse, y viceversa (Villalobos y Thorpe, 1991).

Cuadro N° 2
ESTABLECIMIENTO ASÉPTICO DE EXPLANTES DE *E. dunnii* EN 5 MEDIOS DE CULTIVO

Variables evaluadas	Tratamientos				
	T1	T2	T3	T4	T5
Prendimiento (%)	0	0	66	0	0
Oxidación	si	si	si	si	si
Contaminantes	no	no	no	no	no

Los explantes cultivados en oscuridad por dos semanas, evidenciaron una menor fenolización inicial (oxidación) que los expuestos a fotoperíodo de 16 horas. Sin embargo, no se observaron otras diferencias posteriores, por lo mismo se evaluaron todos en forma conjunta.

Durand *et al.* (1991), plantean que para reducir la fenolización en *Eucalyptus* es necesario incubar los tejidos en la oscuridad, pues así no se favorece la síntesis de fenoles que ocasionan la oxidación de los tejidos. Otras alternativas para controlar la oxidación son: Pretratamientos de inmersión de los explantes en soluciones antioxidantes; reducción de la concentración de sales en el medio de cultivo; utilización de explantes provenientes de zonas en crecimiento activo; y la realización adecuada y frecuente de subcultivos (Muhitch y Fleycher, 1985).

El tratamiento T3, correspondiente a la formulación MS original, adicionada con un 3% de sacarosa, fue el único que evidenció una respuesta positiva en término de explantes brotados (66%). Si bien el porcentaje de brotación es adecuado, resulta necesario continuar la investigación, por cuanto el ensayo realizado consideró escasas unidades experimentales (frascos/tratamiento) y no contempló repeticiones que permitieran un análisis estadístico formal. Para obtener resultados más sólidos es aconsejable repetir los experimentos usando un mínimo de 10 tubos por tratamiento y al menos tres repeticiones de cada uno de ellos. También se sugiere ensayar otros protocolos de desinfección y utilizar distinto tipos de explantes.

CONCLUSIONES

Es posible obtener material vegetativo apropiado para la multiplicación *in vitro* de *E. dunnii*. A pesar de ello, es necesario depurar los protocolos utilizados, con el objeto de incrementar el porcentaje de explantes que expresen una adecuada respuesta de brotación y una menor incidencia de pérdidas por oxidación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración prestada por los profesionales de la Estación Experimental Concordia del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Argentina), Ingeniero Agrónomo, Sr. Javier Oberschelp y la Dra. Diana Díaz.



REFERENCIAS

- Durand, C.; Boulay, R. and Franclet, A., 1991.** Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: Bonga, J. and Durzan, D. (Eds). Tissue culture in forestry. The Hague Nijhoff, Netherlands. pp: 150-181.
- García-López, M.; Sotolongo-Sospedra, R.; González-Suarez, S. y Noda-Jiménez, A., 2003.** Utilización de brotes epicórmicos para la propagación clonal *in vitro* de *Eucalyptus saligna*. Revista del Jardín Botánico Nacional 24(1-2): 239-244.
- Gelid, P.; Rodríguez Traverso, J.; López, G.; Souza, R. y Pathuer, P., 2001.** Evaluación clonal de *E. globulus* en la provincia de Buenos Aires, Argentina. En: Simposio Internacional IUFRO. Desarrollando el eucalipto del futuro. Valdivia, Chile, 10 al 15 de septiembre de 2001 (CD).
- Hartney, V.J., 1995.** Vegetative propagation of the *Eucalyptus*. Australian Forest. Research. 10: 191-211.
- Joseau, M.J.; Verzino, G.; Dorado, M.; Díaz, M. P. y Ingaramo, P., 2000.** Introducción de nuevas especies y orígenes del género *Eucalyptus* en la región este de Córdoba, Arroyito. VII Jornadas de Investigación en Ciencias. Agropecuarias. 119 p.
- Joseau, M.J.; Verzino, G.; Dorado, M. y Díaz, M.P., 2001a.** Introducción de especies y orígenes del género *Eucalyptus* en la región este de Córdoba. Arroyito. En: Simposio Internacional IUFRO. Desarrollando el eucalipto del futuro. Valdivia, Chile, 10 al 15 de septiembre de 2001 (CD).
- Joseau, M.J.; Verzino, G.; Dorado, M. y Díaz, M.P., 2001b.** Introducción de especies y orígenes del género *Eucalyptus* en la región este de Córdoba. XVI Jornadas Forestales de Entre Ríos. p.15.
- Marcó, M.; Harrand, L. y Larocca, F., 2005.** Producción de semillas y clones mejorados de Eucaliptos. Idia XXI Revista de Información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario. Forestales. Ed. INTA, 8: 180-183.
- Martínez Ruiz, R.; Azpíroz Rivero, H.; Rodríguez de la O, J.; Cetina Alcalá, V; Gutiérrez Espinosa, M. y Sahún Castellanos, J., 2005.** Micropropagación clonal *in vitro* en *Eucalyptus grandis* y *E. urophylla*. Ra Ximhai: Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable. Universidad Autónoma Indígena de México. 1(1): 111-130.
- Mc Comb, J. and Bennett, I., 1996.** *Eucalyptus* (*Eucalyptus* sp.) In: Bajaj YPS (Ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg 1: 340-362.
- Muhitch, M. and Fleycher, J., 1985.** Influence of culture age spermidine-treatment on the accumulation of phenolic compounds in suspension cultures. Plant Physiol 78:25-28.

Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Noda-Jiménez, A.; Alvarez-Olivera, P.; Junco-Cruz, L.; Garcia-López, M. y Sotolongo-Sospedra, R., 2000. Propagación clonal *in vitro* de *Eucalyptus pellita*, F. Muell. *Revista Chapingo Ciencias Forestales y del Ambiente* 7(1): 29-33.

Villalobos, V. y Thorpe, J. 1991. Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. En: Roca, W. y Mroginski, L. (Eds). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT, Cali, Colombia. pp: 127-141.

Zelener, N.; Marcucci Poltri, S.; Rodríguez Traverso, J.; Gelid, P.; Pathauer, P.; Hopp, E.; López, C. y Bartoloni, N., 2005. *Eucalyptus dunnii*. Selección de huertos semilleros mediante la aplicación de marcadores moleculares. *Idia XXI Revista de Información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario. Forestales*. Ed. INTA. 8: 221-227.

