

## Propagación masiva *in vitro* de *Eucalyptus saligna* Sm.

Maurilio R. García López\*, Ernesto Gainza Lezcano\*, Ana L. Noda Jimenez\* y Sergio González Suarez\*\*

\*Laboratorio de Biotecnología de las Plantas, Universidad de Pinar del Río

\*\*Facultad de Biología, Universidad de la Habana

### RESUMEN

En la tecnología que se propone se utilizaron semillas de *Eucalyptus saligna* Sm., procedentes de un huerto semillero, las que se desinfectaron con soluciones de bicloruro de mercurio ( $HgCl_2$ ) 0,05 % p/v e hipoclorito de sodio (NaOCl) 4,88; 2,44; 1,22 y 0,48 % de cloro activo, durante 5 y 10 minutos, según el tratamiento. El  $HgCl_2$  produjo un efecto negativo sobre la germinación, no ocurriendo así con las soluciones de NaOCl, recomendándose la concentración de 2,44 %, de este durante 10 minutos. A continuación las semillas se inocularon en un medio Murashige-Skoog, (1962) (MS) líquido con soporte de papel de filtro, suplementado con sacarosa 20 g/L, carbón activado 1 g/L y el pH ajustado a 5,7, donde germinaron y crecieron durante 60 días, al cabo de los cuales se aislaron los segmentos nodales, de las plántulas asépticas y se inocularon en un medio nutritivo compuesto por las sales del MS y suplementado con las vitaminas de Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968); sacarosa 20 g/L, caseína hidrolizada 250 mg/L, el pH ajustado a 5,7 y solidificado con agar tipo E 4 g/L. Las hormonas añadidas al medio de cultivo fueron: 6-benzilaminopurina (BAP) y kinetina (Kin), solas y combinadas con ácido naftalenacético (ANA), en varias concentraciones de acuerdo al tratamiento. A los 35 días se evaluó: número de brote/explante y longitud de los brotes; resultando más efectiva la combinación: Kin 1 mg/L + ANA 0,5 mg/L. El enraizamiento de los brotes obtenidos de la multiplicación de los segmentos nodales se produjo en medios nutritivos que contenían: ácido naftalenacético (ANA), ácido indol-3-ácetico (AIA), o ácido indol-3-butírico (AIB) en las concentraciones de 0,1 y 1,0 mg/L respectivamente. El mayor porcentaje de brotes enraizados se obtuvo en aquellos medios que contenían AIB, no existiendo diferencias significativas para el número de raíces/brote, ni para la longitud de la raíz mayor.

**Palabras clave:** *Eucalyptus saligna*, cultivo de tejidos, propagación, propagación masiva, micropropagación

### ABSTRACT

In the technology that is proposed were used seeds of *Eucalyptus saligna* Sm., taken from a seedbed orchard, those which were disinfected with solutions of mercuric chloride ( $HgCl_2$ ) 0,05 % w/v and sodium hypochlorite (NaCl) 4,88; 2,44; 1,22; and 0,48 % of active chlorine, during 5 and 10 minutes, according to the treatment. The  $HgCl_2$  produced a negative effect on the germination, no occurring thus with the solutions of NaOCl, being recommended the concentration of 2,44% during 10 minutes. Below the seeds were inoculated in a liquid medium Murashige-Skoog (1962) (MS) with support of filter paper, supplemented with sucrose 20 g/L, activated charcoal 1 g/L and the pH adjusted to 5,7, where germinated and grew during 60 days, then the nodal segments of the aseptic seedlings were isolated and inoculated in a nutrient medium MS with the vitamins of Gamborg, sucrose 20 g/L, casein hydrolysate 250 mg/L, the pH adjusted to 5,7 and solidified with agar type E 4 g/L. The hormones added to the culture medium were: 6-benzylaminopurine (BAP) and 6-benzylaminopurine (Kin), alone and combined with naphthaleneacetic acid (NAA) in several concentrations according to the treatment. To 35 days was evaluated: number of shoots/explant and length of the shoots; resulting more effective the combination: Kin 1 mg/L + NAA 0,5 mg/L. The rooted of shoots was produced in a nutrient medium with: naphthaleneacetic acid (NAA), indole-3-acetic acid (IAA) or indole-3-butyric acid (IBA), in the concentrations of 0,1 and 1,0 mg/L respectively. The greater percentage of rooted shoots was obtained in those media with IBA, no existing meaningful differences for the number of roots/shoot, neither for the length of the greater root.

**Key words:** *Eucalyptus saligna*, tissue culture, propagation, mass propagation, micropropagation

### INTRODUCCIÓN

La aplicación de los métodos convencionales de propagación vegetativa de especies forestales ha estado bastante limitada por la dificultad que presentan la mayoría de estas, particularmente los individuos maduros o adultos para propagarse por estos medios, lo que se suma a la considerable elevación de los costos cuando se pretende multiplicarlas en proporciones comerciales. Es indispensable producir grandes cantidades de árboles mejorados con características superiores y de elevada tasa de crecimiento que permitan ciclos de aprovechamiento más cortos. El género *Eucalyptus* por su rapidez de crecimiento responde satisfactoriamente a estos propósitos.

El amplio desarrollo que han tenido las técnicas de cultivo

de tejidos en la propagación masiva de especies agrícolas, ornamentales y frutícolas, ha contribuido a que en la actualidad se hayan iniciado programas de investigación con miras a la propagación aséptica de especies forestales leñosas de importancia económica, que permitan obtener mayor cantidad de plántulas mejoradas, a niveles económicos, con una mayor uniformidad genética (Vargas, 1982).

Se establece una metodología para la micropropagación de *Eucalyptus saligna* Sm., que permite, a partir de plántulas asépticas, germinadas y crecidas *in vitro*, obtener una gran cantidad de plantas, partiendo de las yemas axilares contenidas en los segmentos nodales.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Producción de plántulas asépticas.**

Las semillas de *Eucalyptus saligna* Sm., provenientes de la masa semillera "El Tibisi", Viñales, Pinar del Río, Cuba, se separaron de las impurezas y se desinfectaron sumergiéndolas en soluciones de bicloruro de mercurio e hipoclorito de sodio, según el tratamiento. Para el caso del bicloruro de mercurio la solución desinfectante poseía una concentración del 0,05 % p/v y se probaron dos tiempos de exposición: 5 y 10 minutos; con el hipoclorito de sodio se aplicaron cuatro concentraciones diferentes: 4,88; 2,44; 1,22 y 0,48 % de cloro activo, empleando los mismos tiempos de exposición al desinfectante (5 y 10 minutos). A continuación en todos los tratamientos las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se inocularon en los tubos de cultivo que contenían un medio nutritivo líquido, constituido por las sales del MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 20 g/L, con soporte de papel de filtro y el pH ajustado a 5,7. Todo el proceso de desinfección e inoculación se realizó bajo campana de flujo laminar.

Los tubos que contenían el medio de cultivo y dos semillas en cada uno de ellos, para un total de 60 semillas en cada tratamiento, fueron debidamente identificados y colocados en la cámara de crecimiento donde la temperatura osciló entre (22 y 27) °C y el fotoperíodo estabilizado en 16 horas luz, evaluándose periódicamente la germinación y la contaminación a partir del cuarto día después de la inoculación.

**Multiplicación de segmentos nodales.**

Una vez aisladas las hojas de las plantas asépticas que se usaron para la inducción calogénica, se separaron los segmentos nodales que poseían al menos una yema, cortándolos en porciones de 5 ó 6 mm de longitud y se inocularon a continuación en tubos de cultivo que contenían medio nutritivo constituido por las sales MS; las vitaminas de Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968); sacarosa 20 g/L; caseína hidrolizada 250 mg/L; agar tipo E 4g/L para su solidificación y el pH se ajustó a 5,7.

Se usaron diferentes balances hormonales de acuerdo con cada tratamiento, usando como citoquininas: BAP y Kin, solas y combinadas con ANA.

Una vez concluido el proceso de inoculación, que se realizó en el flujo laminar, los tubos de cultivo que contenían el medio nutritivo y el segmento nodal, se colocaron en la cámara de crecimiento a una temperatura que osciló entre (22 y 27) °C y un fotoperíodo de 16 horas de luz, durante 35 días al cabo de los cuales se evaluó el número de brotes emitidos y la longitud de estos.

Los datos obtenidos se procesaron mediante la Prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis (KW), realizando la comparación múltiple no paramétrica, en los casos

necesarios, por la Prueba de Student-Newman-Keuls (SNK) (Sigarrosa, 1985).

**Enraizamiento de los brotes.**

Los brotes que medían entre 1,5 y 2,0 cm de longitud y poseían al menos dos pares de hojas se transfirieron para un medio nutritivo, líquido con soporte de papel de filtro, que contenía las sales del MS reducidas a la mitad de su concentración, sacarosa 20 g/L, carbón activado 1 g/L y el pH ajustado a 5,7. Se usaron las auxinas: ANA, AIA y AIB a las concentraciones de 0,1 y 1,0 mg/L, según cada tratamiento.

El experimento se desarrolló en la cámara de crecimiento a una temperatura que osciló entre (22 y 27) °C y un fotoperíodo de 16 horas de luz.

A los 30 días se evaluó el porcentaje de brotes con raíces, el número de raíces/brote y la longitud de la raíz mayor. Se aplicó una Prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis (KW).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN****Producción de plántulas asépticas.**

En la tabla I se muestran los resultados de la germinación y la contaminación de las semillas que fueron desinfectadas con diferentes concentraciones NaOCl: 4,88; 2,44; 1,22 y 0,48 % de cloro activo y HgCl<sub>2</sub> 0,05 % p/v, con el fin de obtener plantas asépticas que posteriormente se utilizaron como fuente de explantos en los experimentos de inducción de la calogénesis y en la multiplicación de brotes a partir de segmentos nodales.

El inicio de la germinación para todos los tratamientos ocurrió, en general, a partir del cuarto día después de realizada la inoculación, hasta alcanzar un nivel máximo a los veinte días.

Como se puede apreciar en la referida tabla, el HgCl<sub>2</sub> produjo un efecto negativo sobre la germinación, aunque controló la contaminación sobre todo cuando el tiempo de exposición fue de 10 minutos.

En los tratamientos donde se empleó el NaOCl la respuesta estuvo determinada por la concentración y el tiempo de exposición, no afectándose ostensiblemente la germinación, sin embargo en los tratamientos con NaOCl al 1,22 y 0,48 % de cloro activo, se produjo contaminación, no siendo así para las concentraciones de 4,88 y 2,44 %.

La tolerancia de la semilla a la desinfección depende en primer lugar de la impermeabilidad y espesor de la cubierta seminal. Así Carneiro *et al.* (1995) desinfectaron semillas de *Plathymenia foliolosa* (Bent) con una solución de HgCl<sub>2</sub> al 0,2 % p/v durante 45 minutos, concentración

**TABLA I**

Germinación y contaminación de las semillas en relación con el tipo de desinfectante y el tiempo de exposición empleados.

| Desinfectante               | Tiempo (min.) | Germinación(%)<br>n= 60 | Contaminación(%)<br>(%) n=30 |
|-----------------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|
| HgCl <sub>2</sub> al 0,05 % | 5             | 41,66                   | 3,33                         |
|                             | 10            | 35,00                   | 0                            |
| NaOCl al 0,48 %             | 5             | 96,66                   | 3,33                         |
|                             | 10            | 85,00                   | 13,33                        |
| NaOCl al 1,22%              | 5             | 100                     | 6,66                         |
|                             | 10            | 96,66                   | 3,33                         |
| NaOCl al 2,44 %             | 5             | 100                     | 0                            |
|                             | 10            | 96,66                   | 0                            |
| NaOCl al 4,88 %             | 5             | 98,33                   | 0                            |
|                             | 10            | 88,33                   | 0                            |

y tiempo de exposición al desinfectante sumamente altos, pero al parecer las semillas de la especie en cuestion son de cubierta gruesa, lo que justificaría la resistencia de la semilla a tratamiento tan severo.

Arnould y Favre (1992) emplearon NaOCl al 5 % durante 20 minutos para desinfectar semillas de *Eucalyptus gunnii* con buenos resultados.

En el momento de la desinfección del material vegetal debe tenerse en cuenta que cuando la concentración del producto activo es alta, debe disminuirse el tiempo de exposición y viceversa.

**Multiplicación de segmentos nodales.**

La multiplicación es la fase más importante y determinante en todo programa de propagación *in vitro*, es en ella donde se realiza la verdadera multiplicación o micropropagación de una especie o variedad, definiéndose no sólo el número de plantas o propágulos a obtener, sino su calidad genética por ser en esta fase en la que se producen las variantes somaclonales.

La proliferación de brotes axilares se logra con la adición de citoquininas en el medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas. Su concentración varía en dependencia del balance endógeno de auxinas y citoquininas en los explantos (Hu y Wang, 1983).

Se probaron dos citoquininas (BAP y kinetina) solas y combinadas con una auxina (ANA), con el fin de conocer su efecto sobre la proliferación de brotes y el crecimiento de estos.

En los tratamientos donde se empleó el BAP sólo en las concentraciones de: 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 mg/L, no existieron diferencias significativas entre ellos, en cuanto al número de brotes emitidos/explanto, según la Prueba de KW aplicada. Para la longitud de los brotes si existieron diferencias significativas y la Prueba de SNK reveló que para un nivel de significación del 5 %, el tratamiento con BAP 1,0 mg/L producía los brotes más largos; el tratamiento con BAP 0,5 mg/L, los más cortos y los tratamientos con BAP 1,5 y 2,0 mg/L no diferían entre sí, produciendo brotes de una longitud intermedia (Fig. 1).

Cuando se aplicaron tratamientos con BAP 1 mg/L combinado con 0,01; 0,1; 0,5 y 1,0 mg/L de ANA respectivamente, no existieron diferencias significativas, según la Prueba KW utilizada para el número de brotes/explanto.

Se obtuvieron diferencias altamente significativas para la longitud de los brotes correspondiendo los brotes de mayor longitud con el tratamiento que mayor concentración de ANA poseía (1,0 mg/L). Entre los tratamientos con: 0,01 y 0,1 mg/L de ANA combinados con 1,0 mg/L de BAP, no existieron diferencias

significativas (Fig. 2).

En el otro grupo de tratamientos donde se utilizó la Kin sola en concentraciones de 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 mg/L existieron diferencias significativas entre los tratamientos, para el número de brotes emitidos/explanto. La Prueba SNK puso de manifiesto que la concentración de Kin de 2 mg/L inducía la producción del mayor número de brotes, y que esta difería significativamente de los demás tratamientos, entre los cuales no existían diferencias significativas para un nivel de significación del 5 %. Para la longitud de los brotes no existieron diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 3).

Cuando la Kin 1 mg/L se combinó con ANA 0,01; 0,1; 0,5 y 1,0 mg/L no existieron diferencias significativas para el número de brotes/explanto. Para la longitud de los brotes si existieron diferencias significativas entre los tratamientos donde las concentraciones de ANA 0,5 y 1,0 mg/L + Kin 1,0 mg/L produjeron los brotes más largos y las concentraciones de ANA 0,01 y 0,1 mg/L + Kin 1,0 mg/L, los más cortos (Fig. 4).

En más del 85 % de los medios de cultivo empleados en la micropropagación se incluye como suplemento alguna citoquinina, a pesar de que una pequeña cantidad de ella puede ser sintetizada por los brotes en crecimiento, es reconocido que resulta insuficiente para soportar el crecimiento y desarrollo *in vitro*. El BAP es en general la citoquinina más efectiva y la más empleada en la inducción de yemas axilares, seguida en orden decreciente por la Kin, el 2-isopenteniladenina (2 - ip) y la zeatina reportándose su utilización en el 74,6 %, 19,4 %, 3 % y 3 % respectivamente, de los medios de cultivo

empleados en la propagación (Hu y Wang, 1983). En nuestro caso la Kin resultó ser la citoquinina más efectiva, pues los brotes alcanzaron mayor longitud en los tratamientos que la contenían sobre todo en aquellos donde se combinó con el ANA.

No obstante el papel determinante de las citoquininas en esta fase, en algunos casos es necesaria la adición de auxinas para estimular el crecimiento de los brotes. Uno de los posibles efectos de la auxina es anular el efecto depresivo acumulado de las altas concentraciones de citoquininas sobre el alargamiento de los brotes axilares y restablecer el crecimiento normal de los mismos (Orellana, 1998).

La auxina más empleada en combinación con el BAP para inducir la proliferación de brotes en yemas axilares de *Eucalyptus sp*, es el ANA. Numerosos autores han empleado esa combinación. Así Hartney (1982) multiplicó exitosamente 12 especies de *Eucalyptus*, con un potencial de producción de 1 millón a partir de un tallo en un año. Jenq-Chuan *et al.* (1995) produjeron brotes múltiples cultivando *in vitro* yemas axilares y apicales de *E. grandis x E. urophylla*, en un medio MS con 0,1 mg/L de BA y 0,01 mg/L de ANA, promediando 13,7 yemas/explante en un período de 40 días.

En todos los tratamientos empleados en este trabajo se observó la proliferación de brotes, destacándose el tratamiento con Kin 2 mg/L que difería del resto, en cuanto al número de brotes/explantos producidos. Este resultado no coincide con lo planteado por Hu y Wang (1983) quienes afirmaron que el BAP es la citoquinina más efectiva para la proliferación, situando en segundo

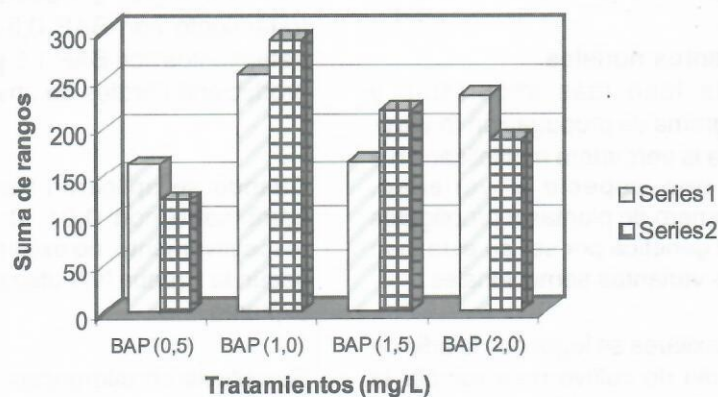


Fig. 1. Número de brotes/explanto (serie 1) (H = 5, 5329, n.s., n = 10) y longitud de los brotes (serie 2) (H = 11, 1244, \*, n = 10) en los tratamientos con diferentes concentraciones de BAP.

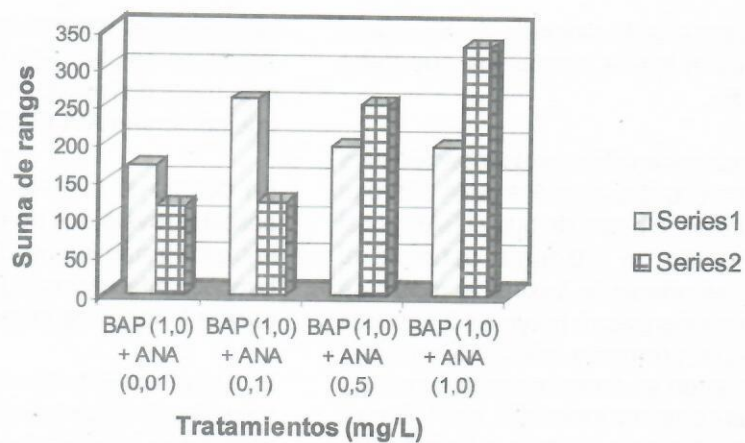


Fig. 2. Número de brotes/explanto (serie 1) ( $H = 3, 2479$ , n.s.,  $n = 10$ ) y longitud de los brotes (serie 2) ( $H = 23, 9369$ , \* \* \*,  $n = 10$ ) en los tratamientos donde se combinó BAP con diferentes concentraciones de ANA.

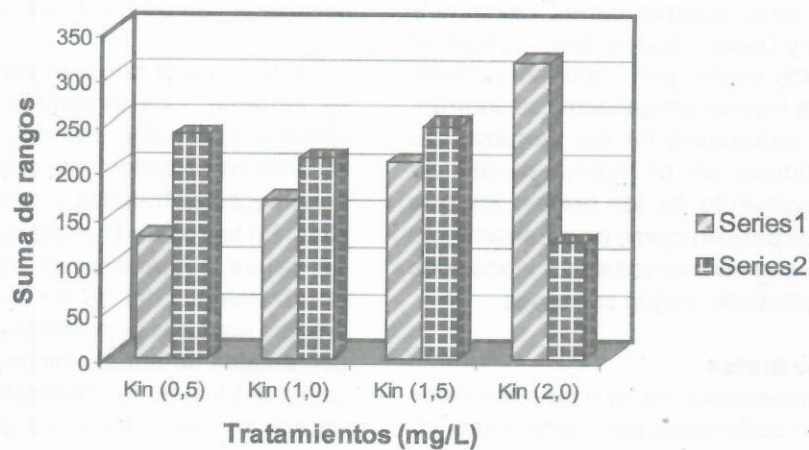


Fig. 3. Número de brotes/explanto (serie 1) ( $H = 16, 0151$ , \* \*,  $n = 10$ ) y longitud de los brotes (serie 2) ( $H = 7, 0836$ , n.s.,  $n = 10$ ) en los tratamientos donde se aplicaron diferentes concentraciones de kinetina.

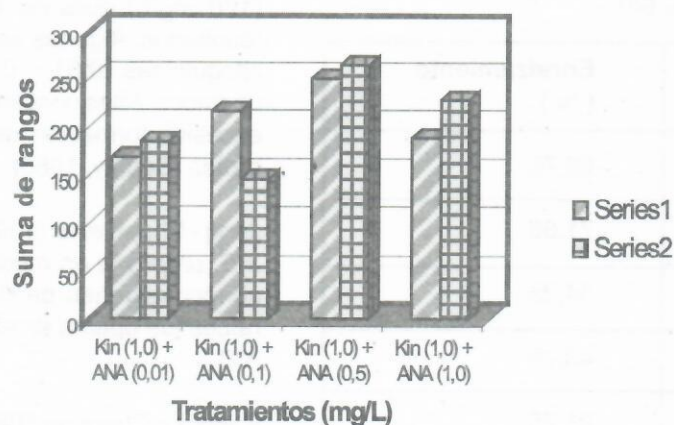


Fig. 4. Número de brotes/explanto (serie 1) ( $H = 3, 1020$ , n.s.,  $n = 10$ ) y longitud de los brotes (serie 2) ( $H = 8, 6365$ , \*,  $n = 10$ ) en los tratamientos donde se combinó la kinetina con diferentes concentraciones de ANA.

lugar a la Kin. Para la especie *E. saligna* y de acuerdo a nuestros resultados es la Kin la citoquinina que debe emplearse para este fin.

Coincidimos con los autores anteriormente mencionados en cuanto al efecto positivo que ejerce el ANA sobre el alargamiento de los brotes, a pesar de que el BAP por si solo en la concentración de 1,0 mg/L estimuló el crecimiento. Cuando se añadió la auxina al medio se observó que los brotes alcanzaban mayores longitudes que cuando el medio contenía sólo citoquinina, acentuándose esto cuando se combinaron la kinetina y el ANA, resultando las combinaciones de : Kin 1,0 mg/L + ANA 0,5 mg/L y Kin 1,0 mg/L + ANA 1,0 mg/L , las más efectivas.

Los brotes producidos por estos dos últimos tratamientos alcanzaron una longitud tal que permitió la eliminación de la fase de alargamiento previa al enraizamiento, dada como necesaria por otros autores como: Lakshmi y Shobha (1985), Lainé y David (1994) y Jenq - Chuan *et al.* (1995). Este aspecto es de gran importancia, pues con la eliminación de la fase de alargamiento se ahorran: reactivos, tiempo y capacidad en las cámaras de crecimiento, lográndose en el mismo medio de proliferación, el alargamiento de los brotes, los que pueden ser transferidos para un medio de enraizamiento o ser seccionados en segmentos nodales e inoculados en un medio de multiplicación, según convenga.

**Enraizamiento de los brotes.**

La evaluación del enraizamiento, de los brotes obtenidos de la multiplicación dio como resultado que en todos los tratamientos se indujo la emisión de raíces, variando el porcentaje en cada caso, según puede observarse en la tabla II.

**TABLA II**

Inducción del enraizamiento de acuerdo a cada tratamiento empleado (n = 64).

| Tratamiento (mg/L) | Enraizamiento (%) |
|--------------------|-------------------|
| ANA (0,1)          | 68,75             |
| ANA (1,0)          | 71,88             |
| AIA (0,1)          | 34,38             |
| AIA (1,0)          | 43,75             |
| AIB (0,1)          | 81,25             |
| AIB (1,0)          | 87,50             |

Los mayores valores corresponden a los tratamientos donde se empleó AIB (81,25 y 87,50 %) y los valores más bajos de inducción se producen en los tratamientos que contenían AIA (34,38 y 43,75 %).

En cuanto al número de raíces/brote la Prueba KW aplicada reveló que no existían diferencias significativas entre los tratamientos, de la misma manera no existieron tampoco diferencias significativas entre los tratamientos para la longitud de la raíz mayor (Fig. 5).

El enraizamiento se caracteriza por ser la fase más voluminosa del proceso de organogénesis, pues en ella cada brote, esqueje o yema, que se ha formado durante la fase de multiplicación, debe ser cultivada y manipulada **in vitro** para que, además de crecer, desarrolle varias raíces que le permitan comenzar la absorción de nutrientes al trasplantarse sobre un sustrato enriquecido y convertirse en una planta aclimatizada, lista para llevarse al campo (Orellana, 1998).

La producción de raíces **in vitro** en brotes de *Eucalyptus* es variable. Los explantos obtenidos de plántulas enraízan fácilmente. Hartney (1982) obtuvo más de un 70 % de enraizamiento de brotes de plántulas en seis de ocho especies tratadas y menos del 30 % para dos de ellas. En brotes de *E. marginata* tomados de plántulas o de callos cotiledonares obtuvo un porcentaje de enraizamiento del 35 %. Sin embargo en nudos de árboles maduros el porcentaje fue del 5 %. El rango de porcentajes de enraizamiento para clones de plántulas osciló del 5 al 80 %, mientras que el rango para clones adultos se mantuvo entre el 2 y el 20 %.

Con respecto a los reguladores del crecimiento las auxinas son los compuestos que deben emplearse para inducir el enraizamiento. El AIB en concentraciones de 0,1 a 10 mg/L o la combinación de diferentes auxinas o someter a los tejidos a altas concentraciones de auxinas (120 mg/L) durante 10 o 12 horas ha dado buenos resultados. Algunas veces las bajas concentraciones de citoquininas (0,01 – 0,1 mg/L) benefician la formación de raíces. Altas concentraciones de auxinas inducen una excesiva formación de callos y la senescencia de los brotes (Boulay, 1985).

Jenq - Chuan *et al.* (1995) enraizaron brotes de *E. grandis* x *E. urophylla* en medios que contenían ANA o AIB en concentraciones de 0,1 a 10 mg/L. La formación de raíces fue optima en el medio que contenía 0,3 mg/L de AIB.

Kapoor y Chauhan (1992), usaron para el enraizamiento de brotes del híbrido F<sub>1</sub> (*E. torelliana* F.V. Muell x *E. citriodora* Hook), dos medios que contenían 1/5 de la concentración de las sales del MS + AIB 0,1 mg/L y

½ de la concentración de las sales del MS + AIB 0,1 mg/L, en el primer caso obtuvieron un 95,83 % de enraizamiento y un 50 % en el segundo, pero los brotes presentaron un mejor desarrollo en el segundo. Cuando utilizaron un medio con la mitad de la concentración de las sales del MS suplementado con AIB 1,0 mg/L se observaron callos basales en algunos brotes los cuales inhibían el desarrollo de las raíces.

La excesiva formación de callos en la base del brote, la ausencia del enraizamiento, el oscurecimiento y la senescencia de los brotes pueden ser minimizados si los cultivos se mantienen en la oscuridad por un período inicial de 2 a 20 días (Boulay, 1983).

Varios autores han prescindido de los reguladores del crecimiento para enraizar brotes de varias especies *in vitro*, lo que resulta de una gran importancia porque la ausencia de reguladores del crecimiento reduce la posibilidad de inestabilidad genética durante la micropropagación (Beauchesne, 1982).

Major *et al.* (1995) emplearon un medio con AIB 1 g/L, donde indujeron los primordios radicales, durante 7 días, al cabo de los cuales transfirieron de nuevo los tallos a un medio sin auxinas para favorecer la emisión de raíces adventicias.

Otra estrategia alternativa para el establecimiento de plántulas enraizadas *in vitro* es la de transferir los brotes a condiciones no estériles tan pronto como el primordio

radical se hace visible (Durand-Creswell *et al.*, 1982).

Los porcentajes de enraizamiento obtenidos para *E. saligna*, en este trabajo, de acuerdo a los tratamientos empleados son altos, comparados con los resultados de otros autores, que en otras especies de *Eucalyptus* han obtenido hasta un 80 % de enraizamiento.

Como se ha expuesto el uso del medio nutritivo MS con las sales reducidas, para enraizar brotes *in vitro*, se informa por varios autores, lo que coincide con nuestros resultados, pues empleamos la mitad de la concentración de las sales del MS como medio de enraizamiento, obteniendo altos porcentajes de inducción.

En cuanto a la consistencia del medio empleamos medios de cultivo líquidos con soportes de papel de filtro, cuestión esta muy debatida en la literatura consultada ya que algunos autores utilizan medios sólidos mientras que otros prefieren el medio líquido para el enraizamiento. De acuerdo a nuestra experiencia preferimos el medio líquido, pues se ahorra agar y la raíz se daña menos al ser extraída del tubo y llevada a la bolsa para su aclimatación.

En los tratamientos aplicados, la formación del callo basal no fue un problema ya que el mismo no se produjo en ningún caso.

No fue necesario el período inicial de exposición de los brotes a la oscuridad con el fin de inducir el enraizamiento,

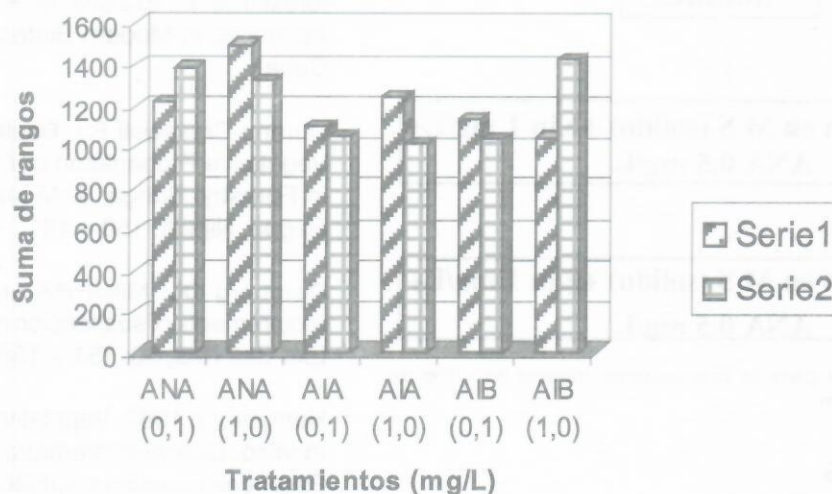


Fig. 5. Comportamiento del número de raíces/brote (serie 1) (H = 5, 5075, n.s., n = 20) y de la longitud de la raíz mayor (serie 2) (H = 7, 5403, n.s., n = 20) ante los tratamientos con diferentes concentraciones de varias auxinas.

pues éste se produjo manteniendo durante todo el tiempo los cultivos en un fotoperíodo de 16 horas de luz.

El AIB es la auxina que más se emplea para estimular la producción de raíces en varias especies de *Eucalyptus*, en nuestro caso también el AIB mostró los mayores porcentajes de inducción, pero no difiere del ANA y del AIA en cuanto al número de raíces/brote ni en la longitud de la raíz mayor, lo que hace pensar que el AIB actúa como un potente inductor del enraizamiento y tiene semejante acción que el ANA y el AIA en el desarrollo posterior del sistema radical.

Salisbury (1994) planteó que el hecho de que el AIB se prefiera para el enraizamiento sobre otras auxinas sintéticas se debe a que es un fuerte diferenciador.

En la figura 6 se propone una metodología para la propagación masiva *in vitro* de *Eucalyptus saligna* Sm.

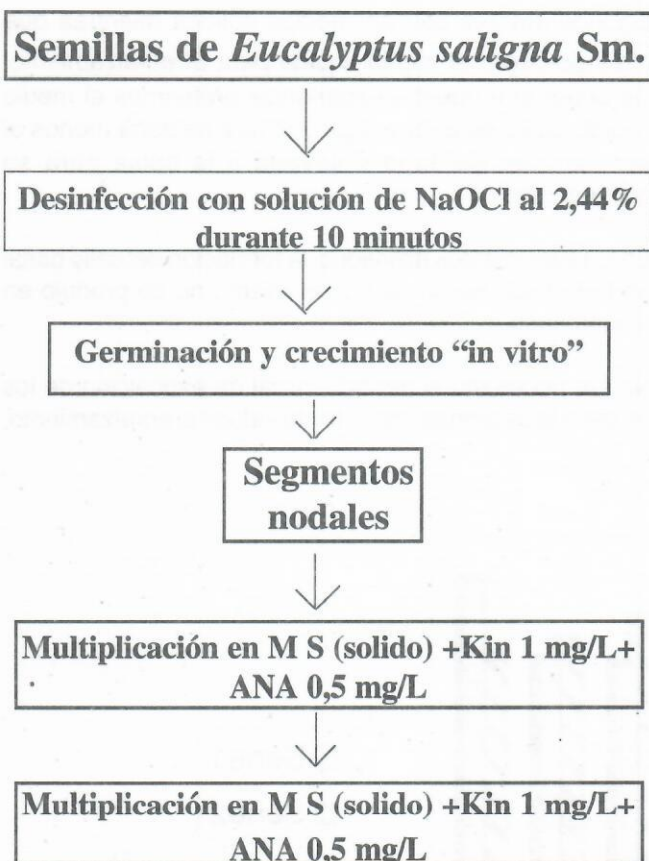


Fig. 6. Metodología para la propagación masiva *in vitro* de *Eucalyptus saligna* Sm

**CONCLUSIONES**

-Se propone una metodología para la propagación masiva *in vitro* de *Eucalyptus saligna* Sm.

-Para la multiplicación de los segmentos nodales de

*Eucalyptus saligna*, la combinación: Kin 1,0 mg/L + ANA 0,5 mg/L resulta efectiva en cuanto al número de brotes/explante producidos y la longitud de estos, con lo que se logra eliminar la fase de elongación previa al enraizamiento.

-El AIB en la concentración de 0,1 mg/L, es la auxina que debe emplearse en un medio de cultivo MS, líquido, con la mitad de la concentración de sus sales, para el enraizamiento de los brotes obtenidos de la multiplicación de los segmentos nodales de *Eucalyptus saligna*.

**BIBLIOGRAFÍA**

Arnould MF and Favre JM. 1992. Essais d'induction de l'embryogenèse somatique chez *Eucalyptus gunni*. Biotechnologies Appliquées Aux Arbres Forestiers. Paris, AFOCEL, 156 pp.

Beauchesne G. 1982. Appearance of plants not true type during in vitro plant propagation. In: Earle, E.D. and Y. Demarly (Eds.). Variability in plants regenerated from tissue culture. Praeger Publications, New York, p 268-272.

Boulay M. 1983. Micropropagation of frost resistant *Eucalyptus*. Workshop on propagation of *Eucalyptus*, Sacramento, June 14 - 16

Boulay M. 1985. Some practical aspects and applications of the micropropagation of forest trees. International Symposium on in vitro Propagation of Forest trees species. Bologna. Italy.

Carneiro LA, Nascimento MA, Araujo RFG, Cardoso MA and Mausur E. 1995. *In vitro* shoot multiplication of *Plathymenia foliolosa* (Bent) an endangered Atlantic rain forest tree. In: Estrada, M. P.; E. Riego, J. Limonta (eds). Advances in Modern Biotechnology. vol. 3 La Habana, Cuba.

Durand-Cresswell RJ, Boulay M and Franclet A. 1982. Vegetative Propagation of *Eucalyptus*. In Tissue Culture in Forestry. Bonga, J. M. and D. J. Durzan (Eds). The Hague, Nijhoff, 150 - 181.

Gamborg OL, Miller RA and Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res, 50: 151 - 158.

Hartney VJ. 1982. Vegetative propagation of *Eucalyptus in vitro*. Colloque International sur la Culture in vitro des Essences Forestiers. IUFRO. Nangis. France. AFOCEL, p 175 - 179.

Hu CV and Wang J. 1983. Meristem shoot tip and bud culture. In Handbook of Plant Cell. Evans, D. A.; P. V.

Ammirato and Y. Yameda (Eds) p 256–290.

Jenq-Chuan Y, Jeng-Der Ch and Zenn-Zong Ch. 1995. Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* x *urophylla* and comparison of growth between micropropagated plantlets and rooted cuttings. *Plant Cell Reports*, 15: 170 – 173.

Kapoor ML and Chauhan JMS. 1992. **In vitro** clonal Propagation of Mature *Eucalyptus* F<sub>1</sub> Hybrid ( *E. torelliana* F. Muell x *E. citriodora* Hook ). *Silvae Genetica*, 41, 6: 305 – 307.

Lainé E and David A. 1994. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. *Plant Cell Reports*. 13:473–476.

Lakshmi Sita G and Shobha Rani B. 1985. **In vitro** propagation of *Eucalyptus grandis* L. by tissue culture. *Plant Cell Reports*, 4: 63 – 65.

Major G, Ross S, Krause M and Trujillo I. 1995. Micropropagación de árboles adultos de *Eucalyptus grandis* Maiden (Hill). *Uruguay Forestal*. No. 8: 16 – 17.

Murashige T and Skoog F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473 – 497.

Orellana P. 1998. Propagación vía organogénesis. En: *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Pérez Ponce, J. N. (Ed). Santa Clara, Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 400 pp.

Salisbury FB. 1994. *Fisiología Vegetal* (Ed.) Wadsworth Inc. 4ta. edición p 305.

Sigarroa A. 1985. *Biometría y Diseño Experimental*. Ed. Pueblo y Educación, La Habana, 793 pp.

Vargas J. 1982. Aplicación del cultivo de tejidos en la propagación vegetativa de especies forestales. *Revista Ciencia Forestal*. Vol. 7, No. 39: 4 – 60.

**Recibido:** 22 de septiembre de 1999.

**Direcc. de los autores:** \*Laboratorio de Biotecnología de las Plantas, Universidad de Pinar del Río, Carret. a San Juan y Martínez km 5 «El Vizcaíno», Pinar del Río 20100, Pinar del Río. \*\*Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de la Habana. Calle 25 # 455 e/ J e I Vedado. Plaza 10400. Ciudad de la Habana, Cuba.