

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE ENRAIZAMIENTO *IN VITRO*
FOTOAUTOTRÓFICO PARA *Eucalyptus dunnii*

por

Romina de SOUZA IBARRA
Rafael GRASSO RODRÍGUEZ

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.

MONTEVIDEO
URUGUAY
2012

Tesis aprobada por:

Director:
Ing. Agr. Msc. Silvia Ross

.....
Ing. Agr. Rafael Escudero

.....
Ing. Agr. Msc. Alicia Castillo

Fecha: 23 de noviembre de 2012

Autor:
Rafael Grasso

.....
Romina de Souza

AGRADECIMIENTOS

De mi parte Rafael Grasso, agradezco el apoyo de mi familia en todo momento, de mi padre Enrique, mi hermano Juan, mi abuela Blanca, de mi madre María que me acompaña desde otro lugar.

Por mi parte Romina de Souza, agradezco el apoyo de mi familia a mi Padre Luis, mi hermano Luisito y a mi madre Teresa por estar ahí en todo momento.

Agradecemos la valiosa ayuda de la orientadora y amiga Ing. Agr. Silvia Ross, por sus valiosos aportes y apoyo durante el transcurso de la tesis.

Agradecemos a la Lic. Sully Toledo por su indispensable aporte en la corrección de la tesis y su buena voluntad.

Agradecemos a Ing. Agr. Joaquín Dutour, por el indispensable apoyo en los análisis estadísticos y diseño del experimento.

Agradecemos a co-orientador Ing. Agr. Rafael Escudero por la buena voluntad.

Agradecemos a las empresas Mundial Forestación S.A. y Forestal Oriental S.A. por el material vegetal proporcionado.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. OBJETIVOS.....	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1. Eucalyptus dunnii “EUCALIPTO BLANCO”.....	3
2.1.1. <u>Importancia en el país de Eucalyptus dunnii</u>	5
2.2. PROPAGACIÓN VEGETATIVA.	7
2.2.1. <u>Razones para clonar</u>	7
2.2.2. <u>Métodos de propagación vegetativa en Eucalyptus spp.</u>	10
2.3. TÉCNICA DE MICROPROPAGACIÓN.	11
2.3.1. <u>Etapas de la micropropagación</u>	12
2.3.2. <u>Composición del medio de cultivo</u>	13
2.3.3. <u>Problemas de la micropropagación</u>	17
2.3.4. <u>Influencia de factores físicos sobre el crecimiento y desarrollo</u>	18
2.3.5. <u>Proceso de enraizamiento</u>	22
2.3.5.1. Factores que influyen en el enraizamiento.	25
2.3.6. <u>Experiencias en micropropagación in vitro en Eucalyptus dunnii</u>	29
2.4. MICROPROPAGACIÓN FOTOAUTOTRÓFICA.	30
2.4.1. <u>Ventajas de la micropropagación fotoautotrófica</u>	31
2.4.2. <u>Mejoras en la ventilación</u>	32
2.4.3. <u>Sustratos</u>	35
2.4.4. <u>Antecedentes en micropropagación fotoautotrófica</u> ..	37
2.4.4.1. En Eucalyptus spp	37
2.4.4.2. En otras especies.....	39
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	42

3.1. PRIMER ENSAYO: EFECTO DE DIFERENTES TIEMPOS DE DESINFECCIÓN.	42
3.2. SEGUNDO ENSAYO: ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACIÓN EN CONDICIONES FOTOAUTOTRÓFICAS.....	46
3.2.1. <u>Preparación de los materiales para el ensayo de enraizamiento</u>	49
3.2.2. <u>Construcción de los recipientes de cultivo</u>	51
3.2.3. <u>Descripción del sistema de inyección de aire enriquecido con CO₂</u>	52
3.2.4. <u>Procedimiento de instalación del cultivo</u>	56
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	59
4.1. EFECTOS DE DIFERENTES TIEMPOS DE DESINFECCIÓN.....	59
4.2. SEGUNDO ENSAYO: ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACIÓN EN CONDICIONES FOTOAUTOTRÓFICAS.....	62
4.2.1. <u>Análisis estadístico y descriptivo de sobrevivencia</u>	62
4.2.2. <u>Análisis estadístico y descriptivo de enraizamiento</u>	64
5. <u>CONCLUSIONES</u>	70
6. <u>RESUMEN</u>	71
7. <u>SUMMARY</u>	73
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	74

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Composición Medio Basal Murashig Skoog.....	45
2. Resultados tiempos de desinfección.	60
3. Porcentaje de sobrevivencia.....	62
4. Sobrevivencia. Analizada con distribución binomial.	63
5. Porcentaje de sobrevivencia según tratamiento y clon.	64
6. Porcentaje de enraizamiento.....	64
7. Enraizamiento analizado con distribución binomial.....	65
8. Efecto Clon en el enraizamiento.	65
9. Porcentaje de enraizamiento discriminado por tratamiento.....	66
10. Porcentaje de enraizamiento por tratamiento y por Clon.....	67

Figura No.

1. Mapa de área de distribución natural de <i>Eucalyptus dunnii</i>	4
2. Sistema de micropropagación fotoautotrófica en recipientes de gran tamaño con ventilación forzada, instalado para su comercialización en Kunming, provincia de Yunnann, China.....	33
3. Plantas cultivadas de <i>E. camaldulensis</i> . Arriba condiciones no enriquecidas con CO ₂ . Abajo Condiciones enriquecidas con CO ₂ en los diferentes materiales de apoyo.	39
4. Crecimiento en el día 15 de plantas de cala.....	40
5. Clones “A” y “B”, ya acondicionadas.....	42
6. Clon “A”, introducción.....	46
7. Explantos en medio con carbono activado.....	49
8. Diagrama esquemático de una unidad de ventilación	

	forzada Para CO ₂	50
9.	Entrada de aire y filtros.....	52
10.	Imagen general del sistema.	53
11.	Regulador de presión.	54
12.	Caudalímetro de gas.	55
13.	Clones recién plantados, respetando el diseño experimental.....	57
14.	Clon B, con raíces el día de finalización del ensayo, tratamiento sin CO ₂	67

1. INTRODUCCIÓN

Las plantaciones forestales en nuestro país en los últimos 20 años se han venido incrementando de forma notoria. Gran empuje lo han efectuado las plantaciones con destino a pulpa de celulosa que han colonizado nuevas aéreas no tradicionales para forestación. En el caso de la madera con otros destinos industriales (debobinado o aserrado) se ha mantenido el ritmo de las plantaciones con ciertos altibajos provocados principalmente por pérdidas de competitividad.

La superficie forestada total (bosque nativo y bosque implantado) registrada hasta el año 2007 gira en el entorno de las 1.721.658 hectáreas, totalizando aproximadamente un 8,6% de la superficie de bosques en el territorio nacional, sin considerar el área de palmares que ocupa unas 70.000 hectáreas. De ese total de hectáreas, 952.431 son plantaciones comerciales que corresponden a un 55,3% del total y el resto 44,7% representa la superficie de bosque nativo. Por lo tanto las superficies implantadas y naturales en Uruguay hasta el año 2010 se mantienen en proporciones similares URUGUAY. MGAP. DGF (s.f.).

Del total implantado hasta el año 2010 según el URUGUAY. MGAP. DGF (s.f.) la superficie con *Eucalyptos* es de 630.701 hectáreas de las cuales 271.595 corresponden a *Eucalyptus globulus*, 224.785ha corresponden a *Eucalyptus grandis*, 53.916ha corresponden a *Eucalyptus dunnii*, 43.119ha a *Eucalyptus maidenii* y el resto corresponde a otros *Eucalyptos*.

La especie en estudio *E. dunnii* se encuentra en Uruguay cultivada en plantaciones comerciales, debido a su buena adaptación y tolerancia al frío, totalizando en 2001 un área de 19.977 ha, (URUGUAY. MGAP. DGF, s.f.); en 2008 pasó a una superficie de 29.525 ha, (URUGUAY. MGAP. DGF, s.f.) y

finalmente 53.916ha en el año 2010 (URUGUAY. MGAP. DGF, s.f.), evidenciándose un rápido y constante aumento de la superficie plantada.

Hasta el momento las plantaciones de *E. dunnii* registradas provienen de reproducción seminal en su mayoría, solo existen pequeñas aéreas de reproducción clonal. Esta tendencia va cambiando ya que las técnicas de clonación se pretenden utilizar a gran escala, debido a las ganancias genéticas que se obtiene en dicho proceso, provocando aumentos considerables en los rendimientos por hectárea. La segunda causa no menos importante es la baja producción de semilla botánica que se da en el país y la región, por lo tanto se genera una dependencia de la importación de semilla del lugar de origen con un alto valor por kilogramo. En la mayoría de los casos dichas semillas provienen de rodales sin ningún proceso de selección, conocidas como semillas salvajes. Por estas razones son importantes los aportes en investigación de fisiología en reproducción vegetativa, dado que *E. dunnii* se conoce como una especie recalcitrante.

1.1. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar un sistema de enraizamiento alternativo para *E. dunnii in vitro*.

Objetivos específicos

- Diseñar y adaptar un sistema de enraizamiento de explantos en un ambiente enriquecido con dióxido de carbono (CO₂).
- Ajustar los tiempos de desinfección para los clones de *Eucalyptus* utilizados.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Eucalyptus dunnii* “EUCALIPTO BLANCO”

Eucalyptus dunnii Maiden (Myrtaceae) es un árbol de fuste recto, follaje denso, péndulo. Corteza persistente en la base del tronco, escamosa, castaño grisácea; en el resto del tronco caduca en largas fajas, ritidoma grisáceo a crema. Primeras hojas opuestas; las juveniles opuestas o subopuestas, pecioladas, ovales a elípticas, ápice agudo mucronado, base cordada o redondeada, verdes netamente discoloras. Las intermedias alternas, pecioladas, oval-lanceoladas o ampliamente lanceoladas, ápice agudo acuminado, base redondeada a amplia cuneada, verdes levemente discoloras. Adultas alternas, pecioladas, lanceoladas, ápice agudo, acuminado, base cuneada, levemente discoloras a concoloras; nervaduras secundarias oblicuas. Flores (7) dispuestas en inflorescencias simples, axilares, con pedúnculos achatados; botones florales ovoides, con pedicelos angulosos, opérculo levemente rostrado, más largo que el hipantio. Florece a fines de primavera y en verano. Frutos hemisféricos, disco convexo, notorio, exserto; valvas salientes, anchas y fuertes (Brussa, 1994).

Es un árbol de bosque alto, con un área de distribución natural restringida en el noreste de Nueva Gales del Sur y en el sureste de Queensland (ver figura 1, Boland et al., citados por Jovanovic et al., 2000).

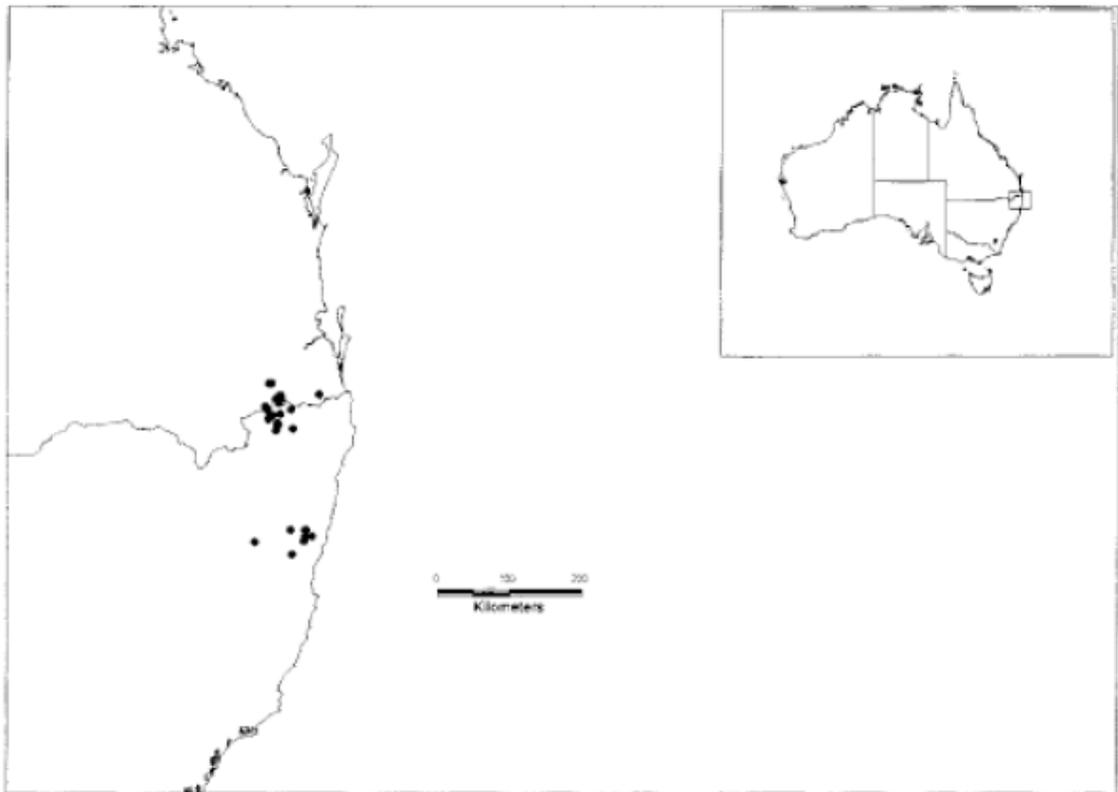


Figura 1. Mapa de área de distribución natural de *Eucalyptus dunnii* (Jovanovic et al., 2000).

Esta especie crece principalmente en los márgenes de las selvas tropicales y tiende a tener una preferencia por suelos basálticos fértiles o suelos aluviales, desarrollándose en altitudes entre 400 m y 650 m (Benson y Hager, citados por Jovanovic et al., 2000).

En el área de distribución natural, la precipitación media anual varía de 845 mm a 1950 mm, con lluvias en verano y un período de dos meses de estación seca, la temperatura media anual oscila entre 14 ° C a 18 ° C, la temperatura máxima de los meses más cálidos oscila entre los 24 ° C a 29 ° C, la temperatura mínima de los meses más frío de -1 ° C a 7 ° C, la temperatura mínimo absoluta en la región es desde -5 ° C a 10 ° C (Jovanovic et al., 2000).

A pesar de la limitada área de distribución natural de la especie presenta importante variabilidad genética. Las fuentes más importantes de esta variación se derivan de diferencias entre las familias dentro de las procedencias de las especies (Arnold et al., citados por Jovanovic et al., 2000).

La variabilidad existente dentro de la especie dispone de un potencial recurso de selección y mejora genética para la adaptación y el crecimiento de las plantaciones (Jovanovic et al., 2000).

Ensayos en Argentina, sugieren que la madera de *E. dunnii* puede ser superior a la de *E. grandis* para la fabricación de pulpa debido a su mayor densidad de la madera (Marcó y López, citados por Jovanovic et al., 2000).

2.1.1. Importancia en el país de *Eucalyptus dunnii*

En Uruguay *Eucalyptus dunnii* se encuentra cultivado en plantaciones comerciales, debido a su buena adaptación, tolerancia al frío y muy buenas características pulpables (alta densidad) y regulares para el aserrado (alto índice de rajaduras) (Marcó, s.f.). Debido a estas características se considera una especie promisoría, por lo cual muchas de las empresas productoras de pulpa están considerando realizar un cambio de especie, sustituir el *E. globulus* debido a problemas sanitarios por falta de adaptación por el *E. dunnii* que puedan abastecer la demanda a largo plazo de las plantas de celulosa¹.

Eucalyptus dunnii se presenta en la actualidad como una alternativa interesante, debido a que combina características de buen crecimiento, rectitud de fuste, buenas cualidades para la producción de pulpa para papel y algunos

¹ Escudero, R. 2011. Com. personal.

usos finales de la madera sólida, además presenta tolerancia a las heladas (Jovanovic et al., 1999).

Uno de los problemas que presenta esta especie es la baja cantidad de semillas que produce (de Sesar et al., citados por Billard y Lallana, 2005).

En la actualidad, la mayor parte de la demanda de semillas de *E. dunnii* se satisface a través de la importación desde su zona de origen en Australia. Esta oferta de semillas no deja de ser deficitaria, debido a la reducida área de distribución natural de la especie (restringida al nordeste de New South Wales y sudeste de Queensland), su escasa representatividad en el sector forestal australiano y los altos costos de importación (INTA Castelar, s.f.).

2.2. PROPAGACIÓN VEGETATIVA

2.2.1. Razones para clonar

En principio las plantas se pueden multiplicar de dos maneras: vegetativamente de forma asexual también llamada clonación y de forma generativa (sexualmente, por semilla) (Pierik, 1990). La reproducción asexual, esto es la reproducción empleando partes vegetativas de la planta original, es posible porque cada célula de la planta contiene la información genética necesaria para generar la planta entera (Hartmann y Kester, 2001).

La totipotencia es la capacidad de las células vegetales de regenerar una planta entera a partir de una o muy pocas células en cultivos *in vitro*. Sin embargo es importante señalar que no todas las células vegetales son totipotentes (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Cuando la multiplicación sexual no es satisfactoria porque no se forman semillas o se forman muy pocas, o las semillas pierden rápidamente su capacidad germinativa, se suele buscar la multiplicación vegetativa (Pierik, 1990).

La propagación vegetativa se constituye como un importante método para la multiplicación de plantas leñosas. Este método de propagación ofrece ciertas ventajas cuando es comparado con la reproducción sexual, de modo que muchas veces es indicado para la propagación de árboles seleccionados.

Mientras que con la reproducción sexuada se consigue apenas capturar el componente genético aditivo de superioridad del genotipo seleccionado, con la propagación vegetativa es posible capturar el componente genético total, es

decir, el componente aditivo y no aditivo, resultando en mayores ganancias dentro de una misma generación de selección.

La segregación y la recombinación genética, verificadas en la reproducción sexuada de especies alógamas, resultan en un alto grado de variabilidad. La multiplicación por vías vegetativas redundan en uniformidad de crecimiento, características morfológicas y calidad tecnológica.

La propagación vegetativa ha sido también el medio más adecuado para el aprovechamiento comercial de la heterosis, observada en varios cruzamientos inter-específicos siendo de gran importancia en la multiplicación de híbridos superiores (Torres et al., 1998).

De acuerdo con Hartmann y Kester (2001), existen varias situaciones en que el clonado es la mejor opción de propagación:

- Mantenimiento de clones

La propagación vegetativa es asexual ya que involucra divisiones mitóticas de las células que duplican el genotipo de la planta; esta duplicación genética se designa clonación y a la población de plantas descendientes se les llama clones. En la clonación las características específicas de cualquier planta individual son perpetuadas por propagación. La clonación es de particular importancia en horticultura debido a que la mayoría de los cultivares de gran parte de las plantas frutales y ornamentales tienen un genotipo heterocigoto y las características únicas de dichas plantas se pierden de inmediato al propagarlas por semillas.

- Propagación de plantas sin semillas

La propagación asexual es necesaria para mantener cultivares que no produzcan semillas viables.

- Evitar períodos juveniles prolongados

Las plantas que se cultivan a partir de semillas pasan por un período juvenil prolongado en el cual no ocurre floración. Algunas plantas leñosas y ciertas herbáceas perennes, como orquídeas y especies de bulbos, pueden necesitar de 5 a 10 años para que se inicie la floración. Una vez que han llegado al estado florífero, florecen con regularidad. La propagación vegetativa retiene esa capacidad de floración y con ella se evita la fase juvenil.

- Control de la forma de crecimiento

Durante el período juvenil las plantas originadas de semillas no solo no producen flores y frutos sino que a menudo muestran características morfológicas diferentes. Algunas de ellas son características muy inconvenientes por ejemplo presencia de espinas o vigor excesivo que se pueden evitar propagando la forma adulta por métodos vegetativos. Algunas plantas como la "Hiedra inglesa" (*Hedera helix*) son mas estimadas en la fase juvenil que en la adulta. La selección de material para estacas en la fase juvenil facilita la propagación de especies difíciles de enraizar ya que las estacas tomadas de material juvenil enraízan con mayor facilidad que las de material adulto.

- Combinación de clones

Un aspecto importante de la propagación asexual lo constituye la posibilidad de combinar en una sola planta dos o más clones por injerto.

- Razones económicas

En general, la propagación en masa por medios vegetativos no es más económica que la propagación comparable por semilla, pero su empleo se justifica por la superioridad y uniformidad de los clones específicos. La principal economía de la propagación vegetativa proviene de la eliminación de la fase juvenil y del acortamiento del tiempo necesario para llegar a la madurez reproductiva.

2.2.2. Métodos de propagación vegetativa en *Eucalyptus spp*

Existen muchos tipos de propagación vegetativa (Hartmann et al., citados por Zobel et al., 1992). En las plantaciones operativas el mayor énfasis se ha puesto en el uso de estacas enraizadas. El injerto se utiliza comúnmente para preservar árboles en bancos clonales o establecer huertos semilleros en los cuales el objetivo es la producción de semillas a gran escala (Zobel et al., 1992).

- Técnica de injerto

Injertar es el arte de unir entre si dos porciones de tejido vegetal viviente de tal manera que se unan y posteriormente crezcan y se desarrollen como una sola planta. Cualquier técnica con que se logre este fin puede considerarse como un método de injerto por lo cual no es de sorprender que en la literatura relacionada se describan innumerables procedimientos de injertos (Hartmann y Kester, 2001).

- Técnica de estaca

En la propagación por estaca se corta de la planta madre una porción de tallo, raíz u hojas, después de lo cual esa porción se coloca en ciertas condiciones ambientales favorables y se induce a que forme raíces y tallos, obteniéndose con ellos una planta nueva, independiente, que en la mayoría de los casos es idéntica a la planta madre (Hartmann y Kester, 2001).

2.3. TÉCNICA DE MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente en que se puedan controlar estrictamente las condiciones de ambiente y la nutrición (Hartmann y Kester, 2001).

Según Pierik (1990), el cultivo *in vitro* se define como el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas semillas, embriones, órganos, explantos, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores.

2.3.1. Etapas de la micropropagación

Diversos autores coinciden que las etapas de la micropropagación son las siguientes:

- Etapa 0: Elección de la planta madre

- Etapa I: Introducción

En esta etapa el objetivo es establecer un explante estéril en un medio de cultivo. Los factores que afectan el éxito de esta etapa incluyen la selección del explante, la eliminación de contaminantes del mismo y las condiciones de cultivo, comprendiendo ingredientes, luz, temperatura, y selección de sostén del explante.

- Etapa II: Multiplicación

La multiplicación se repite con intervalos regulares. El éxito de la multiplicación estriba en que se produzcan plantitas uniformes sin enraizar, del tamaño apropiado, que se recuperen con prontitud después de su transferencia y que empiecen a crecer de inmediato.

- Etapa III: Elongación y enraizamiento

Transferencia de las partes aéreas producidas para medio de enraizamiento y subsiguiente trasplante de las plantas obtenidas a un sustrato o al suelo.

- Etapa IV: Aclimatación

Permite que la planta alcance su crecimiento autotrófico en ambientes de menor humedad relativa, más luz y sustratos sépticos.

2.3.2. Composición del medio de cultivo

El medio de cultivo está constituido por (Margara 1982, Pierik 1990, Hartmann y Kester 2001):

- Agua: 95%
- Sales minerales: Estas se dividen en dos grupos, macroelementos (N, S, P, K, Mg, Ca) cuya dosis oscila entre 30-1700 mg/l y microelementos (Fe, Cu, Zn, Mo, B) cuya dosis oscila en el orden de 0,01-20 mg/l.
- Carbohidratos: 3-5%
- Vitaminas: tiamina; cuya concentración oscila entre 0,1-1,0mg/l, mioinositol; cuya concentración oscila entre 50-500mg/l, ácido ascórbico; 1-10mg/l, ácido cítrico 50-500mg/l.
- Reguladores de crecimiento: opcional

Según Pierik (1990), el crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por una serie de factores complejos:

- 1) La constitución genética de la planta.
- 2) Los nutrientes: agua, macro y micro elementos y azúcares.
- 3) Factores físicos que influyen sobre el crecimiento: luz, temperatura, pH, concentraciones de O₂, CO₂.
- 4) Algunas sustancias orgánicas: reguladores, vitaminas, etc.

Los explantos creciendo *in vitro* poseen los mismos requerimientos que las plantas intactas, pero en la mayoría de los casos pierden la capacidad de sintetizar su propia fuente de carbohidratos, reguladores de crecimiento y vitaminas (Margara, 1982).

Los medios nutritivos utilizados para el cultivo de células, tejidos y órganos de plantas están formados de sustancias esenciales para el crecimiento de los tejidos y controlan, en gran parte, el patrón de desarrollo *in vitro*. Una de las razones para que se hayan desarrollado diferentes composiciones de medio de cultivo para ayudar al crecimiento y morfogénesis, es que los distintos genotipos acumulan diferentes concentraciones endógenas de reguladores del crecimiento. Además la sensibilidad de los diferentes genotipos a la acción de los reguladores también variará con el estado de otras variables (Torres et al., 1998).

La influencia de las concentraciones particulares de reguladores de crecimiento se ve afectada por otras variables como son: el flujo de fotones, la temperatura, concentración de nutrientes inorgánicos, el pH y la presencia o ausencia de otros reguladores (George et al., 2010).

Las células requieren una variedad de nutrientes orgánicos e inorgánicos, estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos. Los nutrientes inorgánicos se requieren en dos niveles, uno macro y otro micro. Las células en crecimiento pueden fabricar sus proteínas a partir de fuentes adecuadas de nitrógeno y carbohidratos suministrados por el medio de cultivo, sin embargo existen además una cantidad de sustancias orgánicas adicionales que se requieren en cantidades mínimas y que son muy esenciales en el crecimiento (Mroginski y Roca, 1991).

Las mismas vías bioquímicas y metabólicas básicas que funcionan en las plantas son conservadas en las células cultivadas; algunos procesos, como la fotosíntesis, pasan a ser inactivados en las condiciones de cultivo. Por eso los medios nutritivos se basan en las exigencias de las plantas en cuanto a los

nutrientes minerales como algunas modificaciones para atender las necesidades específicas *in vitro*. Complementando esas sustancias biosintetizadas por las células, varios compuestos orgánicos son adicionados al medio para suplir las necesidades metabólicas, energéticas y estructurales de las células. También se debe añadir azúcar al medio de cultivo ya que las plantas o sus fragmentos no son completamente autotróficos cuando se desarrollan en estas condiciones (Torres et al., 1998).

- Reguladores del crecimiento

Las hormonas son por definición compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores que influyen sobre el crecimiento y desarrollo, actúan generalmente en lugar diferente a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas concentraciones. Aparte de estos productos naturales se han desarrollado otros productos sintéticos que pueden tener una actividad semejante a los primeros. Al conjunto de estos productos sintéticos junto con las hormonas se los denomina reguladores del crecimiento vegetal (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

En el cultivo *in vitro* de plantas superiores los reguladores especialmente las auxinas y citoquininas, juegan un papel muy importante (Pierik, 1990).

- Auxinas

El término auxina fue utilizado por primera vez por Went (1928) quien descubrió un compuesto indefinido que causaba la curvatura del coleoptilo de avena, fenómeno conocido como fototropismo. Este compuesto es conocido actualmente como ácido indol acético (AIA). Las auxinas generalmente producen: elongación celular, expansión de los tejidos, división celular,

formación de raíces adventicias y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión (Pierik 1990, Azcón-Bieto y Talón 2000).

Con bajas concentraciones de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones de auxinas no se producen raíces y tiene lugar en cambio la formación de callo (Pierik, 1990).

Cada órgano presenta una respuesta diferente frente a la auxina. Si consideramos la concentración de hormona que produce la máxima respuesta debemos concluir que las raíces son más sensibles que las yemas y éstas más sensibles que los tallos. Por lo tanto una alta concentración de auxinas produciría un crecimiento máximo en las yemas, una ligera estimulación de los tallos, mientras que el crecimiento de las raíces estaría fuertemente inhibido. La sensibilidad de un tejido u órgano puede variar con la edad y las condiciones ambientales (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

La formación de raíces adventicias en esquejes es un proceso complejo que consta de al menos dos etapas: la formación de primordios de raíz a partir de ciertas células susceptibles y el crecimiento de las raíces. Ambas etapas requieren auxinas, aunque las necesidades de cada una son diferentes y dependen de la especie (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Citoquininas

Históricamente el término citoquinina surgió como nombre genérico de una serie de sustancias naturales o sintéticas capaces de estimular la división celular en presencia de auxina (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Las citoquininas comprenden una clase de sustancias reguladoras de crecimiento. Producen varios efectos cuando son aplicadas en plantas intactas en particular estimulan la síntesis de proteínas y controlan el ciclo celular. Esta es tal vez la razón por la que pueden promover la maduración de los cloroplastos y retrasar la senescencia de las hojas. La aplicación de citoquininas en un sitio localizado de las plantas causa la transformación de los órganos en fosa de aminoácidos, que luego migran a los órganos de los alrededores. El efecto de las citoquininas es más notable en cultivos de tejidos, donde se utilizan, a menudo junto con las auxinas, para estimular la división celular y el control de la morfogénesis. Añadida en los medios de cultivo, supera la dominancia apical y libera las yemas laterales del estado de latencia (George et al., 2010).

2.3.3. Problemas de la micropropagación

Según Pierik (1990), las plantas cultivadas en tubos de ensayo tienen generalmente la cutícula escasamente desarrollada, debido a la alta humedad relativa, 90 a 100%, que se da *in vitro*. Como consecuencia, cuando se transfiere la planta al suelo se produce una transpiración cuticular extra, ya que la humedad del aire en las condiciones *in vivo* es más baja. Las hojas de una planta producida *in vitro* son frecuentemente más finas, blandas y fotosintéticamente poco activas con exceso de acumulación de agua en los tejidos, fenómeno conocido como “vitrificación”. Los estomas de las plantas *in vitro* pueden no ser suficientemente operativos y al permanecer abiertos cuando la planta ha pasado al suelo, pueden ser el origen de un importante estrés hídrico, durante las primeras horas de aclimatación. En las plantas procedentes de cultivo de tejidos, la conducción de agua entre vástagos y raíces puede verse reducida por una pobre conexión vascular. Es importante tener en cuenta que las plantas *in vitro* han sido criadas como heterótrofas, pero se deben

comportar como autótrofas *in vivo*: el azúcar debe ser producido por medio de la fotosíntesis.

Las raíces que se han originado *in vitro* son vulnerables y no funcionan de forma adecuada *in vivo* (no tienen o tienen pocos pelos radicales) por lo que mueren rápidamente debiendo ser sustituidas por nuevas raíces subterráneas.

Un desarrollo pobre del sistema radical hace que el crecimiento *in vivo* se haga muy difícil, especialmente cuando hay una elevada transpiración. Es de vital importancia que las plantas *in vitro* pierdan la menor cantidad de agua posible cuando pasan a condiciones *in vivo*.

- Variación somaclonal

El paso de las células vegetales a través de un ciclo de cultivo de tejidos a menudo puede resultar en un aumento de la variación espontánea fenotípica y genética de las plantas regeneradas, referidos como variación somaclonal. La variación de los rasgos somáticos varios se ha observado en muchos tejidos derivados de las plantas de cultivo y ahora se considera como un fenómeno general (Ahuja, 1993).

2.3.4. Influencia de factores físicos sobre el crecimiento y desarrollo

Humedad

Se conoce poco de la influencia de la humedad en la cámara de crecimiento, sobre el desarrollo y crecimiento *in vitro*. Teniendo en cuenta que la humedad en los tubos de ensayo es relativamente alta (como se desprenden de las condensaciones de las paredes), la humedad de la cámara de crecimiento

probablemente solo influirá en la pérdida de agua desde los tubos (Pierik, 1990).

Generalmente no es necesario contar en la cámara de cultivo con dispositivos específicos para el control de la humedad ambiente, ya que el correcto tapado de los tubos asegura un contenido de humedad adecuado en la atmósfera de los mismos (Margara, 1982).

Sin embargo en algunos casos puede ser necesario que la humedad relativa sea regulada y mantenida a niveles más apropiados. En diversos estudios realizados con varias especies del género *Eucalyptus* se ha observado que muchas plantas cuando crecen en cámaras de ambiente controlado desarrollan agallas en tejidos de hojas y callos. En un trabajo realizado por Warrington, citado por Gravina et al. (s.f.) se ha determinado que este problema puede ser evitado (o al menos minimizado) manteniendo las plantas bajo condiciones medias a bajas de humedad relativa (menos de 60-65%), aunque el mecanismo responsable inductor del desarrollo de estos síntomas no ha sido totalmente elucidado.

Temperatura

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento es la resultante de su acción sobre la fotosíntesis y las reacciones metabólicas, pero también sobre la nutrición hídrica y mineral y sobre la transpiración (Heller, citado por Gravina et al., s.f.). La temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo *in vitro* es generalmente 3-4°C más alta que la correspondiente para el crecimiento *in vivo*. Teniendo en cuenta que la temperatura en los tubos de ensayo es 3-4°C más alta que la cámara de crecimiento, la temperatura de esta última puede ser mantenida en el óptimo para el crecimiento *in vivo* (Pierik 1990, George et al. 2010).

- Termoperiodismo

El hecho de mantener una temperatura constante no reconoce las fluctuaciones de temperaturas diurnas y estacionales, bajo las cuales las plantas normalmente se desarrollan. Es dable pensar que la termoperioricidad es favorable al crecimiento en la medida que ella provoca un enlentecimiento periódico de las actividades foliares en beneficio de las actividades radiculares durante el enfriamiento nocturno de la parte aérea. También parecería favorecer el mantenimiento de un equilibrio entre la síntesis de hormonas en la parte aérea y radical (George et al., 2010).

Otra ventaja de la alternancia de temperaturas es que ayudan al intercambio de gases en los recipientes de cultivo (George et al., 2010)

- Luz

La luz tiene una influencia importante en la morfogénesis, crecimiento y desarrollo de las plantas. En un ambiente *in vitro*, donde las condiciones son manipulados para optimizar la respuesta, se debe considerar la luz en cuanto cantidad e intensidad, así como el fotoperíodo (Ahuja 1993, George et al. 2010).

Se sabe muy poco sobre el efecto de la duración del día en el cultivo *in vitro*; generalmente se eligen de 14 a 16 horas, aunque también se usa luz continua (Pierik, 1990).

El papel de la luz en la diferenciación involucra varios componentes como son la intensidad, el fotoperíodo y la calidad; aunque se reconoce la importancia morfogenética de estos componentes, los estudios realizados con el fin de analizarlos son escasos (Morginski y Roca, 1991).

La luz es generalmente provista por tubos fluorescentes, y se utiliza una intensidad relativamente baja del orden de los 1000-5000 lux, tanto para el crecimiento como en la inducción de fenómenos de organogénesis (Margara 1982, Pierik 1990).

- Composición del ambiente gaseoso

La disponibilidad de oxígeno en los tejidos de plantas cultivadas está influida por:

- La concentración del gas en el ambiente
- La velocidad de difusión en el recipiente de cultivo, y
- La velocidad de difusión en las células cultivadas o los tejidos.

La concentración será la más cercana a la de la atmósfera ambiental cuando el tejido esté libre del medio y esté rodeado por un mínimo de humedad (George et al., 2010).

Según Pierik (1990)

Oxígeno: una buena aireación es un factor importante para el crecimiento de las células, tejidos, etc. Esto queda bien demostrado por el uso frecuente de aparatos agitadores, en cultivo de tejidos en medio líquido. El suministro de oxígeno en el tubo de ensayo puede ser facilitado de la siguiente manera: utilizando solo tapones metálicos, y no tapones de algodón; utilizar medios líquidos (se consigue un mejor transporte de oxígeno); inocular sobre puentes de papel.

La formación de órganos, especialmente la formación de raíces adventicias, es facilitada por un mejor suministro de oxígeno (Pierik et al., citados por Pierik, 1990); es un hecho comprobado que, especialmente los

esquejes de especies leñosas encuentran grandes dificultades en regenerar sus raíces, cuando estas se encuentran en agar.

Dióxido de carbono (CO₂)

Aunque el CO₂ se puede utilizar en principio como una fuente de carbono para el cultivo *in vitro*, de hecho la sacarosa es un material mucho mejor (Bergmann, citado por Pierik, 1990).

Parece claro que una elevada concentración de CO₂ debería estimular el crecimiento de las plántulas que son autótrofas, pero esto no siempre es el caso de los cultivos *in vitro*, puesto que altas concentraciones de azúcar en el medio puede suprimir la fijación de CO₂. Algunas plantas tienen estomas que son muy sensibles a los altos niveles de CO₂, por lo tanto el cierre estomático se da en forma anticipada, esto puede resultar en bajas concentraciones de CO₂ en la hoja, incluso cuando las concentraciones en los recipientes sean altas. Bajas emisiones de CO₂ aumentarán la susceptibilidad de la planta al estrés oxidativo si la radiación incidente es demasiado alta. Ese estrés puede limitar el crecimiento y funcionamiento de las plantas (George et al., 2010).

2.3.5. Proceso de enraizamiento

La adición de CO₂ *in vitro* tiene escaso valor, ya que la concentración de este gas en un tubo o un matraz bien sellado es casi siempre muy alta. Sin embargo se debe tener en cuenta que la fotosíntesis *in vitro* es generalmente inferior a la normal, debido a la baja irradiancia (Hanson et al., citados por Pierik, 1990) siendo en consecuencia de poco interés el suministro de CO₂.

En contraposición según Kozai et al. (2005), se ha encontrado que la concentración de CO₂ en un recipiente hermético que contengan explantos con

clorofila a menudo se reduce bruscamente. Dicha concentración durante el período de iluminación llega a ser menor que la concentración atmosférica, en ciertos casos llega a ser tan baja alcanzando el punto de compensación de CO₂ de las plántulas *in vitro*. Por definición la tasa de fotosíntesis neta es cero en el punto de compensación de CO₂, incluso cuando otros factores ambientales son favorables para la fotosíntesis. La disminución de la concentración de CO₂ en el recipiente muestra que los explantos tienen capacidad fotosintética. Como resultado la fotosíntesis está restringida por la baja concentración de CO₂ en el recipiente de cultivo.

Las bajas concentraciones de dióxido de carbono pueden estimular la biosíntesis de etileno. A mayores concentraciones (1-10% de CO₂) inhibe de forma competitiva la acción del etileno. Es probable que muchos de los efectos del CO₂ en cultivos de tejidos puedan ejercer su influencia a través de una modificación del efecto del etileno (George et al., 2010).

Según Torres et al. (1998) la técnica de multiplicación vegetativa más comúnmente utilizada para la clonación de plantas leñosas en gran escala ha sido la técnica de enraizamiento de estacas, que ha sido utilizada con éxito para algunas especies, no obteniendo buenos resultados para otras. Mediante lo expuesto el cultivo de tejidos se presenta como una alternativa viable de clonación de especies leñosas.

Una de las limitaciones de esta técnica ha sido el enraizamiento de las partes aéreas regeneradas *in vitro*. Los mayores obstáculos son el desconocimiento de los fenómenos involucrados en los procesos de formación de raíces adventicias. Esta dificultad de caracterizar los factores, está dada en virtud de su complejidad y la gran interacción existente. Pocas generalizaciones pueden ser hechas sobre la rizogénesis. Aparentemente, una relación

cuantitativa entre niveles de auxinas y citoquininas, es responsable del inicio del proceso (Skoog et al., citados por Torres et al., 1998). La participación de otras sustancias reguladoras del crecimiento como las giberelinas, ácido abscísico y etileno también fueron registradas, como así mismo promotores e inhibidores del enraizamiento, como por ejemplo compuestos sinérgicos de la auxina que suponen la formación de un complejo co-factor auxina más activo (Hess, citado por Torres et al., 1998).

Según Pierik (1990) la regeneración de órganos (por formación adventicia o por nueva formación) que no estuvieran presentes en el momento del aislamiento es un proceso extremadamente complejo debido a que existen correlaciones que deben ser rotas, antes de establecer otras nuevas que conduzcan a la regeneración de órganos.

En ese proceso se pueden distinguir las siguientes etapas:

- Des-diferenciación de células diferenciadas (que conducen probablemente a una redefinición y rejuvenecimiento de las células).
- División celular, generalmente seguida por formación de callo; cuando se dirige la división celular, puede comenzar la iniciación de órganos.
- Iniciación de órganos (formación).
- Desarrollo de órganos.

En el proceso de enraizamiento existen limitaciones tanto cualitativas como cuantitativas debidas a un gran número de factores: inherentes al material vegetal, en el invernadero o en el campo, debido a la posición del explanto sobre la planta, a la época del año, al nivel hormonal endógeno, al tamaño del explanto, al método de siembra, a la disponibilidad de nutrientes y reguladores,

a los factores físicos del crecimiento, a la presencia de otras sustancias en el medio, etc.

2.3.5.1. Factores que influyen en el enraizamiento

Factores como genotipo, estrés hídrico, sustancias de reserva como carbohidratos, nutrición mineral, condiciones de crecimiento de la planta (luz, temperatura), zonalidad, sustancias reguladoras del crecimiento y juvenilidad han sido considerados como aquellos factores que se presentan más relevantes en el enraizamiento (Torres et al., 1998).

- Factores ligados a la planta madre

La formación de raíces se induce mucho más fácilmente en plantas juveniles que en plantas adultas (Hackett, citado por Pierik, 1990). Las plantas en estado vegetativo responden mejor que las plantas en floración. Los vástagos regeneran más fácilmente cuando se toman de la parte basal de un árbol debido a que esta zona es la que posee carácter juvenil (Pierik, 1990).

- Genotipo

Según Torres et al. (1998) existen varias evidencias de que la formación de raíces adventicias en los segmentos del tallo es genéticamente controlada. La gran variación observada en especies, cultivares y clones en relación a la mayor o menor habilidad natural de formación de raíces ha demostrado la importancia de los factores genéticos en el enraizamiento. En la práctica esta serie de dificultades pueden ser disminuidas mediante una serie de medidas aplicadas antes y durante el proceso de enraizamiento, una vez que estas diferencias genéticas se manifiestan por medio de fenómenos bioquímicos y

fisiológicos los cuales pueden ser manipulados principalmente por medio de variaciones en el ambiente físico.

- Estado hídrico

Los propagadores de plantas a menudo recalcan la conveniencia de tomar las estacas en la mañana temprano cuando el material vegetal todavía está turgente. Estudios efectuados en cacao y chícharo mostraron una reducción del enraizamiento cuando las estacas se tomaron de plantas madres que sufrían estrés hídrico (Torres et al. 1998, Hartmann y Kester 2001). El estrés hídrico provoca aumento en los contenidos de ácido abscísico y etileno en las hojas (Johnson, citado por Torres et al., 1998), compuestos considerados inhibitorios del enraizamiento.

- Carbohidratos

La nutrición de la planta madre puede ejercer una fuerte influencia en el desarrollo de raíces y tallos de las estacas, este efecto que puede estar relacionado con un estado fisiológico dado del tejido, puede asociarse a relaciones carbohidrato/nitrógeno. Segmentos de tallos más ricos en carbohidratos en relación a nitrógeno tienden a mejorar el enraizamiento. En cultivos de fácil enraizamiento la cantidad de reservas es normalmente mayor respecto a cultivos de difícil enraizamiento, y segmentos de tallos principalmente etiolados responden bien a pre-tratamientos con azúcares con significativos aumentos en enraizamiento (Hartmann y Kester, 2001).

Estacas apicales de *Eucalyptus camaldulensis* enraízan mejor en presencia de sacarosa o riboflavina (Bachelard et al., citados por Torres et al., 1998).

- Nutrición mineral

Según Hartmann y Kester (2001) en las plantas madres el equilibrio de un bajo contenido de nitrógeno y altos de carbohidratos que en muchos casos parecen favorecer el enraizamiento, puede lograrse de diversas formas:

- 1) Reduciendo los abonos nitrogenados a las plantas madres, disminuyendo con ello el crecimiento de los tallos y permitiendo la acumulación de carbohidratos. Cualquier tipo de restricción al crecimiento de raíces de las plantas madres como el que ocurre cuando se cultiva en macetas o muy juntas en setos tienden a impedir el crecimiento vegetativo en exceso y permite la acumulación de carbohidratos.
- 2) Seleccionado como material para estacas aquellas partes de la planta que se encuentra en estado nutricional conveniente. Por ejemplo ramas laterales en las cuales ha disminuido el crecimiento rápido y se han acumulado carbohidratos en lugar de ramas terminales suculentas, (sin embargo en plantas que presentan crecimiento plagiotrópico se debe evitar el uso de ramas laterales).

Un adecuado balance nutricional de las plantas dadoras de propágulos parece estar ligado a la producción de triptófano, precursor natural del ácido indol acético (Haissig, citado por Torres et al., 1998).

El abonado previo de las plantas dadoras de propágulos con boro mostró ser beneficioso en *Eucalyptus* (Assis, citado por Torres et al., 1998).

- Ambiente de crecimiento de las plantas madres

En clones de *E. gunnii* x *E. globulus* de difícil enraizamiento (Boulay, citado por Torres et al., 1998), el mismo fue aumentado utilizándose partes aéreas etioladas (Torres et al., 1998).

Vieitez et al., citados por Torres et al. (1998) notaron que plantas creciendo en ambiente luminoso producirían dos compuestos derivados del ácido elálgico, que impiden la actividad rizogénica del ácido indol acético. Este compuesto no fue encontrado en plantas cultivadas en ausencia de luz o con una intensidad de luz reducida. El fotoperíodo es otro factor importante relacionado con el ambiente de las plantas dadoras de propágulos, por medio del cual la luz interfiere en el proceso de enraizamiento. En *E. grandis* condiciones de días cortos y noches frías fueron más favorables al enraizamiento de segmentos nodales *in vitro* (Durand-Cresswell et al., citados por Torres et al., 1998).

- Edad Fisiológica

En plantas difíciles de hacer enraizar, la edad de la planta madre puede ser un factor dominante en la formación (Hartmann y Kester, 2001).

Cualquier tratamiento que mantenga la fase juvenil de crecimiento será de valor para prevenir la declinación del potencial de enraizamiento a medida que envejecen las plantas madres. La relación de la juvenilidad con el crecimiento de las raíces tal vez se pueda explicar por el incremento en la formación de inhibidores de enraizamiento a medida que la planta se hace vieja. Las estacas de tallos tomadas de plántulas jóvenes de diversas especies de *Eucalyptus* enraízan con facilidad, pero a medida que envejece la planta madre, el enraíce disminuye en forma drástica (Hartmann y Kester, 2001).

En algunas especies, la inducción de brotes adventicios, puede por sí, constituir un método de rejuvenecimiento (Greenwood, citado por Torres et al., 1998). En árboles adultos de *E. grandis*, la utilización de brotes epicórmicos como fuente de explantos (Ykemori, citado por Torres et al., 1998) resultó en brotes con morfología foliar juvenil. El enraizamiento a partir de estos brotes fue obtenido en el décimo sub-cultivo, sugiriendo que el material inicial fue lo suficientemente rejuvenecido a juzgar por los índices de enraizamiento conseguido (75% a 80%) (Torres et al., 1998).

2.3.6. Experiencias en micropropagación *in vitro* en *Eucalyptus dunnii*

Un estudio realizado por Ballard y Lallana (2005) en el cual se seleccionaron brotes originados en 5 medios de multiplicación, se usó como medio para inducción de raíces el woody plant medium (WPM) a la mitad de la concentración, y dos tratamientos, uno sin el agregado de hormona y el otro con hormona (0,5mg/l de ácido indol butírico AIB). Con ninguno de ellos se logró el enraizamiento de los explantos *in vitro*.

En un trabajo realizado por Navroski (2011) de micropropagación de *Eucalyptus dunnii* en el cual evaluó diferentes concentraciones de AIB con el medio nutritivo Murashige y Skoog (MS) a la mitad de su concentración solidificado con agar no hubo formación de raíces.

Navroski (2011) además evaluó el enraizamiento de la especie en estudio en un medio que utilizaba como soporte vermiculita y adicionando medio nutritivo WPM a la mitad de su concentración. De un total de ciento cincuenta explantos colocados en estas condiciones solamente tres emitieron raíces, por lo que no fue posible la realización de un análisis estadístico.

2.4. MICROPROPAGACIÓN FOTOAUTOTRÓFICA

La micropropagación fotoautotrófica es un método de micropropagación libre de patógenos, utilizando un medio sin azúcar, donde la acumulación de hidratos de carbono depende de la fotosíntesis y de la absorción de nutrientes inorgánicos. Por lo tanto, también puede ser llamada micropropagación inorgánica, fotosintética, o sin azúcar en el medio de cultivo (Aitken-Christie et al., citados por Kozai et al., 2005).

Según Kozai y Xiao (2008), existen tres modos de crecimiento de las plantas *in vitro* en cuanto a su fuente de carbono y energía para el crecimiento vegetal:

- Crecimiento fotoautotrófico es la que depende por completo de la fotosíntesis de las plantas *in vitro*.
- Crecimiento heterótrofo es la que es totalmente dependiente de azúcar en el medio de cultivo.
- Crecimiento fotomixotrófico es la que depende tanto de la fotosíntesis como del azúcar en el medio de cultivo.

En la micropropagación convencional, al medio de cultivo se le añade hidratos de carbono en forma de azúcar y las plantas se ven obligadas a actuar ya sea heterotróficamente o fotomixotróficamente. La micropropagación fotoautotrófica se puede definir como la propagación *in vitro* de plantas sin la utilización de azúcar en el medio de cultivo, en el que el crecimiento o la acumulación de hidratos de carbono de las plantas *in vitro* depende por

completo de la fotosíntesis de las plántulas y la absorción de nutrientes inorgánicos (Zobayed et al., 2004).

2.4.1. Ventajas de la micropropagación fotoautotrófica

En relación al método convencional de micropropagación incluye:

- aumento del crecimiento de las plantas
- mejora del enraizamiento
- reducción del riesgo de contaminación microbiana en virtud de la remoción del azúcar del medio de cultivo
- mejora de las características fisiológicas de la planta debido a condiciones ambientales de cultivo que son más naturales
- reducción del stress de la planta durante la aclimatación
- aumento del porcentaje de sobrevivencia de los plantines

(Zobayed et al., Afreen et al., Kozai et al., citados por Cristiano y Wulff 2005, Kozai y Xiao 2008).

Una de las principales ventajas del sistema de micropropagación fotoautotrófica es que hace posible el uso de recipientes de cultivo de gran tamaño con el mínimo riesgo de contaminación microbiana (Aitken-Christie et al., citados por Zobayed et al. 2004, Kozai y Xiao 2008).

La humedad relativa se reduce al 85-90%, y la concentración de etileno es reducido a un nivel insignificante en un recipiente ventilado, de modo que la planta es casi climatizada *in vitro*. Bajo tales condiciones normales del medio ambiente y la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio de las plantas, son pocas las anomalías fisiológicas, morfológicas y fenotípicas que se

observan. Por lo tanto, la aclimatación *ex vitro* puede ser eliminada o simplificada con casi 100% de supervivencia *ex vitro* (Kozai y Xiao, 2008).

2.4.2. Mejoras en la ventilación

Al disminuir la concentración de azúcar y posibilitar que los explantos realicen fotosíntesis, se debe aumentar la concentración de CO₂ dentro del recipiente de cultivo. Para ello existen en la actualidad dos formas de incrementar la misma:

La ventilación natural se puede lograr uniendo discos de filtro gas permeable, ya sea en las paredes laterales o la tapa de la vasija (Kitaya et al., citados por Zobayed et al. 2004, Kozai y Xiao 2008). La ventilación forzada, se puede lograr mediante bombeo de una mezcla de gases (CO₂) en particular con una bomba de aire en el vaso a través de un disco de gas permeable con un filtro (Kozai y Xiao, 2008).

La tasa de ventilación forzada puede ser fácilmente controlada durante el proceso de producción mediante el uso de un controlador de flujo de aire, mientras que la tasa de ventilación natural es difícil de cambiar con el paso de los días. La tasa de ventilación de un recipiente de cultivo debe ser ajustado de acuerdo a la magnitud de las tasas netas de fotosíntesis de las plántulas cultivadas en el interior del recipiente, para la optimización de la parte aérea y por lo tanto la maximización del crecimiento (Kozai y Xiao, 2008). En la figura 2 se muestra el sistema de ventilación forzada.



Figura 2, Sistema de micropropagación fotoautotrófica en recipientes de gran tamaño con ventilación forzada, instalado para su comercialización en Kunming, provincia de Yunnann, China (Kozai y Xiao, 2008).

Un sistema de ventilación forzada, sería más adecuado que la ventilación natural, ya que en el primero se puede generar un suministro constante y cuantificable de la cantidad de gas que entra en el recipiente (Kozai y Xiao, 2008).

En condiciones fotoautotróficas especialmente bajo ventilación forzada, *in vitro* la tasa de transpiración puede aumentar debido a:

- i) la humedad relativa baja en el recipiente de cultivo,
- ii) mayor velocidad de la corriente de aire alrededor de la hoja y
- iii) los estomas son funcionales.

El aumento de la transpiración puede estimular el crecimiento de las plantas mediante la mejora del transporte acrópeto de los nutrientes disueltos y la evaporación estimula el desarrollo de precursores de la cera de la cutícula en la superficie de la hoja (Roberts et al., citados por Kozai et al., 2005).

En el sistema fotoautotrófico de cultivo con ventilación forzada, puede mejorar significativamente el desarrollo de los estomas y la funcionalidad de los mismos, la formación de grandes cantidades de cera epicuticular que contribuyen a un mejor control de la transpiración resultando en una menor pérdida de agua después del transplante *ex vitro*, lo que confiere una alta supervivencia porcentual con respecto al sistema convencional *in vitro* (Zobayed et al., citados por Kozai et al., 2005).

La tasa de transpiración es generalmente baja en las plántulas *in vitro* en el sistema convencional y por lo tanto la baja tasa de absorción de agua y de minerales son comunes. La exposición prolongada de las plántulas a una alta humedad relativa, una baja concentración de CO₂ y etileno acumulado en el espacio superior del recipiente de cultivo, a menudo causa la falta de desarrollo de la capa cuticular, o la falta de funcionalidad de los estomas para el control de la transpiración o la pérdida de agua de las plántulas en condiciones de humedad relativa alta (bajo déficit de presión de vapor). Ligeros cambios en el déficit de presión de vapor *in vitro* producen diferencias significativas en el crecimiento y la morfología de las plántulas (Kozai et al., 2005).

Muchos informes han demostrado que un sistema de micropropagación fotoautotrófico con ventilación forzada aumenta considerablemente el crecimiento de las plántulas en comparación con ventilación natural (Kozai y Xiao, 2008).

2.4.3. Sustratos

Otro factor importante es la utilización de sustratos alternativos al agar, tratando de aumentar la calidad de las raíces obtenidas y facilitar la aclimatación de las plantas bajo este sistema. El enraizamiento *in vitro* se ha mejorado sin reguladores de crecimiento de las plantas, por lo que en la etapa de enraizamiento pueden ser eliminados, especialmente cuando se utiliza medio poroso como Florialite® (Kozai y Xiao, 2000).

La calidad intrínseca de plantas, producidos *in vitro*, es uno de los factores claves que rigen el porcentaje de supervivencia durante la aclimatación en invernadero o en las condiciones de campo (Afreen et al., citados por Zobayed et al., 2004)

El sustrato de arraigo o el material de apoyo juega un papel vital en el proceso de micropropagación (Afreen et al., citados por Zobayed et al., 2004).

Hay evidencia de que las raíces que crecen en un medio con agar mostraron alteraciones estructurales de los tejidos (Kataoka, citado por Zobayed et al., 2004), a menudo carecían de pelos radiculares y murieron poco después del trasplante (Debergh y Maene, Afreen et al., citados por Zobayed et al., 2004).

La sustitución de gel de agar convencional por materiales porosos afecta significativamente al medio ambiente radical y por lo tanto a las características anatómicas de las raíces. Ejemplos de medios alternativos al agar son: vermiculita, Sorbarod ® (a base de celulosa) y Florialite ® (una mezcla de vermiculita y fibra de celulosa) (Afreen-Zobayed et al., 1999). El sistema de raíces desarrollado en Florialite ® con medio líquido tiene numerosas raíces

laterales, en comparación con los otros materiales de apoyo. El sistema radicular bien desarrollado ayuda a los nutrientes y la absorción de agua y promueve el crecimiento general de las plántulas (Afreen-Zobayed al., 1999).

Las plántulas que crecen en materiales porosos pueden sobrevivir bien en las condiciones ambientales *ex vitro*. Porcentajes altos de supervivencia de plántulas de *Eucalipto ex vitro* estuvieron altamente correlacionados con el desarrollo de las raíces, gracias a la mejora del medio ambiente de la zona radicular (Kozai et al., 2005).

Para el éxito de la micropropagación fotoautotrófica, la comprensión del medio ambiente *in vitro* y los conceptos básicos del control del mismo es fundamental. Para el cultivo de plantas fotoautotróficas, la promoción de la fotosíntesis es la principal forma de mejorar la tasa de crecimiento de las plántulas. Para promover la fotosíntesis *in vitro*, es necesario conocer el estado de las condiciones ambientales (por ejemplo, los niveles de la radiación fotosintéticamente activa y la concentración de dióxido de carbono (CO₂) en los vasos y la forma de mantener en rangos óptimos para la maximización de las tasas netas de fotosíntesis de las plántulas. El éxito de la micropropagación fotoautotrófica, también requiere un conocimiento de cuándo (o en qué etapa) los cultivos deben pasar de condiciones fotomixotróficas a fotoautotrófica. Para la micropropagación fotoautotrófica, el número de etapas podrá ser inferior a la micropropagación fotomixotrófica convencional, ya que la multiplicación y la etapa de enraizamiento se combinan a menudo como una etapa de micropropagación fotoautotrófica (Kozai et al., 2005).

Por lo tanto, en teoría, sólo la etapa de introducción/inicio del cultivo debe ser bajo condiciones heterotróficas/ fotomixotróficas donde virus (o patógenos), se establecen en los tejidos. Una vez que los órganos clorofílicos

se desarrollan son capaces de llevar a cabo la fotosíntesis, el cultivo está listo para pasar a las condiciones de micropropagación fotoautotrófica. La etapa de aclimatación a menudo se elimina, cuando las plántulas se cultivan en óptimas condiciones fotoautotróficas (Kozai y Kubota, 2001).

Como en cultivos hidropónicos, los medios utilizados en la micropropagación fotoautotrófica se componen exclusivamente de compuestos inorgánicos, vitaminas y reguladores de crecimiento. Gelificantes no se deben añadir al medio en la micropropagación fotoautotrófica en lugar de estos se debe emplear sustancias porosas como vermiculita como material de apoyo (Kozai y Kubota, 2001).

2.4.4. Antecedentes en micropropagación fotoautotrófica

2.4.4.1. En *Eucalyptus spp*

Las experiencias en micropropagación fotoautotrófica hasta el momento son escasas en el género *Eucalyptus*. Las mismas se han basado en estudios comparativos con el sistema convencional, en lo referente a anatomía y fisiología. Hasta el momento los resultados obtenidos han sido promisorios, pero son conclusiones primarias, evidenciando que es necesario ajustar las técnicas para que realmente sean viables a escala comercial. Para ello es necesario investigar en diferentes condiciones y con diferentes especies, ya que los protocolos de propagación no son totalmente extrapolables debido a que las realidades son diferentes en cada sitio donde se desee aplicar un protocolo. Para el caso del *E. dunnii* no se encontró bibliografía que haga referencia a empleo de esta técnica.

Zobayed et al. (2000) en un estudio comparativo entre micropropagación fotoautotrófica y convencional en *E. camaldulensis* mostraron que en el

tratamiento fotoautotrófico la tasa de fotosíntesis neta fue superior, el cierre y apertura de los estomas fue normal y el contenido de cera epicuticular de la hoja fue significativamente más alto que el control. El estudio anatómico demostró que el parénquima en empalizada se encontraba bien organizado. El tratamiento fotoautotrófico también permite la aclimatación *in vitro*, y después del trasplante *ex vitro*, la tasa de transpiración y la pérdida de agua en porcentaje fue menor que los del control y por lo tanto las plántulas *in vitro* fueron aclimatadas fácilmente *ex vitro*.

En un estudio realizado por Kozai y Kubota (2001) se cultivaron brotes de *E. camaldulensis* de 2,2cm de largo *in vitro* en condiciones fotoautotróficas en cajas tipo Magenta con un volumen de aire de 370ml que contenían diferentes tipos de materiales de apoyo (agar, Gelrite®, red de plástico o vermiculita) durante 6 semanas bajo condiciones no enriquecidas con CO₂ (400 pmol mol⁻¹ en la sala de cultivo) y en condiciones enriquecidas con CO₂ (1200pmol mol⁻¹ en el sala de cultivo). Se conectaron a los lados de las cajas filtro de discos gas permeable. Se observó en el caso de CO₂ enriquecido que aumentó significativamente el crecimiento (masa seca y el número de raíces primarias) de las plantas *in vitro* independientemente del tipo de material de apoyo. El crecimiento *in vitro* fue mayor en vermiculita, seguido por red de plástico, Gelrite®, y el agar (en orden descendente) esto se dio tanto en condiciones enriquecidas como no enriquecidas con CO₂ (Figura 3). El crecimiento de las plantas *ex vitro* fue mayor y el porcentaje de hojas y raíces dañadas fue menor en vermiculita en condiciones de CO₂ enriquecidos. Un extenso sistema radical con muchas raíces de segundo orden fue producido *in vitro* en vermiculita.

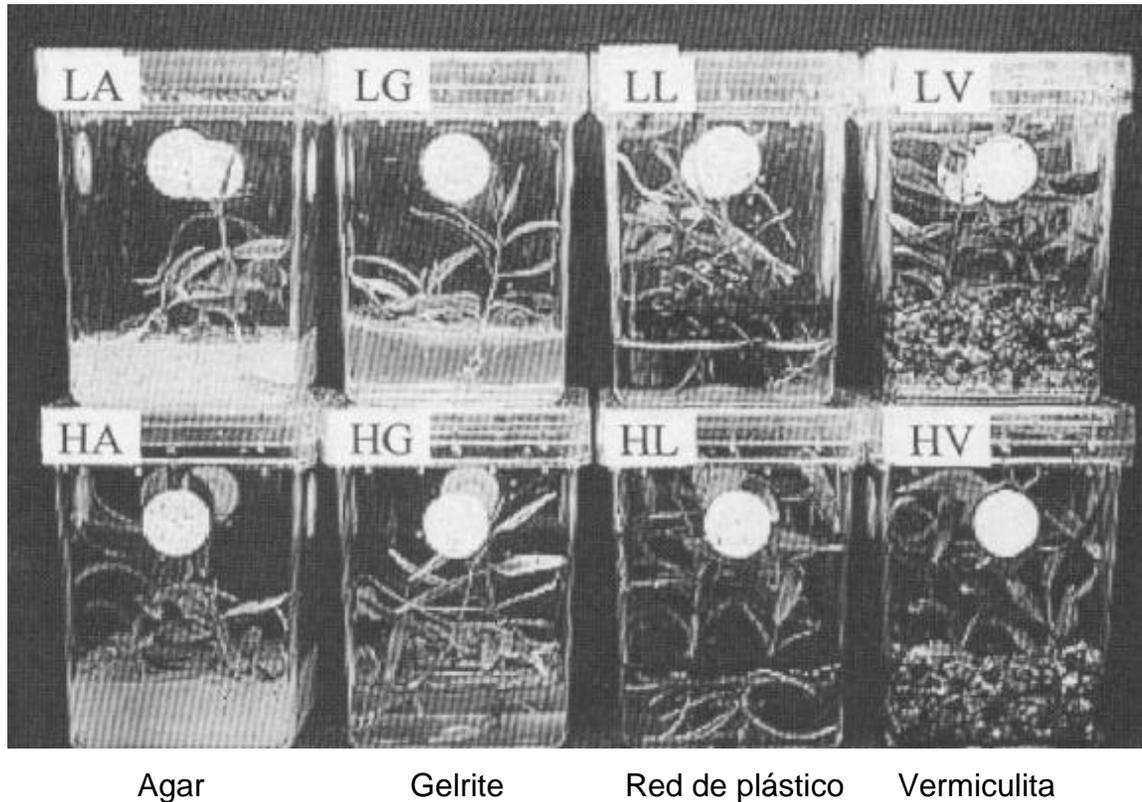


Figura 3, Plantas cultivadas de *E. camaldulensis*. Arriba condiciones no enriquecidas con CO₂. Abajo Condiciones enriquecidas con CO₂. En los diferentes materiales de apoyo (Kozai y Kubota, 2001).

2.4.4.2. En otras especies

Ejemplo de crecimiento en *Zantedeschia aethiopica* (Calas) utilizando el sistema fotoautotrófico.

El crecimiento de las plántulas de Cala en condiciones fotoautotróficas se comparó con el crecimiento en un medio convencional. El crecimiento en el día 15 en condiciones fotoautotróficas fue similar o mayor que el crecimiento en el día 30 en el sistema convencional. La mayoría de las plántulas en el día 15 en condiciones fotoautotróficas casi llegó a la superficie interna de la tapa del

recipiente (unos 15 cm de la superficie del medio), y la morfología y la calidad de las plántulas parecía adecuado para la aclimatación *ex vitro*, de acuerdo con la observación visual, como se ve en la figura 4:

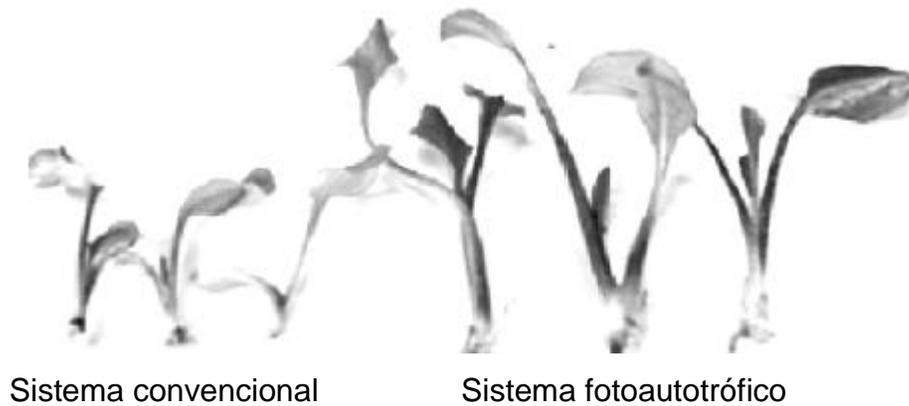


Figura 4: Crecimiento en el día 15 de plantas de cala (Kozai y Xiao, 2008).

El sistema fotoautotrófico acortó el período de multiplicación *in vitro*, así como redujo a la mitad el tiempo de emisión de las raíces (de 30 a 15 días), en comparación con el sistema convencional. El mayor crecimiento de las plántulas en el sistema fotoautotrófico que en el convencional se debió principalmente al aumento de la fotosíntesis y a la transpiración, en condiciones de alta concentración de CO_2 , a las mejoras en la circulación del aire, y la baja humedad relativa en el recipiente. Bajo tales condiciones ambientales, las plántulas se desarrollan fisiológica y morfológicamente con estomas normales. La humedad relativa baja, potencia la transpiración, y por lo tanto aumenta la absorción de nutrientes. Como el CO_2 es la única fuente de carbono en un sistema de micropropagación fotoautotrófico, la distribución relativamente uniforme de CO_2 , la concentración y la velocidad de la corriente de aire en el

espacio superior del recipiente de cultivo, son factores importantes para lograr un crecimiento uniforme de las plantas (Kozai y Xiao, 2000).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PRIMER ENSAYO: EFECTO DE DIFERENTES TIEMPOS DE DESINFECCIÓN

El material de partida para realizar el experimento, fueron plantas de semillas de *Eucalyptus dunnii* del vivero Mundial Forestación (Cerro Colorado, Florida), y plantas clonales de *Eucalyptus dunnii* donadas por la empresa Forestal Oriental S.A. totalizando 5 plantas del clon denominado “A” y 5 plantas del clon denominado “B” las cuales fueron trasladadas a Facultad de Agronomía (Figura 5). Tanto las plantas de semillas como los clones fueron acondicionadas en macetas de polietileno de dos litros, con sustrato comercial comprado en un vivero local de composición indefinida. Luego fueron colocadas en un invernadero con una malla de media sombra. Regándolas periódicamente según las necesidades del cultivo.



Figura 5: Clones “A” y “B”, ya acondicionadas. Fuente: elaboración propia.

En lo que respecta al tratamiento sanitario el material fue tratado con una solución fungicida a base de oxiclورو de cobre en intervalos de 15 días, pasando luego a un fungicida sistémico que tiene como principio activo “carbendazin” también a intervalos de 15 días y a una dosis de 10 ml por litro de agua. Las aplicaciones se realizaron debido a que se constató la presencia de manchas blancas en las superficies de las láminas de las hojas, reconocidas como el *Oidium leucoconium* “hongo oídio”. Con las sucesivas aplicaciones este hongo fue progresivamente desapareciendo.

Al principio se fertilizó con medio MS en forma líquida distribuyendo un litro cada 5 plantas, a intervalos de una semana entre aplicación. Luego se fertilizó con 15-15-15 a razón de 5 a 10 gramos por planta, diluido en agua destilada. Si coincidía la fertilización con la cosecha de brotes se esperaba 2 o 3 días para efectuar la misma luego de extraer los brotes.

Para realizar el ensayo, el material utilizado fueron brotes terminales con tres nudos de aproximadamente 3 cm de longitud, con dos a tres pares de hojas desarrolladas. Se mantuvo el mismo criterio de cosecha tanto para clones como para plantas de semillas. La cosecha del material se realizó en el horario de la mañana utilizando tijeras, tratando de dañar lo menos posible a la planta, a su vez de darle forma a la misma estimulándola a que desarrolle una brotación lateral abundante. Las tijeras, al pasar de planta en planta, fueron desinfectadas con alcohol para evitar la transmisión de enfermedades. Los brotes cosechados fueron colocados en recipientes con agua identificados con el nombre de cada clon o semilla respectivamente. Luego fueron trasladados al laboratorio de biotecnología de la Facultad de Agronomía donde se procedió a lavarlos con agua tibia y detergente doméstico. Luego del lavado se removió parte de la lámina de las hojas, se enjuagaron con abundante agua corriente y se colocaron nuevamente en recipientes con agua.

Posteriormente se procedió a trasladar el material a la cámara de flujo laminar donde se preparó la solución desinfectante, de hipoclorito de sodio al 33% con agua destilada y una gota de Tween 20.

Se procedió a introducir los explantos en la solución desinfectante para la evaluación de tiempos de desinfección (Figura 5), los cuales fueron de 10 y de 15 minutos. Luego de transcurrido dicho tiempo, se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Finalmente el material se introdujo en tubos de ensayo que contenían medio MS (Cuadro 1) a la mitad, sin hormonas, el pH del medio fue ajustado a 5,8 y esterilizado en autoclave a 121°C y 1,5 Kg.cm⁻² durante 20 minutos. Luego los mismos fueron colocados en una cámara de crecimiento de ambiente controlado, a una temperatura de 24 +/- 2°C con un fotoperíodo de 16 horas de luz (lámparas de luz blanca frías con una intensidad lumínica de 25 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Para definir el medio de introducción, fue necesario revisar bibliografía para la especie de interés, se concluyó a que el medio que en teoría presenta mejor respuesta es el medio basal Murashig Skoog a la mitad de su concentración adicionando 30 g por litro de sacarosa y solidificándolo con 7g por litro de agar.

Cuadro 1: Composición Medio Basal Murashig Skoog

Elementos Minerales	mg/l
Macro-elementos	
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
Micro-elementos	
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10,6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Hierro:	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
Vitaminas	
Tiamina	10
Acido Nicotínico	1
Piridoxina	1
Myoinositol	100

Fuente: George et al. (1987).

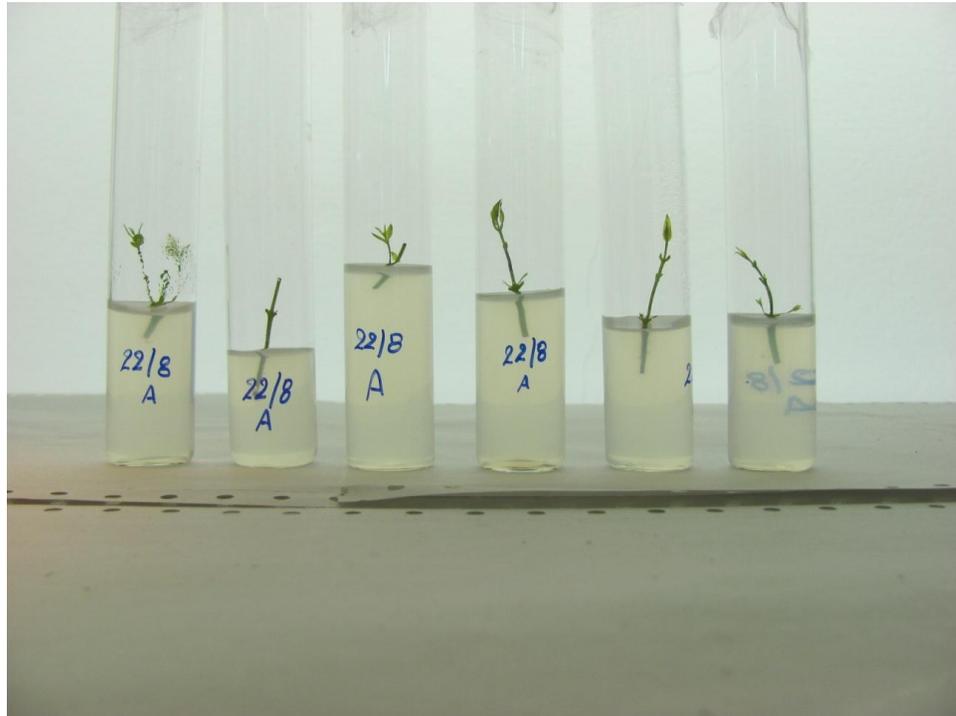


Figura 6: Clon "A", introducción. Fuente: elaboración propia

3.2. SEGUNDO ENSAYO: ENRAIZAMIENTO EN CONDICIONES FOTOAUTOTRÓFICAS

El ensayo fue instalado en el Laboratorio de micropropagación Dr. José García De León de la empresa Forestal Oriental S.A. en la ciudad de Paysandú.

Para la ejecución del experimento fue necesaria la definición de un diseño experimental acorde a los objetivos planteados. Según de Benítez et al. (2010) en la práctica forestal es de interés conocer la influencia de dos o más factores sobre una variable de respuesta. En el caso del experimento propuesto en la tesis lo que se estudió fue el comportamiento de dos clones de *E. dunnii* simultáneamente, con la influencia de distintos ambientes de crecimiento (aire

enriquecido con CO₂, y sin enriquecimiento) sobre las variables de respuesta, sobrevivencia, presencia y número de raíz. En estos casos según de Benítez et al. (2010) lo adecuado sería realizar un experimento factorial: esto significa que cada tratamiento estará definido por la combinación en este caso de los factores: clon y ambiente de crecimiento.

El diseño utilizado fue factorial con dos factores (tratamiento de CO₂ y material genético). Las medias de mínimos cuadrados estimadas fueron comparadas por prueba de probabilidad Tukey–Kramer (p<0,05).

La sobrevivencia de plantas y la presencia de raíces se analizaron mediante modelo lineal asumiendo distribución binomial (Proc Genmod, SAS v9.1).

$$\text{Ln} (y_{ij}/1 - y_{ij}) = \beta_0 + \tau_i + z_j + (\tau z)_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij} / 1 - y_{ij}$ = es el valor para la variable en estudio.

β_0 : intercepto.

τ_i : es el efecto del Tratamiento con CO₂ “i”, con i = 1, 2.

Z_j : es el efecto del Material genético “j”, con j = 1, 2

$(\tau z)_{ij}$: es el efecto de la interacción Tratamiento con CO₂ * Material genético

El número de raíces se analizó mediante modelo lineal asumiendo distribución poisson (Proc Genmod, SAS v9.1).

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + z_j + (\tau z)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

y_{ij} : es el valor para la variable en estudio con el efecto del Ambiente

μ : es el promedio poblacional de la variable respuesta.

τ_i : es el efecto del Tratamiento con CO₂ “i”, con i = 1, 2.

z_j : es el efecto del Material genético “j”, con j = 1, 2.

$(\tau z)_{ij}$: es el efecto de la interacción Tratamiento con CO₂ por Material genético.

ε_{ij} : es el error asociado a las unidades experimentales.

Por lo tanto se puede definir a los experimentos factoriales como aquellos en los que se comparan o estudian simultáneamente dos o más factores principales, incluyendo los diferentes niveles o modalidades de cada uno (de Benítez et al., 2010).

Para llevar a cabo el ensayo se utilizaron los clones “A” y “B” que ya se encontraban en condiciones de cultivo *in vitro* con sucesivos repiques en medio de multiplicación JADS, del orden de 15 a 16 repiques. El primer paso en la instalación fue acondicionar los explantos para la introducción en el sistema fotoautotrófico. Dicho acondicionamiento consistió en introducir un total de 160 explantos en un medio previamente preparado compuesto del medio JADS sin hormonas con 20 g/l de sacarosa y 2,5 g/l de carbono activado dispensado en bollones, el pH del medio fue ajustado a 5,8 y esterilizado en autoclave a 121°C

y $1,5 \text{ Kg.cm}^{-2}$ durante 20 minutos. Luego los mismos fueron colocados en una cámara de crecimiento de ambiente controlado, a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperíodo de 16 horas de luz (lámparas de luz blanca frías con una intensidad lumínica de $25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$); en cada bollón se instalaron de 2 a 3 explantos (Figura 7); el objetivo del pasaje del material por este medio es absorber el exceso de reguladores de crecimiento que fueron utilizados en el proceso de multiplicación. El tiempo durante el cual los explantos permanecieron en este medio fue de 16 días.



Figura 7: Explantos en medio con carbono activado. Fuente: elaboración propia

3.2.1. Preparación de los materiales para el ensayo de enraizamiento

Para llevar a cabo el experimento fue necesaria la construcción de los recipientes donde se colocaron los explantos, ya que al ser un sistema no tradicional de enraizamiento y aclimatación se utilizaron recipientes de mayor tamaño, con el fin de colocar un mayor número de explantos por depósito para

simular condiciones fotoautotróficas, donde se le incorpora la ventilación con aire enriquecido con CO₂, de esta forma se intentó estimular la fotosíntesis y apertura estomática con la idea de que el explanto comience a regular prematuramente su balance hídrico.

En la siguiente figura se muestra el esquema general de inyección de CO₂.

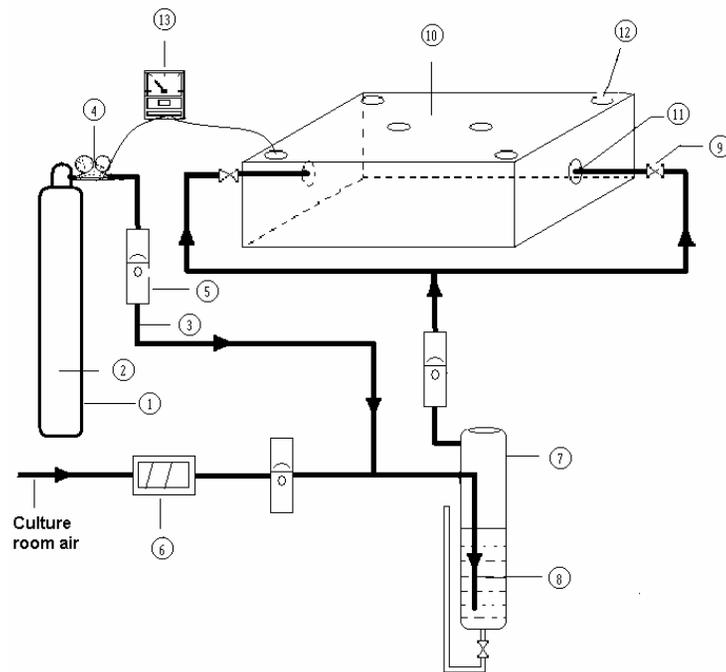


Figura 8. Diagrama esquemático de una unidad de ventilación forzada para CO₂ (Kozai et al., 2005).

Referencias

- 1- Tanque de CO₂
- 2- CO₂ puro
- 3- Tubería de gas
- 4- Regulador de presión de CO₂
- 5- Caudalímetro
- 6- Bomba de aire

- 7- Tanque de humificación y desinfección
- 8- Solución desinfectante
- 9- Válvula
- 10- Recipiente de cultivo
- 11- Orificio de entrada de aire al recipiente
- 12- Orificio de salida de aire del recipiente
- 13- Controlador de concentración de CO₂

El sistema de inyección aplicado en el experimento intenta generar una primera aproximación para adaptar el sistema fotoautotrófico a las condiciones locales.

3.2.2. Construcción de los recipientes de cultivo

Para tratar de obtener las condiciones antes mencionadas se fabricaron 4 recipientes de vidrio en forma de cajas con las siguientes dimensiones: ancho 20cm, largo 38cm y alto 16,5cm, las cuales constaban de una tapa superior también de vidrio removibles y ajustadas para evitar la pérdida de aire. Además fue necesario realizar orificios a ambos lados de los recipientes donde se colocó la entrada de aire enriquecido y en el lado opuesto la salida de aire. Tanto en el orificio de entrada como en el de salida se colocaron filtros de papel (modelo Midisart® 2000 0,20µm PTFE in Startorius) para evitar la contaminación microbiana (Figura 9).



Figura 9. Entrada de aire y filtros. Fuente: elaboración propia.

3.2.3. Descripción del sistema de inyección de aire enriquecido con CO₂

Para llevar a cabo el montaje del sistema fueron necesarios los siguientes implementos: tanque de dióxido de carbono con una concentración de 600ppm de CO₂ diluido en Nitrógeno, un regulador de presión del tanque y flujo de salida de gas, un caudalímetro para medir los litros/hora de gas que pasaron a los recipientes, mangueras, conexiones varias y filtros de papel.

En la figura 10 se muestra en detalle el sistema de inyección de CO₂



Figura 10: Imagen general del sistema. Fuente: elaboración propia.

Regulador de presión

Los reguladores o reductores de presión son equipos que controlan el flujo de gas, la función es mantener una presión constante de salida. En este caso se usó un regulador de oxígeno que es totalmente compatible para el caso del CO₂ (Figura 11). Consta de 2 manómetros, uno de éstos mide la presión del tanque o fuente de gas, en el otro por medio de una llave de pasaje se controla la presión de inyección. En el caso del ensayo la presión se ajustó en 2 bares de salida.



Figura 11: Regulador de presión. Fuente: elaboración propia.

Caudalímetro de gas

Es un instrumento que mide el flujo de gas o caudal que pasa por una cañería en un determinado tiempo, nos da una media del gasto de gas que circula (Figura 12). Para llevar a cabo el experimento el caudal fijado fueron 0,9 litros / min, durante 25 min lo que daba un total de 22,5 litros de gas.

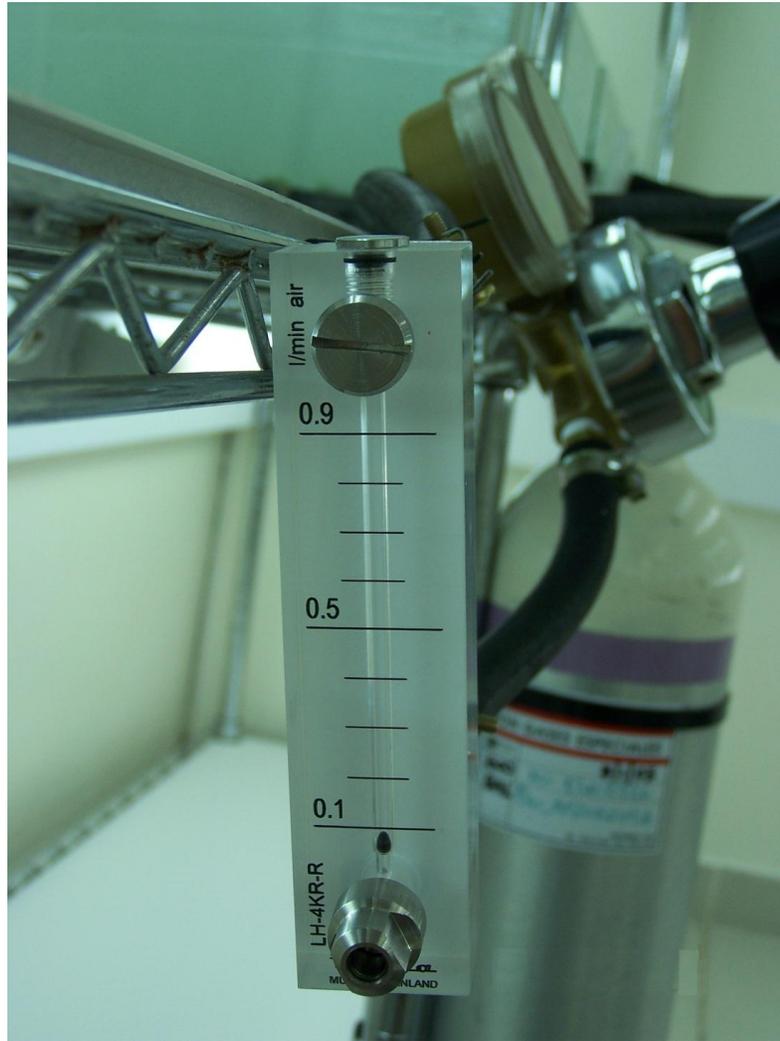


Figura 12: Caudalímetro de gas. Fuente: elaboración propia.

3.2.4. Procedimiento de instalación del cultivo

Luego del pasaje por el medio con carbón, se procedió a instalar el ensayo de enraizamiento el cuál duró treinta días.

El primer paso para la instalación del ensayo fue desinfectar las cuatro cajas con hipoclorito de sodio comercial al cincuenta por ciento y luego con alcohol 70%, con lo cual se pretendía remover los microorganismos de la superficie del recipiente. Este procedimiento se realizó sobre una mesada y en condiciones no asépticas. En cada una de las cajas fue colocada una almaciguera con una capacidad de 40 explantos, las cuales fueron desinfectadas con el procedimiento anterior y colocadas dentro de las cajas.

Como medio de soporte se utilizó Vermiculita la cual fue colocada en bollones regadas hasta saturarla con medio JADS y autoclavada siguiendo el procedimiento tradicional. Luego fue dispensada a la almaciguera previo a la plantación. Posteriormente se procedió a la plantación la cual se realizó encima de una mesada en condiciones no estériles. Se extrajo el material que se encontraba en los bollones con carbono activado, se removieron los restos de agar y se podaron algunas hojas, plantándolos finalmente en la vermiculita.

La plantación se efectuó respetando el diseño experimental (Parcelas apareadas); cada caja tenía 20 individuos del clon "A" y 20 individuos del clon "B", distribuidos en hilera de forma intercalada entre clones (Ver figura 13). La inyección del CO₂ fue suministrada a dos de los recipientes de cultivo, y las restantes fueron el testigo sin suministro de CO₂. El gas fue suministrado por las mañanas alrededor de la hora 8 am, con un caudal de 0.9 L/min, durante 25 min durante todos los días mientras duró el ensayo. Cada recipiente de cultivo poseía un volumen de 11,5l.

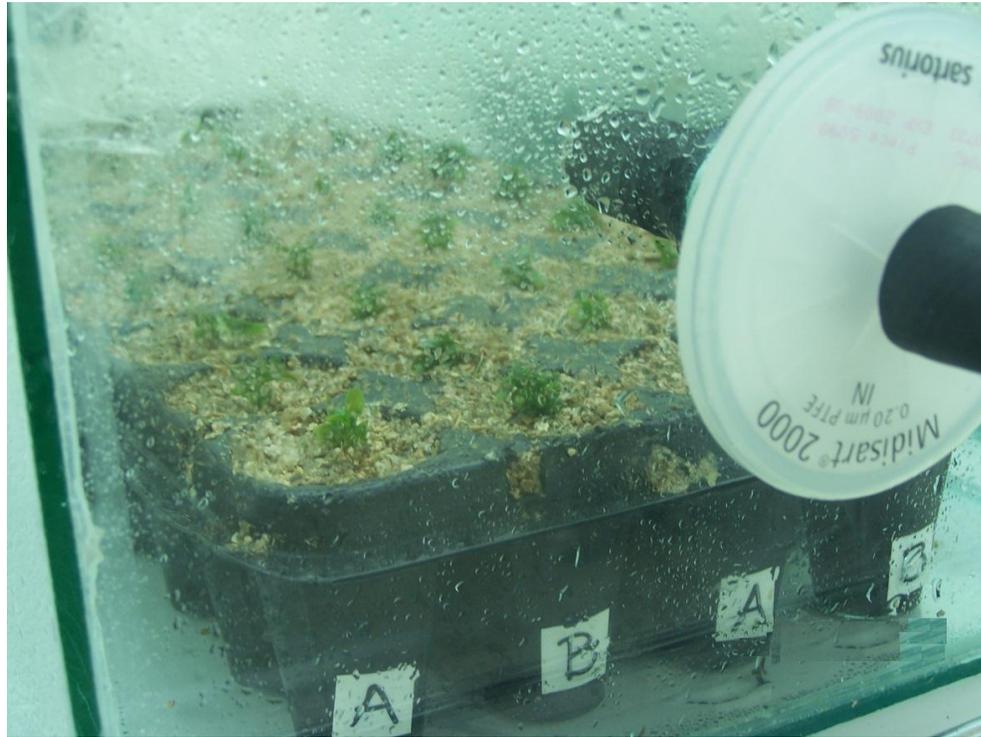


Figura 13: Clones recién plantados, respetando el diseño experimental. Fuente: elaboración propia.

Aplicaciones de productos

Durante el ensayo fue necesaria la aplicación de productos fungicidas debido a los severos ataques de hongos, principalmente *Botrytis cinerea* “botritis” o “moho gris”. Las aplicaciones fueron a intervalos de una semana con el producto comercial “Previcur” a una dosis de un gramo por litro de producto. Las aplicaciones fueron efectuadas cada cinco días aproximadamente según el avance de la enfermedad. Se pudo controlar parte del daño ocasionado pero de todas maneras la mortandad de los explantos fue importante.

Fertilización

La fertilización se llevó a cabo mediante la aplicación en forma de pulverización del medio JADS que se preparó solo con las sales y fue autoclavado. El suministro fue según las necesidades de humedad del cultivo.

El ensayo culminó luego de haber transcurrido un mes en condiciones fotoautotróficas. Ese día se procedió a desarmar el sistema y contabilizar las variables determinadas en el diseño estadístico.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a que el sistema utilizado en la fase de enraizamiento se trata de un sistema totalmente nuevo de inyección de CO₂ en cultivos *in vitro* y utilización de un sustrato alternativo al agar, sin antecedentes para el país y para la especie, se buscó generar una primera aproximación para comenzar a adaptar la técnica a nuestras condiciones y a dos clones de la especie en estudio, pudiendo en un futuro evaluarse a una mayor escala. Por lo tanto si bien los resultados de los análisis estadísticos o cuantitativos son fundamentales en un estudio de investigación, tomó bastante importancia el análisis cualitativo del ensayo.

Son conocidas las limitantes que presenta *Eucalyptus dunnii* en cuanto a la propagación, tanto sexual como asexual. Por este motivo cualquier avance que se genere para tratar de superar estas limitantes es considerado de suma importancia para el sector forestal.

El objetivo de este trabajo fue generar un protocolo para el enraizamiento en condiciones fotoautotróficas con la idea de superar limitantes que presenta el cultivo *in vitro* tradicional en la etapa de enraizamiento y aclimatación de los explantos. Además se evaluaron dos tiempos de desinfección con el objetivo de realizar una primera aproximación y generar un antecedente de este tipo para Uruguay.

4.1. EFECTOS DE DIFERENTES TIEMPOS DE DESINFECCIÓN

En los ensayos realizados con los tiempos de desinfección se pretendió ajustar un protocolo para cada material, variando el tiempo de inmersión y manteniendo la concentración del producto desinfectante. Se observaron diferentes respuestas en los distintos materiales evaluados (ver cuadro No. 2).

Cuadro No. 2. Resultados tiempos de desinfección.

Material vegetal	Tratamiento	No. Explantos iniciales	No. explantos contaminados	Porcentaje contaminación (%)
Plantas de semilla	10'	90	56	62,22
	15'	90	43	47,78
Clon A	10'	90	67	74,44
	15'	90	60	66,67
Clon B	10'	100	11	11,00
	15'	100	5	5,00

El mayor porcentaje de contaminación en promedio se obtuvo en el clon denominado "A". En el mismo se registró un 74,44% de material contaminado para el tiempo de desinfección de 10 minutos. Esta tendencia mejoró cuando se aumentó el tiempo a 15 minutos, registrándose un valor de 66,67% de material contaminado en promedio (ver cuadro No. 2).

El material de semilla también fue severamente afectado por agentes contaminantes, obteniéndose para el tiempo de 10 minutos un 62,22% del material contaminado. Para el tiempo de 15 minutos se registró un 47,78% del material contaminado, evidenciando que al aumentar el tiempo de desinfección se logró disminuir la contaminación de los explantos.

En el caso del clon B, para los dos tratamientos se observó un bajo porcentaje de contaminación, 11% y 5 % para 10 y 15 minutos de tiempo de inmersión respectivamente.

Es de esperar que las características de los explantos sean determinantes en la elección de los desinfectantes, la concentración y el tiempo

de desinfección. Como se ve en los resultados, para una misma especie utilizando el mismo desinfectante, los mismos fueron muy diferentes, ya que en el caso del clon "A" la contaminación fue muy elevada para los dos tratamientos (10 y 15 minutos) superando el 65% de contaminación.

Sin embargo en el clon "B" los resultados fueron totalmente opuestos, ya que la contaminación en ambos tratamientos apenas alcanzó el 11%. En los explantos provenientes de semilla, se vio una respuesta al tiempo de desinfección más marcada que en los clones, ya que los explantos inmersos en la solución desinfectante durante 10 minutos tuvieron una contaminación que en el entorno del 60%, y cuando el tiempo se aumentó a 15 minutos la misma se redujo a un 48%.

Se evidencia una clon dependencia para cada tratamiento y un efecto intermedio para el caso del material de semilla debido a la variabilidad genotípica. Estos resultados demuestran que se debe hacer un estudio minucioso de cada clon en cada etapa si se pretende obtener una buena respuesta en cultivos *in vitro*. Esto sucede con más frecuencia en laboratorios comerciales donde por razones de practicidad se tratan a todos los materiales con un mismo tratamiento de desinfección generando pérdidas en los rendimientos no por el material sino por desajustes en las técnicas aplicadas.

4.2. SEGUNDO ENSAYO: ENRAIZAMIENTO EN CONDICIONES FOTOAUTOTRÓFICAS

El objetivo de este ensayo fue evaluar el comportamiento de dos clones de *Eucalyptus dunnii* (Clon denominado “A” y Clon denominado “B”) en la etapa de enraizamiento y aclimatación en dos condiciones; aire enriquecido con CO₂ y sin enriquecimiento con CO₂. Las variables analizadas fueron: sobrevivencia, presencia/ausencia de raíces y número de raíces.

4.2.1. Análisis estadístico y descriptivo de sobrevivencia

El ensayo constó de dos tratamientos, aire enriquecido con CO₂ y sin enriquecimiento de CO₂. Cada tratamiento constaba de un total de 80 explantos (40 explantos de cada Clon).

Cuadro No. 3. Porcentaje de sobrevivencia

Sobrevivencia	No. explantos
Total observaciones	160
Total de explantos	58
% sobrevivencia total	36,25

El primer dato que fue necesario analizar fue la sobrevivencia, ya que en las condiciones que fue montado el ensayo fue una limitante severa. De un total de 160 explantos introducidos en el ensayo 58 sobrevivieron, lo cual representa un alto porcentaje de contaminación (ver cuadro No. 3). Esto se puede deber en primera instancia a que la instalación del ensayo no se realizó en cámara de flujo laminar. Otro factor importante es que los explantos estaban compartiendo

un mismo ambiente de cultivo, lo que llevó a que la diseminación de las enfermedades se propagara con gran rapidez, teniendo en cuenta que los tratamientos con fungicidas no tuvieron el efecto esperado. Según el diseño estadístico ambos clones tenían que compartir un mismo ambiente de cultivo, y al ser un clon más propenso al ataque de enfermedades el contagio al otro clon fue notorio.

Cuadro No. 4. Sobrevivencia. Analizada con distribución binomial.

Fuente	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Rep	1	155	6,61	0,0111
Trata	1	155	18,29	<,0001
Clon	1	155	30,57	<,0001
Trata*Clon	1	155	7,37	0,0074

En el cuadro anterior se observa que existe un efecto significativo de los tratamientos y de los clones.

Por lo tanto se concluye que no existió un comportamiento superior de un clon en un determinado tratamiento. Se observa claramente que hay un efecto denominado "Clon". En ambos tratamientos el clon "A", fue el que presentó menor porcentaje de sobrevivencia.

Cuadro No. 5. Porcentaje de sobrevivencia según tratamiento y clon

Tratamiento	Clon	Total	Plantas vivas	% sobrevivencia
Enriquecido con CO ₂	A	40	5	12,5
	B	40	11	27,5
Sin enriquecimiento de CO ₂	A	40	8	20
	B	40	34	85

Los menores porcentajes de sobrevivencia tanto para el clon “A” como para el clon “B” se observaron en el ambiente enriquecido con CO₂ (ver cuadro No. 5).

4.2.2. Análisis estadístico y descriptivo de enraizamiento

En cuanto al enraizamiento las observaciones se corresponden con el total de plantas que sobrevivieron (58), de las cuales 25 emitieron raíces, llegando a un 43,86% de enraizamiento (ver cuadro No. 6).

Cuadro No. 6. Porcentaje de enraizamiento

Total observaciones	58
Total de plantas con raíces	25
% con raíces	43,86

En el cuadro No. 7 se observa que no hay interacción significativa entre tratamiento y clon. Solo hay efecto significativo del “Clon” y no de los tratamientos.

Cuadro No. 7. Enraizamiento analizado con distribución binomial

Fuente	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Rep	1	53	0,9	0,3466
Trata	1	53	0,04	0,8456
Clon	1	53	8,69	0,0047

Como se observa en el cuadro No. 8 existe una marcada diferencia entre clones en el enraizamiento.

Cuadro No. 8. Efecto Clon en el enraizamiento

Clon	Estimar	Error estándar	Letter Group
“B”	0,5424	0,1088	a
“A”	0,0683	0,0856	b

En cuanto al enraizamiento, se observó un mayor porcentaje en el tratamiento enriquecido con CO₂ (ver cuadro No. 9). Una posible explicación sería que al incrementarse la concentración de CO₂ en el recipiente se estimuló la fotosíntesis, provocando un aumento de los azúcares disponibles necesarios para la iniciación y desarrollo de las raíces, aunque los datos del análisis estadístico muestran que no hubo diferencias significativas, si se pudo constatar que existe un efecto “Clon” al igual que al estudiar la sobrevivencia.

Esto concuerda con lo expresado por Torres et al. (1998) quienes enuncian que existen varias evidencias de que la formación de raíces adventicias en los segmentos del tallo es genéticamente controlada. La gran variación observada entre especies, cultivares y clones en relación a la mayor o menor habilidad natural de formación de raíces ha demostrado la importancia de los factores genéticos en el enraizamiento.

Si bien surgen estos datos del análisis, hay que tener en cuenta que el material de partida fue disminuyendo por consecuencia de la grave contaminación. Al momento de evaluar el enraizamiento no se consideró el total de explantos iniciales, sino los que sobrevivieron. Como ya se mencionó el más afectado fue el tratamiento enriquecido con CO₂, siendo 16 explantos evaluados en este tratamiento y 32 los evaluados en el tratamiento sin enriquecimiento. Esto puede llevar a que se genere una comparación errónea, que subestime o sobreestime algún tratamiento.

Cuadro No. 9. Porcentaje de enraizamiento discriminado por tratamiento

Tratamiento	n	con raíces	% con raíces
Enriquecido con CO ₂	15	7	46,7
Sin enriquecimiento de CO ₂	42	18	42,9

Al discriminar por clon y por tratamiento se observa que se mantiene la misma tendencia ya mencionada del efecto Clon (en ambos tratamientos el mayor porcentaje de enraizamiento lo obtuvo el clon “B”), y a su vez se ve un efecto del tratamiento, esto se observa en el cuadro No. 10.

Cuadro No. 10. Porcentaje de enraizamiento por tratamiento y por clon

Tratamiento	Clon	N inicial	con raíces	% con raíces
Enriquecido con CO ₂	A	5	0,0	0,0
	B	10	7,0	70,0
Sin enriquecimiento de CO ₂	A	8	1,0	12,5
	B	34	17,0	50,0

En la figura No. 14 se muestran algunas plantas de las que emitieron raíces.



Figura 14. Clon B, con raíces, el día de finalización del ensayo, tratamiento sin CO₂.

En la bibliografía consultada no se encontraron estudios de enraizamiento en condiciones fotoautotróficas para la especie *E. dunnii*. Los datos que surgen como comparativos son los expresados por Billard y Lallana (2005) con un protocolo de multiplicación y enraizamiento en micropropagación convencional para *E. dunnii*. Partieron de 333 segmentos uninodales, a los 12 días de cultivo el 52% (176 explantos) sobrevivió. Luego de la fase de multiplicación sobrevivieron 41 brotes, de los cuales ninguno emitió raíz, obteniendo un 0% de enraizamiento.

En un trabajo realizado por Navroski (2011) de micropropagación de *Eucalyptus dunnii* en el cual evaluó diferentes concentraciones de AIB con el medio nutritivo MS a la mitad de su concentración solidificado con agar, no hubo formación de raíces. Además evaluó el enraizamiento de la especie en estudio en un medio que utilizaba como soporte vermiculita y adicionando medio nutritivo WPM a la mitad de su concentración. De un total de 150 explantos colocados en estas condiciones solamente 3 emitieron raíces, por lo que no fue posible la realización de un análisis estadístico.

En el caso del experimento realizado en la tesis se partió de 160 explantos que estaban en medio de multiplicación, de estos sobrevivieron 58 (36,25%) y emitieron raíces 25 lo cual representa un 43,86% de enraizamiento. Comparando los resultados obtenidos con los citados en bibliografía se observa una mejora en el enraizamiento. Debido a estos resultados sería conveniente seguir investigando en el ajuste de ésta técnica.

Al trabajar con diferentes genotipos se observa que si se aplican las mismas condiciones de enraizamiento van a responder de manera diferente. Por lo tanto es clave identificar claramente las condiciones de cultivo y si algo salió bien tratar de imitar esas condiciones para futuros ensayos. Una de las

alternativas será tratar de identificar grupos de clones que respondan a las mismas condiciones y tratarlos por igual, ya que si se generaliza el cultivo por razones operativas se cometen errores que repercuten en el resultado final.

5. CONCLUSIONES

Se evaluó un nuevo sistema de enraizamiento de cultivos *in vitro* en condiciones fotoautotróficas para los clones en estudio de *Eucalyptus dunnii*. Los resultados obtenidos en el ensayo de enraizamiento muestran que esta técnica es promisoría en comparación con la bibliografía consultada. Sería bueno continuar con futuras investigaciones hasta llegar a un ajuste óptimo. Lo que se tiene que rever es tratar de bajar la contaminación microbiana dentro de los recipientes de cultivo, ya que fue una de las limitantes más severas de este trabajo. A pesar de no encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos con CO₂ y sin CO₂, se observó una tendencia a un mayor porcentaje de enraizamiento en el tratamiento con inyección de CO₂.

Con respecto al ensayo de contaminación se logró ajustar un protocolo de desinfección del material vegetal. Con 15 minutos de inmersión en una solución de Hipoclorito de Sodio al 33%, se logró en el mejor de los casos cero explantos contaminados. Se pudo constatar que existe un marcado efecto clon en cuanto a susceptibilidad a la contaminación. El que presentó menor porcentaje de contaminación fue el clon "B" luego seguido por las plantas de semilla y por último el clon denominado "A" el cual presentó la mayor sensibilidad en cuanto a la contaminación.

A pesar de que *Eucalyptus dunnii* se considera una especie recalcitrante, si se manejan con precisión las técnicas, modificando las condiciones del ambiente de cultivo en la fase de enraizamiento, se pueden obtener buenos resultados en pequeña escala, que con trabajo e investigación se pueden llevar a un nivel de producción comercial (vivero), sobre todo en sistemas de inyección de CO₂ en casas de propagación.

6. RESUMEN

Eucalyptus dunnii es una especie que se ha tornado de gran importancia en la producción de pulpa de celulosa en Uruguay debido a su adaptación a las condiciones edafo-climáticas con especial énfasis en tolerancia a las heladas. Esto ha permitido aumentar el aprovechamiento de los campos forestales pudiendo plantar en terrenos donde otras especies de *Eucalyptus* hasta el momento no prosperaron. El objetivo de este trabajo fue evaluar un nuevo sistema de enraizamiento en condiciones fotoautotróficas. El material utilizado fueron plantas de *E. dunnii* provenientes de reproducción seminal donadas por la empresa Mundial Forestación S.A. y clones de la misma especie donadas por la empresa Forestal Oriental S.A. El experimento central consistió en evaluar el enraizamiento de explantos de *Eucalyptus dunnii* en condiciones fotoautotróficas, siendo esto un método de micropropagación libre de patógenos, utilizando un medio sin azúcar, en el cual la acumulación de hidratos de carbono depende de la fotosíntesis y de la absorción de nutrientes inorgánicos. Para esto se diseñó un sistema de enraizamiento que consistió en utilizar recipientes de mayor tamaño, con sustrato compuesto por vemiculita alternativo al medio con agar, un medio de cultivo sin azúcar, y aplicándole ventilación forzada con aire enriquecido y ventilación natural mediante filtros. Teniendo en cuenta que *E. dunnii* es una especie recalcitrante en cuanto al enraizamiento, se buscó una alternativa de propagación vegetativa, con el fin de levantar ciertas limitantes que presenta el cultivo *in vitro* tradicional. Se logró una introducción satisfactoria con el tiempo de inmersión de 15 minutos para todos los genotipos evaluados, además de encontrar un gran efecto clon, siendo un genotipo más propenso al ataque microbiano que el otro. Con respecto al enraizamiento se evidenció el mismo efecto clon, al generarse un enraizamiento diferencial entre clones. A pesar de la severa contaminación se logró un porcentaje de enraizamiento de 43,86%; el tratamiento con inyección

de CO₂ presentó una tendencia a un mayor enraizamiento aunque no presentaron diferencias significativas. Se considera por los datos preliminares obtenidos en el ensayo que se debería mejorar el control de la contaminación para poder generar datos que permitan una comparación más objetiva.

Palabras clave: *Eucalyptus dunnii*; Micropropagación; Micropropagación fotoautotrófica; Inyección de CO₂.

7. SUMMARY

Eucalyptus dunnii has become a species of great importance for pulp production in Uruguay. It adapts well to soil and climate conditions, and exhibits frost tolerance, making it possible to plant where other *Eucalyptus* species do not prosper successfully. Our objective was to assess a new rooting system in photoautotrophic conditions. As source of explants we used *E. dunnii* seedlings (Mundial Forestación S.A donation) and clones (Forestal Oriental S.A donation). In photoautotrophic rooting, a system without sugar in the culture medium, carbohydrates accumulation depends on photosynthesis and mineral nutrients acquisition. We designed a rooting system in larger containers, vermiculite as an alternative to agar, without sugar and forced ventilation with CO₂-enriched air. Considering that *E. dunnii* is a species which shows rooting recalcitrance, we tried to develop an alternative vegetative propagation system to overcome the limitations of traditional micropropagation. In the introduction step we were able to reduce contamination with a 15'-immersion in sodium hypochlorite solution, finding a strong clon-dependent effect. Despite the strong contamination, 43,86% rooting was achieved. Although a trend was observed towards enhanced rooting in explants from CO₂-enriched air treatment, no significant differences were found. These preliminary data suggest that efforts should be made in order to reduce contamination so that more data could be obtained and objectively compared.

Keywords: *Eucalyptus dunnii*; Micropropagation; Photoautotrophic
Micropropagation; CO₂ injection.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. AHUJA, M.R. 1993. Micropropagation of woody plants. Dordrecht, Kluwer. 507 p.
2. ARGENTINA. INTA CASTELAR. s.f. Selección de huertos semilleros mediante la aplicación de marcadores moleculares. (en línea). IDIA XXI: 215-221. Consultado 17 oct. 2011. Disponible en <http://www.biblioteca.org.ar/libros/210593.pdf>
3. AZCÓN-BIETO, J.; TALÓN, M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. 2^a ed. Madrid, Interamericana-McGraw-Hill. 522 p.
4. BILLARD, C.; LALLANA, V. 2005. Multiplicación in vitro de *Eucalyptus Dunnii* (en línea). Ciencia, Docencia y Tecnología. 16 (30): 199-216. Consultado 6 mar. 2012. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/145/14503008.pdf>
5. BRUSSA, C. A. 1994. *Eucalyptus*. Montevideo, Hemisferio Sur. 328 p.
6. CRISTIANO, A.; WULFF, M. 2005. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. (en línea). Ciencia Rural. 35: 961-965. Consultado 14 oct. 2011. Disponible en <http://www.scielo.br/pdf/%0D/cr/v35n4/a39v35n4.pdf>
7. DE BENÍTEZ, C.; PECE, M.; DE GALINDEZ, M. 2010. Análisis de la variancia en experimentos factoriales. (en línea). s.l., Universidad Nacional de Santiago del Estero. 46 p. (Serie didáctica no. 21). Consultado 10 mar. 2012. Disponible en <http://fcf.unse.edu.ar/archivos/series-didacticas/sd-21-estadistica.pdf>
8. GEORGE, E.; PUTTOCK, D.J.M.; GEORGE, H.J.1987. Plant culture media. Westbury, Exegetics. v.1, 567 p.
9. _____; HALL, M.; DE KLERK, G. 2010. Plant propagation by tissue culture. 3rd ed. Amsterdam, Springer. 501 p.
10. GRAVINA, A.; MAJOR, G.; PIESTUN, D. s.f. Introducción al cultivo de tejidos vegetales "In Vitro". Montevideo, Facultad de Agronomía. 33 p.

11. HARTMANN, H.; KESTER, D. 2001. Propagación de plantas; principios y prácticas. México, Compañía Editorial Continental. 759 p.
12. JOVANOVIĆ, T.; ARNOLD, R.; BOOTH, T. 2000. Determining the climatic suitability of *Eucalyptus dunnii* for plantations in Australia, China and Central and South America (en línea). *New Forests*. 19: 215-226. Consultado 8 ago. 2011. Disponible en <http://www.springerlink.com/content/v2106w03882v3709/>
13. KOZAI, T.; KUBOTA, C. 2001. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. (en línea). *Journal of Plant Research*. 114: 525-537. Consultado 15 nov. 2011. Disponible en <http://www.springerlink.com.proxy.timbo.org.uy:443/content/9fggyvypvhqmbc1d/>
14. _____; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. 2005. Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. Dordrecht, Springer. 314 p.
15. _____; XIAO, Y. 2008. A commercialized photoautotrophic micropropagation system. (en línea). *Plant Tissue Culture Engineering*. 6: 355-371. Consultado 20 oct. 2011. Disponible en <http://www.springerlink.com.proxy.timbo.org.uy:443/content/h225327565012051/>
16. MARGARA, J. 1982. Bases de la multiplicación vegetativa, los meristemos y el organogénesis. París, INRA. 262 p.
17. NAVROSKI, M.C. 2011. Multiplicação in vitro de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden. Mestre em Engenharia Florestal. Tesis Ing. Agr. Santa María, RS, Brasil. Universidade Federal de Santa Maria. 101 p.
18. PIERIK, R.L.M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid, Mundi-Prensa. 326 p.
19. ROCA, W.; MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. fundamentos y aplicaciones. Colombia, CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 969 p.

20. TORRES, A.; CALDAS, L.; BUSO, J. 1998. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, D.F., Serviço de Produção de Informação-SPI. 509 p.
21. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN GENERAL FORESTAL. s.f. Recurso forestal. Planilla electrónica Eucalyptus. Bosques plantados registrados. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado 16 mar. 2012. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,20,441,O,S,0,MNU;E:134;2;MNU>
22. XIAO, Y.; KOZAI, T. 2004. Commercial application of a photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation; plantlet growth and production cost. (en línea). HortScience. 39(6): 1387-1391. Consultado 16 dic. 2011. Disponible en <http://hortsci.ashspublications.org/content/39/6/1387.full.pdf>
23. ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN, F. KOZAI, T. 2001. Physiology of eucalyptus plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. (en línea). In Vitro Cell Development Biology Plant. 37: 807-813. Consultado 8 nov. 2011. Disponible en <http://www.springerlink.com.proxy.timbo.org.uy:443/content/3885q41u10007x34/>
24. _____.; _____.; XIAO, Y. 2004. Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. (en línea). In Vitro Cell Development Biology Plant. 40: 450-458. Consultado 20 oct. 2011. Disponible en <http://www.springerlink.com.proxy.timbo.org.uy:443/content/w516hpq773317g66/>
25. ZOBEL, B.; TALBERT, J. 1992. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. México, Limusa. 545 p.