

REGENERACIÓN IN VITRO DE PLANTAS DE EUCALYPTUS CINEREA F. V. MUELL, A PARTIR DE COTILEDONES E HIPOCOTILOS.

Plant regeneration in vitro of Eucalyptus cinerea F.v. Muell, from cotyledon and hypocotyl explants.

Idel Contreras G. y Jonatha Almeida P.

Laboratorio de Cultivos in vitro, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. idelcg91@argentina.com

RESUMEN

Los eucaliptos son árboles de crecimiento rápido originarios de Australia, muchos de ellos son comercialmente importantes por su madera, pulpa para papel y aceites esenciales. Diferentes especies han sido propagadas in vitro exitosamente a partir de órganos juveniles como explantes, tales como los cotiledones e hipocotilos. Dada la importancia de *E. cinerea* (eucalipto plateado), como especie ornamental y por el uso de sus ramas en arreglos florales, se iniciaron ensayos para su micropropagación directa. Fueron utilizados como explantes cotiledones e hipocotilos de plantas germinadas asépticamente y luego cultivados en medio nutritivo básico MS el cual contenía (en mg*⁻¹-l): 0,01; 0,02; 0,05 y 0,1 de TDZ, vitaminas de Gamborg y 0,18% de Phytigel. Después de unas 8 semanas de incubación bajo luz continua de 800-900 lux y 28± 2°C, los cotiledones comenzaron a generar yemas en todos los medios con TDZ. La mayor proliferación de éstas fue obtenida en el medio con 0,05 mg*⁻¹-l de TDZ. Por otro lado, los hipocotilos formaron callos en el medio con 0,05 mg*⁻¹-l y pequeñas plantas en los medios con 0,02 y 0,1 mg*⁻¹-l de TDZ. El proceso morfogénico directo se ha mantenido por varios meses, realizando subcultivos cada 4 semanas en el medio nutritivo inicial, carente del fitoregulator. El enraizamiento de las plantas obtenidas ocurrió alrededor de las 11 semanas cuando éstas fueron transferidas al medio nutritivo MS a la mitad de su fuerza iónica, libre de auxinas. Las plantas crecen en condiciones de invernadero vigorosamente sin mostrar alteraciones fenotípicas.

Palabras clave: Eucalipto plateado, micropropagación directa, TDZ.

ABSTRACT

Eucalyptus are fast growing trees from Australia. Many of them are commercially important because their wood, pulp to make paper, essential oils, etc. A good number of their species have been successfully propagated in vitro using young explants as cotyledons and hypocotyls. Taking in account that *E. cinerea* (silver eucalyptus) is an attractive tree which is used in gardens and backyards, several assays were done to micropropagate it. Cotyledons and hypocotyls were used as explants coming from aseptical seedlings germinated in vitro. They were cultured on Murashige and Skoog (MS, 1962) basic nutritional medium containing (mg*⁻¹-l) TDZ 0,01; 0,02; 0,05, and 0,1; Gamborg vitamins and Phytigel 0,18%. After 8 weeks incubating under continuous light (800-900 lux) and 28 ± 2 °C cotyledons starting bud proliferation all over nutritious media. However, best bud regeneration was observed on medium containing TDZ 0,05 mg*⁻¹-l. On the other hand, hypocotyls produced calli on medium containing TDZ 0,05 mg*⁻¹-l and small plantlets on media containing TDZ 0,02 and 0,1 mg*⁻¹-l. Direct morphogenesis remained for several months after explants were cultured on initiation media hormone free. Plant rooting was observed around 11 weeks after culture initiation, when small plants were transferred to a half ionic strength MS basic medium auxin free. Around 2 weeks later, when plants were acclimatized they were transferred to the greenhouse conditions, where are growing vigorously.

Key words: Silver eucalyptus, direct micropropagation, TDZ

INTRODUCCIÓN

Los eucaliptos son árboles de crecimiento rápido, originarios de Australia, ampliamente distribuidos en el mundo. Muchos de ellos son comercialmente importantes por su madera, pulpa para papel, aceites esenciales, etc. Desde hace cierto tiempo han sido desarrollados métodos para la propagación in vitro rápida de especies vegetales, como una técnica para obtener genotipos selectos que de una u otra forma van a incrementar la productividad de estos árboles. En este sentido, diferentes especies de eucaliptos

han sido propagados in vitro exitosamente, en algunos casos, usando explantes provenientes de plantas maduras (Muralidharan y Mascarenhas, 1987, Subbaiah y Minocha, 1990, Lainé y David, 1994.) y en otros, cultivando órganos o tejidos de plántulas o de individuos jóvenes (Bennet y McComb, 1982, Diallo y Duhoux, 1984, Adam et al., 1992). Dada la importancia del *E. cinerea* (Eucalipto plateado), tanto como especie ornamental de jardín, como por el uso de sus ramas para hacer arreglos florales, se iniciaron ensayos con el fin de estandarizar la metodología para su micropropagación rápida y directa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron usadas semillas del eucalipto plateado para ser germinadas asépticamente. Para esto se uso el Medio Orgánico Mínimo (MOM, MS, 1962), sólido y luego de esterilizarlas superficialmente fueron colocadas en este medio e incubadas a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, en oscuridad completa. Cuando las plántulas tenían entre 7 y 15 días de edad fueron escindidos sus cotiledones e hipocotilos para ser cultivados en medio nutritivo básico MS, el cual contenía además (en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$): Inositol 100, vitaminas de Gamborg (B5), sacarosa 30000 y para solidificar el medio Phytigel (MR) al 0,18%. El regulador del crecimiento usado fue TDZ a las concentraciones siguientes: 0,0; 0,01; 0,02; 0,05 y 0,1. Los cultivos realizados fueron incu-

bados por 72 horas en oscuridad completa y luego fueron colocados bajo intensidad lumínica continua de 800-900 lux y $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Los subcultivos a medios frescos de igual composición química fueron realizados entre 4 y 6 semanas. Una vez que los procesos organogénicos fueron observables, los brotes y callos obtenidos fueron transferidos a medios nutritivos sin el TDZ. Cuando ocurrió el alargamiento de los vástagos, éstos fueron individualizados y transferidos a medios nutritivos sólidos MS a media fuerza iónica, libres de hormonas donde ocurrió el enraizamiento. Posteriormente las plantas del eucalipto plateado fueron sembradas en recipientes plásticos con una mezcla semiestéril de arena y tierra negra en proporciones iguales y la aclimatización final se llevó a cabo en condiciones de invernadero.



Figura 1. Numerosos vástagos del eucalipto plateado neo-generados a partir de cotiledones en medio MS con TDZ $0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

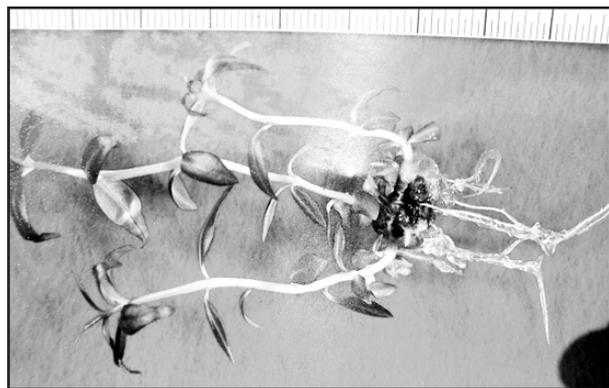


Figura 2. Vástagos de diferentes tamaños producidos in vitro a partir de hipocotilo del eucalipto plateado cuando el medio nutritivo básico MS contenía $0,02 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

CUADRO 1. Regeneración de vástagos y producción de callos a partir de cotiledones e hipocotilos de *E. cinerea*, usando como inductor el TDZ.

TDZ (mg.l-1)	COTILEDONES		HIPOCOTILOS	
	Callo	Vástago	Callo	Vástago
0,00	+	-	+	-
0,01	-	++	+	-
0,02	-	++	+	+++
0,05	-	+++	++	-
0,10	-	+	++	+

Callo: + = incipiente
++ = moderado

Vástago: + = hasta 5
++ = de seis a 12
+++ = de 13 a incontables

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los ensayos para la inducción in vitro de plantas de *E. cinerea* añadiendo a los medios nutritivos TDZ a concentraciones variadas pueden verse en la Tabla 1. En tal sentido, puede decirse que las diferentes dosis añadidas de este regulador inducen la neo-regeneración de brotes en menor o mayor grado, tanto en los cotiledones como en los hipocotilos del eucalipto plateado. Allí puede verse que en el caso de los cotiledones, la concentración de 0,05 mg*1⁻¹ de TDZ indujo el mayor número de brotes (Figura 1), los que posteriormente se alargaron y produjeron raíces, sin embargo, concentraciones menores (0,01 y 0,02 mg*1⁻¹) de esta hormona también produjeron una respuesta organogénica directa aunque en menor proporción. Respuesta similar a la descrita fue reportada por Nugent et al. (2001), quienes trabajaron con explantes cotiledonares e hipocotilares de *E. globulus*. Ellos usaron TDZ (0,05iM) en combinación con ANA + 2,4-D, AIB, AIA y Dicamba a concentraciones variadas. La mejor combinación, de acuerdo a sus resultados fueron TDZ + 2,4-D y TDZ + ANA, para la inducción de yemas adventicias.

El TDZ (N fenil-N'-1,2,3- tiazol- 5-ylúrea), es considerado como una de las sustancias más activas con propiedades de citocinina, la cual facilita la micropropagación eficiente de muchas especies leñosas recalcitrantes (Thomas y Katterman,1986, Huetteman y Preece,1993). Aún cuando los eucaliptos que han

sido cultivados in vitro, no se comportan de manera recalcitrante, el tiazurón, cuando ha sido usado como inductor de organogénesis en estas plantas, ha dado muy buenos resultados (Azmi et al., 1997, Nugent et al., 2001 (a), Nugent et al., 2001 (b)).

En lo referente a la respuesta in vitro de los hipocotilos del eucalipto plateado, puede observarse en la Cuadro 1, que aún cuando todos los explantes formaron callos de incipientes a moderados, hubo también inducción notable de yemas cuando la concentración de TDZ en el medio fue de 0,02 mg*1⁻¹ (Figura 2). Los hipocotilos de diferentes especies de plantas (leñosas o no) y específicamente las de

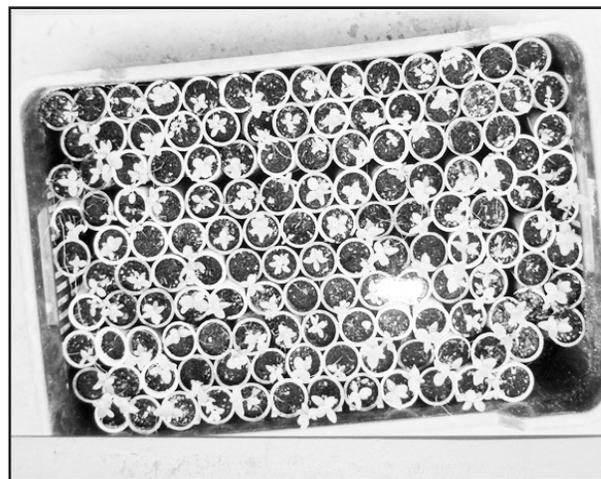


Figura 3. Plantas del eucalipto plateado sembradas en tubetes con mezcla de arena y tierra negra (1:1) creciendo en invernadero

Eucalyptus spp., han mostrado gran capacidad de respuesta in vitro, en términos de ser prolíficos en la generación de yemas.

Azmi et al. (1997), reportaron alta frecuencia de regeneración en *E. globulus* a partir del cultivo de hipocotilos. Estos autores indican que hasta un 70% de los explantes generaron entre 5 y 20 yemas en medio nutritivo MS con BA (0,2 mg*1⁻¹) + ANA (0,01-1,0 mg*1⁻¹) y con BA + TDZ ambos a 0,2 mg*1⁻¹.

Los resultados de este trabajo muestran que la mejor respuesta organogénica se logró con el cultivo de cotiledones, puesto que, a excepción del control, la mayoría de los restantes cultivos con los tratamientos con el TDZ, generaron yemas, mientras que los hipocotilos, en los medios con iguales concentraciones de la hormona, produjeron callos, excluyendo el caso mencionado antes.

Por otro lado, la individualización de las plantas obtenidas para su alargamiento y posterior enraizamiento en medio nutritivo fresco (MS), a la mitad

de su fuerza iónica, sin hormonas, generó en los vástagos raíces vigorosas, lo que condujo a sembrar estas plantas en sustrato semiestéril conformado por tierra negra y arena (1:1) y luego fueron llevadas a condiciones de invernadero, donde han crecido sin mostrar alteración fenotípica alguna (Figura 3).

El TDZ, como puede verse en estos resultados, promueve la formación de callos, yemas y raíces en el eucalipto plateado; similares respuestas han sido reportadas por otros autores con otras especies (Thomas y Katterman, 1986, Huetteman y Preece, 1993). De igual manera se ha encontrado que este regulador induce la embriogénesis somática (Gill y Saxena, 1992, Contreras, 1995), sin añadir al medio de cultivo auxina alguna, como regularmente se hace. Tal variedad de respuestas inducidas por el TDZ puede deberse a que éste causa la acumulación y/o biosíntesis de citocininas endógenas por un lado, y puede además por otro lado, modular a otros reguladores endógenos del crecimiento, como se piensa que ocurre con las auxinas (Gill y Saxena, 1992).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, S., D. CHRIQUI Y JC. CAISSARD. 1992. Transformation génétique et régénération de bourgeons transgéniques chez *Eucalyptus globulus*. AFOCEL 1991. Biotechnologies appliquées aux arbres forestiers, Paris .pp 81-110.
- BENNETT, JJ. Y JA. MCCOMB. 1982. Propagation of jarrah (*Eucalyptus marginata*) by organ and tissue culture. Aust. For. Res. 12: 121-127.
- CONTRERAS G, I. 1995. Cultivos in vitro de maní (*Arachis hypogaea L.*) Trabajo de Ascenso a Profesor Titular. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. 83 p.
- DIALLO, N. Y E. DUHOUX. 1984. Organogénesis et multiplication in vitro chez *Eucalyptus camaldulensis*. J.Plant Physiol. 115 : 177-182.
- GILL, R. Y PK. SAXENA. 1992. Direct somatic embryogenesis and regeneration of plants from seedling plants of peanut (*Arachis hypogaea*):promotive role of thidiazuron. Can. J. Bot. 70: 1186-1192.
- HUETTEMAN, CA. Y JE. PREECE. 1993. Thidiazuron : a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 33: 105-119.
- LAINÉ, E. Y A. DAVID. 1994. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 13: 473-476.
- MURALIDHARAN, EM. Y AF. MASCARENHAS. 1987. In vitro plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *E. citriodora*. Plant Cell Rep. 6: 256-259.

- MURASHIGE, T. Y F. SKOOG 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NUGENT, G., S. CHANDLER, P. WHITEMAN Y T. STEVENSON . 2001. (a). Adventitious bud formation in *Eucalyptus globulus* Labill. *In vitro Cell Dev. Biol.- Plant.* 37: 388-391.
- NUGENT, G., S. CHANDLER, P. WHITEMAN Y T. STEVENSON. 2001 (b). Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 67: 85-88.
- SUBBAIAH, MM Y SC. MINOCHA. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. *Plant. Cell Rep.* 9: 370-373.
- THOMAS, JC. Y FR. KATTERMAN. 1986. Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant. Physiol.* 81: 681-683.