

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE METATOPOLINA EN MICROPROPAGACIÓN DE
GENOTIPOS DE *EUCALYPTUS GLOBULUS*

por

Facundo ESQUIVEL BOSCHI

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

MONTEVIDEO
URUGUAY
2022

Tesis aprobada por:

Director: -----

Ing. Agr. Dra. Alicia Castillo

Ing. Agr, MSc. Silvia Ross

Ing. Agr. PhD. Marco Dalla Rizza

Fecha: 12 de agosto de 2022

Autor: -----

Facundo Esquivel Boschi

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mi tutora Alicia Castillo, por haber aceptado este desafío y por su dedicación. Siendo un punto de referencia muy importante para todo el proceso.

Al INIA, en especial a Marco Dalla Rizza, por guiarme en el proceso de la tesis, y a todo el equipo del laboratorio.

Un agradecimiento enorme para el Ing. Agrónomo Federico Boschi, tío y referente, por estar presente en todo momento, de manera incondicional.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia y amigos. Mis padres, Daniela y Carlos, y mis hermanos Vicky y Nahuel por el apoyo fundamental en todo. A mis abuelos, Orlinda, Carlos, y las Arburua; mis tías, tíos y primos.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBRACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADRO E ILUSTRACIONES.....	VI
 1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	 1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	4
2.1. <u>EUCALYPTUS GLOBULUS</u>	4
2.1.1. <u>Centro de origen</u>	4
2.1.2. <u>Importancia en el país</u>	4
2.2. <u>CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS</u>	5
2.3. <u>MICROPROPAGACIÓN</u>	5
2.3.1. <u>Ventajas de la micropropagación</u>	6
2.3.3. <u>Problemas asociados a la micropropagación</u>	7
2.3.5. <u>Problemas asociados a la micropropagación en <i>Eucalyptus globulus</i></u>	8
2.4. <u>ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN</u>	8
2.4.1. <u>Etapa 0</u>	9
2.4.2. <u>Etapa I: Establecimiento del cultivo aséptico</u>	10
2.4.3. <u>Etapa II: Multiplicación</u>	11
2.4.4. <u>Etapa III: Enraizamiento</u>	12
2.4.5. <u>Etapa IV: Aclimatación</u>	13
2.5. <u>REGULADORES DE CRECIMIENTO</u>	14
2.5.1. <u>Auxinas</u>	16
2.5.2. <u>Citoquininas</u>	17
3. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	21
3.1. <u>MATERIAL VEGETAL</u>	21
3.2. <u>DESINFECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y EL EQUIPAMIENTO</u>	21
3.3. <u>ENSAYOS EN LA FASE MULTIPLICACION</u>	22
3.3.1. <u>Medio de multiplicación</u>	22
3.3.2. <u>Condiciones de cultivo</u>	22
3.3.3. <u>Tratamientos</u>	22
3.3.4. <u>Variables cuantificadas</u>	23

3.3.5. <u>Efecto del medio de multiplicación sobre el enraizamiento</u>	24
3.4. ANALISIS ESTADISTICO	24
4. <u>RESULTADOS</u>	25
4.1. NÚMERO DE PLANTAS POR INTERVALO DE ALTURA.....	25
4.1.1. <u>Número de planta por intervalo de altura en función de los genotipos</u>	25
4.1.2. <u>Número de planta por intervalo de altura en función de los tratamientos</u>	27
4.1.3. <u>Número de planta por intervalo de planta en función de la interacción genotipo por tratamiento</u>	29
4.2. TASA DE PROLIFERACIÓN	35
4.3. PRESENCIA DE CALLOS	38
4.4. PRESENCIA DE VITRIFICACIÓN	41
4.5. ENRAIZAMIENTO	41
4.5.1. <u>Presencia de raíces</u>	41
4.5.2. <u>Longitud de raíces</u>	43
5. <u>DISCUSIÓN</u>	44
5.1. NÚMERO DE PLANTAS POR INTERVALO DE ALTURA.....	44
5.2. TASA DE PROLIFERACIÓN	45
5.3. PRESENCIA DE CALLO	46
5.4. PRESENCIA DE VITRIFICACIÓN	47
5.5. ENRAIZAMIENTO	48
6. <u>CONCLUSIONES</u>	50
7. <u>RESUMEN</u>	51
8. <u>SUMMARY</u>	52
9. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	53
10. <u>ANEXO</u>	61

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Procedencia de individuos seleccionados.....	21
2. Tratamientos aplicados en función del tipo de citoquinina y concentración suministrados en los medios de cultivo.....	23
3. Número promedio de plantas para el intervalo de altura menor a 0,5 cm en función de los genotipos.....	25
4. Número promedio de plantas para la variable altura entre 0,5 a 1 cm en función de los genotipos.....	26
5. Número promedio de plantas para la variable altura mayor a 1 cm en función de los genotipos.....	26
6. Número promedio de planta para el intervalo de altura menor a 0,5 cm en función de los tratamientos.	27
7. Número promedio de plantas para la variable altura entre 0,5 a 1 cm en función de los tratamientos.	28
8. Número promedio de plantas para la variable altura mayor a 1 cm en función de los tratamientos.	29
9. Número promedio de plantas para el intervalo de altura menor a 0,5 cm en función de la interacción genotipo por tratamiento.....	30
10. Número promedio de plantas para la variable altura entre 0,5 a 1 cm en función de la interacción genotipo por tratamiento.....	32
11. Número promedio de plantas para la variable altura mayor a 1 cm en función de la interacción genotipo por tratamiento.....	34
12. Tasa de proliferación promedio por repique en función de los tratamientos.	35
13. Tasa de proliferación promedio por repique en función de los genotipos.	36
14. Tasa de proliferación promedio por repique en función de la interacción genotipo por tratamiento.	37
15. Número promedio de plantas para la variable presencia de callo entre tratamientos.	38

16. Número promedio de plantas para la variable presencia de callo en función de los genotipos.....	39
17. Número promedio de plantas para la variable presencia de callo en función de la interacción genotipo por tratamiento.....	40
18. Porcentaje de Enraizamiento para cada genotipo y tratamiento y porcentaje promedio de enraizamiento para los tratamientos y genotipos.....	43
19. Longitud de raíz mínima, promedio y máxima en centímetros en función de los tratamientos.....	43

Figura No.

1. Esquema del sistema de micropropagación.....	9
2. Estructura química de la benciladenina y la metatopolina.....	19
3. Gráficos de la tasa de proliferación en función de los genotipos y de los tratamientos.	36
4. Gráficos de frecuencia media para la variable presencia de callos en función del genotipo y de los tratamientos	39
5. Porcentaje de enraizamiento en función de la combinación de genotipos y tratamientos.	42

1. INTRODUCCIÓN

El sector forestal presenta un marco de crecimiento o expansión exponencial desde la implementación de la primera y segunda ley forestal, sumado a esto, se instaló una fuerte inversión de capital nacional y sobre todo extranjero en las últimas décadas, tanto en la fase primaria como en la fase industrial del sector. Las inversiones realizadas han logrado un gran avance tecnológico, brindando mayor calidad y rendimiento en cuanto a los productos silviculturales e industriales que se generan. Todos estos factores han llevado a un aumento en las áreas forestadas del país, así como el aumento de empresas silviculturales, e industriales de la madera, como también empresas no forestales que intervienen con el sector, como las de transporte y logística.

Eucalyptus globulus Labill. (*E. globulus*) es una especie de interés para la industria celulósica por su alto rendimiento de pulpa y su calidad de madera. A pesar de esto, las áreas forestadas con la especie son muy reducidas, y están bastante concentradas en la región sureste del país. La disminución en cuanto a las plantaciones se debe principalmente a la presencia de la enfermedad de mancha foliar causada por *Teratosphaeria nubilosa*, enfermedad difícil de controlar y que causa altos porcentajes de mortalidad en rodales, por lo que se ha reemplazado al *E. globulus* por especies tolerantes y/o resistentes a la mancha foliar. Apuntando a resolver esta limitante, el INIA cuenta con un programa de mejoramiento genético para la especie *E. globulus*, con el objetivo de seleccionar clones con rápida velocidad de recambio de follaje; ya que el follaje adulto es más tolerante a la nubilosa, y de esta forma es posible generar un escape a la enfermedad.

Otra limitante de la especie tiene que ver con la difícil propagación de la misma, por los bajos porcentajes de enraizamiento. Asimismo, corresponde decir que igualmente el interés por *E. globulus* se mantiene gracias a la mejor calidad de madera.

En términos generales, la producción de plantas de los materiales forestales se obtiene principalmente mediante la propagación seminal y la propagación vegetativa por la técnica de estaca. Ambas formas de propagación presentan ciertas limitaciones; en relación a la producción de los plantines clonales hay una dependencia con la época de año, además existen dificultades para lograr altas tasas de enraizamiento y se deben realizar controles con vigilancia periódica por los problemas sanitarios que ocurren en la fase de vivero. Mientras que para la propagación seminal las principales limitaciones están asociadas a la segregación génica. Frente a la baja disponibilidad de plantas principalmente de origen clonal la técnica de micropropagación acapara el interés para la propagación forestal. Esto asociado a las ventajas de la micropropagación

La técnica de micropropagación en las últimas décadas ha acaparado mayor interés para la propagación de especies forestales, esto está asociado a las ventajas que presenta la micropropagación con respecto a los menores tiempos de producción, a la alta capacidad de producir y almacenar plántulas y la independencia de la estacionalidad. Sin embargo, la micropropagación también presenta desventajas que han impedido un mayor crecimiento de esta técnica para las especies forestales; por ejemplo, hay mayor dificultad de micropropagar algunas especies madereras. En cuanto al *E. globulus* se considera una especie que presenta dificultades para la micropropagación, debido principalmente a limitaciones que se dan en el proceso, por no alcanzar plantas de calidad para la etapa de enraizamiento.

El objetivo general de esta tesis fue evaluar un protocolo de micropropagación para *Eucalyptus globulus* en las etapas de multiplicación y enraizamiento a partir de la inclusión de dos citoquininas en distintos genotipos, con el fin de incrementar el número de plantas clonales.

En cuanto a los objetivos específicos de la tesis fueron:

- Cuantificar para cada tratamiento la tasa de multiplicación de los genotipos utilizados.
- Evaluar la altura de las plantas en los distintos medios de cultivo y en cada genotipo.
- Determinar la incidencia de la vitrificación y presencia de callos en los distintos genotipos.
- Determinar porcentajes de enraizamiento y la correlación con la citoquinina utilizada en la fase de multiplicación.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *EUCALYPTUS GLOBULUS*

2.1.1. Centro de origen

El área de distribución natural de la especie *Eucalyptus globulus* Labill. se localiza en las zonas del sur del estado de Victoria en Australia, en el estrecho de Bass y en la costa oeste de Tasmania. A su vez la especie se desarrolla en climas templados y fríos, con temperaturas máximas de 20 a 23°C y mínimas de 0 a 8 °C, bajo condiciones húmedas y subhúmedas, y con un régimen de precipitaciones principalmente invernales del entorno entre los 600 y 1400 mm. Es una especie que presenta buen desarrollo radicular y vegetativo, en suelos de textura limosa a arcillosa asociados a un buen drenaje. (Brussa, 1994).

2.1.2. Importancia en el país

En Uruguay la introducción de la especie fue en el año 1858, a partir de una difusión masiva dentro del país. Debido a su popularidad por su rusticidad y rápido crecimiento, por su alta capacidad de generar semilla y por presentar una alta resistencia a plagas y enfermedades, se plantó en un principio con el fin de generar sombra y refugio para el ganado ya que sus hojas juveniles no eran apetitosas para los animales (Brussa, 1994).

En la última década se ha registrado una gran disminución en cuanto al área plantada de *Eucalyptus globulus* debido a la presencia de *Teratosphaeria nubilosa* en el país. Siendo *E. globulus* una especie muy susceptible a esta enfermedad, por lo que a lo largo de los últimos años se ha reemplazado por especies más tolerantes a la enfermedad. Actualmente las plantaciones de *Eucalyptus globulus* se concentran en la región sureste del país, donde mejor se adapta la especie, principalmente en los departamentos de Canelones, Florida, Lavalleja, Maldonado y Rocha (Morales Olmos et al., 2018), con un área plantada total de 149.329 de hectáreas, incluyendo a las especies de *Eucalyptus bicostata* y *Eucalyptus maidenii* (MGAP.DIEA, 2020).

El uso principal de esta especie es para la producción de astillas de exportación y como madera rolliza para celulosa (Morales Olmos et al., 2018). Otras especies dentro del género *Eucalyptus* utilizadas en el país que han reemplazado al *Eucalyptus globulus* son el *Eucalyptus dunnii* con un área plantada de 191.035 hectáreas y *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus saligna* con 235.620 hectáreas entre ambas especies (MGAP.DIEA, 2020).

2.2. CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS

El cultivo de tejido permite establecer y favorecer en condiciones controladas el crecimiento de células, tejidos, órganos de plantas (embriones, brotes, raíces y flores) y plantas en condiciones *in vitro* es decir dentro de recipientes cerrados, en un medio de cultivo definido. Este crecimiento ocurre bajo condiciones de asepsia y con el control del ambiente (Neumann et al., 2009, Kester et al., 2014).

El cultivo *in vitro* de plantas es posible de llevar a cabo a partir de la totipotencia, que es una característica que presentan las células vegetales, significa que las células individuales tienen la capacidad de producir células diferenciadas que caracterizan órganos y regeneran a la planta completa (Iliev et al., 2010).

Dentro de las aplicaciones existentes, una de las más difundidas es la micropropagación, pero hay un gran número de otras técnicas como son: el cultivo de meristemas, la producción de plantas transgénicas, la conservación de germoplasma entre otras (Neumann et al., 2009, George, 2010, Kane et al., 2015).

2.3. MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación es una técnica que permite la propagación vegetativa de plantas en condiciones de cultivo *in vitro* (Kane et al., 2015). Así se obtienen, plantas a partir de la proliferación y crecimiento de meristemas

axilares y apicales existentes, o también, a partir de la regeneración de brotes adventicios formados *de novo*, iniciados a partir de órganos de las plantas como hojas, partes florales, raíces entre otros (Iliev et al., 2010, George, 2010).

2.3.1. Ventajas de la micropropagación

La micropropagación presenta ventajas, ya que es una técnica de gran utilidad al presentar la capacidad de producir gran cantidad de plantas de nuevas variedades libre de enfermedades, ya que el proceso se desarrolla en un ambiente controlado bajo condiciones de asepsia (Taji et al., 1992), utilizando espacios reducidos (Faria et al., 2022).

Al proceder de propagación vegetativa no ocurre la recombinación genética de gametos, por lo que la descendencia es genéticamente idéntica al material de partida (Neumann et al., 2009, Trueman et al., 2018).

Es especialmente útil para obtener plantas que se multiplican lentamente en condiciones de campo, para materiales difíciles de propagar por métodos de estaca y también para materiales que han sido modificados o transformados genéticamente mediante biotecnología (Kester et al., 2014). Mediante la micropropagación y las técnicas de cultivo *in vitro* es posible almacenar y conservar bancos de germoplasmas de materiales madres en especies de interés (Neumann et al., 2009).

En la micropropagación, es fundamental contar con protocolos eficientes, que permitan la obtención de un gran número de plantas de calidad en cada ciclo del cultivo o repique (Kester et al., 2014). Por lo que para una correcta operación en cultivo de tejidos es necesario conocer los factores básicos que afectan el crecimiento, conocer la respuesta de los cultivos a estos factores y cómo el crecimiento puede verse modificado (Neumann et al., 2009).

2.3.3. Problemas asociados a la micropropagación

Entre los problemas asociados al cultivo *in vitro* y la micropropagación, está la hiperhidricidad o vitrificación. Es un desorden fisiológico, que tiene diversas causas; en el explante ocurre un consumo excesivo de agua e inhibición de la síntesis de lignina y celulosa, por lo que las plántulas presentan un aspecto translúcido por la acumulación de agua, lo que resulta en el deterioro del cultivo y falla en la proliferación (De Klerk, 2007, Kester et al., 2014). La hiperhidricidad es una consecuencia de las condiciones artificiales del medio *in vitro* (Rojas-Martínez et al., 2010), siendo más común en cultivos que crecen en medios líquidos o medios que presentan baja concentración de agar; en ambos casos hay un desequilibrio en la absorción de nutrientes del medio de cultivo (De Klerk, 2007, Rojas-Martínez et al., 2010, Kester et al., 2014).

Otra dificultad encontrada en la micropropagación es la variación somaclonal que consiste en mutaciones no deseables que ocurren en los ciclos de multiplicación *in vitro* (repiques) produciendo sectores o puntos de crecimiento mutantes, generando plantas fuera de tipo (Kester et al., 2014). Los subcultivos deben ser limitados en el tiempo para evitar la variación somaclonal; estos cambios están asociados al ambiente artificial con altos suministros de reguladores de crecimiento y nutrientes (Kester et al., 2014, Oliveira et al., 2017).

Un aspecto a considerar es la parte financiera y operacional de la técnica. Existen dificultades debido al alto costo de inversión asociado a las instalaciones y equipamiento de laboratorio, esto trae aparejado altos costos por propágulo, costos de mantenimiento y además se necesita mano de obra con personal capacitado y entrenado en el manejo de la técnica (Neumann et al., 2009, Kester et al., 2014).

2.3.5. Problemas asociados a la micropropagación en *Eucalyptus globulus*

El enraizamiento adventicio tiende a ser la principal limitante en la propagación vegetativa de *Eucalyptus globulus*, presentando una respuesta recalcitrante tanto en el enraizamiento por estaca (Borges et al., 2011) como en el enraizamiento *in vitro* (Calderon-Baltierra et al., 2004, Correa et al., 2005, Martellet y Fett-Neto, 2005, Cordeiro et al., 2014).

La formación de raíces adventicias presenta dos mecanismos, el primero por organogénesis directa, a partir de células establecidas o diferenciadas, como las células del cambium; o mediante la organogénesis indirecta a partir de las células de callo (Li et al., 2009), siendo el callo una masa de células desorganizadas que en medios de cultivo definidos tienen la capacidad de generar brotes y raíces (Ahloowalia et al., 2004).

Para la formación de raíces en *E. globulus* se observan ambos mecanismos, y cuando en la especie se da la inducción de raíz a partir de callos, primero ocurre la formación de este en la región basal de las plántulas, proceso que está directamente relacionado con la fase de enraizamiento (Calderon-Baltierra et al., 2004, Correa et al., 2005), y a partir del callo, posteriormente se desarrolla la raíz principal, siendo una raíz frágil y de mala calidad por una débil conexión entre la misma y el sistema vascular del tallo (Calderon-Baltierra et al., 2004).

2.4. ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación es aplicada por laboratorios comerciales y de investigación a partir de un sistema, que consiste en el seguimiento de distintas etapas, que pueden ser 5, y con esta metodología se logra simplificar la programación de la producción y el análisis de costos (Kane et al., 2015) (Fig. No. 1).

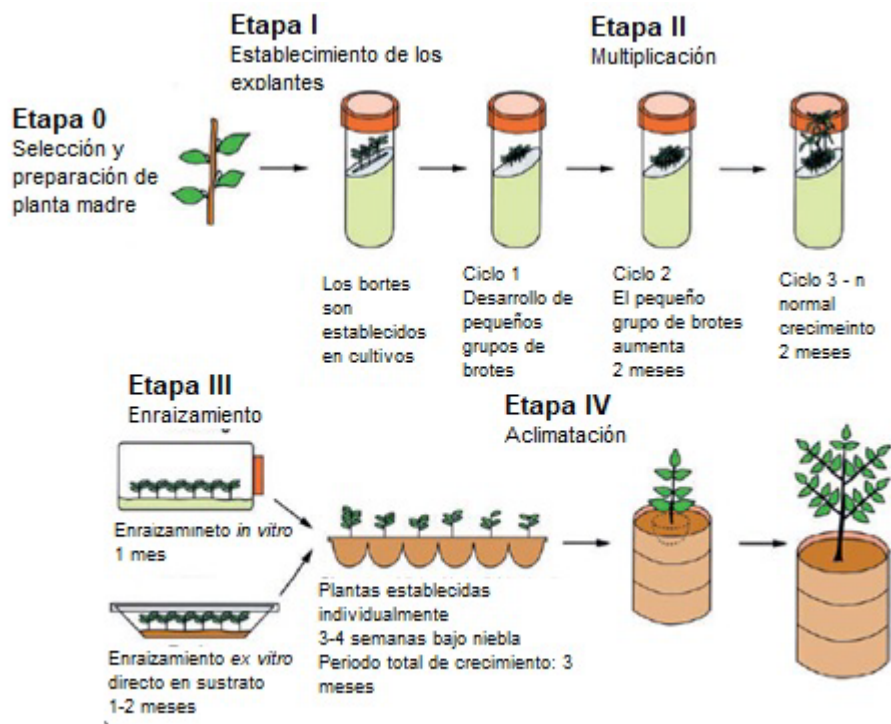


Figura No. 1. Esquema del sistema de micropropagación. **Fuente:** adaptado de Kester et al. (2014).

2.4.1. Etapa 0:

2.4.1.1. *Selección y preparación de la planta madre*

La etapa 0 es considerada como una etapa previa a la micropropagación, el objetivo de esta etapa es disminuir la contaminación, mantener la higiene y un buen estado de fertilización de las plantas madre, con el fin de favorecer el establecimiento inicial del cultivo *in vitro* (Kane et al., 2015).

Las plantas seleccionadas son establecidas en invernáculo bajo condiciones semi controladas y aisladas, libres de enfermedades e insectos. A su vez, también es posible el uso de productos químicos, como pesticidas y fungicidas, para lograr un mejor control sanitario; y mediante la aplicación de fertilizantes es posible mejorar el acondicionamiento de los materiales y el establecimiento de los explantes *in vitro* (Ahloowalia et al., 2004).

2.4.1.2. Selección del explante

Si se compara explantes obtenidos a partir de brotes juveniles y maduros, los explantes de brotes juveniles suelen establecerse más fácilmente, con una mayor respuesta de crecimiento y proliferación, y proporcionan una mayor facilidad para formar hojas y raíces adventicias comparado con explantes obtenidos a partir de brotes maduros (De Klerk, 2002, Nehra et al., 2005, Wendling y Xavier, 2010). La dificultad asociada a los explantes adultos se debe a una fisiología alterada, una mayor concentración de compuestos fenólicos y una posible mayor contaminación con microorganismos y virus (Preece, 2012). Para obtener material vegetal juvenil en materiales adultos se busca una reversión juvenil de los brotes, a través de un programa de podas frecuentes y severas, o a partir de la utilización de yemas latentes, como yemas epicórmicas, axilares o adventicias (Preece, 2012).

2.4.2. Etapas I: Establecimiento del cultivo aséptico

En esta etapa el objetivo es establecer los explantes al cultivo *in vitro* en condiciones de asepsia. Se realiza mediante la desinfección de los explantes, evitando la introducción de contaminación indeseable y proporcionando un medio apropiado para la especie y tipo de explante, para que se pueda dar más rápido un correcto ajuste fisiológico de los explantes a las condiciones *in vitro* (Iliev et al., 2010).

Para generar las condiciones de asepsia, se busca erradicar los microorganismos que incluyen hongos, mohos, levaduras y bacterias en la superficie de los explantes, patógenos endógenos, virus sistémicos y organismos similares a virus (Kester et al., 2014, Kane et al., 2015), así como contaminantes no patógenos que presentes en el medio de cultivo con disponibilidad de nutrientes y azúcares producen metabolitos secundarios tóxicos para las plantas (Kane et al., 2015).

La desinfección superficial incluye enjuagues con productos químicos en base a cloro como Hipoclorito de Sodio o de Calcio que actúan como desinfectantes (Ahloowalia et al., 2004, Trueman et al., 2018) durante algunos minutos, luego los explantes se enjuagan en agua destilada estéril tres o más veces hasta eliminar el agente de desinfección utilizado, en los últimos enjuagues se pueden incluir antioxidantes, como polivinilpirrolidona (PVP), ascorbato o carbón activado (Trueman et al., 2018).

Luego de la desinfección superficial, los explantes pasan a medios de cultivo, comúnmente establecidos con distintas formulaciones dependiendo de la especie. Uno de los más usados es el medio base MS (Murashige y Skoog, 1962) con la adición de sacarosa en concentraciones entre 58,4 mM (2%) a 87,6 mM (3%) (Trueman et al., 2018). También el medio de cultivo es suplementado con auxinas y citoquininas para mejorar la supervivencia de los explantes y desarrollo de los brotes, la concentración y tipo de regulador de crecimiento dependerá de la especie y tipo de explante (Kester et al., 2014).

2.4.3. Etapas II: Multiplicación

El objetivo de esta etapa es la producción de nuevos brotes a partir del explante inicial. Este aumento en el número de explantes, se obtiene mediante el desarrollo de las yemas secundarias o a partir del crecimiento de las microestacas sembradas (Iliev et al., 2010, Kester et al., 2014).

Los primeros subcultivos de esta etapa se inician a partir de los brotes axilares separados de los explantes. A su vez, estos brotes recién formados sirven como nuevos explantes secundarios para continuar con la proliferación y repetir los subcultivos (George y Debergh, 2010, Tripepi, 2015).

La tasa de multiplicación es la cantidad de nuevos explantes que se obtienen por explante sembrado en cada repique. Esta difiere en función de las especies y de las condiciones de cultivo y permite conocer el número teórico de plantas a obtener (Taji et al., 1992), es útil y necesario para planificar la producción de plantas.

Para las especies de *Eucalyptus* en la fase de multiplicación se utilizan medios de cultivo semisólidos, conformados por distintas bases de sales. Entre los más utilizados está la formulación de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962), la base de sales Woody Plant Medium (Lloyd y McCown, 1980), y JADS (Correia et al., 1995) entre otras. A su vez el medio de cultivo también es suplementado con aditivos orgánicos y sacarosa, a un pH de entre 5,6 a 6,0 (Trueman et al., 2018). Para alcanzar la propagación deseada en la micropropagación de *E. globulus*, es necesario incluir citoquininas en el medio de cultivo, para eliminar la dominancia apical de los brotes y promover el crecimiento de nuevos brotes (Cordeiro et al., 2014).

2.4.4. Etapas III: Enraizamiento

Esta etapa involucra la inducción y desarrollo de raíces. Los propágulos obtenidos en la etapa de multiplicación, son individualizados y colocados en el medio de enraizamiento.

Los medios de enraizamiento para las especies del género *Eucalyptus* se basan en un medio semisólido, suplementados con menores concentraciones de sacarosa y nutrientes minerales comparado con el medio de cultivo utilizado en la fase de multiplicación. Las concentraciones de sacarosa fluctúan entre los 43,8 mM y 58,4 mM, y a concentraciones medias o menores de base de sales MS (Trueman et al., 2018).

En cuanto a los reguladores de crecimiento para favorecer el enraizamiento en las especies de *Eucalyptus*, se suministra al medio de cultivo únicamente auxinas, ya que es la hormona que estimula la inducción y desarrollo radicular (De Klerk et al., 1999, Correa et al., 2005, Brondani et al., 2012, Trueman et al., 2018).

En muchos casos, esta etapa se desarrolla en condiciones de oscuridad, para mejorar la inducción de raíces en las plántulas (Trueman et al., 2018). Estas condiciones generan, por un lado, un agotamiento de los fotosintatos, que provoca el aumento de consumo de sacarosa como fuente

de carbono del medio (Correa et al., 2005), y por otro lado generan un metabolismo más rápido de las auxinas endógenas y exógenas (Maynard y Bassuk, citado por Fotopoulos y Sotiropoulos, 2005). La oscuridad permite un mayor aprovechamiento de las auxinas utilizadas, ya que son fotosensibles, y se inactivan con la luz (Beyl, 2011). Luego del desarrollo de raíces, los explantes son transferidos del medio de cultivo a un sustrato.

2.4.5. Etapas IV: Aclimatación

En esta etapa se realiza el pasaje de las plántulas desde condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro* (Hazarika et al., 2006, Kane et al., 2015). Para las especies leñosas y en particular las de *Eucalyptus*, ocurren pérdidas de rendimiento y muerte de plantas, debido al estrés generado en los brotes y en algunos casos raíces no funcionales de las plántulas (Faria et al., 2022).

Durante el cultivo *in vitro*, las plántulas crecen con humedad muy alta dentro de los frascos tapados, e irradiación baja, turbulencia de aire muy baja, concentración de CO₂ variable y a menudo insuficiente, potencial hídrico dependiente de la composición del medio, azúcares como fuente de carbono, reguladores del crecimiento en medio nutritivo, etileno y otros volátiles (Hazarika et al., 2006, Pospíšilová et al., 2007). Por lo cual, después de la transferencia *ex vitro*, las plántulas realizan cambios anatómicos y metabólicos para corregir las anomalías inducidas durante el cultivo *in vitro* y aclimatarse a las condiciones autótrofas, con baja humedad del aire y alta irradiación, principalmente para los procesos transpiración y nutrición autótrofa (Hazarika et al., 2006, Pospíšilová et al., 2007).

Si la transferencia de las plántulas no es realizada en forma gradual, habrá una alta proporción de marchitez de las mismas, debido a una alta tasa de pérdida de agua de las plántulas, por una alta tasa de transpiración. Esto es la consecuencia de ausencia del desarrollo de la cutícula, *in vitro* no hay formación de las ceras epicuticulares y además no hay regulación en la apertura y cierre de los estomas porque los explantes crecen en un ambiente

cerrado con alta humedad relativa, del orden del 100%. En estas condiciones los estomas no se cierran correctamente frente a estímulos externos y hay una alta conductancia estomática que no responde frente a cambios de humedad del ambiente (Pospíšilová et al., 2007).

El pasaje de una nutrición heterótrofa a autótrofa tiende a ser lento, ya que las hojas formadas *in vitro*, en presencia de sacarosa no logran desarrollar actividad fotosintética, por lo cual en condiciones *ex vitro* las mismas cumplen funciones de almacenaje y suministro de carbono a las nuevas hojas en desarrollo, y con el tiempo tienden a caer o adaptarse a las condiciones autotróficas, volviéndose fotosintéticamente activas y persistir en la aclimatación (Hazarika et al., 2006).

La transferencia de las plántulas se realiza en invernaderos o ambientes controlados que permiten tener un mejor control de la transición de condiciones *in vitro* a *ex vitro* (Tripepi, 2015). Se realizan modificaciones graduales de factores ambientales, principalmente la humedad relativa e irradiancia, con el objetivo de mejorar el desarrollo de la cutícula, el funcionamiento estomático, y parámetros fotosintéticos, asociados al contenido de clorofila, la estructura de los cloroplastos, la eficiencia fotosintética y la tasa fotosintética neta (Hazarika et al., 2006, Pospíšilová et al., 2007).

2.5. REGULADORES DE CRECIMIENTO

Los reguladores de crecimiento son moléculas orgánicas que en pequeñas concentraciones son capaces de inducir distintos efectos en las plantas en términos de expresión génica, crecimiento y desarrollo; controlan y modulan el inicio y desarrollo de los embriones somáticos, el crecimiento y desarrollo de los callos, la proliferación de brotes axilares y el desarrollo de raíces adventicias (Beyl, 2011).

Las hormonas de mayor importancia para los cultivos *in vitro* son las auxinas y citoquininas, y en función del tipo y la concentración de las mismas, será el efecto que presente en el cultivo, según el objetivo buscado (Beyl, 2011, Aremu et al., 2017). Los reguladores de crecimiento son compuestos naturales que actúan a baja concentración; en algunos casos se usan moléculas orgánicas producidas por síntesis química, debido a su actividad biológica similar a los compuestos naturales y producidas menor costo (Kumar et al., 2016).

En las últimas décadas el conocimiento sobre los reguladores de crecimiento y su modo de acción ha avanzado, existen nuevos grupos de moléculas como poliaminas, brasinosteroides, derivados de ácidos jasmónico, entre otros, que están siendo estudiadas por su efecto o por su actividad en procesos biológicos y metabólicos de las plantas (George, 2010).

Dependiendo de la etapa del cultivo *in vitro*, los requerimientos en cuanto al tipo, la concentración y los balances entre los reguladores de crecimiento pueden variar. En general en la etapa de iniciación las concentraciones de reguladores de crecimiento son bajas, del orden de 0,5 a 1 mg L⁻¹ para citoquininas y del orden de 0,01 a 0,1 mg L⁻¹ para las auxinas (Kester et al., 2014), pero en la etapa de multiplicación se utilizan concentraciones altas de citoquininas y más bajas de auxinas para favorecer la proliferación de brotes axilares (Beyl, 2011, Cordeiro et al., 2014). Mientras que en la etapa de enraizamiento hay un alto suministro de auxinas al medio, y nulo o bajo de citoquininas, para inducir la formación de raíces adventicias. (Beyl, 2011, Komatsu et al., 2011).

2.5.1. Auxinas

2.5.1.1. *Función de las auxinas*

Las auxinas presentan un importante rol en el crecimiento vegetal, debido a la influencia que tienen en el crecimiento y división celular. Las auxinas participan en la regulación del aumento del número de células y en la expansión celular. También presentan un efecto indirecto al inducir la síntesis de giberelinas, hormona que promueve la elongación del tallo (Jordan y Casaretto, 2006).

Las auxinas inducen la dominancia apical, al reprimir el desarrollo de las yemas laterales y axilares, también reprimen la expresión de genes claves para la biosíntesis de citoquininas y promueven la degradación de citoquinina induciendo la expresión de genes que codifican para las enzimas citoquinina-oxidasa (Taiz et al., 2015). La biosíntesis de auxinas está asociada a tejidos en activa división celular y crecimiento, principalmente los meristemas apicales del tallo, hojas jóvenes y frutos en desarrollo. La distribución de auxina es en gradientes desde el ápice primario hacia la base de la planta (Beyl, 2011).

Las auxinas estimulan e inducen la diferenciación y crecimiento de raíces laterales y adventicias, al estimular la división celular de las células localizadas en el periciclo y dan origen al meristema apical de raíz (Jordan y Casaretto, 2006). Debido a que las auxinas favorecen la inducción radicular, son el principal regulador de crecimiento suministrado en los medios de enraizamiento (Beyl, 2011).

2.5.1.2. *AIA: Ácido indol acético*

El AIA es utilizado para estimular el desarrollo de embriones *in vitro*, también puede ser utilizado en alta concentración para obtener división celular en las etapas de proliferación; las concentraciones típicas utilizadas rondan

entre los 5 a 285 μM (Kester et al., 2014). El AIA, es un compuesto fácilmente oxidable e inestable a la luz (Taji et al., 1992), además de ser una hormona fácilmente descompuesta por enzimas peroxidasas y oxidasas de AIA, por lo que su actividad tiende a ser baja comparada con el resto de auxinas (Beyl, 2011).

2.5.1.3. *AIB: Ácido indol butírico*

El AIB presenta una estructura molecular similar a la del AIA, diferenciándose en la cadena lateral (Beyl, 2011). Las concentraciones exógenas típicas del AIB rondan entre 0,5 y 50 μM (Kester et al., 2014).

El AIB es mayormente utilizado en los cultivos *in vitro* en la fase de enraizamiento para la especie *E. globulus*, ya que tiende a ser más eficiente en la inducción y regeneración de raíces (Bennett et al., 2003, Martellet y Fett-Neto, 2005, Brondani et al., 2012).

2.5.1.4. *Otras Auxinas*

El ácido naftalenacético (ANA) es comúnmente utilizado solo o en combinación con AIA, en la fase de enraizamiento a concentraciones de 0,5 a 50,0 μM (Kester et al., 2014). Otra auxina es el 2,4 ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) es una auxina estable en los medios de cultivo, utilizada en los cultivos de callos y cultivos de células (Neumann et al., 2009) a concentración entre 0,2 a 2,2 μM (Kester et al., 2014).

2.5.2. Citoquininas

2.5.2.1. *Función de las citoquininas*

Las citoquininas son un grupo de hormonas que participan en el crecimiento y desarrollo vegetal, actúan en gran variedad de procesos biológicos. Junto a las auxinas promueven y estimulan la división y diferenciación celular al favorecer la acumulación de ciclinas en la fase G1 del

ciclo celular (Jordan y Casaretto, 2006). También favorecen el desarrollo de cloroplastos, desarrollo del sistema vascular y la iniciación y proliferación de brotes de yemas laterales al interrumpir la dominancia apical (Beyl, 2011).

Las citoquininas retardan la senescencia de las hojas, esto debido a que presentan un rol antagónico con el etileno, hormona promotora de la senescencia. Impiden la ocurrencia de clorosis y la degradación de clorofila, manteniendo así por más tiempo a las hojas funcionales con alta actividad fotosintética, promoviendo la maduración de los cloroplastos y la actividad de fosa (Jordan y Casaretto, 2006).

La aplicación de citoquininas en los cultivos *in vitro* estimula la formación de brotes en la etapa de multiplicación, pero su presencia en las etapas siguientes, tienen un efecto negativo que arrastra a las etapas de enraizamiento y aclimatación (Werbrouck et al., 1995, De Klerk et al., 2001). Estos efectos nocivos se deben a la formación de metabolitos secundarios estables e inactivos, que se acumulan en la zona basal de las plantas y pueden inhibir la formación de raíces (Werbrouck et al., 1995, Werbrouck et al., 1996).

2.5.2.2. *Clasificación de las citoquininas*

Dentro de las citoquininas del grupo adenina, se pueden clasificar según la configuración de la cadena lateral en la posición terminal N-6 de la adenina, pudiendo diferenciarse en aromáticas e isoprenoides (Aremu et al., 2012).

Tanto la benciladenina (BA) como la metatopolina (MT) son dos citoquininas de tipo aromático, que presentan un grupo bencilo en la cadena lateral (Matsubara citado por Aremu et al., 2012), generando una citoquinina más activa comparado con los grupos de citoquininas isoprenoides (Aremu et al., 2012, Ahmad y Anis, 2019) (Figura No. 2).

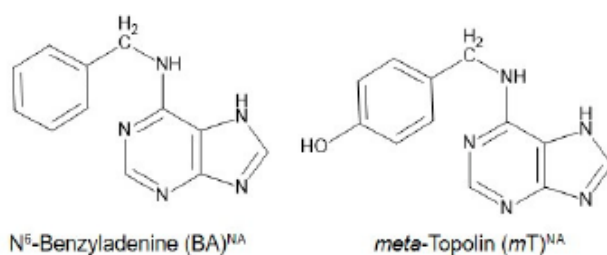


Figura No. 2. Estructura química de la benciladenina y la metatopolina.
Fuente: adaptado de Aremu et al. (2020).

2.5.2.3. Benciladenina

Horgan, citado por Aremu et al. (2012), indica que la primera identificación de la benciladenina se encontró en la especie *Populus robusta*, sintetizada como 6-(2-hidroxibencil) amino purina. La BA se presenta como una citoquinina eficiente en cuanto a la proliferación de brotes y económica por lo que es aplicada comúnmente en los sistemas comerciales de propagación (Werbrouck et al., 1995, Ahmad y Anis, 2019). Las concentraciones típicas para la BA rondan los 0,05 hasta los 45 μ M (Kester et al., 2014).

2.5.2.4. Metatopolina

La primera fuente detectada de metatopolina se encontró en la especie *Populus × canadensis* Moench., Cv. *robusta*, sintetizada como N⁶-meta-hidroxil-benciladenina, y demostró ser más activa en la promoción y en la formación de brotes que la benciladenina y otras citoquinas isoprenoides (Strnad et al., 1992, 1997). La principal diferencia en la estructura química entre las dos citoquininas se debe a la presencia de un grupo hidroxilo en el anillo bencilo en la metatopolina, dándole una mayor actividad (Aremu et al., 2012) (Figura No. 2).

2.5.2.5. *Otras citoquininas*

Otras citoquininas que son menos utilizadas en la micropropagación, ya sea porque poseen altos costos, y/o porque presentan menor efectividad, son entre otras, la kinetina, la thidiazuron y la zeatina. La kinetina es una citoquinina aromática utilizada a concentraciones de 0,5 a 0,25 μM (Taji et al., 1992). Thidiazuron es una citoquinina derivada de diphenylurea, presenta pérdida de actividad durante el autoclavado, y comúnmente es utilizada en combinaciones con otras citoquininas (Kester et al., 2014). Por último, la zeatina es una citoquinina del grupo isoprenoide, de alto costo y con pérdidas de actividad durante el autoclavado, concentraciones típicas para la zeatina rondan entre los 0,05 a 0,25 μM (Taji et al., 1992).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado provino de una selección de prueba de progenie del cruzamiento controlado de especies *Eucalyptus globulus x globulus* realizados por la empresa Forestal Atlántico Sur establecido en el departamento de Lavalleja. Estos individuos forman parte del conjunto de los materiales que selecciona el programa de mejoramiento genético de *E. globulus* de INIA dentro del proyecto de mejoramiento genético de esta especie.

Se utilizaron cuatro genotipos para el experimento, tres provienen de cruzamientos controlados y un restante de polinización abierta (Cuadro No. 1).

Cuadro No. 1. Procedencia de individuos seleccionados

Genotipo	Madre	Padre
19G8	136B7	138B8
19G11	172B7	136B7
19G28	136B7	223B1
19G40	134B5	Polinización Abierta

Los ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Unidad de Biotecnología en la Estación experimental de INIA “Las Brujas”. Estos ensayos se realizaron a partir de materiales ya introducidos, que se encontraban en fase de multiplicación.

3.2. DESINFECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y EL EQUIPAMIENTO

Los medios de cultivo fueron esterilizados en frascos de 300 mL mediante el autoclave a 120°C y una presión de 15 psi con un mínimo de 15 minutos dependiendo del volumen de producción. Mientras que los componentes termolábiles de los medios de cultivo fueron agregados luego

del autoclavado, mediante esterilización por filtración con filtros de jeringa Milipore® de 20 micras.

La manipulación de los materiales se realizó en cabinas de flujo laminar, NUAIRE. Las pinzas y bisturíes fueron esterilizados con esterilizadores eléctricos con bolitas de cuarzo, mientras que los materiales de vidrio fueron esterilizados mediante calor seco de estufa CLEAN BENCH, durante dos horas a 200°C.

3.3. ENSAYOS EN LA FASE MULTIPLICACION

3.3.1. Medio de multiplicación

Los explantes en la fase de multiplicación, se cultivaron en medios de cultivo compuestos por macronutrientes de sales MS, micronutrientes de sales WPM ¹, suplementados con 7,2 g L⁻¹ de agar y 0,05 µM de ácido naftalenacético (ANA) como auxina (Anexo No. 1).

3.3.2. Condiciones de cultivo

Los explantes fueron colocados en cámara de crecimiento con una temperatura de 23 °C (±2 °C), 16 horas de fotoperíodo, con luz fluorescente y una intensidad lumínica de 30 µmol m⁻² s⁻¹.

3.3.3. Tratamientos

Con el objetivo de evaluar los efectos de las citoquininas, se realizaron cinco tratamientos, en los cuales los medios de cultivo se suplementaron con benciladenina a concentraciones de 0,4 µM y 0,9 µM, con metatopolina a concentraciones de 0,4 µM y 0,8 µM y un medio de cultivo sin suministro de citoquininas, como medio control (Cuadro No. 2). Por cada frasco se colocaron seis explantes, y se realizaron repiques periódicos cada cuatro semanas.

Cuadro No. 2. Tratamientos aplicados en función del tipo de citoquinina y concentración suministrados en los medios de cultivo.

Citoquinina	Concentración		Tratamiento
BA	0,4 μM	0,1 mg L^{-1}	Ba1
BA	0,9 μM	0,2 mg L^{-1}	Ba2
MT	0,4 μM	0,1 mg L^{-1}	Mt1
MT	0,8 μM	0,2 mg L^{-1}	Mt2
Testigo	-	-	T

3.3.4. Variables cuantificadas

Para la variable número de plantas por intervalo de altura, en cada repique se midieron el total de plantas presentes por tratamiento. La altura de la planta se midió desde la base hasta el ápice de la misma, clasificando a las plantas en tres intervalos de altura: menor a 0,5 cm, entre 0,5 a 1 cm, y mayor a 1 cm.

En cuanto a la variable tasa de proliferación, la misma se evaluó mediante el conteo de nuevos individuos obtenidos en cada subcultivo.

La presencia de callo se cuantificó a partir de la observación de plantas que presentan callosidad blanca en ápice y hojas de las mismas. En cuanto a la vitrificación, la misma se cuantificó a partir del número de plantas que presentaban síntomas.

Al finalizar la fase de enraizamiento se evaluó la presencia de raíces, contando el número de plantas que desarrollaron raíces en el período estudiado. También se evaluó la longitud de las mismas para las plantas que formaron raíces, determinando la longitud mínima, media y máxima para cada medio de cultivo.

3.3.5. Efecto del medio de multiplicación sobre el enraizamiento

3.3.5.1. *Medio de enraizamiento*

Los individuos seleccionados para la fase de enraizamiento fueron colocados en el medio de cultivo utilizado por el laboratorio para especies leñosas. El medio de cultivo de la fase de enraizamiento se compuso a partir de 1/3 de las sales minerales del MS, suplementado con 5,5 g L⁻¹ de agar, 10g L⁻¹ de sacarosa y 3,0 µM de ácido indol butírico (AIB) como auxina, ajustado a un pH de 5,8 (Castillo et al., 2021) (Anexo No. 2). Para la fase de enraizamiento se evaluó las condiciones (tratamientos) establecidas de la fase multiplicación sobre el enraizamiento.

3.3.5.2. *Condiciones durante la fase de enraizamiento*

La fase de enraizamiento se realizó en un período de tres semanas, la etapa inicial se desarrolló en oscuridad total, que se llevó a cabo en las primeras dos semanas, Luego las plantas se colocaron en la cámara de crecimiento con luz fluorescente 30 µmol m⁻² s⁻¹.

3.4. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos obtenidos se analizaron a partir del programa INFOSTAT, con análisis de varianza (ANOVA). Se realizó análisis de contrastes mediante el test de Tukey para diferenciar entre los tratamientos con un p<0.05 y una diferencia mínima de 0,05.

El diseño experimental fue factorial (Anexo No. 3), se realizó teniendo en cuenta cuatro genotipos y cinco tratamientos y cuatro repeticiones para cada combinación de tratamiento y genotipo (Cuadro No. 2 y 3).

4. RESULTADOS

4.1. NÚMERO DE PLANTAS POR INTERVALO DE ALTURA

En cuanto a la variable número de plantas por intervalo de altura, se registraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos, entre tratamientos y en la interacción genotipo por tratamiento para las tres categorías de altura, siendo tres factores de gran importancia para la variable altura de planta.

El análisis estadístico para la variable altura y el de las demás variables del presente capítulo, se encuentran en el anexo (Anexo No. 4).

4.1.1. Número de planta por intervalo de altura en función de los genotipos

En función de los genotipos, para el intervalo de altura menor a 0,5 cm, el genotipo 19G40 registró la media más alta de 12,07 plantas por repique, y presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) con el resto de los genotipos. Mientras que el resto de los genotipos no presentaron diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$). Por lo cual el genotipo 19G40 es el que produjo mayor número de plantas en la franja de menor tamaño (Cuadro No. 3).

Cuadro No. 3. Número promedio de plantas para el intervalo de altura menor a 0,5 cm en función de los genotipos. En la primera columna se presenta los genotipos, en la segunda la media de genotipos correspondiente al número de plantas de altura menor a 0,5 cm y la tercera indica las DS.

Genotipo	Medias	Diferencia Significativa (*)
19G8	5,27	B
19G11	3,73	B
19G28	4,13	B
19G40	12,07	A

* Letras distintas indican diferencias significativas.

Para el intervalo de altura entre 0,5 a 1 cm, el genotipo 19G40 registró una media de 5,93, siendo el menor número por repique para este intervalo. El genotipo presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al resto de los genotipos. A su vez el resto no presentaron diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$) (Cuadro No. 4).

Cuadro No. 4. Número promedio de plantas para la variable altura entre 0,5 a 1 cm en función de los genotipos.

Genotipo	Media	Diferencia Significativa (*)
19G28	8,87	A
19G11	8,87	A
19G8	8,53	A
19G40	5,93	B

* Letras distintas indican diferencias significativas.

Para la variable altura de planta en el intervalo mayor a 1 cm en función de los genotipos, 19G40 fue el que registró el mínimo valor medio, siendo de 1,20 el número promedio de plantas mayores a 1 cm. Este genotipo presentó diferencias significativas con el resto ($p < 0,05$), mientras que estos últimos no presentaron diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$) (Cuadro No. 5).

Cuadro No. 5. Número promedio de plantas para la variable altura mayor a 1 cm en función de los genotipos.

Genotipo	Media	Diferencia Significativa (*)
19G28	4,40	A
19G11	3,60	A
19G8	3,27	A
19G40	1,20	B

* Letras distintas indican diferencias significativas.

4.1.2. Número de planta por intervalo de altura en función de los tratamientos

Con relación al intervalo de altura de planta menor a 0,5 cm, en función a los tratamientos, el testigo resultó ser el que presentó mayor media, siendo de 8,58 el número promedio de plantas menor a 0,5 cm por repique. Mientras que Mt1 registró un número promedio de plantas por repique de 4,17, siendo este el menor valor, por lo tanto, Mt1 produjo menor número de plantas chicas que no pasarán a la fase de enraizamiento (Cuadro No. 6).

Al contrastar la metatopolina y la benciladenina a una misma concentración de 0,4 μ M (Mt1 y Ba1), fue posible observar diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p < 0,05$), donde se registró menor frecuencia media Mt1, de 4,17 explantes menores a 0,5 cm; y el medio con benciladenina presentó una mayor producción de plantas de menor tamaño. (Cuadro No. 6).

Cuadro No. 6. Número promedio de planta para el intervalo de altura menor a 0,5 cm en función de los tratamientos. En la primera columna del cuadro se presentan los tratamientos, en la segunda columna se muestra la media del tratamiento y la tercera columna indica las diferencias significativas (DS).

Tratamiento	Medias	Diferencias Significativas (*)
T	8,58	A
Ba1	6,92	AB
Ba2	6,08	BC
Mt2	5,75	BC
Mt1	4,17	C

* Letras distintas indican diferencias significativas.

Para el intervalo de altura de planta entre 0,5 a 1 cm en función de los tratamientos, se destacó el tratamiento testigo, el cual registró el menor

número promedio de plantas, siendo de 4,17, presentando diferencias significativas ($p < 0,05$) con el resto de los tratamientos.

Los medios de cultivo suministrados con benciladenina y metatopolina a una misma concentración, de 0,4 μM (Ba1 y Mt1), presentaron diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$). El tratamiento Mt1 (10,42) registró un número de plantas promedio mayor que Ba1 (7,25). Esto indica que el tratamiento Mt1 produce mayor cantidad de plantas de tamaño intermedio que el tratamiento Ba1 (Cuadro No. 7).

Cuadro No. 7. Número promedio de plantas para la variable altura entre 0,5 a 1 cm en función de los tratamientos.

Tratamiento	Media	Diferencia Significativa (*)
Mt1	10,42	A
Ba2	9,58	AB
Mt2	8,83	AB
Ba1	7,25	B
T	4,17	C

* Letras distintas indican diferencias significativas.

En relación a la variable altura de planta para el intervalo mayor a 1 cm en función de la citoquinina suministrada a los medios de cultivo, el tratamiento que registró el menor valor medio, que fue de 0,17, correspondió al tratamiento testigo. Lo que indica que el tratamiento testigo fue el que produjo menor cantidad de plantas de la categoría de mayor altura. Este tratamiento presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al resto de los tratamientos, y estos últimos no presentaron diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$) (Cuadro No. 8).

Cuadro No. 8. Número promedio de plantas para la variable altura mayor a 1 cm en función de los tratamientos.

Tratamiento	Media	Diferencia Significativa (*)
Mt1	4,58	A
Mt2	4,00	A
Ba2	3,67	A
Ba1	3,17	A
T	0,17	B

* Letras distintas indican diferencias significativas.

4.1.3. Número de planta por intervalo de planta en función de la interacción genotipo por tratamiento

La variable altura de planta para el intervalo menor a 0,5 cm presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) en función de la interacción tratamiento y genotipo. Las interacciones 19G40-Ba1, 19G40-T, 19G40-Mt2, 19G40-Ba2 y 19G8-T presentaron mayores cantidades de plantas con menor altura, y con diferenciándose de la interacción 19G28-Ba1 que presentó la menor cantidad de plantas para la variable, siendo de 2,23 plantas menores a 0,5 cm.

Al contrastar los tratamientos con MT (Mt1 y Mt2), la única interacción en que presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) fue con el genotipo 19G40, en que la interacción 19G40-Mt1 obtuvo una menor media para la variable altura de planta menor a 0,5 cm, siendo de 6,0 individuos por repique, mientras que la interacción 19G40-Mt2 registró casi el doble, con una media de 12,3 explantes por repique (Cuadro No. 9).

Cuadro No. 9. Número promedio de plantas para el intervalo de altura menor a 0,5 cm en función de la interacción genotipo por tratamiento. La primera columna indica el genotipo, la segunda el tratamiento, la tercera presenta la media de la interacción genotipo por tratamiento para la variable altura entre 0,5 a 1 cm, y la cuarta indica las DS.

Genotipo	Tratamiento	Medias	Diferencia Significativas (*)
19G40	Ba1	16,00	A
19G40	T	14,33	A
19G40	Mt2	12,33	AB
19G40	Ba2	11,67	ABC
19G8	T	8,33	BCD
19G28	T	7,33	BCDE
19G8	Ba1	6,33	CDE
19G40	Mt1	6,00	CDE
19G11	Mt1	5,00	DE
19G8	Ba2	5,00	DE
19G28	Ba2	4,33	DE
19G11	T	4,33	DE
19G8	Mt2	4,00	DE
19G28	Mt2	3,67	DE
19G11	Ba2	3,33	DE
19G11	Ba1	3,00	DE
19G28	Mt1	3,00	DE
19G11	Mt2	3,00	DE
19G8	Mt1	2,67	DE
19G28	Ba1	2,33	E

* Letras distintas indican diferencias significativas.

Para la variable altura de planta en el intervalo entre 0,5 a 1 cm, se registraron diferencias significativas ($p < 0,05$). Las cuatro interacciones con mayor cantidad de individuos con altura intermedia fueron: 19G28-Ba2, 19G11-Mt2, 19G8-Mt1 y 19G28-Mt1, estas interacciones presentaron diferencias significativas con respecto a las cuatro interacciones que registraron las menores cantidad de plantas intermedias, 19G28-T, 19G40-Ba1, 19G8-T y 19G40-T.

En cuanto a los tratamientos con metatopolina en diferentes concentraciones (Mt1 y Mt2), se observan resultados variados en función de los genotipos. Tanto el 19G8 y el 19G40 presentaron resultados similares entre tratamientos, pero los genotipos 19G28 y 19G11 obtuvieron resultados opuestos entre sí. El genotipo 19G28 con Mt1 cuantificó una media de 11,3 individuos de altura intermedia por repique, diferenciándose de 19G28-Mt2 que registró una media de 3,67 explantes por subcultivo. Mientras que el genotipo 19G11 con Mt2 registró un promedio de 12,0 explantes por repique y 19G11-Mt1 obtuvo menor cantidad de individuos por repique, con una media de 8,33.

A su vez para los genotipos no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos con benciladenina a diferentes concentraciones (Ba1 y Ba2) (Cuadro No. 10).

Cuadro No. 10. Número promedio de plantas para la variable altura entre 0,5 a 1 cm en función de la interacción genotipo por tratamiento.

Genotipo	Tratamiento	Medias	Diferencias Significativas (*)
19G28	Ba2	13,33	A
19G11	Mt2	12,00	A
19G8	Mt1	12,00	A
19G28	Mt1	11,33	A
19G8	Mt2	10,33	AB
19G28	Ba1	10,00	AB
19G40	Mt1	10,00	AB
19G8	Ba2	9,33	ABC
19G11	Ba2	9,00	ABC
19G11	Mt1	8,33	ABC
19G11	Ba1	7,67	ABC
19G8	Ba1	7,67	ABC
19G11	T	7,33	ABC
19G40	Mt2	6,67	ABC
19G40	Ba2	6,00	ABC
19G28	Mt2	3,67	BC
19G28	T	3,67	BC
19G40	Ba1	3,67	BC
19G8	T	3,33	BC
19G40	T	2,33	C

* Letras distintas indican diferencias significativas.

Para el intervalo de altura mayor a 1 cm en función de la interacción genotipo por tratamiento, las interacciones 19G8-T y 19G11-T no se registraron individuos con altura mayor a 1 cm (Cuadro No. 11).

Al comparar interacciones de los genotipos en función de diferentes concentraciones de BA (Ba1 y Ba2), los genotipos 19G8 y 19G28 no presentaron diferencias entre las concentraciones, pero sí los genotipos 19G11 y 19G28. En el caso del 19G11, con Ba2 (19G11-Ba2) registró la máxima media para la variable, siendo de 8,33 explantes mayores a 1 cm por repique, y diferenciándose de 19G11-Ba1 que registró una media de 1,67. Mientras tanto, el genotipo 19G28 obtuvo resultados opuestos, ya que registró que la interacción 19G28-Ba1, obtuvo una media de 7,6 explantes por repique, mientras que la interacción 19G28-Ba2 registró una media de 3,0 individuos por repique.

A su vez para las interacciones en función de los tratamientos con MT (Mt1 y Mt2), el único genotipo que presentó diferencias significativas ($p < 0,05$), fue el genotipo 19G40. En la interacción con Mt1 obtuvo una mayor media para la variable altura mayor a un 1 cm, siendo de 5,67 individuos por explante; mientras que la interacción 19G40-Mt2 registró una media de 0,33 individuos por repique (Cuadro No. 11).

Cuadro No. 11. Número promedio de plantas para la variable altura mayor a 1 cm en función de la interacción genotipo por tratamiento.

Genotipo	Tratamiento	Medias	Diferencias Significativas (*)
19G11	Ba2	8,33	A
19G28	Ba1	7,67	AB
19G28	Mt2	6,33	ABC
19G8	Mt1	5,67	ABCD
19G8	Mt2	5,00	ABCDE
19G28	Mt1	4,67	ABCDE
19G11	Mt2	4,33	ABCDE
19G40	Mt1	4,33	ABCDE
19G11	Mt1	3,67	ABCDE
19G28	Ba2	3,00	BCDE
19G8	Ba1	3,00	BCDE
19G8	Ba2	2,67	BCDE
19G11	Ba1	1,67	CDE
19G40	Ba2	0,67	DE
19G28	T	0,33	E
19G40	Ba1	0,33	E
19G40	Mt2	0,33	E
19G40	T	0,33	E
19G8	T	0,00	E
19G11	T	0,00	E

* Letras distintas indican diferencias significativas.

4.2. TASA DE PROLIFERACIÓN

Para la variable tasa de proliferación, se registraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos, entre los tratamientos y para la interacción genotipo por tratamiento.

En cuanto a los tratamientos, el testigo fue el único que no presentó proliferación, diferenciándose del resto de los tratamientos. A su vez el resto de los tratamientos no presentaron diferencias entre sí (Cuadro No. 12) (fig. No. 5).

Cuadro No. 12. Tasa de proliferación promedio por repique en función de los tratamientos.

Tratamiento	Media	Diferencia Significativa (*)
Mt1	2,42	A
Mt2	1,92	A
Ba1	1,92	A
Ba2	1,67	A
T	0,00	B

* Letras distintas indican diferencias significativas.

Para la variable tasa de proliferación en función de los genotipos, se destacó el genotipo 19G8 que registró la mayor media, con una tasa de proliferación de 3,20 por repique. Este genotipo presentó diferencias significativas con el resto de los genotipos ($p < 0,05$), mientras que el resto no presentó diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$) (Cuadro No. 13) (Fig. No. 5).

Cuadro No. 13. Tasa de proliferación promedio por repique en función de los genotipos.

Genotipo	Media	Diferencia Significativa (*)
19G8	3,20	A
19G28	1,60	B
19G40	1,07	B
19G11	0,47	B

* Letras distintas indican diferencias significativas.

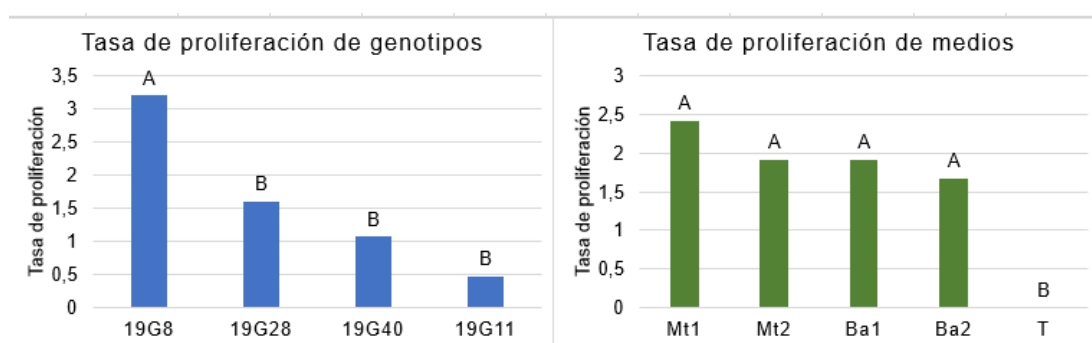


Figura No. 3. Gráficos de la tasa de proliferación en función de los genotipos y de los tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p > 0,05$ Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas.

En cuanto a la interacción genotipo por tratamiento para la variable tasa de proliferación, la interacción 19G8-Mt1 fue la que presentó la máxima media, registrando una proliferación de 5 nuevos individuos por repique. Esta interacción presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) con las interacciones 19G40-T, 19G11-T, 19G28-T, 19G8-T y 19G11-Mt2, siendo estas últimas las 5 interacciones que no tuvieron proliferación. También cabe destacar que 4 de las 5 incluyen al tratamiento testigo. (Cuadro No. 14).

Cuadro No. 14. Tasa de proliferación promedio por repique en función de la interacción genotipo por tratamiento.

Genotipo	Tratamiento	Medias	Diferencias Significativas (*)
19G8	Mt1	5,00	A
19G8	Mt2	4,00	AB
19G8	Ba1	3,67	AB
19G8	Ba2	3,33	AB
19G28	Mt2	2,67	AB
19G40	Mt1	2,33	AB
19G28	Ba1	2,33	AB
19G28	Ba2	2,00	AB
19G11	Mt1	1,33	AB
19G40	Ba1	1,33	AB
19G40	Mt2	1,00	AB
19G28	Mt1	1,00	AB
19G11	Ba2	0,67	AB
19G40	Ba2	0,67	AB
19G11	Ba1	0,33	AB
19G40	T	0,00	B
19G11	Mt2	0,00	B
19G11	T	0,00	B
19G28	T	0,00	B
19G8	T	0,00	B

* Letras distintas indican diferencias significativas.

4.3. PRESENCIA DE CALLOS

En cuanto a la variable presencia de callos, se registraron diferencias significativas entre genotipos, entre tratamiento y para la interacción genotipo por tratamiento ($p < 0,05$).

Para la variable presencia de callos en función de los tratamientos, el tratamiento testigo fue el que presentó el máximo valor, con una media de 5,42 plantas con presencia de callo por repique. A su vez el tratamiento testigo presentó diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos ($p < 0,05$), mientras que el resto de los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$) (Cuadro No. 15) (Fig. No. 6).

Cuadro No. 15. Número promedio de plantas para la variable presencia de callo entre tratamientos.

Tratamiento	Media	Diferencia Significativa (*)
T	5,42	A
Mt2	1,42	B
Ba2	1,33	B
Mt1	1,17	B
Ba1	0,92	B

* Letras distintas indican diferencias significativas.

En cuanto a la variable presencia de callo en función del genotipo, se destacó el genotipo 19G11 con la máxima media, de 3,40 plantas promedio por repique, presentando diferencias significativas con respecto al resto de los genotipos ($p < 0,05$). A su vez el resto de los genotipos no presentaron diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$) (Cuadro No. 16) (Fig. No. 6).

Cuadro No. 16. Número promedio de plantas para la variable presencia de callo en función de los genotipos.

Genotipo	Media	Diferencia Significativa (*)
19G11	3,40	A
19G28	1,93	B
19G40	1,67	B
19G8	1,20	B

* Letras distintas indican diferencias significativas.

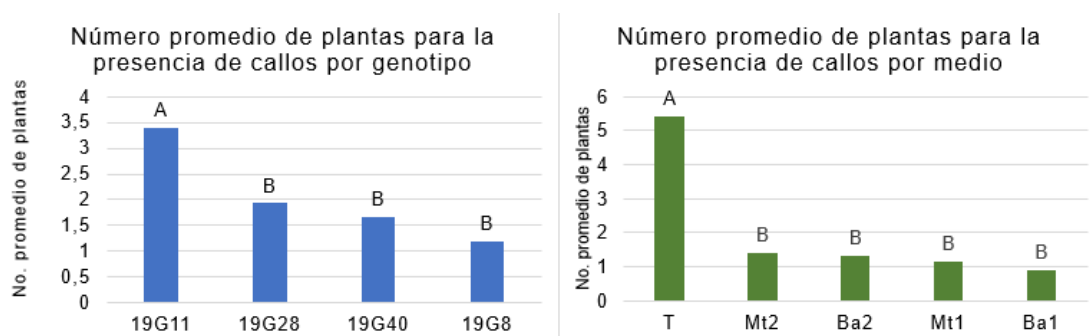


Figura No. 4. Gráficos de frecuencia media para la variable presencia de callos en función del genotipo y de los tratamientos. * Letras distintas indican diferencias significativas.

El máximo valor medio para la variable presencia de callo en función de la interacción genotipo por tratamiento, se obtuvo en la interacción 19G28-T, con una media de 9,00 plantas por repique. También cabe destacar que las interacciones 19G28-Ba1 y 19G28-Ba2 no registraron plantas con desarrollo de callo (Cuadro No. 17).

Cuadro No. 17. Número promedio de plantas para la variable presencia de callo en función de la interacción genotipo por tratamiento.

Genotipo	Tratamiento	Medias	Diferencias Significativas (*)
19G28	T	9,00	A
19G11	T	6,00	AB
19G8	T	3,67	BC
19G11	Mt2	3,67	BC
19G40	T	3,00	BC
19G11	Ba2	3,00	BC
19G11	Mt1	2,33	BC
19G11	Ba1	2,00	BC
19G40	Ba1	1,33	C
19G40	Ba2	1,33	C
19G40	Mt2	1,33	C
19G40	Mt1	1,33	C
19G8	Ba2	1,00	C
19G8	Mt1	0,67	C
19G8	Ba1	0,33	C
19G28	Mt2	0,33	C
19G28	Mt1	0,33	C
19G8	Mt2	0,33	C
19G28	Ba1	0,00	C
19G28	Ba2	0,00	C

* Letras distintas indican diferencias significativas.

4.4. PRESENCIA DE VITRIFICACIÓN

En cuanto a la presencia de vitrificación en las plantas, se registraron pocos individuos con indicios o síntomas, por lo tanto, en el análisis estadístico, el programa INFOSTAT no encontró diferencias significativas.

Al cuantificar los individuos con vitrificación, se registró para el genotipo 19G8 únicamente 4 explantes en el tratamiento Ba1; 1 explante en el primer subcultivo y 3 en el segundo. En cuanto al genotipo 19G40 en todos los tratamientos se registraron al menos un individuo con síntomas de vitrificación. El genotipo 19G28 tuvo dos individuos con vitrificación, en el tratamiento Mt1. Y para el genotipo 19G11 se registraron dos explantes y un frasco con los seis individuos con síntomas de vitrificación, todos en el tratamiento Ba1.

4.5. ENRAIZAMIENTO

4.5.1. Presencia de raíces

La presencia de raíces se determinó a partir del porcentaje de plantas que provenían de los distintos tratamientos en cada genotipo.

En cuanto a la variable presencia de raíz en función de tratamientos, se destacó Mt1, con un porcentaje medio de 39,0%, seguido de Ba1 con un porcentaje medio de 28,4%, a su vez los siguientes tratamientos fueron Ba2 y Mt2 con porcentajes medios de 17,7% y 16,7% respectivamente. Por último, está el tratamiento testigo con el menor porcentaje medio de 6,3%, tratamiento que solo obtuvo enraizamiento en el genotipo 19G40.

En relación a los genotipos, el 19G40 fue el único que logró enraizar en los explantes que provenían de todos los tratamientos, incluso fue el único genotipo que logró enraizar en explantes que venían del tratamiento testigo. Este obtuvo el máximo porcentaje promedio de enraizamiento para los genotipos, siendo de 45,8%.

También cabe destacar que los genotipos 19G28 y 19G8, los porcentajes de enraizamiento no variaron según el tratamiento previo. El genotipo 19G28 en todos los tratamientos obtuvo un porcentaje de enraizamiento del orden del 20%, a excepción del tratamiento testigo, donde no se obtuvieron explantes enraizados. En el genotipo 19G8 no se registró enraizamiento en explantes provenientes de los tratamientos Ba2 y T, y en el resto de los tratamientos el porcentaje de enraizamiento no alcanzó el 5%.

En la combinación de genotipo por tratamiento, Mt1-19G40 presentó el porcentaje más alto de enraizamiento, de un 93%; siendo este el porcentaje más alto con respecto al resto de los tratamientos; ya que el segundo mejor porcentaje de enraizamiento fue de 50% en la combinación Ba1-19G40 (Cuadro No. 18) (Fig. No. 7).

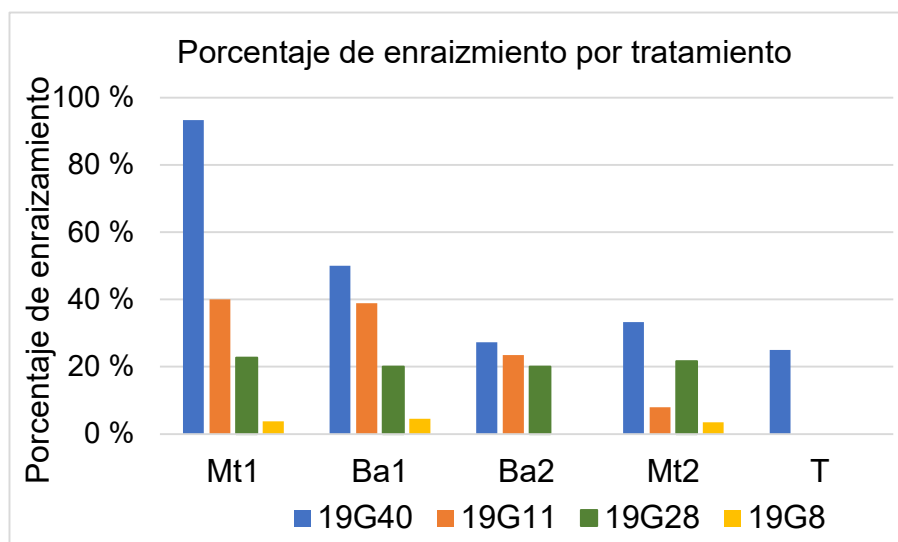


Figura No. 5. Porcentaje de enraizamiento en función de la combinación de genotipos y tratamientos.

Cuadro No. 18. Porcentaje de Enraizamiento para cada genotipo y tratamiento y porcentaje promedio de enraizamiento para los tratamientos y genotipos.

Genotipo/ Tratamiento	19G40	19G11	19G28	19G8	Promedio Tratamiento
Mt1	93,3%	40,0%	22,7%	3,8%	39,0%
Ba1	50,0%	38,9%	20,0%	4,5%	28,4%
Ba2	27,3%	23,5%	20,0%	0,0%	17,7%
Mt2	33,3%	8,0%	21,7%	3,5%	16,7%
T	25,0%	0,0%	0,0%	0,0%	6,3%
Promedio genotipos	45,8%	22,1%	16,9%	1,7%	

4.5.2. Longitud de raíces

En cuanto a la variable longitud de raíces, las longitudes mínimas fueron mayores para los dos tratamientos con MT, alcanzando una longitud mínima de 0,4 cm. Para los tratamientos con BA y el testigo la longitud mínima fue de 0,2 cm.

En relación a la longitud promedio para la variable longitud de raíz, el promedio más alto se registró para el tratamiento con Mt1. A su vez, para la variable longitud máxima de raíz, el máximo valor también se registró en el mismo tratamiento (Cuadro No. 19).

Cuadro No. 19. Longitud de raíz mínima, promedio y máxima en centímetros en función de los tratamientos.

Tratamiento	Mínima (cm)	Promedio (cm)	Máxima (cm)
Mt1	0,4	1,05	1,7
Mt2	0,4	0,53	0,8
Ba1	0,2	0,33	0,5
Ba2	0,2	0,26	0,3
T	0,2	0,25	0,3

5. DISCUSIÓN

5.1. NÚMERO DE PLANTAS POR INTERVALO DE ALTURA

Esta variable se diferenció en intervalos porque *E. globulus* es una especie difícil de elongar durante la micropropagación, por lo cual, al cuantificar el número de plantas por tratamiento para cada intervalo de altura, se identificó el tratamiento donde se obtuvieron los mejores explantes.

El tratamiento testigo registró la mayor producción de individuos de menores alturas. Por lo que, para obtener explantes de tamaño adecuado para el pasaje a la fase de enraizamiento, es necesario el suministro de citoquininas al medio de multiplicación.

En cuanto al comportamiento de los individuos frente a las distintas citoquininas, los tratamientos con metatopolina proporcionaron los mejores resultados para la variable altura, siendo el tratamiento Mt1 el único que presentó diferencias significativas (con respecto al tratamiento testigo en los tres intervalos de altura. También al comparar los tratamientos con metatopolina y benciladenina a una misma concentración de 0,4 μ M (Mt1 y Ba1), se observó que Ba1 produjo mayor cantidad de plantas con menor altura comparado con Mt1.

En ensayos para *Eucalyptus tereticornis* Sm., en que se evaluó el efecto de citoquinas en el alargamiento de los explantes en la fase de multiplicación, se registraron mejores resultados con el uso de benciladenina que con otras citoquininas como kinetina y thidiazuron (Aggarwal et al., 2012).

El aumento de la concentración de citoquininas no presentó un aumento en el número de plantas de menor tamaño. Al comparar los tratamientos de una misma citoquinina, pero en distintas concentraciones (Ba1-Ba2 y Mt1-Mt2), no se obtuvieron diferencias significativas. A su vez Aggarwal et al. (2012) obtuvo como resultados que para *Eucalyptus tereticornis* Sm., concentraciones de BA superiores a 2,5 μ M promueven la

multiplicación de brotes, mientras que concentraciones menores a 1,0 μM promueven la elongación. En nuestro ensayo, las concentraciones no se encontraron dentro de estos rangos, esto podría explicar porque no se encontraron diferencias significativas para el número de plantas por intervalo de altura entre concentraciones.

Para *E. globulus* existe una dependencia en función del genotipo (Fett-Neto et al., 2001), el mismo genotipo define una respuesta a la citoquinina. Esto se observó en interacción genotipo por tratamiento que presentó un importante efecto para la variable número de plantas por intervalo de altura. Un ejemplo de esto se observó al comparar los tratamientos Ba2 y Mt2 para el intervalo de altura mayor a un centímetro. En esta interacción, el genotipo 19G11 en combinación con Ba2 presentó el doble de individuos mayores a un centímetro con respecto a Mt2, mientras que para los genotipos 19G28 y 19G8 la situación fue a la inversa, Ba2 presentó menor número de individuos de mayor altura que Mt2. En cuanto al genotipo 19G40 no hubo diferencias entre tratamientos.

5.2. TASA DE PROLIFERACIÓN

El tratamiento testigo fue el único que no registró proliferación. Esto indica que para obtener proliferación en la fase de multiplicación para *E. globulus* fue necesario el suministro de citoquininas al medio de cultivo. Resultados similares obtuvo Trindade et al. (1990), donde se planteó que la aplicación de citoquininas exógenas fue requerida para estimular la formación de brotes en *E. globulus*. Este autor determinó que la citoquinina como regulador de crecimiento fue un factor limitante para la multiplicación *in vitro* de la especie (Trindade et al., 1990).

En *E. globulus* existen estudios para la variable tasa de proliferación con diferentes citoquininas, de las cuales se incluyó BA y kinetina. Trindade et al. (1990) obtuvo como resultado que la BA presentó mayores tasas de proliferación y explantes más vigorosos que con la kinetina. Mientras que

Bennett et al. (1994), obtuvo los mejores resultados en cuanto a proliferación a partir de la alternancia de subcultivos con BA y kinetina. La benciladenina, a pesar de ser una citoquinina efectiva para la regeneración y multiplicación de *in vitro* de distintas especies, genera efectos negativos en el enraizamiento y aclimatación de las plantas (Aremu et al., 2012).

Hasta la fecha no hay reportes de la inclusión MT en protocolos de micropropagación de *E. globulus*. En ensayos con otras especies se obtuvieron mejores respuestas en la proliferación partir del uso de MT que con BA (Wojtania, 2010, Naaz et al., 2019, Ivanova et al., 2021).

Además, los genotipos mostraron diferencias para la variable tasa de proliferación, destacándose el genotipo 19G8, por presentar la mayor tasa de proliferación en todos los medios evaluados. Otros trabajos, obtuvieron como resultado que para *E. globulus* (Cordeiro et al., 2014) e híbridos de *E. globulus* (Borges et al., 2011), la capacidad de formar brotes adventicios tuvo dependencia en función de los genotipos (Borges et al., 2011, Cordeiro et al., 2014), nuestros resultados coincidieron con estas observaciones.

5.3. PRESENCIA DE CALLO

En cuanto a la variable presencia de callo, fue posible diferenciar el tratamiento y el genotipo con la mayor producción de callo por planta. En este caso el medio de cultivo sin suministro de citoquininas y el genotipo 19G11 presentaron la mayor producción de callos (Fig. No. 6).

En ensayos de *E. globulus* se obtuvo como resultado que la presencia y el balance de los reguladores de crecimiento tuvieron un efecto en la calidad de los explantes obtenidos, donde no solo importó la concentración de citoquininas, sino que también fue importante la concentración de las mismas en relación con el balance de auxinas (Cordeiro et al., 2014). En nuestros resultados quedó demostrado que mediante el suministro de cualquiera de las dos citoquininas se obtuvieron explantes de mayor calidad, con menor incidencia de callos, mayores tasas de proliferación y altura. La presencia de

callos fue cinco veces mayor que en resto de los tratamientos que incluía citoquinina.

Resultados similares se obtuvieron en ensayos de *Eucalyptus nitens* Maiden, donde medios de cultivo suplementados con una baja proporción de auxina/citoquinina, redujeron la formación de callos y previnieron la posibilidad de variación somaclonal que puede ocurrir en la fase de multiplicación (Gomes y Canhoto, 2003).

5.4. PRESENCIA DE VITRIFICACIÓN

En cuanto a la vitrificación se observó una mayor cantidad de individuos con síntomas en el tratamiento Ba1.

En medios de cultivo suplementados con MT y BA, utilizando como especie *Aloe polyphylla*, una especie susceptible a la vitrificación, se registró mayor severidad en los medios de cultivo suplementados con BA que los medios con MT (Bairu et al., 2007).

Estos resultados se deben a que la BA es un factor que aumenta la incidencia de vitrificación, aunque no son conocidas las causas de las mismas (Rojas-Martínez y De Klerk, 2010). Esto se podría atribuir a que se genera un estrés alterando la homeóstasis en la planta (Wu et al., 2011).

Existen diferentes prácticas para revertir la vitrificación en sus etapas iniciales, una de estas consiste en el pasaje de los explantes a un medio de cultivo sin BA (Wu et al., 2011).

Estos resultados pueden deberse a que los metabolitos de la MT se metabolizan más rápido (Werbrouck et al., 1996), por el contrario, la BA y sus metabolitos se acumulan en los explantes con los sucesivos subcultivos por ser compuestos más estables (Werbrouck et al., 1995; Bairu et al., 2007). Esto podría llevar a un desbalance interno, problema que genera alteraciones fisiológicas como la vitrificación.

5.5. ENRAIZAMIENTO

Para la especie de *E. globulus*, la capacidad de enraizamiento tiene una alta dependencia de los clones, y a su vez, estos tendrán diferentes requerimientos para la fase de enraizamiento (Trindade y Pais, 1997). Nuestros resultados coincidieron con esta afirmación. En cuatro genotipos se observaron cuatro comportamientos diferentes.

En el caso del genotipo 19G40, su respuesta al enraizamiento fue casi 100% cuando en el medio de multiplicación se utilizó MT, sin embargo, cuando se utilizó BA, el enraizamiento disminuyó a la mitad. Pero los genotipos 19G8 y 19G28, no modificaron su respuesta al enraizamiento en función del tipo y concentración de citoquinina en el medio de multiplicación, para estos genotipos no hubo diferencias. El genotipo 19G11 tuvo una respuesta diferente y mostró un descenso en los porcentajes de enraizamiento cuando aumento la concentración de citoquinina.

Si bien la MT optimizó el enraizamiento en un único genotipo, cuando se utilizó BA en los medios de multiplicación no se observó un aumento en los resultados de enraizamiento. Otros autores reportaron resultados similares, en los cuales observaron mejores rendimientos por parte de la MT, destacando un efecto inhibitorio de la benciladenina para la formación de raíces y bajos valores de sobrevivencia en la aclimatación (Bairu et al., 2007, Bairu et al., 2008, Naaz et al., 2019).

Con MT a su vez se ven mejorados parámetros de calidad de raíz (Werbrouck et al., 1996), en nuestros resultados se observaron diferencias en el largo de las mismas, siendo otro aspecto interesante del MT.

En la combinación entre genotipo y tratamiento, se destacó la de 19G40-Mt1, que registró los máximos porcentajes de enraizamiento, con casi la totalidad de individuos enraizados, siendo un porcentaje alto para los

resultados obtenidos, ya que el siguiente registrado, corresponde a la interacción Ba1-19G40, donde enraizó la mitad de los individuos.

Bennett et al. (1994), en ensayos de enraizamiento en micropropagación para *E. globulus*, obtuvo como resultado que los brotes provenientes de medios con zeatina como citoquinina de la fase de multiplicación reportaron mejores porcentajes de enraizamiento y de sobrevivencia que los brotes provenientes de medios de cultivos suministrados con benciladenina.

La benciladenina presentó efectos negativos para las fases posteriores de enraizamiento y aclimatación (Werbrouck et al., 1995). Según su ensayo en *Spathiphyllum floribundum*, la benciladenina fue metabolizada y acumulada en la base, como dos tipos de metabolitos, 9-beta-D-ribofuranosyl-benzyladenine (9G-BA) y 9-beta-D-glucopyranosyl-benzyladenine (9R-BA) que estarían implicados en la inhibición de la formación de raíces (Werbrouck et al., 1995). A su vez, para la misma especie, el principal derivado de la metatopolina fue N⁶-(3-O-β-D-glucopyranosyl) benzyladenine-9-riboside ((OG)[9R]mT), metabolito metabolizado más rápido que [9G]BA y rápidamente degradado durante la aclimatación (Werbrouck et al., 1996). Los metabolitos generados en la metabolización de la metatopolina presentaron un efecto menos tóxico y fueron fácilmente degradables (Werbrouck et al., 1996, Bairu et al., 2009).

6. CONCLUSIONES

Para la especie *E. globulus* existe una clara dependencia del genotipo en relación al tipo y concentración de citoquinina, lo que genera un efecto en la tasa de proliferación, en la calidad de explante obtenido y en el porcentaje de enraizamiento.

En *E. globulus*, el suministro de citoquininas es necesario para obtener explantes de calidad para la micropropagación. En la fase de multiplicación permitió obtener proliferación y elongación, además de una menor incidencia de callos, mientras que en la fase de enraizamiento el tratamiento sin citoquinina obtuvo porcentajes de enraizamiento casi nulos.

Con MT se obtuvieron mejores porcentajes de enraizamiento y longitud de raíz. A su vez Mt1 obtuvo la menor producción de plantas de menor tamaño y los mayores porcentajes de enraizamiento y longitud de raíz, superando los resultados obtenidos con BA.

7. RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de dos citoquininas en individuos de *Eucalyptus globulus* en el proceso de micropropagación, centrándose en las fases de multiplicación y enraizamiento. Para la fase de multiplicación, el estudio evaluó la proliferación de brotes, crecimiento en altura, producción de callo y vitrificación en plántulas, mientras que en la fase de enraizamiento el estudio se centró en determinar porcentajes de enraizamiento y longitud de raíz. Para el ensayo se utilizaron cuatro genotipos y cinco tratamientos, en función del tipo y la concentración de citoquinina suministrados en la fase de multiplicación. En la fase de multiplicación las plántulas fueron sub cultivadas cada cuatro semanas durante un período de 3 meses. Los resultados indicaron que es necesario el suministro de citoquininas en la fase de multiplicación, ya que sin estas se obtienen plántulas de menor tamaño, con baja proliferación y con alta incidencia de callos en hojas y ápice. Los explantes provenientes de tratamientos Mt1 resultaron ser superiores en altura, al ser el único tratamiento que se diferenció con el testigo para los tres intervalos de altura estudiados. Comparativamente los explantes obtenidos de Ba1 resultaron en una altura inferior que los explantes Mt1. Para evaluar las variables de la fase de enraizamiento las plántulas fueron transferidas a medios de enraizamiento durante tres semanas. Los resultados mostraron que el tratamiento sin citoquinina registró bajos porcentajes de enraizamiento (6,3%), debido a una mala conformación de explante en la fase de multiplicación. El tratamiento con Mt1 obtuvo los máximos porcentajes de enraizamiento (39%) y longitud de raíz, y el genotipo 19G40 presentó los máximos porcentajes de enraizamiento (45,8%), siendo el único genotipo que enraizó en todos los tratamientos. A su vez la combinación 19G40-Mt1 presentó el porcentaje más alto de enraizamiento, de un 93%.

Palabras clave: *Eucalyptus globulus*; Micropropagación; Metatopolina.

8. SUMMARY

The objective of this thesis was to evaluate the effect of two cytokinins in *Eucalyptus globulus* individuals in the micropropagation process, focusing on the multiplication and rooting phases. For the multiplication phase, the study evaluated shoot proliferation, height growth, callus production and vitrification in explants, while in the rooting phase the study focused on determining rooting percentages and root length. Four genotypes and five treatments were used for the experiment, depending on the type and concentration of cytokinin supplied in the multiplication phase. In the multiplication phase, the explants were subcultured every four weeks for a period of 3 months. The results indicated that the supply of cytokinins is necessary in the multiplication phase, since without them, small explants, with low proliferation rate and with a high incidence of calluses in leaves and apex. The explants from Mt1 treatments turned out to be superior in height, as it was the only treatment that differed from the control for the three height intervals studied. Comparatively, the explants obtained from Ba1 resulted in a lower height than the Mt1 explants. To evaluate the variables of the rooting phase, the explants were transferred to rooting media for three weeks. The results showed that treatment without cytokinin registered low rooting percentages (6,3%), due to poor explant conformation in the multiplication phase. The treatment with Mt1 obtained the highest rooting percentages (39,0%) and root length, and the 19G40 genotype presented the highest rooting percentages (45,8%), being the only genotype that rooted in all treatments. In turn, the 19G40-Mt1 combination presented the highest rooting percentage, 93%.

Keywords: *Eucalyptus globulus*; Micropropagation; Metatopolin.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Aggarwal, D.; Kumar, A.; Sharma, J.; Reddy, S. 2012. Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. 48(5): 521 - 529.
2. Ahloowalia, B.; Prakash, J.; Savangikar, V.; Savangikar, C. 2004. Plant Tissue Culture. In: International Atomic Energy Agency. eds. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Vienna, IAEA. pp. 3 - 10.
3. Ahmad, A.; Anis, M. 2019. *Meta*-topolin Improves In Vitro Morphogenesis, Rhizogenesis and Biochemical Analysis in *Pterocarpus marsupium* Roxb.: A Potential Drug-Yielding Tree. Journal of Plant Growth Regulation. 38(3): 1007 - 1016.
4. Aremu, A.; Bairu, M.; Dolezal, K.; Finnie, J.; Van Staden, J. 2012. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 108(1): 1 - 16.
5. _____.; A.; Doležal, K.; Van Staden, J. 2017. New cytokinin-like compounds as a tool to improve rooting and establishment of micropropagated plantlets. Acta Horticulturae. 1155: 497 - 504.
6. _____.; Fawole, O.; Makunga, N.; Masondo, N.; Moyo, M.; Buthelezi, N.; Amoo, S.; Spíchal, L.; Doležal, K. 2020. Applications of Cytokinins in Horticultural Fruit Crops: Trends and Future Prospects. Biomolecules. 10(9): 1 - 71.
7. Bairu, M.; Stirk, W.; Dolezal, K.; Van Staden, J. 2007. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 90(1): 15 - 23.

8. _____.; Stirk, W. A.; Dolezal, K.; Van Staden, J. 2008. The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars 'Williams' and 'Grand Naine' (Musa spp. AAA). Plant Cell Tissue Organ Culture. 95(3): 15 - 23.
9. _____.; Jain, N.; Stirk, W. A.; Doležal, K.; Van Staden, J. 2009. Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the médium. South African Journal of Botany. 75(1): 122 - 127.
10. Bennett, I. J.; McComb, J.; Tonkin, C.; McDavid, D. 1994. Alternating Cytokinins in Multiplication Media in vitro shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. Annals of Botany. 74(1): 53 - 58.
11. _____.; McDavid, D.; McComb, J. 2003. The influence of ammonium nitrate, pH and butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalyptus globulus*. Biologia Plantarum. 47(3): 355 - 360.
12. Beyl, C. 2011. Micropropagation. In: Beyl, C.; Trigiano, R. eds. Plant propagation concepts and laboratory exercises. Boca Raton, Florida, CRC. pp. 371 - 384.
13. Borges, S. R.; Xavier, A.; de Oliveira, L. S.; de Melo, L. A.; Rosado, A. M. 2011. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. Revista Árvore. 35(2): 425 - 434.
14. Brondani, G. E.; Baccarin, F. J.; de Wit Ondas, H. W.; Stape, J. L.; Gonçalves, A. N.; de Almeida, M. 2012. Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* mini-cuttings. Journal of Forestry Research. 23(4): 583 - 592.
15. Brussa, C. 1994. Eucalyptus: especies de cultivo más frecuente en Uruguay y regiones de clima templados. Montevideo, Hemisferio Sur. 314 p.

16. Calderon-Baltierra, X.; Montenegro, G.; de García, E. 2004. Ontogeny of in vitro rooting processes in *Eucalyptus globulus*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. 40(5): 499 - 503.
17. Castillo, A.; Cabrera, D.; Rodríguez, P.; Zappolo, R. 2021. Improved micropropagation protocol for pear rootstocks of the OH×F series and a new selection. Acta Horticulturae. 1303: 107 - 112
18. Cordeiro, M.; Brondani, G.; Oliveira, L.; Almeida, M. 2014. Culture medium, BAP and NAA on in vitro multiplication of *Eucalyptus globulus* Labill clone. Scientia Forestalis. 42(103): 337 - 344.
19. Correa, L.; Paim, D.; Schwambach, J.; Fett-Neto, A. 2005. Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. Plant Growth Regulation. 45(1): 63 - 73.
20. Correia, D.; Goncalves, A. N.; Couto, H. Y. Z.; Ribeiro, M. C. 1995. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF). 48-49: 107 - 116.
21. De Fossard, R. A.; Mint, A.; Lee, E. C. M. 1974. A broad spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabacum*) pith Tissue callus. Physiologia plantarum. 30(2): 125 - 130.
22. De Klerk, G. J.; Van der Krieken, W.; De Jong, J. C. 1999. Review: The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. In Vitro Cellular & Developmental Biology–Plant. 35(3): 189 - 199.
23. _____.; Hanecakova, J.; Jasik, J. 2001. The role of cytokinins in rooting of stem slices apple microcuttings. Plant Biosystems. 135(1): 79 - 84.
24. _____. 2002. Rooting of microcuttings: theory and practice. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. 38(5): 415 - 422.
25. _____. 2007. Stress in plants cultured in vitro. Propagation of Ornamental Plants. 7(3): 129 - 137.

26. Faria, J. C. T.; Ribeiro-Kumara, C.; Costa, R.; Nieri, E.; Carvalho, D.; Pinto, J.; Neto, A.; Brondani, G. E. 2022. Use of biodegradable polyester-based microvessels for micropropagation of mature *Eucalyptus microcorys*. *New Zeland Journal of Forestry Science*. 52(3): 1 - 13.
27. Fett-Neto, A. G.; Fett, J. P.; Vieira, L. W.; Pasquali, G.; Termignoni, R. R.; Ferreira, A. G. 2001. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology*. 21(7): 457 – 464.
28. Fotopoulos, S.; Sotiropoulos, T. E. 2005. In vitro rooting of PR 204/84 rootstock (*Prunus persica* x *P. amygdalus*) as influenced by mineral concentration of the culture medium and exposure to darkness for a period. *Agronomy Research*. 3(1): 3 - 8.
29. George, E. 2010. Plant Tissue Culture Procedure - Background. In: George, E.; Hall, M.; De Klerk, G. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3a. ed. Dordrecht, Springer. pp. 1 - 28.
30. _____.; Debergh, P. 2010. Micropropagation: Uses and Methods. In: George, E.; Hall, M.; De Klerk, G. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3a. ed. Dordrecht, Springer. pp. 29 - 64.
31. Gomes, F.; Canhoto, J. 2003. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining Gum). *In Vitro Cellular & Developmental Biology–Plant*. 39(3): 316 - 321.
32. Hazarika, B.; Teixeira, J.; Talukdar, A. 2006. Effective Acclimatization of in Vitro Cultured Plants: Methods, Physiology and Genetics. In: Teixeira, J. ed. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. London, Global Science Books. pp. 427 - 438.
33. Iliev, I.; Gajdošová, A.; Libiaková, G.; Jain, S. 2010. Plant Micropropagation. In: Davey, M.; Anthony, P. eds. *Plant Cell Culture: Essential Methods*. Sussex, John Wiley and Son. pp. 1 - 20.

34. Ivanova, V.; Nacheva, L.; Panchev, V. 2021. Possibilities for application of in vitro techniques in propagation of species of the genus *Tilia* sp. Bulgarian Journal of Agricultural Science. 27(1): 103 - 110.
35. Jordan, M.; Casaretto, J. 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citoquininas. In: Squeo, A.; Cardemil, L. eds. Fisiología Vegetal. La Serena, Universidad de La Serena. pp. 1 - 28.
36. Kane, M.; Kauth, P.; Stewart, S. 2015. Micropropagation. In: Beyl, C.; Trigiano, R. eds. Plant propagation concepts and laboratory exercises. 2a. ed. Boca Raton, Florida, CRC. pp. 359 - 370.
37. Kester, D.; Davies, F.; Geneve, R. 2014. Principles of Tissue Culture and Micropropagation. In: Hartmann, H.; Kester, D. eds. Hartmann & Kester's Plant Propagation: Principles and Practices. 8a. ed. London, Pearson Prentice Hall. pp. 644 - 751.
38. Komatsu, Y. H.; Batagin-Piotto, K. D.; Brondani G. E.; Gonçalves, A. N.; de Almeida, M. 2011. In vitro morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. Journal of Forestry Research. 22(2): 202 - 215.
39. Kumar, S.; Singh, R.; Kalia, S.; Sharma, S. K.; Kalia, R. K. 2016. Recent advances in understanding the role of growth regulators in plant growth and development *in vitro* – I. conventional growth regulators. Indian Forester. 142(5): 459 - 470.
40. Li, S.; Xue, L.; Xu, S.; Feng, H.; An, L. 2009. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. The Botanical Review. 75(2): 230 - 247.
41. Lloyd, G. B.; McCown, B. H. 1980. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kolmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings International Plant Propagators Society. 30(5): 421 - 427.
42. Martellet, C. F.; Fett-Neto, A. G. 2005. Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. Plant Growth Regulation. 45(1): 1 - 10.

43. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, UY). 2020. Anuario estadístico agropecuario 2020. Montevideo. 270 p.
44. Morales Olmos, V.; Ansuberro, J.; Pintos, M.; Perez, G. 2018. Panorama empresarial del sector forestal uruguayo productor de *Eucalyptus globulus*. Agrociencia (Uruguay). 22(1): 133 - 139.
45. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum. 15(3): 473 - 497.
46. Naaz, A.; Hussain, S.; Alatar, A. 2019. Meta-topolin improved micropropagation in *Syzygium cumini* and acclimatization to ex vitro conditions. Biologia Plantarum. 63(1): 174 - 182.
47. Nehra, N.; Becwar, M.; Rottmann, W.; Pearson, L.; Chowdhury, K.; Chang, S.; Wilde, H.; Kodrzycki, R.; Zhang, C.; Gause, K.; Parks, D.; Hinchee, M. 2005. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. 41(6): 701 - 717.
48. Neumann, K. H.; Kumar, A.; Imani, J. 2009. Plant cell and tissue culture- a tool in biotechnology. Basics and Applications. Heidelberg, Springer. 341 p.
49. Oliveira, L. S.; Xavier, A.; Otoni, W. C.; Campos, J. M. S.; Viccini, L. F.; Takahashi, E. K. 2017. Assessment of genetic stability of micropropagated *Eucalyptus globulus* Labill hybrid clones by means of flow cytometry and microsatellites markers. Revista Árvore. 41(1): 1 - 10.
50. Pospíšilová, J.; Synková, H.; Haisel, D.; Semorádová, Š. 2007. Acclimation of Plantlets to *Ex Vitro* Conditions: Effects of Air Humidity, Irradiance, CO₂ Concentration and Abscissic Acid. Acta Horticulturae. 748: 29 - 38.

51. Preece, J. 2012. Stock Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis. In: George, E.; Hall, M.; De Klerk, G. eds. Plant Propagation by Tissue Culture. 3a. ed. Dordrecht, Springer. pp. 403 - 422.
52. Rojas-Martínez, L.; Visser, R. G. F.; de Klerk, G. J. 2010. The Hyperhydricity syndrome: waterlogging of plant tissues as a major cause. *Propagation of Ornamental Plants*. 10(4): 169 - 175.
53. _____.; de Klerk, G. J. 2010. Hyperhydricity in plant tissue culture. Drowning from within. *Prophyta Annual*. 2010: 22 - 25.
54. Strnad, M.; Peters, W.; Beck, E. Kamínek, M. 1992. Immunodetection and Identification of N6-(o-Hydroxybenzylamino) Purine as a Naturally Occurring Cytokinin in *Populus x canadensis* Moench cv *Robusta* Leaves'. *Plant physiology*. 99(1): 74 - 80.
55. _____.; Hanuš, J.; Vaněk, T.; Kamínek, M.; Ballantine, J. A.; Fussell, B.; Hanke, D. E. 1997. Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x Canadensis* Moench., Cv. *Robusta*). *Phytochemistry*. 45(2): 213 - 218.
56. Taiz, L.; Zeiger, E.; Max Moller, I.; Murphy, A. 2015. *Plant Physiology and Development*. 6a. ed. Massachusetts, Sinauer Associates. 761 p.
57. Taji, A.; Dodd, W.; Williams, R. 1992. *Plant Tissue Culture Practice*. Armidale, University of New England. 122 p.
58. Trindade, H.; Ferreira, J. G.; Pais, M. S.; Aloni, R. 1990. The role of cytokinin and auxin in rapid multiplication of shoots of *Eucalyptus globulus* grown in vitro. *Australian Forestry*. 53(4): 221 - 223.
59. _____.; Pais, M. S. 1997. In vitro studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability. *In Vitro Cellular & Developmental Biology–Plant*. 33(1): 1 - 5.
60. Tripepi, R. 2015. Micropropagation. In: Beyl, C.; Trigiano, R. eds. *Plant propagation concepts and laboratory exercises*. Boca Raton, Florida, CRC. pp. 405 - 415.

61. Trueman, S.; Hung, C.; Wendling, I. 2018. Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. *Forests*. 9(2): 1 - 42.
62. Wendling, I.; Xavier, A. 2010. Influencia do ácido indolbutírico e da minisestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore*. 20(6): 921 - 930.
63. Werbrouck, S.; van der Jeugt, B.; Dewitte, W.; Prinsen, E.; Van Onckelen, H. Debergh, P. 1995. The Metabolism of benzyladenine in *Spathiphyllum floribundum* "Schott Petite" in relation to acclimatization problems. *Plant Cell Reports*. 14(1): 662 - 665.
64. _____.; Strnad, M.; Van Onckelen, H. A.; Debergh, P. C. 1996. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in Tissue culture? *Physiologia Plantarum*. 98(2): 291 - 297.
65. Wojtania, A. 2010. Effect of meta-topolin on in vitro propagation of *Pelargonium x Hortorum* and *Pelargonium x Hederifolium* cultivars. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 79(2): 101 - 106.
66. Wu H.; XiaoNan, Y.; Teixeira, J. A.; GuangPei, L. 2011. Direct shoot induction of *Paeonia lactiflora* 'Zhong Sheng Fen' and rejuvenation of hyperhydric shoots. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 39(4): 271-278

10. ANEXO

Anexo No. 1. Cuadro del medio de multiplicación.

Medio de multiplicación		
	Compuesto	Concentración
Macronutrientes de sales MS	NH ₄ NO ₃	8,1 mM
	K ₂ HPO ₄	0,8 mM
	MgSO ₄	1,4 mM
	KNO ₃	4,4 mM
	MgCl ₂	2,9 mM
	CaCl ₂ 2H ₂ O	3,9 mM
	Ca(NO ₃) ₂	6,6 mM
Micronutrientes de sales WPM	H ₃ BO ₃	100,3 µM
	CuSO ₄	1,6 µM
	MgSO ₄	185,3 µM
	Na ₂ MoO ₄	1,2 µM
	ZnSO ₄	53,3 µM
Vitaminas de Fossard (De Fossard et al., 1974)	Acido nicotínico	40,6 µM
	Piridoxina	7,7 µM
	Tiamina	50,9 µM
	Pantotenato de calcio	114,0 µM
	Ácido ascórbico	10,2 µM
	Glicina	46,6 µM
	Biotina	1,0 µM
	Cisteína	173,3 µM
	Riboflavina	1,0 µM
Reguladores de crecimiento	ANA	0,05 µM
	Citoquininas	Ver cuadro No. 2
	Myo-inositol	555,1 µM
	Agar	7,2 g
	Sacarosa	29,2 mM

Anexo No. 2. Cuadro del medio de enraizamiento.

Medio de enraizamiento		
	Compuesto	Concentración
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	6,9 mM
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,0 mM
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50 mM
	KNO ₃	6,3 mM
	K ₂ HPO ₄	0,3 mM
Micronutrientes	H ₃ BO ₃	33,4 µM
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,03 µM
	MnSO ₄ .H ₂ O	33,3 µM
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,3 µM
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	10,2 µM
	FeSO ₄ .7H ₂ O	33,3 µM
	Na ₂ .EDTA	270,4 µM
	KI	1,7 µM
Vitaminas	Tiamina	0,4 µM
	Ácido nicotínico	4,1 µM
	Piridoxina	3,0 µM
	Glicina	11,3 µM
	Myo-inositol	555,1 µM
Reguladores de crecimiento	AIB	3,0 µM
	Sacarosa	29,2 mM
	Agar	5,5 g

Anexo 3. Diseño estadístico del modelo factorial:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

para $i = 1, \dots, a$, $j = 1, \dots, b$, $k = 1, \dots, n$ donde:

- μ es el efecto medio global.
- α_i es el efecto incremental sobre la media causado por el nivel i del factor A.
- β_j el efecto incremental sobre la media causado por el nivel j del factor B.
- $(\alpha\beta)_{ij}$ el efecto incremental sobre la media causado por la interacción del nivel i del factor A y el nivel j del factor B.
- ϵ_{ijk} el término de error.

Anexo No. 4. Datos estadísticos.

El análisis estadístico para la variable altura de planta menor a 0,5 cm en función de los tratamientos, el n fue de 12, un error experimental (E.E.) de 0,55 y una diferencia significativa mínima (DSM) de 2,25. En función de los genotipos el n fue de 15, el E.E. de 0,5 y el DSM 1,88. Y para la interacción genotipo por ambiente presentó un n de 3, un E.E. de 1,11 y un DSM de 5,96.

En el análisis para la variable altura de planta entre 0,5 a 1 cm, en cuanto a los tratamientos el n fue de 12, el E.E. de 0,69 y el DSM 1,588. En función de los genotipos presentó un n de 15, un E.E. de 0,63 y un DSM de 2,348. La interacción tratamiento por genotipo tuvo un n de 3, un E.E. de 1,38 y un DSM de 7,43

En relación al análisis estadístico para la variable altura de planta mayor a 1 cm, para los tratamientos el n fue de 15, el E.E. de 0,44 y el DSM fue de 1,997. En cuanto a los genotipos el n fue de 15, el E.E. de 0,44 y el DSM de 1,676. Mientras que para la interacción genotipo por tratamiento el n fue de 3 y el E.E. de 0,99 y el DSM de 5,30.

Para la variable tasa de proliferación en función de los tratamientos el n fue de 12, un E.E. de 0,46 y un DSM de 1,67. Mientras que, para los genotipos, el n fue de 15, con un E.E. de 0,41 y un DSM de 1,569. La interacción tratamiento por genotipo presentó un n de 3, E.E. de 0,92 y DSM de 4,96.

En cuanto al análisis estadístico para la variable presencia de callo en función de los tratamientos, el n fue de 12, el E.E. de 0,37 y la DSM de 1,69. En cuanto a los genotipos el n fue de 15, el E.E. de 0,37 y la DSM de 1,42. La interacción tratamiento por genotipo presentó un n de 3, con un E.E. de 0,64 y un DSM de 4,5.