

X
R/ ✓
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA



ESTUDIO PRELIMINAR DE CULTIVO in vitro DE
SEGMENTOS NODALES DE Eucaliptus camaldulensis
EN EL SALVADOR

SEMINARIO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

AGUILAR FLORES, JOSE ATILIO
GOMEZ ARTEAGA, CARLOS ANTONIO
RODRIGUEZ URRUTIA, EFRAIN ANTONIO

PREVIA OPCION AL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO

ENERO 1989

SAN SALVADOR,

EL SALVADOR,

CENTRO AMERICA.

Tesis
A 283u



f. 3-639

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR : LIC. LUIS ARGUETA ANTILLON

SECRETARIO GENERAL : ING. RENE MAURICIO MEJIA MENDEZ

d / por Admin Académico for de cc. AA. / feb. / 89

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

DECANO : ING. AGR. HECTOR ARMANDO MARROQUIN AREVALO

SECRETARIO : ING. AGR. JORGE ALBERTO ULLOA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

JEFE DE DEPARTAMENTO : ING. AGR. JOSE RICARDO T. VILANOVA

ASESOR : ING. AGR. GUILLERMO A. RAMOS OLIVA

JURADO CALIFICADOR : - ING. AGR. JOSE RICARDO T. VILANOVA
- ING. AGR. FELIPE ALFREDO CERON MARTI
- ING. AGR. MARIO ANTONIO ORELLANA

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo desean expresar sus sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones.

- Al Ing. M. Sc. Guillermo A. Ramos Oliva, asesor, por su desinteresada colaboración en la dirección de este trabajo.
- Al Dr. Héctor González Rosas, del Centro de Fruticultura, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México; por su ayuda en la realización de esta investigación.
- Al Dr. Víctor Manuel Villalobos Arámbula, Jefe del Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales PMCT/CATIE; por el aporte de sus conocimientos sobre cultivo de tejidos.
- Al Dr. Nelson Espinoza del Centro Internacional de la Papa (CIP), por su cooperación en el desarrollo de esta investigación.
- A la Ing. Agr. Julia Amalia Nuila de Mejía, por su atenta colaboración y asesoría en el análisis, interpretación y redacción de los resultados.
- Al Ing. M. Sc. Nicolás E. Guillén Astacio, el Br. William Ramos e Irma Murcia, del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CENTA, por su constante colaboración.
- Al Ing. M. Sc. Hugo Antonio Zambrana Rivera, Jefe del Proyecto — Madeleña, por su acertada orientación para la selección del tema de investigación y colaboración económica.
- Al Ing. M. Sc. Felipe Alfredo Cerón Martí, técnico del ISIC, por su valioso aporte en el desarrollo de la presente investigación.

- A la señora Marina del Carmen Rodríguez, Secretaria del Departamento de Zootecnia, por su eficiente colaboración.

- A la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, por forjar nuestra preparación profesional.

DEDICATORIA

De José Atilio Aguilar Flores :

A DIOS : Por permitirme vivir y proporcionarme sabiduría.

A MIS PADRES : José Atilio Aguilar Valencia y
María Luz de Aguilar
Por sus constantes esfuerzos en el forjamiento de mi persona.

A MIS HERMANOS : Rubidia, Miguel Angel, Amalia y Renán
Con cariño.

A MIS SOBRINOS Y DEMAS FAMILIA : Con afecto.

A mis compañeros de Seminario, Tony y Carlos, por todos los esfuerzos compartidos.

A mi patria, El Salvador.

DEDICATORIA

De Carlos Antonio Gómez Arteaga :

A DIOS : Por permitirme vivir y proporcionarme sabiduría.

A MIS PADRES : Carlos Gómez Guardado y
María Segunda de Gómez
Por sus constantes esfuerzos en el forjamiento de mi persona.

A MIS HERMANOS : Reina, Irma, Elvira, Lilian y Pedro
Con cariño

A MIS SOBRINOS Y DEMAS FAMILIA : Con afecto

A mis compañeros de Seminario, Tony y Atilio, por todos los esfuerzos compartidos.

A mi patria, El Salvador.

DEDICATORIA

De Efraín Antonio Rodríguez Urrutia :

A DIOS : Por permitirme vivir y proporcionarme sabiduría.

A MIS PADRES : José Efraín Rodríguez Alvarez y Concepción Urrutia de Rodríguez
Por sus constantes esfuerzos en el forjamiento de mi persona.

A MIS HERMANAS : Lety, Bony, Miriam y Glenda
Con cariño.

A MI ABUELA Y DEMAS
FAMILIA : Con afecto

A mis compañeros de Seminario, Atilio y Carlos, por todos los esfuerzos compartidos.

A mi patria, El Salvador.

RESUMEN

El Eucaliptus camaldulensis es una especie promisoría con alto potencial de producción de biomasa, apto para los programas de reforestación en casi todas las regiones del mundo. Uno de los mayores problemas en su propagación es la heterogeneidad de los árboles obtenidos — por semilla debido a que presenta una polinización cruzada. La solución a este problema es la propagación vegetativa.

La falta de una metodología para la propagación vegetativa de E. camaldulensis, ha sido la restricción más importante para el mejoramiento de esta especie; sin embargo, la aplicación de la técnica del cultivo in vitro es una alternativa para resolver este problema.

En la presente investigación, realizada de julio a diciembre de 1988, en las instalaciones del CENTA, en San Andrés, Departamento de La Libertad, El Salvador, se evaluaron los medios de cultivo de Murashige y Skoog, Woody Plant Medium y el de Shenck e Hildebrandt para determinar cual era el más eficiente para la propagación in vitro de E. camaldulensis; a través de una metodología que permita la obtención de plantas por medio del cultivo in vitro partiendo de segmentos nodales provenientes de árboles sobresalientes.

El material vegetal debe de ser desinfectado sumergiéndolo previamente en hipoclorito de calcio al 10% durante 15 minutos, alcohol al 70% — por 3 minutos e hipoclorito de calcio al 8% durante 15 minutos.

Los medios de cultivo fueron ajustados a un pH de 5.7 y se le adicionó 2 g/l del fungicida sistémico Benlate y 350 mg/l del bactericida Ampicilina; además, se le agregó una solución antioxidante constituida por 250 mg/l de ácido cítrico y 300 mg/l de ácido ascórbico.

La inducción de la brotación y elongación de los brotes fué más eficiente en el medio de Murashige y Skoog suplementado con Cinetina, Benzil

adenina, Pantotenato de calcio y Biotina, proporcionando un fotoperíodo de 18 horas y una temperatura que varió entre 25-30°C.

El enraizamiento de los brotes fue más efectivo en el medio de Mu rashige y Skoog, disminuyéndolo su concentración a la mitad (1/2 MS) -- y adicionándole una mezcla de AIA, IBA, ANA e IPA en 10 mg/l de cada uno, incubados en la oscuridad por 72 horas y una temperatura que varió entre 25-30 °C, para ser luego transferidos a un medio de Murashige y Skoog (1/2 MS), conteniendo 0.25% de Carbón activado utilizando un fotoperíodo de 18 horas y temperatura de 25-30 °C durante 30 días.

Esta investigación mostró la posibilidad que existe de propagar -- segmentos nodales de Eucaliptus camaldulensis, haciendo uso de la técnica de cultivo in vitro.

SUMMARY

The Eucaliptus camaldulensis is a promising species with high potential of biomass production available for reforestation program in almost all parts of the world. One of the major problems in its propagation is the trees heterogenicity, obtained by seed, due to cross polination. The solution of this problem is vegetative propagation.

The lacking methodology for vegetative propagation of E. camaldulensis, has been the most important restriction for the improvement of this species, however, the application of in vitro culture technique is one alternative to solve this problem.

In the present work, which was realized from july to december of 1988 at the National Agrary Technology Center, San Andrés, La Libertad Department, El Salvador; were evaluated Murashige and Skoog, Woody Plant Medium and Shenck and Hildebrandt culture media, to determine which was the most efficient for in vitro propagation of E. camaldulensis; and to establish a methodology to obtain plants by in vitro culture using nodes segments from exelling trees.

The vegetative material must be disinfected by deeping previously in Calcium hipoclorite 10% during 15 minutes, alcohol 70% during 3 minutes and Calcium hipoclorite 8% during 15 minutes.

The culture medium were adjusted to pH 5.7 it was added the systemic fungicide Benlate 2 g/l, bactericide Ampiciline 350 mg/l and an antioxidant solution constituted by citric acid 250 mg/l and Ascorbic acid 300 mg/l.

The budding and elongation induction was more efficient in Murashige and Skoog medium supplied with Cinetine, Benzil adenine, Calcium Pantotenate and Biotine which gave 18 hours of photoperiod, and a temperature --

rank of 25-30 °C.

The buds rooting were more effective in Murashige and Skoog medium (half concentration), supplied with IAA, IBA, ANA, and IPA mixture, - 10 mg/l each, incubated in 72 hours of darkness, with a temperature - rank of 25-30 °C, and then transferred to Murashige and Skoog medium -- containing activated charcoal 0.25% and with 18 hours of photoperiod, and a temperature rank of 25-30 °C. during 30 days.

This work shows the possibility to propagate Eucalyptus camaldulensis nodes segments using in vitro culture technique.

	página
2.3.1.2.4.1 Citocininas.	10
2.3.1.2.4.2 Auxinas	10
2.3.1.3 Agua	11
2.3.1.4 Agentes solidificantes	11
2.3.1.5 Suplementos no definidos	11
2.4 pH	13
2.5 Problemas que afectan el establecimiento <u>in vitro</u> ..	13
2.5.1 Oxidación fenólica	13
2.5.1.1 Prevención de la oxidación fenólica..	13
2.5.2 Contaminación microbiana	14
2.5.1.2 Prevención de microorganismos en el - cultivo <u>in vitro</u>	14
2.6 Condiciones de cultivo	15
3. MATERIALES Y METODOS	16
3.1 Localización	16
3.2 Preparación del material vegetal	16
3.3 Medios de cultivo	19
3.4 Siembra del explante y condiciones de cultivo	21
3.5 Toma de datos	22
3.5.1 Toma de datos en el control de la contamina- ción y la oxidación fenólica	22
3.5.2 Toma de datos en la inducción de la brotación de las yemas axilares	22

	página
3.5.3 Toma de datos para la fase de elongación de brotes	23
3.5.4 Toma de datos para la fase de enraizamiento.	23
3.6 Diseño estadístico	23
3.6.1 Modelo estadístico	24
4. RESULTADOS Y DISCUSION	23
4.1 Control de la contaminación microbiana en los segmentos nodales	25
4.2 Control de la contaminación microbiana en el medio de cultivo	25
4.3 Control de la oxidación fenólica	29
4.4 Porcentaje de contaminación microbiana y oxidación fenólica en los medios MS y SH para cada una de las fases evaluadas	31
4.5 Inducción de la brotación de las yemas axilares	32
4.6 Elongación de los brotes	34
4.7 Fase de enraizamiento	36
5. CONCLUSIONES	39
6. BIBLIOGRAFIA	40

INDICE DE CUADROS

TEXTO

1	Resumen cronológico sobre trabajos realizados en la - propagación <u>in vitro</u> de Eucalipto	6
2	Composición de los medios básicos de Murashige y Skoog, Shenck e Hildebrandt y Woody Plant Medium	12
3	Porcentaje de contaminación microbiana y oxidación fe- nólica durante las fases de inducción de la brotación, elongación y enraizamiento de los brotes para cada uno de los medios evaluados	31
4	Análisis de Varianza para la brotación de las yemas - axilares en los medios de cultivo evaluados	33
5	Prueba de Duncan para la brotación de las yemas axila- res en los medios de cultivo evaluados	34
6	Análisis de varianza para la elongación de los brotes alcanzado en los medios de cultivo evaluados	34
7	Prueba de Duncan para la elongación de los brotes, al- canzado en los medios de cultivo evaluados	35
8	Análisis de varianza para la fase de enraizamiento ..	36
9	Prueba de Duncan para la fase de enraizamiento	36

TEXTO

10	Variación de la unidad experimental durante las <u>fa</u> ses de inducción de la brotación, elongación y enraizamiento de los brotes para cada uno de los medios evaluados	38
----	--	----

INDICE DE FIGURAS

TEXTO

1	Esquema que muestra el proceso para la obtención de los segmentos nodales en <u>Eucaliptus camaldulensis</u> . - a) Arbol podado en su parte media y basal; b) rama de eucalipto; c) segmento nodal conteniendo las yemas axilares preformadas	17
2	Porcentaje de contaminación microbiana en cuatro pruebas de desinfección de segmentos nodales de <u>Eucaliptus camaldulensis</u>	26
3	Porcentaje de contaminación fungosa y bacteriana en el medio de cultivo	28
4	Fotografía que muestra la no fitotoxicidad de Benlate y Ampicilina adicionados al medio de cultivo	29
5	Tratamientos para el control de la oxidación fenólica en segmentos nodales de <u>Eucaliptus camaldulensis</u>	30
6.	Iniciación del crecimiento de las yemas axilares en <u>Eucaliptus camaldulensis</u>	33
7.	Elongación de los brotes de <u>E. camaldulensis</u> , 30 días después de haber sido inoculados en el medio de Murashige y Skoog	35
8.	Enraizamiento de brotes de <u>E. camaldulensis</u> en el medio de Murashige y Skoog.....	37

1. INTRODUCCION

El manejo del recurso bosque mediante un rendimiento sostenido, es un aspecto muy importante a tomarse en cuenta, a fin de evitar la degradación de los mismos, ya que, debe recordarse el principio ampliamente conocido que dice: "La tasa de multiplicación de los bosques no debe -- ser superada por la tasa con que se degradan"; sin embargo, en El Salva dor se hace caso omiso a dicho principio, lo cual trae como consecuen-- cia el incremento de las áreas deforestadas, disminución de los mantos acuíferos y deficiencias en la producción de madera y leña^{1/}.

En la actualidad se ha puesto énfasis en la selección de especies forestales apropiadas para superar esta situación, dentro de ellas se destaca el Eucaliptus camaldulensis, la cual está ampliamente difundida en el mundo, debido a su adaptabilidad a una gran diversidad de condi-- ciones. Dicha especie puede ser propagada por semilla sexual por ser -- el método más fácil y económico, pero presenta el problema de alta se-- gregación, dando origen a plantaciones heterogéneas y mal formadas, así como la baja producción de biomasa; también, puede ser propagada asexual-- mente utilizando macroestacas, pero se han presentado problemas de bajo porcentaje de enraizamiento, además de necesitarse gran cantidad de mate-- rial vegetativo para su propagación (15, 23).

Todo lo anteriormente expuesto justifica la necesidad de propagar y plantar árboles con buenas características aplicando un sistema que per-- mita la multiplicación masiva de los individuos que presentan cualidades deseadas. Un buen instrumento para cumplir con dicho objetivo, es el -- uso de técnicas de reproducción asexual utilizando el cultivo in vitro, el cual permite la reproducción en corto tiempo de una gran cantidad de plantas y poca variabilidad genética de los materiales que por sus carac-- terísticas se han considerado sobresalientes (26).

1/ GONZALEZ ROSAS, H. 1988. Cultivo in vitro en forestales. Chapin-- pingo, México, Centro de Fruticultura, Colegio de Postgraduados. (Comunicación personal).

Actualmente en El Salvador no se tienen antecedentes de trabajos de investigación sobre cultivo in vitro realizados en esta especie; - sin embargo, en otros países como Brasil, Francia, Australia y la India, ya se ha trabajado, y los resultados obtenidos han sido satisfactorios (9, 14, 15).

1.1 Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar los medios de cultivo de Murashige y Skoog, Woody Plant Medium y el de Schenk e Hildebrandt; a través de una metodología que permita la obtención de plantas por medio de la técnica del cultivo in vitro, partiendo de segmentos nodales de árboles sobresalientes de Eucaliptus camaldulensis.

2. REVISION DE LITERATURA

Los árboles de Eucalipto son nativos de Australia. Aunque se les puede encontrar también en forma natural en las islas del norte incluyendo Tímor, Nueva Guinea y las Filipinas. El Eucalipto crece bajo varios agroclimas, altitudes y tipos de suelos. Se les puede encontrar en regiones áridas y en áreas donde la precipitación anual excede los 1000 mm. Los árboles de Eucalipto han sido plantados extensivamente en Sud-Africa, Africa, Asia, España, Portugal, América y países del Medio Oriente. Actualmente el área de plantaciones de tipo comercial de Eucalipto cubre más de 4 millones de hectáreas en 58 países (15).

Desde inicios de este siglo varias especies de Eucalipto se han -- identificado universalmente como candidatas promisorias de producción rápida de biomasa leñosa. Su madera es excelente para pulpa y producción de papel, así como para fuente de combustible. Entre las especies comerciales de mayor importancia figuran el E. camaldulensis, E. citriodora, E. globulus, E. torelliana y E. grandis (15).

Las primeras plantaciones de Eucaliptus camaldulensis en El Salvador se establecieron en 1983 por el Proyecto Leña y Puentes Alternas de Energía, ahora Proyecto Cultivo de Arboles de uso Múltiple (MADELEÑA); especie que en la actualidad cobra cada vez más importancia en el país (20).

2.1 Propagación vegetativa in vitro

El cultivo de tejidos es un término que describe cualquier tipo de cultivo aséptico de protoplastos, células, trozos de órganos, embriones, yemas, polen y anteras, que crecen en recipientes que contienen como sustrato medios nutritivos definidos o indefinidos (4, 17, 27).

La técnica de cultivo de tejidos ofrece entre otras, las siguientes

ventajas : Altas tasas de multiplicación de plantas a partir de segmentos de tejidos muy pequeños, control de gran número de individuos en espacios reducidos libres de microorganismos, conservación de germoplasma, mejoramiento genético, intercambio internacional de materiales valiosos (3); clones con resistencia a sales y al frío (2); y - en particular para la clonación de materiales sobresalientes (26).

La multiplicación vegetativa de las plantas in vitro involucra su reproducción a partir de una porción de ellas, lo que comúnmente se conoce como explante (3, 4). Cada célula en la planta, tiene la misma constitución genética, por lo cual, el genotipo de la planta madre se conserva en los individuos que de él se deriven (3).

Los aspectos fundamentales del cultivo de tejidos vegetales son :

- El aislamiento de fragmentos de tejidos u órganos (explantes) de una planta completa. Considerando dentro de éste la época del año en que se realice la recolección del material vegetal, ya que la estación lluviosa proporciona un ambiente adecuado para la proliferación de microorganismos patógenos que pueden afectar el establecimiento in vitro; además, debe tomarse en cuenta la edad del material a propagar, debido a que los materiales jóvenes tienen mayor capacidad morfogénica (27).
- Proveer a estos explantes de un medio ambiente apropiado que permita expresar su capacidad morfogénica, en tal sentido, es necesario que el material vegetal de la planta sea colocado en un medio sintético conteniendo todos aquellos nutrientes, vitaminas y reguladores del crecimiento que las células, tejidos u órganos recibían a través de las raíces o de los órganos fotosintetizadores de la planta; así como también, en condiciones adecuadas de luz, temperatura y humedad relativa (27).

La mayoría de las técnicas de cultivo de tejidos descritas en la li

temperatura pueden ser aplicadas universalmente; sin embargo, se deben hacer modificaciones para adaptarlas a condiciones locales de un laboratorio (27).

2.2 Cultivo in vitro en Eucalipto

Los primeros trabajos del cultivo in vitro de Eucalipto se realizaron en la década de 1950, pero fue hasta el año de 1964 cuando MARCAVILLACA, logró los primeros avances en el enraizamiento de Eucalyptus camaldulensis (11). En 1981, MASCARENHAS et al, lograron la propagación in vitro de Eucalyptus citriodora en el medio de Murashige y Skoog, adicionándole 2 citocininas para la inducción de brotes y 4 auxinas para la formación del sistema radical (21). LAKSHMI (1981), obtuvo la inducción de callos, brotes y raíces a partir de cotiledones e hipocótilos de Eucalyptus citriodora y E. grandis (18). En 1973 DE FOSSARD logró la formación de callos de E. grandis y E. bancroftii, sin conseguir la regeneración de plantas con las combinaciones de auxinas-citocininas (5). HARINEY (1981) reportó la factibilidad que existe para la propagación de E. camaldulensis, utilizando el medio de Murashige y Skoog -- adicionándole ANA y BA (16). OKA et al (1982), evaluaron los medios de Murashige y Skoog y el de Shenck e Hildebrandt para la regeneración de E. globulus, utilizándose como explante segmentos de hipocotilo de plantas recién germinadas (25) y GUPTA et al (1983), lograron definir un método rápido de propagación clonal de E. torelliana y E. camaldulensis utilizando el medio de Murashige y Skoog (15).

McCOMB y BENNET (1982), concluyeron sobre la importancia de la técnica de cultivo in vitro como una herramienta para los programas de mejoramiento del Eucalipto (22).

En la siguiente cronología se describen investigaciones relevantes en la propagación in vitro de Eucalyptus (11).

Cuadro 1. Resumen cronológico sobre trabajos realizados en la propagación in vitro de Eucalipto*

AÑO	AUTOR	TRABAJO REALIZADO
1964	MARCAVILLACA	Enraizamiento de <u>Eucaliptus camaldulensis</u>
1965	SUSSEX	Morfogénesis en <u>Eucaliptus camaldulensis</u>
1966	ANEJA	Formación de plantas por cultivo de tejidos a partir de lignotubérculos de <u>E. citriodora</u> Hook.
1972	BLAKE	Efecto de factores nutricionales para lograr el desarrollo de yemas de <u>E. obliqua</u> L'Herit.
1974	DE FOSSARD	Cultivo de tejidos de Eucalipto.
1974	CRESSWEL	Cultivo de órganos de <u>E. grandis</u> .
1975	KITAHARA	Formación de tallos y raíces a partir de callos de hipocotilo de <u>E. alba</u> .
1975	GONCALVES	El crecimiento y desarrollo de Eucalipto por el sistema de cultivo de tejidos.
1979	GONCALVES	Cultivo de tejidos de Eucalipto.
1981	MASCARENHAS	Propagación <u>in vitro</u> de <u>E. citriodora</u> en el medio de Murashige y Skoog.
1981	LAKSHMI	Inducción de callos, brotes y raíces a partir de cotiledones e hipocotilos de <u>E. citriodora</u> y <u>E. grandis</u> .
1981	HARTNEY	Propagación de <u>E. camaldulensis</u> en el medio de Murashige y Skoog.
1982	MCCOMB y BENNETT	Importancia del cultivo <u>in vitro</u> para los programas de mejoramiento de Eucalipto.

* Cronología presentada por DURAND-CRESSWELL et al (11) y ampliada por los autores de esta tesis.

Continuación Cuadro 1.

AÑO	AUTOR	TRABAJO REALIZADO
1982	OKA	Evaluación de los medios de Murashige y Skoog y el de Shenck e Hildebrandt para la regeneración de <u>E. globulus</u> .
1983	GUPTA	Propagación <u>in vitro</u> de <u>E. torelliana</u> y <u>E. camaldulensis</u> .

2.2.1 Materiales utilizados como explantes

Los materiales utilizados como explantes en investigaciones han sido de diversos tipos: lignotubérculos usados en la micropropagación de Eucaliptus bancroftii (1, 19); segmentos nodales con yemas axilares en Eucaliptus camaldulensis y Eucaliptus torelliana (14); cotiledones e hipocótilos en E. pauciflora y E. citriodora (18).

La lista de materiales usados en la propagación in vitro de eucalipto podría extenderse aún más; sin embargo, es importante hacer mención que en la mayoría de los casos se han utilizado segmentos nodales conteniendo las yemas axilares (14). Estos regeneran brotes múltiples que pueden ser luego inducidos a formar raíces o bien para inducir la brotación de las yemas axilares para formar más tallos que podrán a su vez ser enraizados (4).

2.3 Medios de cultivo

El éxito del cultivo in vitro como una manera de propagar plantas está grandemente influenciado por el medio de cultivo empleado (4, 27). Cada especie y cada órgano tiene probablemente según su edad y estado fisiológico, requerimientos nutricionales diferentes. La búsqueda para

cada especie de sus necesidades, es una tarea árdua y muy difícil. Es to ha hecho que ciertos medios propuestos por diferentes autores, y -- que han dado una respuesta satisfactoria de crecimiento, hayan sido -- aceptados con ligeras variantes y generalizado su uso (4).

El medio más ampliamente utilizado es el de Murashige y Skoog, el cual fue desarrollado inicialmente para cultivo de tabaco, pero actual^umente se está utilizando en el cultivo de un amplio rango de géneros y especies vegetales (12). En la propagación in vitro de Eucalipto, éste ha sido el medio más utilizado en los diferentes trabajos de investi^gación, dentro de los cuales se destacan los realizados por GUPTA et al (14, 15); MASCAPENHAS et al (21); DEPOMMIER (6). En menor frecuencia han sido utilizados los medios de Shenck e Hildebrandt (25), y el Woody Plant Medium^{2/}.

Respecto a la composición de los 3 medios de cultivo antes mencionados, éstos presentan diferencias en sus constituyentes y concentraciones (Cuadro 2).

2.3.1 Composición de los medios de cultivo

En general los medios de cultivo se encuentran constituidos por los siguientes componentes :

- Sustancias inorgánicas
 - Macronutrientes
 - Micronutrientes
- Sustancias orgánicas

^{2/} GONZALEZ ROSAS, H. 1988. Cultivo in vitro en forestales. Chapin^go, México. Centro de Fruticultura, Colegio de Postgraduados. (Comunicación personal).

- Vitaminas
 - Aminoácidos
 - Fuente de Carbono
 - Reguladores del crecimiento
-
- Agua
 - Agentes solidificantes
 - Suplementos no definidos

2.3.1.1 Sustancias inorgánicas

2.3.1.1.1 Macronutrientes

Estos se encuentran en mayor cantidad en el medio de cultivo. — Dentro de éstos existen sustancias que son de gran importancia por ser ampliamente utilizadas por la célula vegetal, como son el nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, carbono, calcio y magnesio (4, 12).

2.3.1.1.2 Micronutrientes

Estos se encuentran en pequeñas cantidades en el medio de cultivo. En este grupo están incluidos el boro, hierro, zinc, manganeso, cobre, molibdeno y cobalto (4, 12). Todos éstos son necesarios en ínfimas cantidades, participan en las reacciones como cofactores o componentes estructurales de enzimas (12).

2.3.1.2 Sustancias orgánicas

2.3.1.2.1 Vitaminas

Estas tienen una función catalítica activa (coenzima) en los sistemas enzimáticos, por lo que son requeridas en cantidades trazas (12). De todas las empleadas sólo las vitaminas del complejo B (tiamina, ácido nicotínico y piridoxina), son necesarias y de éstas sólo la tiamina es

indispensable en el medio para estimular el crecimiento de las células vegetales (4).

2.3.1.2.2 Aminoácidos

Ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejido in vitro; sin embargo, son utilizados ya que proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio (27).

2.3.1.2.3 Fuente de Carbono

Los cultivos in vitro son heterotrofos y requieren de una fuente de carbohidratos para obtener la energía necesaria para su desarrollo y crecimiento. La sacarosa es la fuente carbohidratada de mayor uso en los cultivos in vitro, aunque en ciertos casos se recomiendan otros azúcares como la glucosa o la fructosa. Esto va a depender del cultivo y la especie (4). Los carbohidratos proveen la fuente de energía y actúan como reguladores osmóticos en el medio (12).

2.3.1.2.4 Reguladores del crecimiento

2.3.1.2.4.1 Citocininas

Las citocininas son sustancias que estimulan la división y diferenciación celular. Las más utilizadas son la bencil adenina (BA) y la furilamino purina (cinetina). La BA ayuda a romper la dominancia apical permitiendo de esa forma el desarrollo de los brotes axilares (12). La cinetina estimula la formación de yemas y de brotes adventicios (27).

2.3.1.2.4.2 Auxinas

Las auxinas son un grupo de compuestos que se caracterizan por su capacidad de inducir el alargamiento celular. Las auxinas más empleadas

son el ácido indol acético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), ácido indol butírico (AIB), ácido 2,4-dicloro fenoxiacético (2,4-D). El AIA es rápidamente degradado por la luz y por la oxidación. El ANA, AIA, 2,4-D son termoestables (12). Las auxinas actúan en la promoción de la elongación celular debido a que inducen la formación de una enzima plastilizante de la pared celular (12).

*NKANKA (1981), utilizando el IBA en dosis de 1 mg/l, logró inducir el enraizamiento de Eucalyptis rudis (24). En 1983, GUPTA et al, logró un 70% de enraizamiento en E. torelliana y un 50% en E. canaldulensis, al usar ANA, IBA, IPA, AIA, en dosis de 10 mg/l de cada una (14).

2.3.1.3 Agua

Es de vital importancia para la preparación de medios de cultivo. Esta debe ser bidestilada (27).

2.3.1.4 Agentes solidificantes

Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de soporte para la preparación de medios sólidos. Otros compuestos se han empleado para sustituir al agar; sin embargo, pocos han tenido éxito, posiblemente el que más popularidad ha alcanzado es el Gel rite debido a su menor costo (27).

2.3.1.5 Suplementos no definidos

Algunos de los suplementos utilizados han sido :

- a) Antioxidantes, como el ácido cítrico y ácido ascórbico (27).
- b) Carbón activado, el cual es utilizado en los medios de enraizamiento, debido a que absorbe excesos de auxinas y residuos de sustancias tóxicas que se encuentran en el medio de cultivo, favoreciendo de esta forma el crecimiento de las raíces (27).

Cuadro 2. Composición de los medios básicos de Murashige y Skoog (17) Schenk e Hildebrandt (17) y Woody Plant Medium (13).

Componentes (mg/l).	Murashige y Skoog	Schenk e Hildebrandt	Woody Plant Medium
NH_4NO_3	1650		400
KNO_3	1900	2500	
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$			556
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	400	370
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$		300	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	200	96
K_2SO_4			990
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		10	16.6
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16.9		
KH_2PO_4	170		170
H_3BO_3	6.3	5	6.3
Na_2EDTA	37.3	20	37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	15	27.8
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			8.6
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.6	1	
KI	0.83	1	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.2	0.25
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.1	0.25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.1	
Acido nicotínico	0.5	5	0.5
Glicina	2.0		
Tiamina-HCl	0.1	5	1
Piridoxina -HCl	0.5	0.5	0.5
Mio-inositol	100	1000	100
Sacarosa	3%	3%	3%
Agar	0.8%	0.8%	0.8%
pH	5.7	5.7	5.7

2.4. pH

Todas las investigaciones sobre cultivo in vitro de Eucalipto reportan el uso de un pH que varía entre 5.7 y 5.8 (7, 8, 9). El pH se ajusta con NaOH ó HCl al 0.1 y 1 N (27).

2.5. Problemas que afectan el establecimiento in vitro

Dos de los problemas para la propagación in vitro de Eucalyptus camaldulensis son la oxidación fenólica y la contaminación microbiana (9, 11).

2.5.1 Oxidación fenólica

La exudación de compuestos fenólicos por los explantes sembrados - en el medio es el primer problema con que se tropieza. Estos compuestos producto de oxidaciones y de coloración café, son debido a la formación de quinonas, las cuales son tóxicas a los microorganismos e inhibidores del crecimiento celular (3). Dichas quinonas resultan por la activación de la polifeniloxidasas, la cual oxida los fenoles presentes en altas concentraciones en plantas del género Eucalipto^{3/}.

2.5.1.1 Prevención de la oxidación fenólica

Para contrarrestar este problema, existen sustancias antioxidantes como la cisteína, ácido cítrico, ácido ascórbico, tirosina, y el polivinilpyrrolidone (3, 24), quienes inhiben la activación de la polifeniloxidasas, evitando así la producción de fenoles (11).

.....

3/ GONZALEZ ROSAS, H. 1988. Cultivo in vitro en forestales. Chapin-
go, México, Centro de Fruticultura, Colegio de Postgraduados.
(Comunicación personal).

2.5.2 Contaminación microbiana

Con respecto a la contaminación microbiana, CUSTERS, citado por CERON, menciona que el establecimiento en condiciones asépticas de los brotes es muy afectado por este factor, ya que los microorganismos causan la muerte, cuando atacan directamente el tejido o compiten con el explante por los nutrientes, espacio físico y oxígeno, además de producir sustancias tóxicas (3).

SONDAHL et al citado por CERON, concluye que el éxito que pueda obtenerse en el cultivo in vitro depende de la eficiencia con que se controle la contaminación y la oxidación (3).

2.5.2.1 Prevención de microorganismos en el cultivo in vitro.

El material a propagar obtenido en el campo, requiere de un procedimiento más riguroso de desinfección que el que se realiza con plantas desarrolladas en invernadero, ya que las que crecen en un medio ambiente natural están expuestas a ser hospedantes de microorganismos en mayor proporción (27).

Las condiciones de asepsia es algo fundamental para el éxito en el cultivo in vitro, ya que es necesario que al momento de inocular el material se encuentre libre de todo contaminante. Al respecto existen muchas metodologías establecidas para la desinfección del explante, en la mayoría de los casos se recomienda el uso de hipoclorito de calcio adicionándole 1 ó 2 gotas de Tween 20 ó Teepol, seguidos de lavados con agua destilada estéril, pero además se menciona el uso del hipoclorito de sodio, pero éste presenta el inconveniente de crear daños al tejido (9, 11, 24, 27).

Algunos trabajos han mostrado que la proporción de cultivos libres de contaminantes puede ser incrementada por inmersión del tejido en ---

alcohol al 45-80 por ciento en períodos de 3-5 minutos. Yemas latentes de melocotón cultivadas in vitro necesitaron para estar libres de microorganismos de un procedimiento complejo de desinfección que se inició con inmersión en alcohol al 70% durante cinco minutos (3).

La efectividad de los agentes desinfectantes, puede ser mejorada al adicionarle una o dos gotas de detergente, el cual rompe la tensión superficial y permite que el agente penetre y elimine los microorganismos (5, 27).

Los procedimientos de esterilización superficial, destruyen a los microorganismos que están sobre el explante, pero no eliminan a los microorganismos endógenos (11).

Para que sea efectivo el agente antifúngico debe ser no tóxico a las células del explante y además debe tener un amplio espectro de actividad fungicida. Uno de los fungicidas más utilizados en el cultivo in vitro de tejidos vegetales es el Benlate, el cual es tomado y traslocado por células y órganos de la planta (3).

Es ampliamente conocido que para tener un medio de cultivo aséptico basta con autoclavarlo durante un tiempo que varía según el volumen de medio a autoclavar, a 15 libras de presión, utilizando 120 °C (27).

2.6 Condiciones de cultivo

Para obtener buenos resultados en el cultivo in vitro de Eucalipto, es necesario crear un ambiente que le proporcione las condiciones adecuadas. En la mayoría de investigaciones se han utilizado fotoperíodos de 12, 16 y 18 horas, y temperaturas que varían entre 25 - 27 °C (8, 9, 10, 14).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización

El presente trabajo se realizó en el período comprendido entre julio y diciembre de 1988 en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro Nacional de Tecnología Agrícola (CENTA), situado en San Andrés, Departamento de La Libertad, El Salvador.

3.2 Preparación del material vegetal

Se utilizó material recolectado de árboles "plus" previamente seleccionados, de cinco años de edad, ubicados en el Centro de Desarrollo Forestal (CEDEFOR), en San Andrés, Departamento de La Libertad. Los árboles fueron podados en su parte media y basal para inducirlos a brotación, dejando un tocón que varió entre 0.50 y 1 m de longitud (Figura 1a), procediéndose un mes después a la recolección de segmentos nodales de 2 - 3 cm de longitud, los cuales fueron tomados de la parte media de la rama (Figura 1b). Cada uno de estos segmentos contenía 1 - 2 yemas axilares preformadas (yemas de 2 - 3 mm de longitud), (Figura 1c).

Los segmentos fueron colocados en un depósito conteniendo agua para evitar su deshidratación durante el transporte al laboratorio.

Previo a la fase de establecimiento del ensayo se evaluaron diferentes metodologías de desinfección de los segmentos nodales, con el objeto de determinar cual de ellas era la más eficiente en el control de microorganismos, utilizando para ello hipoclorito de calcio al 10% y 8% y alcohol 70% (3). Dichos tratamientos se describen a continuación:

- a) Sin hipoclorito de calcio y sin alcohol.
- b) Hipoclorito de calcio al 10% durante 5 minutos, alcohol al 70% por un minuto e hipoclorito de calcio al 8% durante 5 minutos.
- c) Hipoclorito de calcio al 10% durante 10 minutos, alcohol al 70% -

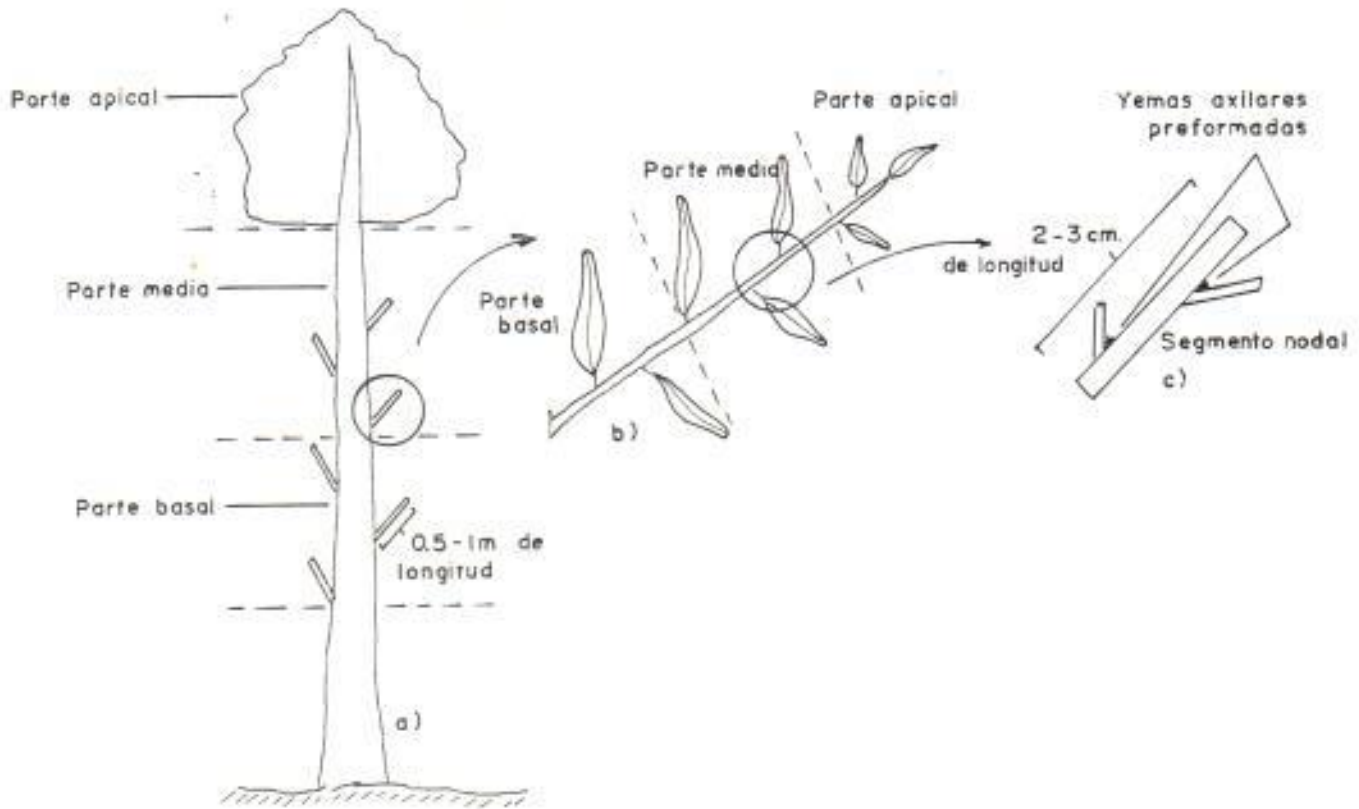


Figura 1. Esquema que muestra el proceso para la obtención de los segmentos nodales en *Eucalyptus camaldulensis*. a) Arbol podado en su parte media y basal; b) rama de eucalipto; c) segmento nodal conteniendo las yemas axilares preformadas.

- durante 2 minutos e hipoclorito de calcio al 8% durante 10 minutos.
- d) Hipoclorito de calcio al 10% durante 15 minutos, alcohol al 70% por 3 minutos e hipoclorito de calcio al 8% durante 15 minutos.

Cada uno de los tratamientos mencionados anteriormente estuvo constituido por 20 tubos conteniendo cada uno de ellos agua bidestilada, azúcar, agar y un explante, determinándose por medio de recuentos cual de ellos era el más eficiente para el control de la contaminación microbiana, resultando el tratamiento "d" el más efectivo para dicho fin. (Figura 2).

Con el objeto de ejercer un mejor control de la contaminación, se -

evaluaron diferentes tratamientos de fungicidas como Micostatín y Benlate (3); y bactericidas como la Rifampicina, Agrimicin^{4/} y Ampicilina (3) adicionados al medio, los cuales se describen a continuación:

- a) Sin fungicida y sin bactericida
- b) Micostatín (300 mg/l) y Rifampicina (40 mg/l)
- c) Micostatín (300 mg/l) y Agrimicin 100 (2 gr/l)
- d) Micostatín (300 mg/l) y Ampicilina (350 mg/l).
- e) Benlate (2 gr/l) y Rifampicina (40 mg/l).
- f) Benlate (2 gr/l) y Agrimicin 100 (2 gr/l).
- g) Benlate (2 gr/l) y Ampicilina (350 mg/l).

La metodología utilizada para la determinación del mejor tratamiento fue similar a la empleada para definir el proceso de desinfección -- de los segmentos nodales. En esta etapa el tratamiento "g" resultó ser más eficiente. (Figura 3).

Debido a la alta producción de exudados fenólicos, fue necesario - realizar diversos tratamientos con diferentes antioxidantes. Dichos tratamientos fueron aplicados a los segmentos nodales en un período de 30 - minutos y adicionados al medio de cultivo, los cuales se detallan a continuación.

- a) Sin antioxidantes.
- b) Acido cítrico en 250 mg/l
- c) Acido ascórbico en 300 mg/l
- d) Acido cítrico en 250 mg/l y ácido ascórbico en 300 mg/l.
- e) Carbón activado en 1 gr/l.

El tratamiento "d" resultó ser el más efectivo para el control de - la oxidación y su selección se realizó de igual forma a los 2 casos ---

4/ ESPINOZA, N. 1988. Control de la contaminación microbiana en el - cultivo in vitro. La Molina, Lima, Perú, Centro Internacional de la papa (CIP). (Comunicación personal).

anteriores. (Figura 4).

Una vez determinados los mejores tratamientos para el control de la contaminación y oxidación, se procedió al establecimiento in vitro de los segmentos nodales, siguiendo el siguiente método :

Primero se lavaron en agua corriente conteniendo jabón líquido comercial (1-2 gotas) y Tween 20 (2 gotas), durante 5 minutos, enjuagándose posteriormente con agua destilada (2-3 veces); 2) luego se sumergieron en hipoclorito de calcio al 10% durante 15 minutos, enjuagando - 3 veces con agua destilada; 3) se expusieron en alcohol 70% durante 3 - minutos seguidos de 3 lavados en agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar; y 4) finalmente el material fue tratado con hipoclorito de calcio al 8% durante 15 minutos, lavados con agua destilada estéril (3-5 veces), dentro de la cámara de flujo laminar.

Los brotes al ser desinfectados y enjuagados, eran colocados en -- agua destilada estéril durante 10 a 15 minutos, procediéndose posteriormente a eliminar el tejido dañado por la desinfección y las porciones innecesarias de tallo u hojas, para dejar el explante aproximadamente de 1-2 cm de longitud con su respectiva yema axilar. Inmediatamente después, cada explante era colocado en una solución antioxidante que contenía ácido ascórbico (300 mg/l) y ácido cítrico (250 mg/l) durante 30 minutos (3), previamente esterilizado a través de un filtro microporoso estéril de 0.9-1.4 UF con la bomba de vacío, dentro de la cámara de flujo laminar (13).

3.3 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron el de Murashige y Skoog -- (MS), Woody Plant Medium (WPM), y el de Shenck e Hildebrandt (SH) (Cuadro 2).

Para la iniciación de la brotación y elongación de los brotes, fué necesario realizar modificaciones en los 3 medios, en base a la metodología

gía descrita por GUPTA et al, describiéndose a continuación el suplemento y concentración en mg/l (14).

Medio 1 (M1) : Medio básico MS + Cinetina (0.2) + BA (0.5) + Pantotenato de calcio (0.1) + Biotina (0.1).

Medio 1 (M1) : Medio básico WPM + Cinetina (0.2) + BA (0.5) + Pantotenato de calcio (0.1) + Biotina (0.1).

Medio 1 (M1) : Medio básico SH + Cinetina (0.2) + BA (0.5) + Pantotenato de calcio (0.1) + Biotina (0.1).

Para la inducción del enraizamiento de los brotes se modificaron los 3 medios de cultivo, según lo reportado por GUPTA et al, detallando a continuación el suplemento y concentración en mg/l (14).

Medio 2 (M2) : 1/2 Medio básico MS + IBA (10) + IPA (10) + AIA (10) + ANA (10).

Medio 2 (M2) : 1/2 Medio básico WPM + IBA (10) + IPA (10) + AIA (10) + ANA (10).

Medio 2 (M2) : 1/2 Medio básico SH + IBA (10) + IPA (10) + AIA (10) + ANA (10).

Medio 3 (M3) : 1/2 Medio básico MS + Carbón activado (0.25 %).

Medio 3 (M3) : 1/2 Medio básico WPM + Carbón activado (0.25 %).

Medio 3 (M3) : 1/2 Medio básico SH + Carbón activado (0.25 %).

Con el fin de combatir el problema de hongos se agregó a todos los medios Benlate en dosis de 0.2%, previo a su esterilización. Este fungicida fue agregado al grupo de medios en todas sus fases.

Al estar los medios preparados su pH fue ajustado a 5.7 (\pm 0.01) previamente determinado en otros experimentos, utilizando para su ajuste KOH ó HCl en concentración de 0.1 y 1 Normal (7, 8). El gelificante empleado fue BACTO DIFCO agar, al 0.8%. Finalmente se distribuyó el medio en tubos con tapón de rosca de 30 ml de capacidad, de 70 mm de longitud y 22 mm de diámetro, agregando 10 ml de medio a cada uno.

La esterilización de los medios se realizó en autoclave con vapor húmedo a 15 libras de presión, una temperatura de 120 °C, durante 15 minutos.

Para el control de las bacterias se utilizó como antibiótico la Ampicilina a razón de 350 mg/l, disuelta en agua destilada con agitación magnética durante 30 minutos. Posteriormente fue esterilizado por medio de un filtro microporoso estéril de 0.9 - 1.4 UF con la bomba de vacío, dentro de la cámara de flujo laminar.

Para evitar los problemas de oxidación, fue necesario agregar al medio una solución antioxidante, compuesta por ácido ascórbico (300 mg/l) y ácido cítrico (250 mg/l). Esta mezcla fue esterilizada con filtro microporoso 0.9 - 1.4 UF y con la bomba de vacío dentro de la cámara de flujo laminar.

Una vez se tenía los medios de cultivo estériles dentro de la cámara de flujo laminar, se les agregaba la solución antioxidante y el bactericida, dejándolos que solidificaran en refrigeración.

3.4 Siembra del explante y condiciones de cultivo

Una vez preparados los segmentos nodales se procedía a sembrarlos en el grupo de medios de cultivo M1, e inmediatamente eran incubados en una refrigeradora a 15 °C proporcionándole luz continua durante 72 horas con una lámpara de 20 watts, ubicada a 5 cm de altura sobre el nivel de los tubos. Posteriormente los tubos se incubaron en la cámara de crecimiento

con un fotoperíodo de 18 horas de luz y 6 de oscuridad, utilizando para el suministro de luz 8 lámparas de 40 watts en 2.5 m^2 ; las temperaturas variaron entre 25-30 °C. Después de 30 días las yemas habían crecido y desarrollado por lo que fueron transferidos al grupo de medios M2 en donde permanecieron durante 72 horas en la oscuridad, con una temperatura que varió entre 25 - 30°C, para posteriormente ser sembrados en el grupo de medios M3 y mantenidos en condiciones de temperatura de 25 - 30 °C y con un fotoperíodo de 18 horas de luz (usando 8 lámparas en 2.5 m^2) y 6 horas de oscuridad durante 30 días, período en el cual se logró la formación de raíces.

3.5 Toma de datos

3.5.1 Toma de datos en el control de la contaminación y la oxidación fenólica.

Para definir el mejor tratamiento para el control de la contaminación microbiana, se realizaron recuentos de tubos contaminados por hongos y bacterias, estableciéndose el mejor tratamiento en términos de porcentaje.

Con respecto a la oxidación fenólica se efectuaron recuentos del número de explantes que habían producido exudados fenólicos, determinándose posteriormente el mejor tratamiento en términos de porcentaje.

3.5.2 Toma de datos en la inducción de la brotación de las yemas axilares.

Los datos tomados en esta fase fueron el número de tubos en los cuales se había iniciado el proceso de inducción de la brotación, lo cual se realizó por observación directa de los explantes dentro del tubo, considerando que las yemas axilares tuvieron un tamaño mayor a los 3 mm — aproximadamente. Estos datos fueron tomados entre los 15-20 días después de haber realizado la siembra.

3.5.3 Toma de datos para la fase de elongación de brotes.

Los datos de elongación fueron medidos con el uso de una regla -- graduada. Esto se realizó por comparación aproximada desde la parte -- externa del tubo (Figura 7). Estos datos fueron tomados 30 días des-- pués de haber efectuado la siembra.

3.5.4 Toma de datos para la fase de enraizamiento.

El dato tomado en esta fase, fue únicamente el número de brotes en los cuales había enraizamiento. Esto fue realizado por simple observa-- ción a través del cristal del tubo en cada uno de los medios evaluados. Los datos fueron tomados 60 días después de la siembra del explante.

3.6 Diseño estadístico

Para realizar el análisis de los datos se utilizó un diseño comple-- tamente al azar con 4 repeticiones. Cada repetición estuvo constituida por 3 tratamientos, los cuales se describen a continuación:

- T₁ = Medio de Murashige y Skoog
- T₂ = Woody Plant Medium
- T₃ = Medio de Shenck e Hildebrandt.

La unidad experimental con que se inició el ensayo estuvo formada por 20 tubos, conteniendo el mismo tratamiento. Pero debido a los pro-- blemas de contaminación, oxidación y muerte del explante, dicha unidad se vió reducida en las fases de elongación y enraizamiento de los bro-- tes.

Con el fin de determinar la significancia estadística en los prome-- dios obtenidos en cada tratamiento, se realizó la prueba de Duncan con un nivel de significancia del 5%.

.....

3.6.1 Modelo estadístico

$$Y_{ij} = U + C_i + E_{ij}$$

U = Media general

C_i = Efecto del i-ésimo medio de cultivo.

E_{ij} = Error experimental.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Control de la contaminación microbiana en los segmentos nodales.

Debido al alto porcentaje de contaminación microbiana que se presentó previo a la fase de establecimiento de los explantes, fue necesario evaluar diferentes metodologías de desinfección en los segmentos nodales, los cuales fueron descritos en materiales y métodos.

Transcurridos 7 días después de haber realizado la siembra, se observó que los menores porcentajes de contaminación por hongos (30 %) y bacterias (20 %) se obtuvieron con el tratamiento d (Figura 2), lo cual coincide con el proceso de desinfección utilizado por otros autores, -- quienes manifiestan que el hipoclorito de calcio ejerce una acción desinfectante sin causarle daño al material vegetal (3); así mismo, reportan que el alcohol elimina las grasas que se encuentran sobre la superficie del tejido, permitiendo de esta forma una mayor penetración del hipoclorito de calcio (17). Otro factor que influyó en forma determinante, fue el tiempo de exposición de los segmentos nodales al agente desinfectante, ya que el eucalipto por ser una especie leñosa y por encontrarse en un medio ambiente natural, es un reservorio de microorganismos patógenos difíciles de erradicar, por lo que, éste requiere de un mayor tiempo de exposición durante el proceso de desinfección.

4.2 Control de la contaminación microbiana en el medio de cultivo.

La eficiencia en el control de la contaminación microbiana en el cultivo in vitro, no solamente depende del proceso de desinfección del explante, sino que también de otros factores, entre los cuales se encuentra la adición de fungicidas y bactericidas al medio de cultivo. Es por ello que se evaluaron 7 tratamientos descritos anteriormente.

Después de 3 semanas de haber efectuado la siembra se procedió a realizar el recuento, determinándose que el mejor tratamiento estuvo --

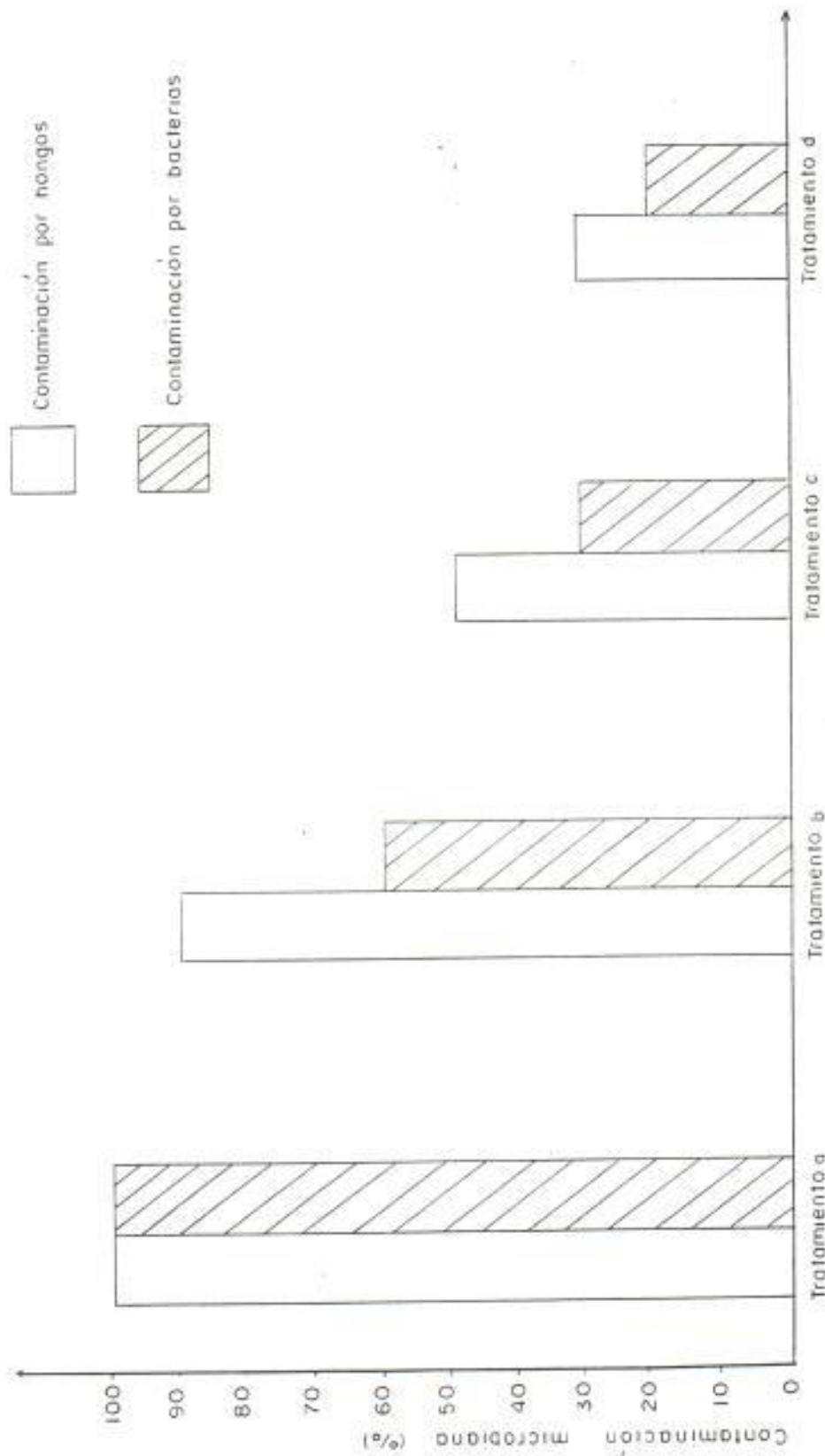


Fig. 2 Porcentaje de contaminación microbiana en cuatro pruebas de desinfección de segmentos nodales de *Eucalyptus camaldulensis*

constituido por Benlate en dosis de 2 g/l y Ampicilina en 350 mg/l, - con el cual se logró reducir la contaminación fungosa a un 20% y la bacteriana a un 10% (Figura 3).

WITTENBACH y BUKOVAC, citados por CERON, han demostrado el efecto benéfico de Benomil (Agente químicamente activo del Benlate) en el medio de cultivo, para reducir la contaminación por hongos (3).

La supervivencia de los segmentos nodales se consideró alta en los medios con el fungicida (Figura 3), lo cual demostró, que el combate de hongos fue aceptable. Esto se refuerza con lo mencionado por SOLEL et al, citados por CERON, quienes afirman que el Benlate es un fungicida sistémico, el cual es tomado y translocado por células y órganos de la planta, protegiendo al medio de cultivo y al tejido vegetal contra las contaminaciones por hongos (3).

WILLIAMS et al, citado por CERON, manifiestan que es necesario tener precaución al utilizar Benlate en el cultivo in vitro, ya que en -- ápices caulinares de Cymbidium sp. y Colocasia esculenta se determinó su efecto inhibitor, el cual puede deberse a inhibidores metabólicos y/o enzimáticos, así como por la inducción de aberraciones cromosómicas (3).

En la presente investigación, a pesar de la alta concentración utilizada de Benlate (2 g/l) no se observaron toxicidades por el producto en ninguno de los medios evaluados (Figura 4).

Con respecto al uso de Ampicilina, se demostró su eficiencia en el control de bacterias, debido al amplio espectro de acción, además, de no causar daño al tejido en la dosis utilizada (350 mg/l).

Debido a las dificultades para establecer asépticamente los segmentos nodales, se consideró que la desinfección del tejido vegetal y la -- adición de Benlate y la Ampicilina al medio de cultivo, son elementos importantes para permitir el establecimiento efectivo in vitro.

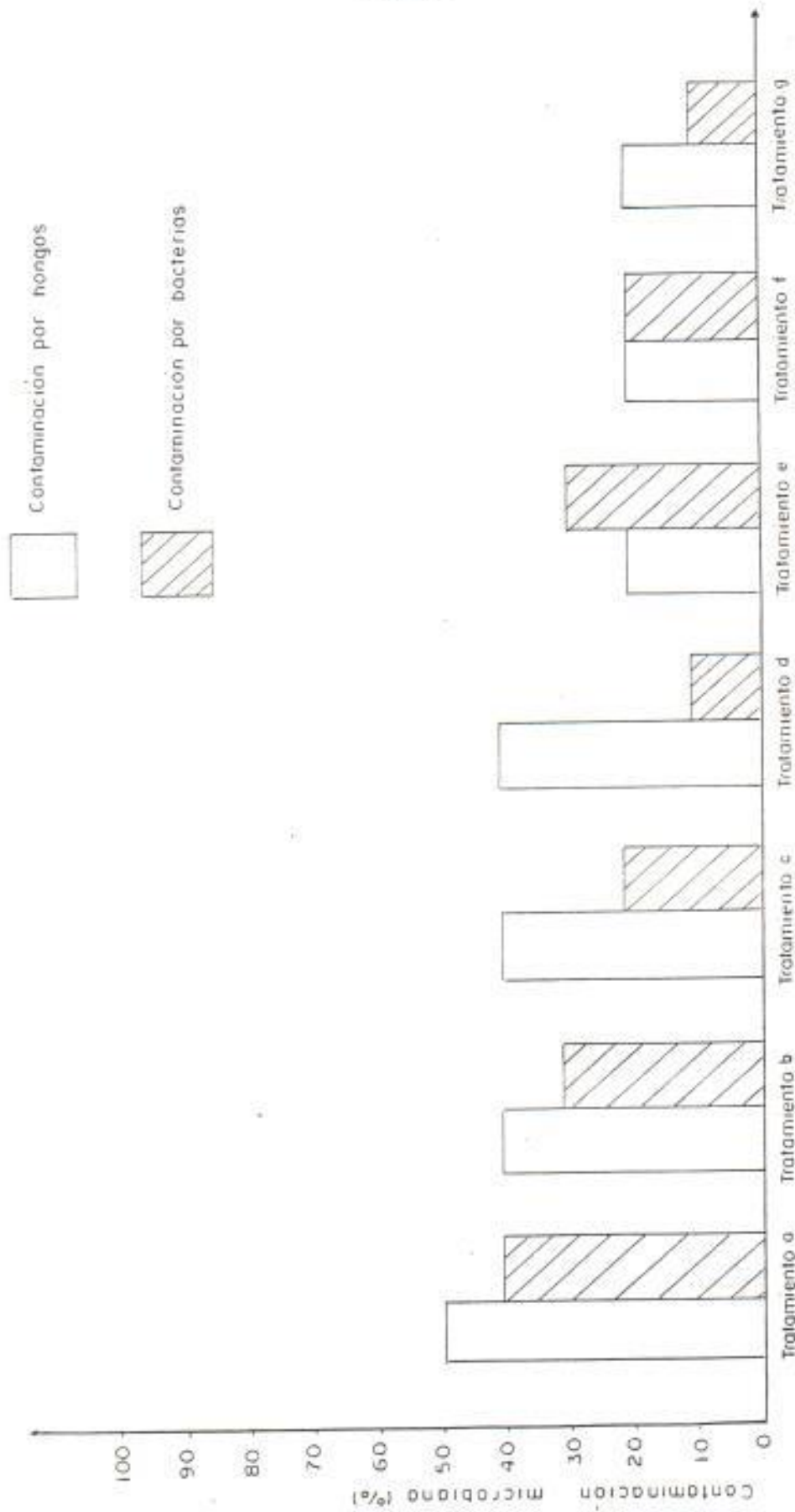


Fig.3 Porcentaje de contaminación fungosa y bacteriana en el medio de cultivo.

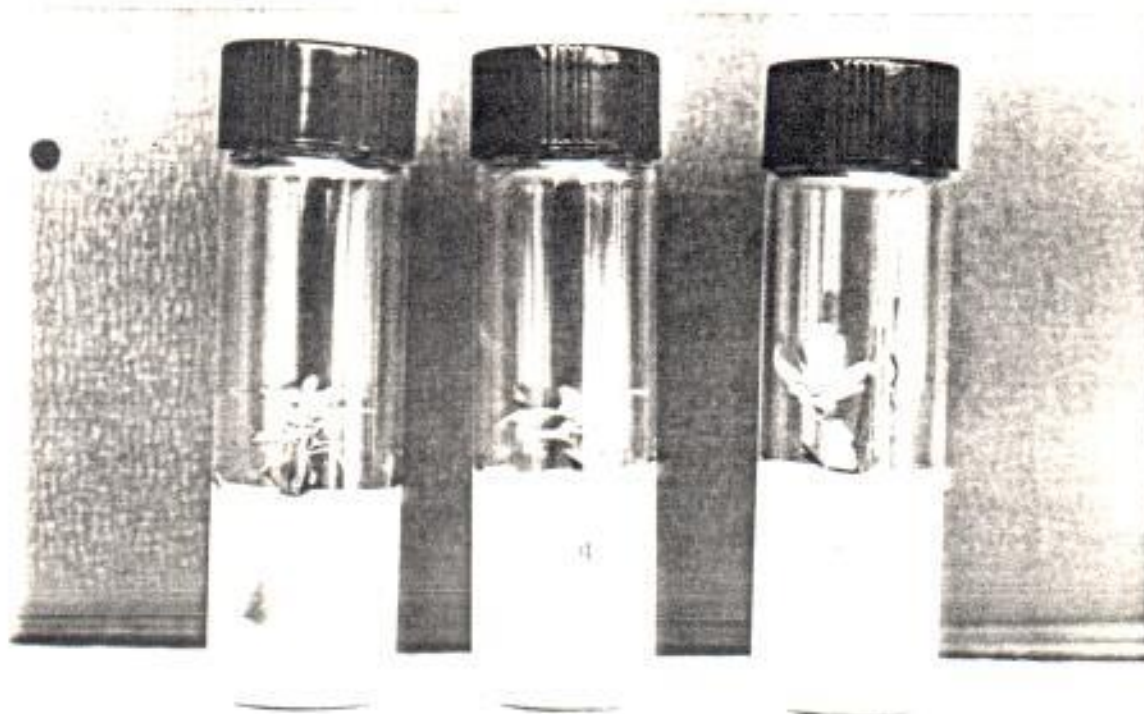


Figura 4. Fotografía que muestra la no fitotoxicidad de Benlate y la Ampicilina adicionados al medio de cultivo.

4.3 Control de la oxidación fenólica

Para resolver este problema se evaluaron diferentes tratamientos antioxidantes aplicados a los segmentos nodales y al medio de cultivo, previo al establecimiento del material. Dichos tratamientos fueron descritos en materiales y métodos.

La combinación de ácido cítrico en 250 mg/l y ácido ascórbico en 300 mg/l, resultó ser el tratamiento más efectivo para controlar la oxidación fenólica, reduciéndola a un 5% (Figura 5), confirmándose así, la acción antioxidante del ácido cítrico y del ácido ascórbico y su efecto sinérgico (3), debido a que ambas sustancias se incorporaron a la fisiología del explante, evitando la activación de la polifeniloxidasas, responsable de la oxidación fenólica (11).

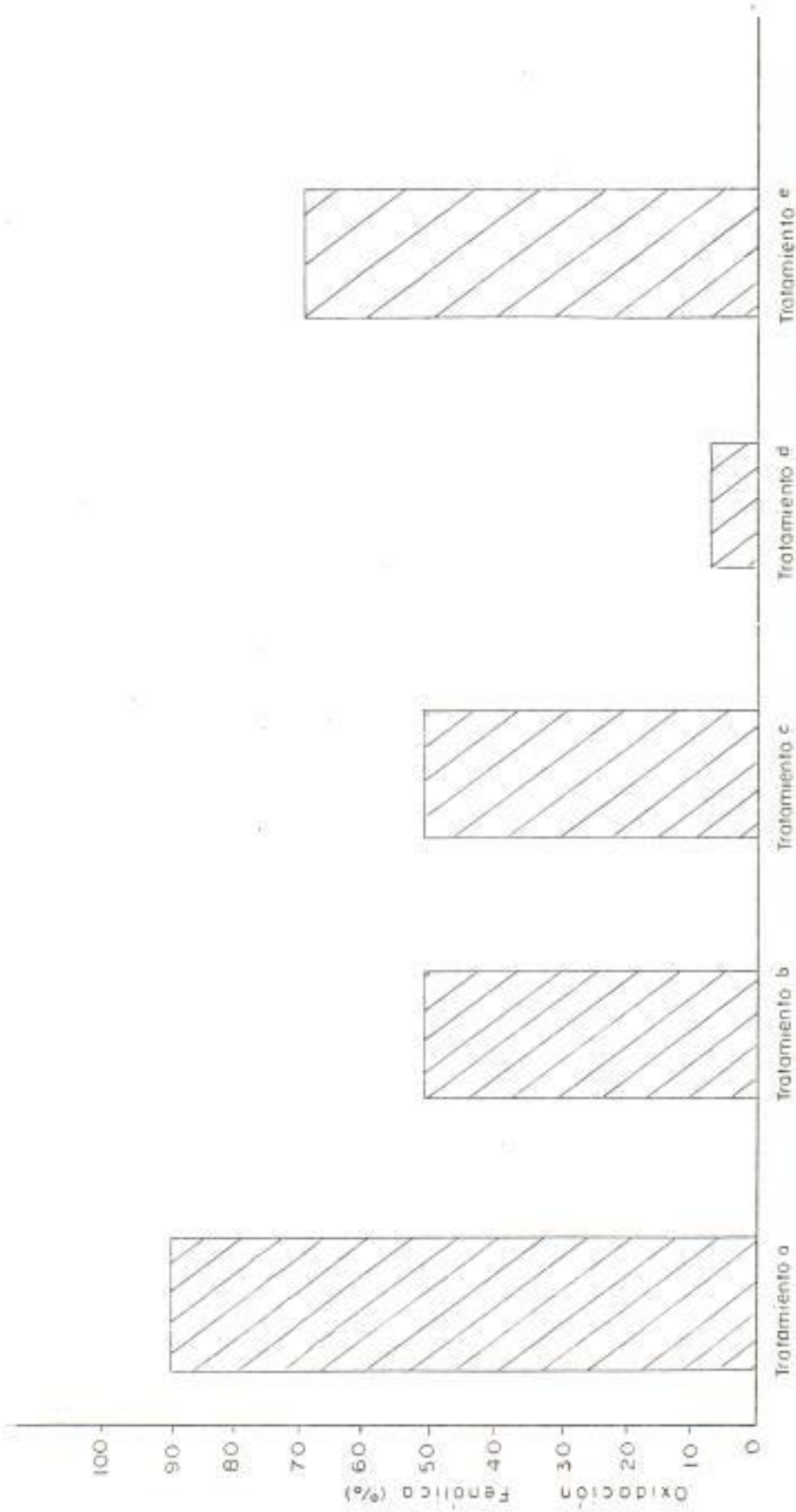


Fig. 5. Tratamientos para el control de la oxidación fenólica en segmentos nodales de *Eucalyptus camaldulensis*.

4.4 Porcentaje de contaminación microbiana y oxidación fenólica en los medios MS, WPM y SH para cada una de las fases evaluadas.

Una vez determinados los mejores tratamientos para el control de la contaminación microbiana y oxidación fenólica, se procedió al establecimiento del ensayo, obteniéndose al final de cada fase los siguientes porcentajes de contaminación microbiana y oxidación fenólica para cada uno de los medios evaluados (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de contaminación microbiana y oxidación fenólica durante las fases de inducción de la brotación, elongación y enraizamiento de los brotes para cada uno de los medios evaluados.

Medios de Cultivo	Inducción de la brotación		Elongación de los brotes		Enraizamiento de los brotes	
	Contaminación microbiana (%)	Oxidación fenólica (%)	Contaminación microbiana (%)	Oxidación fenólica (%)	Contaminación microbiana (%)	Oxidación fenólica (%)
Murashige y Skoog	17.5	5	-	-	7.81	-
Woody Plant Medium	25	6.25	-	-	9.37	-
Shenck e - Hildebrandt	17.5	3.75	-	-	7.5	-
Promedio	20	5	-	-	8.23	-

Los mayores porcentajes de contaminación se presentaron en la fase de inducción de la brotación (promedio 20%), el cual se considera aceptable, ya que otros investigadores reportan que el material vegetal traído del campo es difícil de establecer en cultivo in vitro, debido a

que son reservorios de microorganismos patógenos difíciles de erradicar (5, 27). En la fase de elongación de los brotes no existieron problemas de contaminación, pero, en la fase de enraizamiento, sí se presentaron dichos problemas (Cuadro 3), lo cual fue debido, posiblemente a la manipulación del material en las 2 transferencias que se realizaron a los grupos de medios M2 y M3.

Con respecto a la oxidación fenólica, ésta se logró reducir a un 5% y solamente se presentó en la fase de inducción de la brotación (Cuadro 3).

4.5 Inducción de la brotación de las yemas axilares

Después de haber controlado los problemas de contaminación microbiana y de oxidación fenólica, se procedió a establecer los tratamientos para inducción de la brotación y crecimiento de las yemas axilares, para lo cual se utilizaron los medios de cultivo de Murashige y Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM) y el de Shenck e Hildebrandt (SH), descritos anteriormente.

Después de 15-20 días de haber establecido el experimento se inició el crecimiento de las yemas axilares en el medio de Murashige y Skoog (Figura 6), lo cual fue precoz si se compara con lo informado por GUPTA et al, quienes lograron inducir el crecimiento in vitro de las yemas axilares de E. camaldulensis entre 25 - 30 días después de la siembra (14).

El análisis de varianza mostró diferencias significativas en la brotación de las yemas axilares para cada uno de los medios de cultivo (Cuadro 4). A través de la prueba de Duncan (Cuadro 5), fueron comparados los promedios de inducción de la brotación, resultando superior el medio de Murashige y Skoog en un 97%, en comparación con los medios de Shenck e Hildebrandt y Woody Plant Medium, que reportaron un 63% y 58% de brotación respectivamente (Cuadro 10). Estos datos se deben posiblemente --



Figura 6. Iniciación del crecimiento de las yemas axilares en Eucalyptus camaldulensis en el medio de cultivo de Murashige y Skoog.

por la mayor concentración de sales minerales que contiene el medio de Murashige y Skoog (Cuadro 2), las cuales contribuyen a la elongación de los brotes después de haber sido desencadenado el proceso morfogénico inducido por las citocininas.

Cuadro 4. Análisis de varianza para la brotación de las yemas axilares en los medios de cultivo evaluados.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Ft. 5%
Tratamiento	2	138.67	69.33	52.13*	4.26
Error experimental	9	12	1.33		
Total	11	150.67			

* Significativo al 5%.

Cuadro 5. Prueba de Duncan para la brotación de las yemas axilares - en los medios de cultivo evaluados.

\bar{x} Tratamiento	MS	SH	WPM
	16	10	8
WPM = 8	8*	2*	-
SH = 10	6*	-	
MS = 16	-		

* Significativo al 5%.
Coeficiente de Variación = 10.15 %

4.6 Elongación de los brotes

Después de 15 días de haberse iniciado el crecimiento, se midió la elongación que habían alcanzado los brotes en cada medio, reportando el análisis de varianzas diferencias significativas (Cuadro 6). A través de la prueba de Duncan (Cuadro 7), se determinó que el medio de Murashige y Skoog elongó los brotes en un promedio de 15 mm (Figura 7), mientras que el medio de Shenck e Hildebrandt lo hizo en 9 mm y el Woody -- Plant Medium en 8 mm (Cuadro 10). Los resultados anteriores pueden deberse al mejor balance mineral que presenta el medio de Murashige y Skoog, y a la interacción de éste con la Cinetina y la Benzil-adenina para la estimulación de la división y diferenciación celular (12).

Cuadro 6. Análisis de varianzas para la elongación de los brotes alcanzado en los medios de cultivo evaluados.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Ft 5%
Tratamiento	2	114.67	57.33	19.84*	4.26
Error experimental	9	26	2.89		
Total	11				

* Significativo al 5%.

Cuadro 7. Prueba de Duncan para la elongación de los brotes, alcanzado en los medios de cultivo evaluados.

\bar{x} Tratamiento	MS 15	SH 9	WPM 8
WPM = 8	7*	1 ^{n.s.}	-
SH = 9	6*	-	-
MS = 15	-	-	-

* Significativo al 5%

n.s. : No significativo

Coefficiente de variación = 15.93 %



Figura 7. Elongación de los brotes de *E. camaldulensis*, 30 días después de haber sido inoculados en el medio de Murashige y Skoog.

4.7 Fase de enraizamiento

Los datos obtenidos en esta fase fueron sometidos a un análisis de varianza (Cuadro 8), el cual mostró diferencias significativas para los tratamientos en estudio; a través de la prueba de Duncan (Cuadro 9), fueron comparados los medios de inducción del enraizamiento, resultando superior el medio de Murashige y Skoog en un 49% en comparación con los medios de Shenck e Hildebrandt y Woody Plant Medium, con los cuales se obtuvo un 22% y 17% respectivamente (Cuadro 10). Estos resultados coinciden con lo reportado por GUPTA et al, quienes obtuvieron un 50% de enraizamiento utilizando el medio de Murashige y Skoog en la propagación de Eucaliptus camaldulensis (14).

Cuadro 8. Análisis de varianza para la fase de enraizamiento.

F. de V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Ft 5%
Tratamiento	2	85.5	42.75	40.71*	4.26
Error experimental	9	9.5	1.05		
Total	11				

* Significativo al 5%.

Cuadro 9. Prueba de Duncan para la fase de enraizamiento.

\bar{x} Tratamiento	MS	SH	WPM
	7.25	2.00	1.25
WPM = 1.25	6*	0.75 ^{n.s.}	-
SH = 2.00	5.25*		
MS = 7.25			

* Significativo al 5%

n.s. = No significativo

Coefficiente de variación = 29.14%

La diferencia obtenida en el porcentaje de enraizamiento, posiblemente se debe al mayor vigor que presentaban los brotes provenientes del medio de Murashige y Skoog, los que se vieron favorecidos también

por la reducción de sales en un 50%, mecanismo utilizado en el cultivo in vitro, para obligar al brote a producir raíces (27) (Figura 8); y al efecto de la adición de ANA, IBA, IPA y AIA, los cuales favorecen el alargamiento celular de los primordios radicales. Además, el uso de carbón activado fué otro factor que contribuyó a la formación de raíces, ya que a éste se le atribuye la capacidad de estimular la rizogénesis, aún cuando se desconoce la forma como éste actúa (27).

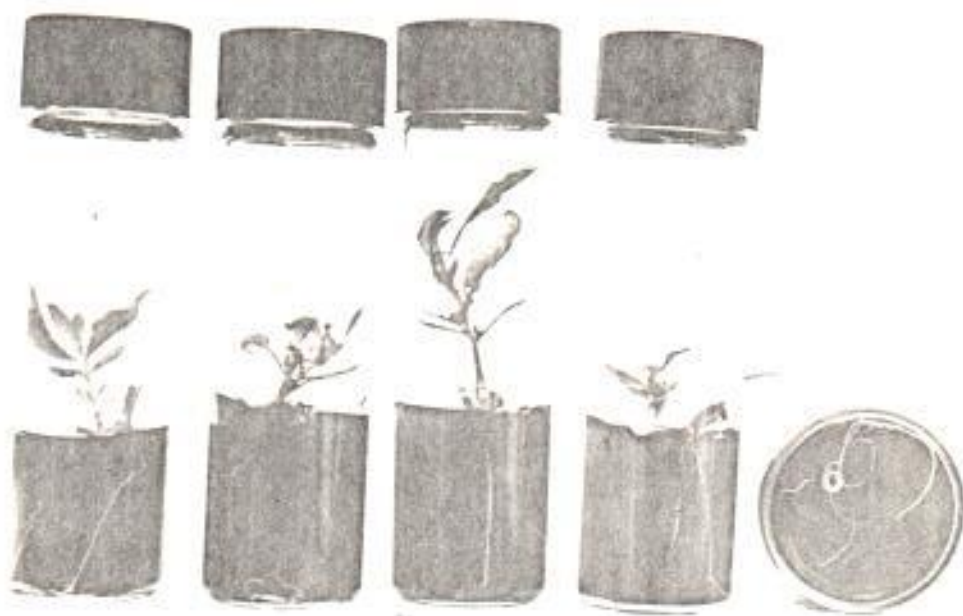


Figura 8. Enraizamiento de brotes de E. camaldulensis en el medio de - Murashige y Skoog.

Los resultados obtenidos en la inducción de brotación, elongación y enraizamiento coinciden con lo reportado por GUPTA et al, quienes manifiestan que el medio de Murashige y Skoog es el que ha dado los mejores resultados en la propagación in vitro de segmentos nodales de Eucalyptus camaldulensis (14).

Cuadro 10. Variación de la unidad experimental durante las fases de inducción de la brotación, elongación y enraizamiento de los brotes para cada uno de los medios evaluados.

Medios de Cultivo	Inducción de la brotación		Elongación de los brotes		Enraizamiento de los brotes	
	Total de tubos	Porcentaje (%)	Total de tubos	Longitud Promedio (mm)	Total de tubos	Porcentaje (%)
Murashige y Skoog	66	97	64	15	59	49
Woody Plant Medium	55	58	32	8	29	17
Shenck e Hildebrandt	63	63	40	9	37	22

5. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se concluye que :

- 1) El medio de cultivo más efectivo para la inducción in vitro de la brotación, elongación y enraizamiento de segmentos nodales de Eucaliptus camaldulensis fue el de Murashige y Skoog./
- 2) Los segmentos nodales conteniendo las yemas axilares preformadas - se considera un material adecuado para el cultivo in vitro de Eucaliptus camaldulensis.
- 3) La inmersión de los segmentos nodales en hipoclorito de calcio al 10% durante 15 minutos, alcohol al 70% por 3 minutos e hipoclorito de calcio al 8% durante 15 minutos, combinado con la incorporación de Benlate en dosis de 2 g/l y Ampicilina en concentración de 350 mg/l en el medio de cultivo, resultó ser el proceso más efectivo para el control de hongos y bacterias en los segmentos nodales sembrados in vitro.
- 4) La inmersión de los segmentos nodales en una solución antioxidante de ácido cítrico en dosis de 250 mg/l y ácido ascórbico en dosis de 300 mg/l , y la adición de dicha solución al medio de cultivo, fue el tratamiento más eficiente para el control de la oxidación fenológica.

6. BIBLIOGRAFIA

1. ANEJA, S.; ATAL, C.K. 1969. Plantlet formation in tissue cultures from lignotubers of Eucalyptus citriodora Hook. *Current Sci.* 38:69.
2. BIONDI, S.; THORPE, T.A. 1981. Clonal propagation of forest tree species. Costed Symp. of tissue culture of economically important. (Filipinas). p. 197-204.
3. CERON MARTI. F.A. 1987. Uso de reguladores de crecimiento vegetal en la inducción in vivo de yemas axilares latentes de Coffea arabica y establecimiento de los brotes vegetativos in vitro. - Tesis. Magister Scientiae. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 23-33.
4. CURSO DE Cultivo de Tejidos. (2, 1987, Turrialba, Costa Rica). 1987. Memoria. Turrialba, Costa Rica, IICA. 124 p.
5. DE FOSSARD, R.A. 1974. Tissue and organ culture of Eucalyptus. *Forestry Sciences.* (New Zeland). No. 4:267-278.
6. DEPOMMIER, D. 1981. Micropropagation D' Eucalyptus resistant au froid; Influence de quelques facteurs sur L'allongement et -- L'enracinement des plantules. *Desessences Forestieres.* (France). p. 127-132.
7. DURAND-CRESSWELL, R.; NITSCH, C. 1975. Organ culture of Eucalyptus grandis L. *Planta.* (Berl.). p. 88-90.
8. _____.; _____. 1978. Factors influencing the regeneration of Eucalyptus grandis by organ culture. In *Symposium on tissue culture for horticultural purposes.* University of Thent Belgium. - p. 149-156.
9. _____.; BOUDET, A.M. Le Bouturage "in vitro" de L'Eucalyptus. - *Micropropagation d'arbres forestiers.* AFOCEL. No. 12-6/79. -- (France). p. 57-66.
10. _____.; DE FOSSARD, R.A. Organ culture of Eucalyptus grandis. - University of New England. s.p.
11. _____.; BOULAY, M.; FRANCIET, A. 1982. Vegetative propagation of Eucalyptus. In *tissue culture in forestry.* (ed) Bonga, J.M.; -- Durzan, D.J. Martinus Nijhoff/DR. W. Junk Publishers. Tha Hague, Boston, EE. UU. p. 150-181.

12. GODOY HERNANDEZ, G. del C. 1985. Cultivo *in vitro* de órganos florales de Leucaena leucocephala (LAM) de wit (Huaxin). Tesis. Químico Biólogo Agropecuario, Mérida, Yucatán, México, Universidad Autónoma de Yucatán, Escuela de Química. p. 40-62.
13. GONZALEZ ROSAS, H. 1988. Cultivo *in vitro* en forestales. Chapin-go, México, Centro de Fruticultura, Colegio de Postgraduados. (Comunicación personal).
14. GUPTA, P.K.; MEHTA, U.J.; MASCARENHAS, A.F. 1983. A tissue culture method for rapid clonal propagation of mature trees of -- Eucalyptus torelliana and Eucalyptus camaldulensis. Plant Cell Reports. India. 2:296-299.
15. _____.; MASCARENHAS, A.F. 1987. Eucalyptus; Cell and tissue - culture in forestry. Forestry Sciences. (New Zealand). 3:385-399.
16. HARNEY, V.J. 1981. Vegetative propagation of Eucalyptus *in vitro*. Desessences forestieres. (Francia). p. 175-180.
17. HURTADO M., D.V.; MERINO M., M.E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. p. 15-30, 44-84, 133-145.
18. LAKSHMI SITA, G. 1981. Tissue culture of Eucalyptus Species. COSTED. Symp. on tissue culture of economically important. (Filipinas). p. 180-184.
19. LEE, E.C.M.; DE FOSSARD, R.A. 1974. The effects of various auxins and cytokinins on the *in vitro* culture of stem and lignotuber tissues of Eucalyptus bancroftii maiden. New Physiol. 73:707-717.
20. MARTINEZ CHOTO, M.L.; DIAZ GUILLEN, M. de J. 1987. Evaluación de - mezclas de suelo más arena y fungicidas en la germinación de --- "Eucalyptus camaldulensis". Tesis. Ing. Agr. Fitotecnista. San Salvador, Universidad Evangélica de El Salvador, Facultad de -- Ciencias Agronómicas. p. 2-5.
21. MASCARENHAS, A.F.; GUPTA, P.K.; KULKARNI, V.M. 1981. Propagation - of trees by tissue culture. Costed Symp. on tissue culture of economically important. (Filipinas). s.p.

22. McCOMB, J.A.; BENNETT, I. 1982. Vegetative propagation of Eucalyptus using tissue culture and its application to forest improvement in western Australia. V. International congress of plant tissue and cell culture. (Japón). p. 118.
23. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. 1984. Especies para leña; arbustos y árboles para la producción de energía. Trad. por Vera Arguello de Ferrández. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 204-207.
24. NKANKA, B. 1981. Eucalyptus rudis Endl. Technique de micropropagation par la culture de noeuds in vitro. Desessences forestieres. (Francia). p. 135-142.
25. OKA, S.; YEUNG, E.C.; THORPE, T.A. 1982. Shoot formation in Eucalyptus globulus hypocotyl explants. New Zealand Journal of -- forestry science. Canada. 12(3):5501-509.
26. VILLALOBOS, V.M.; THORPE, T.A.; YEUNG, E.C. 1983. Aplicaciones -- del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo. No. 51:45-50.
27. _____. 1988. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 203 p.