PROPAGACION VEGETATIVA DE *Eucalyptus* grandis

María Isabel Trujillo[1]

INTRODUCCIÓN

La importancia de la propagación vegetativa en los programas de mejoramiento genético y a nivel operativo avanza día a día a la luz de los buenos resultados obtenidos en plantaciones clonales comerciales.
La propagación vegetativa de individuos genéticamente seleccionados permite multiplicar exactamente todas las características de interés por las que son seleccionados. Si las técnicas de propagación son las adecuadas para permitir la producción de plantas a escala comercial, se logran plantaciones genéticamente superiores y con un grado de uniformidad que facilita y mejora todas las actividades de manejo y explotación.
El proceso de clonación involucra varias etapas hasta llegar a su utilización comercial; envuelve una fase de selección de individuos en el campo, rescate de genotipos selectos, producción de plantas clonales, evaluación mediante test clonal, plantaciones piloto y multiplicación comercial (Couto *et al,* 2004). El Programa Nacional Forestal de INIA esta llevando adelante este proceso desde 1992 habiendo logrado hasta la fecha estandarizar protocolos, liberar al mercado clones y mantener bancos de germoplasmas.
En este reporte se resumen las metodologías y resultados obtenidos para las diferentes etapas del proceso.

SELECCIÓN FENOTíPICA DE ÁRBOLES PLUS

Para la especie *Eucalyptus grandis* la primera selección de árboles plus se realizó en 1992 con la finalidad de incorporar al Programa de Mejoramiento Genético genotipos con cierta adaptación local. En esta oportunidad se trabajó en conjunto con la Facultad de Agronomía (Proyecto FPTA) y se seleccionaron 196 ejemplares. Los criterios de selección consistieron en superioridad volumétrica y características de forma y sanidad
Con semilla procedente de estos árboles plus y con accesiones procedentes de Australia se instalaron la Población Genética Base y una red de pruebas de progenie abarcando las zonas de prioridad forestal.
En el año 2000 se realiza la segunda selección de árboles plus para la especie, evaluándose y seleccionándose árboles en todas las pruebas de progenie. En esta oportunidad se seleccionan 521 árboles plus evaluándose además de los criterios anteriores, características de la madera como la densidad y tensiones de crecimiento. (De Mello *et al*. 2002).

RESCATE DE GENOTIPOS SELECTOS

Una vez seleccionado los ejemplares en el campo, estos deben ser propagados vegetativamente con la finalidad de incorporar la totalidad de su información genética a los programas de mejoramiento y de liberar al mercado dicho material selecto. Para la propagación vegetativa se llevan adelante técnicas de macro y micropropagación.

Rescate de genotipos selectos mediante macropropagación

Dentro del término macropropagación se agrupan las técnicas de estacas, injertos y acodos. En todas ellas se parte de un segmento relativamente grande de material vegetativo del árbol seleccionado y se lo induce a enraizar o se le acopla el sistema radicular de otra planta.
En los años 2000 y 2001 se trabajo con la técnica de injerto lográndose injertar 182 árboles seleccionados,

[1]Ing. Agr. - Programa Nacional Forestal INIA Tacuarembó

lográndose un porcentaje de prendimiento del 94 % (De Mello *et al*. 2002).
Estos injertos se instalaron en la Estación Experimental del Norte y constituyen uno de los bancos de germoplasma del Programa Nacional Forestal. A su vez se utilizan como fuente de material para realizar introducciones *in vitro* y micropropagar dichos materiales.
A partir del año 2002 se decide trabajar con la técnica de estaca para el rescate de los genotipos selectos, lo que implica el tronchado de árboles para provocar el rebrote de material juvenil. Como al tronchar los árboles se corre el riesgo de perder las cepas se decide comenzar a tronchar aquellos que presenten alguna réplica en buen estado lograda por el método de injerto.
Debido a limitantes operativas y de personal se decide tronchar pocos árboles por vez, tratando de extremar los cuidados de las cepas a evaluar.
En primer lugar se procede a la verificación de la superioridad de los árboles seleccionados y luego a fines del mes de agosto se realiza el tronchado de los árboles. En el momento del tronchado se miden indicadores volumétricos del árbol, se troza en medidas estándar para el aserrado y se sacan discos a diferentes alturas para los cálculos de densidad y de porcentaje de corteza. Con las trozas aserrables se cortan tablones de medidas convencionales y se analiza el porcentaje de rajado para el secado natural.
Los cuidados posteriores de la cepa consisten en: cercado con alambre de púa para impedir el daño por ganado, fertilización (100 gr de triple 15) y control periódico de hormigas cortadoras hasta el momento en que se cosechan los rebrotes.
Cuando los rebrotes de cepa alcanzan un grado de rustificación suficiente (aproximadamente a los 3 meses) se cosechan para realizar las estacas. La colecta del material se efectúa en las primeras horas de la mañana y las estacas se cortan en el campo, sumergiéndolas inmediatamente en agua para disminuir las perdidas por evaporación durante el transporte.
Las estacas consisten en segmentos nodales de 6 a 8 cm de largo, con 2 o 4 yemas axilares y con la lámina foliar seccionada a la mitad transversalmente para reducir el área de transpiración. Cada estaca debidamente identificada es estaqueada en bandejas con sustrato. El sustrato consiste en 50% de corteza de pino compostada y 50 % cascara de arroz quemada. Las estacas se mantienen en invernáculo bajo riego por aspersión y temperaturas que promedian entre los 25ºC y 35ºC
Al cabo de dos meses se evalúa el porcentaje de estacas con raíz.

Resultados y discusión

A partir del mes de efectuado el tronchado comienzan a apreciarse los primeros signos de rebrotes. Según la bibliografía la capacidad de rebrotar así como la cantidad y vigor de los rebrotes varía con el genotipo, época del año, luminosidad y fertilidad del árbol plus.

En el siguiente cuadro se aprecian los códigos de los árboles tronchados, la presencia o no de rebrote, la cantidad y el vigor de los mismos

Cuadro Nº 1: Caracterización de los rebrotes

Código	Rebrotes	Cantidad*	Vigor*
27102	Si	Escaso	Vigoroso
27120	Si	Abundante	Vigoroso
27138	Si	Abundante	Poco Vigoroso
2785	No		
27100	Si	Escaso	Poco Vigoroso
27196	Si	Muy escaso	Poco Vigoroso
27127	No		
2425	No		
2416	No		
2470	No		
2116	Si	Abundante	Vigoroso
2114	Si	Abundante	Poco vigorosos
2133	Si	Escaso	Poco vigorosos
218	Si	Muy escaso	Poco vigorosos
1312	Si	Muy escaso	Poco vigorosos
135	No		
139	No		

- Se definió como abundante cuando la cepa rebroto en más de dos sitios, escaso cuando rebroto en dos y muy escaso cuando rebroto en solo uno.
- El término vigor hace referencia a la apariencia en cuento a grosor y consistencia de los rebrotes.

Del cuadro se concluye que del total de árboles tronchados un 40 % no rebrotó y a su vez de los que rebrotaron solo un 20 % presentaron rebrotes abundantes y vigorosos. Estos porcentajes se consideran bajos si nos referimos a talas rasas, pero como en este caso solo se troncha el árbol seleccionado se concluyó que el factor limitante era la poca incidencia de luz.
Además de esta limitante debe mencionarse los problemas de ramoneo por parte del ganado y ataques de hormigas que afectaron los rebrotes de cepas.
De todas las cepas que rebrotaron se cosechó material para hacer estacas variando la cantidad y el vigor de las mismas según las características del rebrote.
A continuación se presenta el cuadro con la cantidad de estacas cosechadas y enraizadas.

Cuadro Nº 2: Estacas cosechadas y % de enraizamiento

Código	Estacas cosechadas	Estacas enraizadas	% de enraizamiento
27102	13	3	23
27120	80	45	56
27138	50	3	6
27100	20	0	0
27196	7	0	0
2116	30	13	43
2114	31	10	32
2133	6	3	50
218	5	2	40
1312	1	1	100

De los dos cuadros anteriores se concluye que la cantidad y el estado de los rebrotes son importantes determinantes de la cantidad de estacas enraizadas a obtener. En términos generales aquellos rebrotes con tallos finos y entrenudos largos caracterizados como de poco vigorosos sufren importantes problemas de deshidratación no llegando la mayoría de ellos a emitir raíces. Cuando los rebrotes eran vigorosos el factor limitante para el enraizamiento podría ser genético o de condiciones ambientales no adecuadas.

Rescate de genotipos selectos mediante micropropagación

El término micropropagación hace referencia a las técnicas de propagación donde se realiza el cultivo aséptico de una pequeña porción de material vegetal (explanto) en condiciones ambientales y nutricionales controladas. Como método para la propagación de genotipos superiores tiene algunas ventajas en relación con los métodos tradicionales ya que permite propagar árboles adultos sin necesidad de troncharlos, se obtienen cientos de réplicas en poco espacio e independientemente de la época del año y los propágulos son fácilmente almacenables e intercambiables entre programas de mejoramiento. Estas características han determinado que el INIA utilice estas técnicas en varios programas de mejoramiento genético. Para la especie *Eucalyptus grandis* en 1992 y 1993 mediante un proyecto FPTA llevado adelante por el Laboratorio de Biotecnología de Facultad de Agronomía se micropropropagaron 35 árboles de los 196 seleccionados.
A partir del 1995 la tarea de micropropagación se ha llevando adelante por parte del Laboratorio de Biotecnología Forestal de INIA Tacuarembó lográndose el ajuste de los protocolos de micropropagación para la especie, la propagación de árboles selectos y la conservación en bancos de germoplasma.
Para la micropropagación de árboles adultos selectos se cosechan las ramas más bajas que presenten diámetros de 3 cm con el uso de escaleras o elevadores hidráulicos.
Estas ramas son desinfectadas con detergente y los extremos se sellan con parafina para luego acondicionarlas en el invernáculo en condiciones de humedad y temperatura adecuada (70% de HR y 25 ºC) para provocar la brotación de yemas epicórmicas (foto1).

Estos brotes son cosechados utilizando tijeras o bisturí y se introducen en una solución preparada con 250 ml de agua destilada, 5 gotas de Tween 20 y 0.1 g de benomyl. En esta solución se llevan al Laboratorio donde comienzan el proceso de micropropagación.
Este proceso se ha estandarizado en:

a) Etapa de introducción

En primer lugar se realiza la desinfección del material según la siguiente secuencia:

- remojo durante 5 minutos en solución al 6 % de hipoclorito de sodio comercial
- 3 enjuagues con agua destilada estéril
- los brotes cosechados se cortan en segmentos nodales que posean 2 o 4 yemas axilares y 1 par de hojas seccionadas a la mitad.
- remojo de los segmentos nodales durante 3 minutos en solución al 6 % de hipoclorito de sodio comercial.
- 3 enjuagues con agua destilada estéril

Luego de la desinfección los segmentos nodales se introducen en tubos de ensayos conteniendo 20 ml de medio de cultivo estéril.
El medio de introducción consiste en: solución mineral + vitaminas De Fossard(De Fossard R. A *et al* 1974)+ 8.5 g/l agar + 10 g/l sacarosa + 0.2mg/l BAP
Como solución mineral se están utilizando tres formulaciones que se alternan según la respuesta observada en cada genotipo en particular, se utiliza la formulación de Murashige and Skoog (1962) a la mitad de su concentración, la formulación de Jads (citado por Correia *et al* , 1995) y el Wood Plant Medium.(Lloyd, G. and

McCown, B. 1980)
La etapa de introducción dura hasta que los segmentos nodales emitan nuevas yemas, en ese momento el material pasa a la etapa de multiplicación.

b) Etapa de multiplicación

El medio consiste en: solución mineral + vitaminas De Fossard+ 8.5 g/l agar + 10 g/l sacarosa + 0.2mg/l BAP + 0.2 mg/l ANA
En esta etapa se favorece la formación de yemas. Cuando los entre nudos de los nuevos brotes comienzan a elongar se pasa a la etapa de elongación y enraizamiento

c) Etapa de elongación y enraizamiento

El medio consiste en: solución mineral + vitaminas De Fossard+ 8.5 g/l agar + 10 g/l sacarosa + 0.2mg/l BAP + 0.2 mg/l ANA + 5 g/l Carbon activado

Luego que las plántulas emiten 2 o mas raíces de más de 3 cm y alcanzan una altura de 4 cm comienza el proceso de aclimatación.

d) Etapa de aclimatación

Esta etapa es de fundamental importancia ya que prepara a la microplanta para que pueda sobrevivir en condiciones normales. Las plantas micropropagadas son difíciles de aclimatar ya que no tienen suficiente pared epicuticular y tienen estomas anormales, lo que lleva a una excesiva deshidratación y pobre control del intercambio gaseoso. En el transcurso de la aclimatación las yemas forman nuevas hojas funcionales que reemplazan a las anteriores y que soportan condiciones ambientales normales. Cuando esto ocurre las plántulas pueden ser llevadas al campo sin cuidados especiales.
El medio de aclimatación consiste en: sustrato formado por 50 % corteza de pino compostada y 50 % de cascara de arroz quemada + 35 ml de solución mineral Wood Plant Medium.
Aproximadamente a los 2 meses de estar en estas condiciones o cuando la planta ha emitido 2 pares de hojas nuevas se comienza a perforar el parafilm que cubre los tubos con las plantas. Al cabo de una semana se retira totalmente la cubierta de parafilm, se riega con benomyl y se deja 2 días en estas condiciones. Luego se transplanta a maceta y se lleva a invernáculo con riego por aspersión y temperatura controlada.

Resultados y conclusiones

- La respuesta a cada una de las etapas del cultivo *in vitro* es altamente dependiente del genotipo que se quiere propagar.
- Al trabajar con árboles creciendo en el campo, la contaminación del material con que se inicia el cultivo es una limitante de consideración.
- La propagación de árboles adultos donde los tejidos han perdido plasticidad para formar nuevas estructuras determina ciclos de producción mas prolongados para retomar el estado de juvenilidad de los tejidos.
- Del total de ramas que se cosechan de los árboles selectos y se acondicionan en el invernáculo, se han obtenido brotes viables (que crecen mas de 1.5 cm de altura) en el 50 % de ellas.
- De todos los segmentos nodales que se introducen el 88 %, se pierde por contaminación y oxidación de los tejidos.

- En la etapa de multiplicación las pérdidas han oscilado entre 10 y 30 % debido a contaminación, formación de callo y vitrificación de los tejidos. Estas pérdidas varían ampliamente según el genotipo con el que se trabaja.
- El tiempo que permanecen los cultivos en esta etapa hasta que las rosetas elongan es también muy dependiente del clon. Para la micropropagación de árboles adultos, los clones que han mostrado etapas de multiplicación mas cortas han logrado la elongación luego de cinco meses de cultivo. En aquellos brotes que presentan una buena elongación luego de aproximadamente 2 meses se observa la emisión de raíces.
- Para la etapa de aclimatación las perdidas están directamente relacionadas con un pobre control de las condiciones ambientales. Es preciso comenzar con condiciones de humedad relativa muy alta y paulatinamente disminuirla a los valores de humedad relativa ambiente normales. Si se da un buen control de este factor las perdidas en esta etapa son muy reducidas.

PRODUCCIÓN DE PLANTAS CLONALES

Luego que se logran rescatar los genotipos selectos ya sea por técnicas de macro o micropropagación, se deben producir las plantas clonales para instalar los jardines, bancos y test clonales.
En esta etapa la producción de plantas se hace por estaquilla y se evalúa principalmente la capacidad de enraizamiento de cada clon.
Las plantas para producir estacas (pies madres) se manejan con fertilizaciones y podas frecuentes (cada 15 días en los meses de producción) para favorecer la emisión de brotes que puedan ser cosechados como estacas.
Se ha evaluado la diferencia entre mantener los pies madres en maceta o instalarlos en el campo con las ventajas y desventajas que cada manejo presenta.
Trabajando con pies madres instalados en macetas se logra tener una producción de brotes más estables en el tiempo y los pies madres son fácilmente sustituibles por otros. La desventaja que hemos encontrado para este método, ha sido lograr brotes con rusticidad suficiente que no se pierdan luego por deshidratación.
Con pies madres instalados a campo se tiene una producción de estacas muy estacional y los pies madres son difíciles de sustituir por otros. Como ventaja se ha observado que en los períodos de primavera y otoño los brotes obtenidos de estos pies madres se encuentran más rustificados y resisten mejor las condiciones de estaquillado que los brotes obtenidos de pies madres en maceta.
En el siguiente cuadro se observan ejemplos de los porcentajes de enraizamiento obtenidos con clones INIA.

Cuadro Nº 3: Porcentaje de enraizamiento de estacas cosechadas de pies madres

Código	Cantidad	Fecha	% en raiz.
378B	58	Feb-03	61
INIAFOR031	28	"	55
INIAFOR032	39	"	51
INIAFOR033	52	"	53
INIAFOR034	45	"	50
INIAFOR035	36	"	53
INIAFOR036	27	"	52
INIAFOR037	55	"	55
INIAFOR038	43	"	57
INIAFOR039	19	"	50
VS13	20	"	38
H	14	"	22
JL13	18	"	14
JL1	23	"	8
378B	15	Ene-05	67
JL28	32	"	50
JL28	40	"	48
JL28	192	"	46
V	12	"	42
2133	88	"	38
5	48	"	35
218	12	"	33
378B	116	"	28
2116	145	"	20

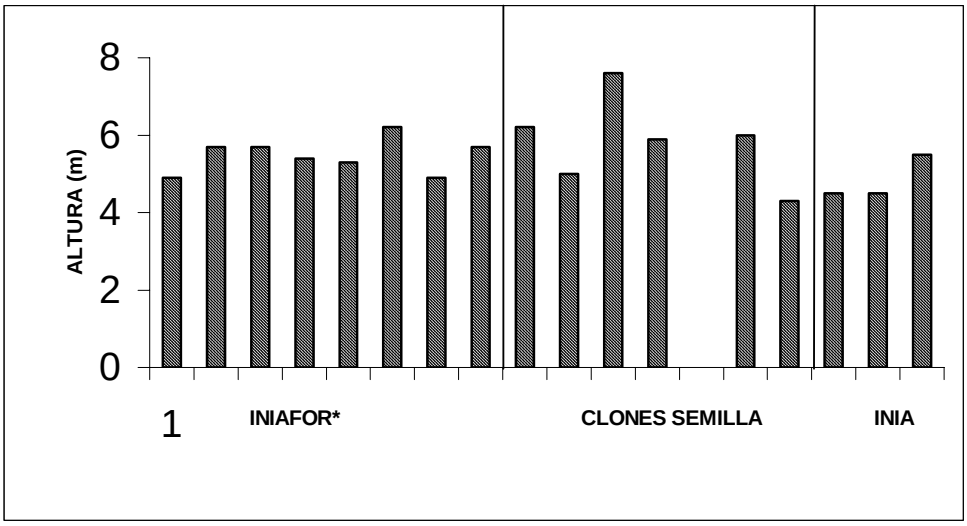
En general se observa que los porcentajes de enraizamiento son bajos, destacándose el clon 378B el cual es un clon que proviene de semilla.
El bajo porcentaje de enraizamiento observado puede deberse a que las condiciones del invernáculo no se lograron ajustar para las temperaturas requeridas. A pesar de que se instaló una cortina de agua, un aire acondicionado y se cambió el sistema de riego, en los meses de verano alcanza temperaturas máximas muy elevadas que provocan importantes problemas en las estacas.

EVALUACIÓN MEDIANTE TEST CLONAL

Una vez que los genotipos selectos han logrado multiplicarse vegetativamente en cantidades suficientes como para evaluarlos, se procede a la instalación de los test clonales.
Con los test clonales se logran obtener datos reales del comportamiento de cada clon en condiciones de plantación en diferentes zonas.
Debido principalmente a limitantes de infraestructura para la producción de plantas, el INIA no ha podido realizar

por si misma los test clonales los cuales se han instalado y se continuaran instalando en convenio con empresas forestales.
En convenio con la empresa COLONVADE S.A en noviembre del 2004 se instaló un test clonal con los clones INIA y otros clones propiedad de COLONVADE. Datos de crecimiento a los 10 meses se encuentran publicados en la Actividad de Difusión Nº 416.
En el predio de INIA de la Estación Experimental del Norte en abril del 2003 se instaló un ensayo clonal con fines demostrativos que cuenta con 18 clones en evaluación, 8 clones INIAFOR , 7 clones de semilla de árboles plus y 3 clones INIA con baja capacidad de enraizamiento.

En la siguiente gráfica se observan los promedios de altura por clon a los 2 años.



*Se llama clones INIAFOR a los clones INIA que salieron a la venta en el 2003

Gráfica Nº1: Promedios de altura por clon a los 2 años

En la gráfica se observa que los clones que provienen de plántulas de semilla tienen una mayor variación en comportamiento ya que al provenir de semilla de polinización abierta solo se tiene información sobre la superioridad del árbol madre. Los restantes clones INIA todos provienen de árboles adultos seleccionados por su superioridad fenotípica por lo cual tienen un comportamiento más homogéneo.

CONCLUSIONES FINALES

La propagación vegetativa de árboles seleccionados es una herramienta muy valiosa para los programas de mejoramiento genético, permitiendo avanzar muy rápidamente en la mejora de características que tienen un importante control genético. Sin embargo como fue expresado, son necesarias condiciones de infraestructura y manejo adecuados para llevar adelante con éxito dicha propagación. También hay que destacar que existen genotipos que presentan limitaciones genéticas para lograr el enraizamiento y por lo tanto no son aptas para plantaciones clonales a escala comercial.

El INIA cuenta con un amplio pool genético en evaluación que permitirá continuar seleccionando individuos que se destaquen por características de interés productivo o industrial para las diferentes zonas del país, sin embargo las limitantes de infraestructura y personal para llevar adelante las tareas de propagación vegetativa son bien reconocidas siendo por lo tanto necesario un estrecho trabajo en conjunto entre el INIA y las empresas forestales para alcanzar logros significativos.

Bibliografía

Couto Alfenas, .A.; Valverde Zauza, E.; Gonçalves Mafia, R.; Francisco de Assis, T. 2004. Clonagem do Eucalipto. En: Clonagem e Doenças do Eucalitpto. UFV, Viçosa. pp 19-152.

Correia, d.; Gonçalves, A.N.; Zarate do Couto, H.T.; 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 multiplicaçao in vitro. IPEF n48/n49, p. 107-116, 1995.

De Mello, J.C.; Balmelli, G.; Bennadjii, Z.; García, R.; Uetsuki, Y.; Maruyama, T. 2002. Metodología para la selección de árboles plus de *Eucalyptus* grandis por crecimiento, forma y características de la madera. Serie Aftercare Forestal INIA-JICA Nº 2. 13p.

De Mello, J.C.; Tabuchi, K.; Bennadjii, Z.; Maruyama, T. 2002. Macropropagación de *Eucalyptus* grandis. Serie Aftercare Forestal INIA-JICA Nº 10. 13p.

De Fossard, R.A.; Nitsch, C.; Cresswell, R.J ; Lee, E.C.M. 1974. Tissue and organ culture of *Eucalyptus*. N.Z.J. For. Sci.4:267-278.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Lloyd, G. and McCown, B. 1980. Comercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip. Comb.Proc. Intern. Plant Propagator´s Soc. 30:421-427.1980.