

AFTERCARE DEL PROYECTO DE MEJORAMIENTO GENÉTICO FORESTAL EN EL URUGUAY (2000-2002)



MICROPROPAGACIÓN DE *Eucalyptus grandis*

María Isabel Trujillo
Jorge Lemos
Zohra Bennadji
Tsuyoshi Maruyama

SERIE AFTERCARE FORESTAL INIA-JICA - FEBRERO 2002
INIA - TACUAREMBÓ

PUBLICACIÓN
Nº 11



JAPÓN

Asistencia Oficial para el Desarrollo

MICROPROPAGACIÓN DE *Eucalyptus grandis*

Autores: María Isabel Trujillo¹

Jorge Lemos²

Zohra Bennadji³

Tsuyoshi Maruyama⁴

¹ Ing. Agr. Programa Nacional Forestal. INIA-Tacuarembó (Uruguay).
mit@tb.inia.org.uy

² Asist. Lab. Programa Nacional Forestal. INIA-Tacuarembó (Uruguay).
jorgelem@montevideo.com.uy

³ Ing. Agr. Ph.D. Programa Nacional Forestal. INIA-Tacuarembó (Uruguay).
zobenn@tb.inia.org.uy

⁴ Ing. For. Ph.D. Aftercare INIA-JICA. INIA-Tacuarembó (Uruguay).
tsumaruyama@hotmail.com

Título: MICROPROPAGACIÓN DE *Eucalyptus grandis*

Autores: María Isabel Trujillo
Jorge Lemos
Zohra Bennadji
Tsuyoshi Maruyama

Serie Aftercare Forestal INIA-JICA

Publicación N° 11

Febrero 2002

INIA Tacuarembó

ISBN: 9974-38-152-5

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

Foto de Portada: Plántulas de *Eucalyptus grandis* obtenidas por micropropagación .

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	2
Material vegetal	2
Colección y acondicionamiento de ramas	2
Colección de brotes epicormicos	3
Inicio del cultivo	4
Desifeción de brotes	4
Introducción	4
Multiplicación	4
Elongación	5
Enraizamiento	6
Aclimatación	6
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
Material vegetal	7
Inicio del cultivo	7
Multiplicación	8
Elongación de brotes	9
Enraizamiento de brotes	10
Aclimatación de plántulas	11
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	12
BIBLIOGRAFÍA	13

MICROPROPAGACIÓN DE *Eucalyptus grandis*

RESUMEN

El reciente y notorio desarrollo que presenta la forestación en Uruguay, ha motivado el interés por el mejoramiento genético de varias especies forestales. En la especie Eucalyptus grandis el avance ha sido significativo y se intenta obtener la mayor ganancia genética en el menor tiempo posible. En esta estrategia todas las técnicas de propagación vegetativa tienen una importancia clave como complemento a las técnicas de propagación sexual.

La micropropagación tiene el potencial para lograr la clonación, de genotipos superiores con la mayor tasa de multiplicación. En el programa de mejoramiento genético forestal del INIA se ha logrado establecer un protocolo detallado para la micropropagación de árboles plus de esta especie y actualmente se cuenta con 35 clones conservados en un banco de germoplasma in vitro y 12 clones que están instalados en el campo en un jardín clonal.

Debido a que la respuesta a la técnica es muy dependiente del clon, es necesario hacer continuos ajustes que permitan aumentar la eficiencia del proceso. Con este objetivo se han diseñado ensayos para comparar el efecto de 2 tipos de citokininas en la etapa de multiplicación y la respuesta al enraizamiento según la composición del medio.

A medida que se siga avanzando en la propagación de árboles superiores y en la ejecución de test clonales el avance en el mejoramiento genético de la especie será muy significativo.

Palabras claves: micropropagación, citokininas, auxinas, enraizamiento

INTRODUCCIÓN

La micropropagación es el cultivo aséptico de material vegetal, bajo condiciones ambientales y nutricionales controladas. Su aplicación al mejoramiento genético de especies forestales es muy amplia y va desde procedimientos sencillos donde se utiliza como una herramienta para clonar árboles superiores, hasta procedimientos complejos donde se regeneran plantas completas a partir de células que han sido modificadas genéticamente.

En el programa forestal de INIA se está utilizando desde 1995 como una herramienta para clonar árboles superiores, ya que permite propagar árboles adultos sin necesidad de su tronchado, se obtienen cientos de réplicas en poco espacio e independientemente de la época del año y los propágulos son fácilmente almacenables e intercambiables con otros programas de mejoramiento.

Actualmente el programa cuenta con 35 clones conservados en un banco de germoplasma *in vitro* y 12 clones que están instalados en el campo en un jardín clonal.

Los resultados obtenidos han sido variables, dependiendo principalmente del clon, existiendo algunos que responden muy bien y otros que son muy difíciles de propagar. Las etapas más críticas son la desinfección del material adulto, la elongación de los brotes multiplicados y el enraizamiento. En todas estas etapas se han llevado adelante ensayos probando diferentes tratamientos con el fin de estandarizar un protocolo para la micropropagación de la especie. En esta publicación se detallarán todas las etapas que llevan a la formación de una planta completa y algunos de los ensayos llevados a cabo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Colección y acondicionamiento de ramas

Debido a que la micropropagación es considerada una técnica cara, ya que implica un alto consumo de insumos y de mano de obra, el material a clonar es siempre mate-

rial selecto. Los árboles se seleccionaron por una o varias características de interés y luego se procedió a la colecta del material. Para la colecta se utilizaron escaleras o un elevador hidráulico que permitió elegir ramas de 3 a 6 cm de diámetro que no presentaran síntomas de estrés ni enfermedad y que se encontraran lo más cercanas posibles a la base del árbol (estas ramas presentan tejidos más juveniles que el resto). (Figura 1).

Las ramas cosechadas fueron cuidadosamente identificadas y se transportaron en conservadoras tratando de evitar cualquier daño a los tejidos. Una vez que se arribó a las instalaciones de trabajo, se lavaron con abundante agua y detergente con la finalidad de disminuir las posibles fuentes de contaminación. Posteriormente los extremos de las ramas se sellaron con parafina disminuyendo así las pérdidas de agua. Se acondicionaron en mesadas dispuestas en el invernáculo en un ambiente saturado en humedad y se realizaron 1 a 3 aplicaciones de productos fúngicos por semana. (Figura 2).

El método utilizado para la producción de brotes epicormicos inducidos en ramas de árboles adultos fue similar al desarrollado por Ikemori (1987).



Figura 1. Colecta de ramas con elevador hidráulico.

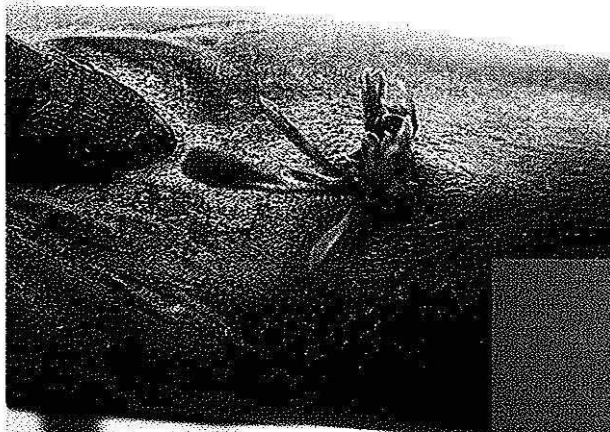


Figura 2. Ramas acondicionadas en el invernáculo.

Colección de brotes epicormicos

Al cabo de una o dos semana de instaladas las ramas en el invernáculo comenzaron a visualizarse puntos abultados en la corteza

por donde se desarrollaron posteriormente las yemas epicórmicas (yemas adventicias que se desarrollan debajo de la corteza). (Figura 3 y 4).



Figuras 3 y 4. Yemas epicórmicas.

La colecta de brotes se realizó en el invernáculo utilizando tijera o bisturí y se sumergieron inmediatamente en agua y detergente (Tween 20) teniendo siempre la precaución de que los recipientes se encontraran debidamente identificados. En estos recipientes se trasladaron al laboratorio donde se realizó la desinfección y posterior introducción "in vitro".

Inicio del cultivo

Desinfección de brotes

Los brotes se desinfectaron por 5-10 min. con una solución de 0.25% (v/v cloro activo) de hipoclorito de sodio. Luego se enjuagaron 5 veces con una solución estéril (por filtrado) de 1% (p/v) de ácido ascórbico.

Introducción

Luego de desinfectado el material se procedió a cortar los segmentos nodales en condiciones de máxima asepsia (cámara de flujo laminar). Un explanto nodal consiste en un segmento de tallo de aproximadamente 10 a 30 mm de largo con 1 ó 2 yemas, sin incluir la yema apical. (Figura 5).

Estos segmentos se colocaron individualmente en tubos de ensayo conteniendo MI (medio de introducción), consistente en sales minerales reducidas a la mitad de la concentración de la formulación original de Murashige y Skoog (1962), vitaminas de la formulación de De Fossard (1974), 3% (p/v) de sacarosa, 1 μ M de 6-benzylaminopurina (BAP), 0.05 μ M de ácido naftaleneacético (ANA), y solidificado con 0.8% (p/v) de agar.

El pH se ajustó a 5.8 antes del autoclavado a 121° C (1.1.kg cm⁻²) por 15 min. Los cultivos se colocaron a 25° C bajo luz blanca fluorescente (3000-5000 lux de intensidad) con un régimen de 16 horas de luz por día. Al cabo de una semana se realizó la primera evaluación donde se desecharon todos los tubos con material contaminado y/o necrosado. A la siguiente semana se realizó otra evaluación y el material libre de contaminantes se repicó a nuevos tubos de ensayos conteniendo el mismo medio. Cada 15 ó 20 días se repitió este proceso, descartando el material contaminado y repicando el material libre de contaminantes.

Multiplicación

Luego que el explanto se logra establecer en el medio de cultivo (1 ó 2 subcultivos)

4

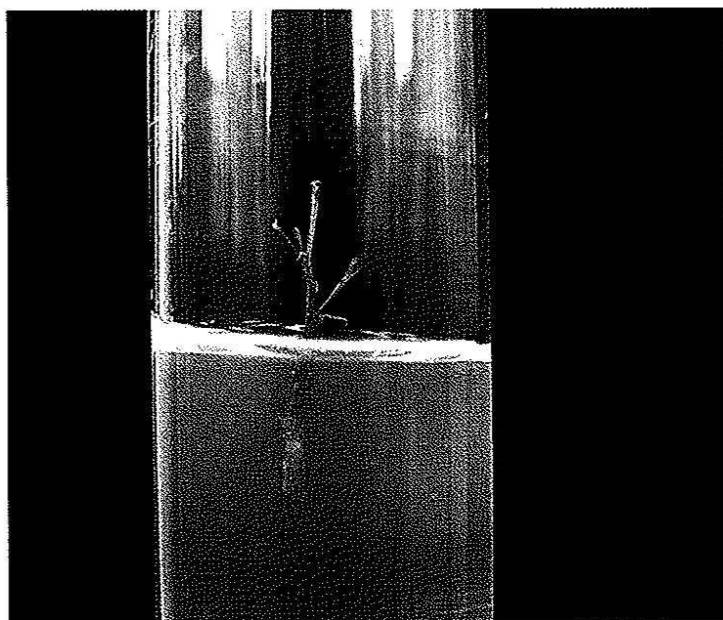


Figura 5. Segmento nodal en medio de introducción.

comienza la producción de nuevas yemas a partir de primordios preformados o desde yemas adventicias y se considera finalizada la etapa de introducción. El material se replica al MM (medio de multiplicación), basado en la formulación de Murashige y Skoog (1962), con las sales minerales reducidas a la mitad de la concentración original, 3% (p/v) de sacarosa, y solidificado con 0.2% (p/v) de gerlita. En este medio la proliferación de yemas es muy intensa y el explanto se transforma en una roseta. (Figura 6).

En esta etapa se diseñó un experimento con el fin de comparar el efecto en la multipli-

cación de 2 tipos de citocininas, el BAP y la Zeatina. La frecuencia de multiplicación (% de explantos que formaron nuevos brotes), el número de nuevos brotes por explanto y la longitud máxima de los brotes por explanto se evaluaron a los 30 días de cultivo.

Elongación

Los brotes multiplicados se transfirieron al ME (medio de elongación), de la misma formulación que el MM pero suplementado con BAP a una concentración 10 veces menor ($0.1 \mu\text{M}$). (Figura 7).

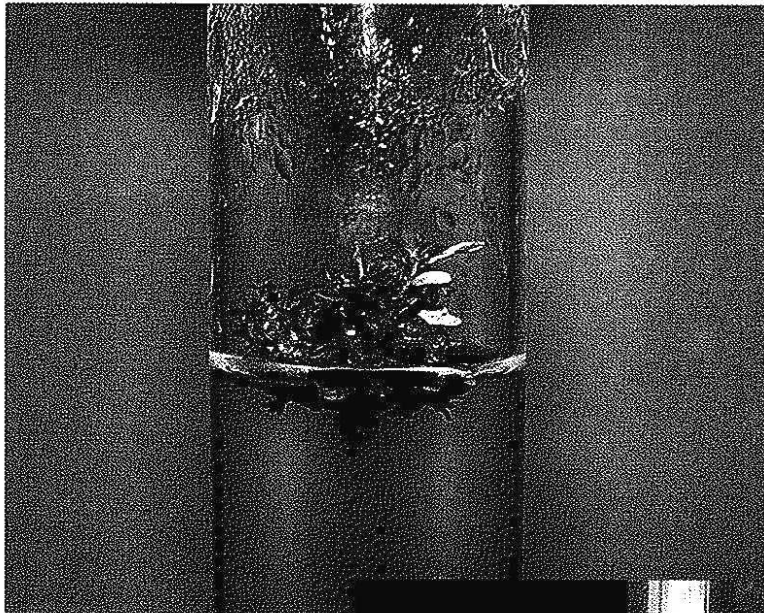


Figura 6. Roseta en medio de multiplicación.



Figura 7. Brote.

Enraizamiento

Los brotes elongados (aproximadamente 2 cm) se aislaron y se transfirieron al MR (medio de enraizamiento). Se utilizó el medio WPM (Lloyd y McCown, 1980) con las sales minerales y la concentración de sacarosa reducidas a la mitad o a la cuarta parte, y suplementado con 0-1 μ M de ácido indol butírico (AIB). (Figura 8).

Aclimatación

Los brotes enraizados que presentaron un adecuado desarrollo radicular se transplantaron a tubetes de plástico con vermiculita luego de lavar cuidadosamente con agua las raíces para eliminar los resi-

duos de gerlita. Las plántulas se mantuvieron durante aproximadamente 2 semanas a humedad relativa alta (90-95%) dentro de contenedores de plástico con cubierta transparente. Posteriormente se pusieron en contacto con el aire en forma gradual mediante la apertura de la cubierta por periodos cortos de tiempo (20-30 min. durante los primeros días) que se aumentaban paulatinamente hasta su completa exposición a las condiciones climáticas normales, aproximadamente 1 mes después de iniciado el proceso. Las plántulas fueron regadas con agua durante las 2 primeras semanas y luego fertilizadas con 0.1% (v/v) de solución nutritiva comercial Takeda No.2 (Takeda, Co., conteniendo en p/v: 5.0% N, 10% P, y 5% K). (Figura 9).



Figura 8. Brote en medio de enraizamiento.



Figura 9. Plántula aclimatada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Material vegetal

Aunque teóricamente no es considerado el método más eficiente, se tomó la decisión de iniciar la micropropagación a partir del cultivo de yemas epicórmicas debido a: 1) la dificultad experimentada en la micropropagación con brotes adultos, 2) la baja respuesta del material adulto en la propagación por estacas, 3) no contar, en aquel entonces, con un jardín clonal (basado en técnicas de injerto) que suministre material rejuvenecido para introducción, y 4) la imposibilidad, en aquel entonces, de cortar los árboles más para el manejo de rebrote de cepas pues se tenían programado los estudios de características de la madera y la evaluación de las tensiones de crecimiento de árboles en pie.

Dependiendo del árbol más, se observaron variaciones en la capacidad de rebrote de las ramas colectadas. Asimismo, se pudo observar en algunos casos, diferencias en función al diámetro de las ramas colectadas. Aunque no se hizo un seguimiento minucioso para determinar estas variaciones, se pudo observar que generalmente las ramas más gruesas tuvieron una mayor y más rápida respuesta. Sin embargo, con el método utilizado y cosechando en promedio unas 5 ramas por individuo, se pudo inducir rebrote en la mayoría de los árboles cosechados (70-80%).

Cuando los brotes epicórmicos alcanzaron una altura aproximada de 2-3 cm se cosecharon para ser introducidas "in vitro". Brotes de menor longitud pueden ser también utilizados pero con un rendimiento menor.

Aunque bajo este sistema se pueden realizar 2-3 periodos de cosecha de brotes, normalmente realizamos solo la primera cosecha, lo más rápido posible, pues mientras más tiempo de permanencia tengan las ramas en el invernáculo mayor será el problema de contaminación. La experiencia acumulada nos permite recomendar la utilización de los primeros brotes para un mejor resultado en la introducción del material.

Inicio del cultivo

Uno de los principales problemas a resolver, para iniciar el cultivo de tejidos, es el obtener un material libre de contaminación con capacidad regenerativa. La composición del medio del cultivo es muy rica en compuestos azucarados lo cual favorece el desarrollo de hongos y bacterias que puedan introducirse junto con el explante. El proceso de desinfección debe ser lo suficientemente intenso como para eliminar los contaminantes sin provocar daños irreversibles en el explante. Cuando el proceso es demasiado intenso, los tejidos se necrosan y aparecen en el medio exudados fenólicos (oxidación) que provocan la pérdida del material.

De acuerdo con la bibliografía y las experiencias propias en *E. grandis*, se puede afirmar que una de las claves, o mejor dicho la principal clave para obtener un explante introducido exitosamente *in vitro*, es el material original en sí. Aunque en muchos casos las técnicas de desinfección resuelven este problema, nada pueden hacer cuando el material donante es inadecuado o presenta problemas de contaminación interna, resultando en la dificultad de obtener cultivos libres de patógenos (Casells, 1991; 1997).

La desinfección de material adulto creciendo en el campo es por lo tanto muy difícil debido a la gran incidencia de contaminación microbiana endógena. La dificultad de iniciar la micropropagación de *E. grandis* a través del cultivo de brotes adultos y la situación de avance en la que se encontraba el programa de mejoramiento, derivaron en el uso de brotes epicórmicos inducidos en ramas adultas como material de introducción.

Diferentes métodos de desinfección fueron probados. Se ensayaron varios agentes desinfectantes, tales como etanol (70% v/v por 0.5-3 min.), hipoclorito de sodio (0.10-2.0% p/v de cloro activo por 3-10 min.), peróxido de hidrógeno (1-10% v/v por 5-15 min.) y cloruro de mercurio (0.05-0.3% p/v por 10-20 min.), en aplicación individual o combinada. Aunque los resultados obtenidos fueron muy variados, dependiendo del material vegetal, la tendencia mostró una relación

inversamente proporcional entre el porcentaje de contaminación y la cantidad de explantos oxidados. Es decir, que la dificultad de establecer un alto porcentaje de cultivos asépticos sin causar daños a los tejidos, fue evidente. Por los resultados obtenidos y considerando la facilidad de adquisición, costos y manipulación de los productos, recomendamos el uso del hipoclorito de sodio. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando una concentración de 0.25% p/v de cloro activo con tratamientos de 5-10 min. Mayor concentración o/y periodos de aplicación mas largos, aumentan considerablemente el porcentaje de oxidación en los explantos. Ensayos posteriores demostraron que la aplicación del ácido ascórbico (1% p/v) en los procesos de desinfección, tuvieron un efecto positivo en la disminución de la oxidación. Con este método se obtuvo un porcentaje de introducción de explantos de alrededor del 40%.

Multiplicación de brotes

Las Figuras 10, 11 y 12 muestran los resultados obtenidos en 7 árboles plus, luego de 1 mes de cultivo, del efecto del tipo de citokinina en: la frecuencia de multiplicación, la cantidad de brotes por explanto, y la longitud máxima de los brotes, respectivamente. Las frecuencias de multiplicación fluctuaron entre 70 y 100% tanto para el

tratamiento con BAP como para la Zeatina, y con excepción de los resultados obtenidos en los árboles 20 y H, donde la Zeatina resulto ligeramente superior, no se observaron diferencias entre los 2 tipos de citokinina.

Las mayores diferencias pudieron observarse al comparar el efecto en la cantidad de brotes por explanto. El tratamiento con Zeatina resulto en un mayor número de brotes por explanto en todos los arboles ensayados. Los rangos registrados para el tratamiento con BAP fluctuaron entre 1.00 y 2.11 brotes por explanto en promedio, mientras que para el tratamiento con Zeatina los rangos variaron de 1.88 a 3.60. Aunque en algunos arboles las diferencias no fueron muy notables, el promedio general registra un valor favorable para la Zeatina de 2.54 brotes por explanto versus 1.63 para el promedio en el tratamiento con BAP. (Figura 11).

En contraste, el tamaño máximo promedio de los brotes en el proceso de multiplicación fue ligeramente mayor con el BAP. (Figura 12).

A pesar de los resultados favorable obtenidos en la multiplicación de brotes utilizando Zeatina, es necesario considerar que el costo de esta citokinina es aproximadamente 130 veces mayor que el del BAP, por lo que su uso podría ser considerado no justificable del punto de vista económico.

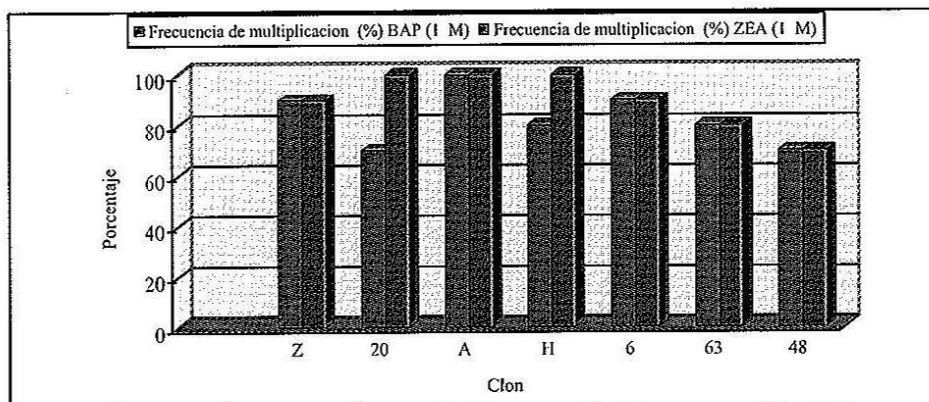


Figura 10. Efecto del tipo de citokinina en la frecuencia de multiplicación en *E. grandis*. La frecuencia de brote fue evaluada a los 30 días de cultivo. Los porcentajes fueron calculados a partir de 10 explantos por clon en cada tratamiento.

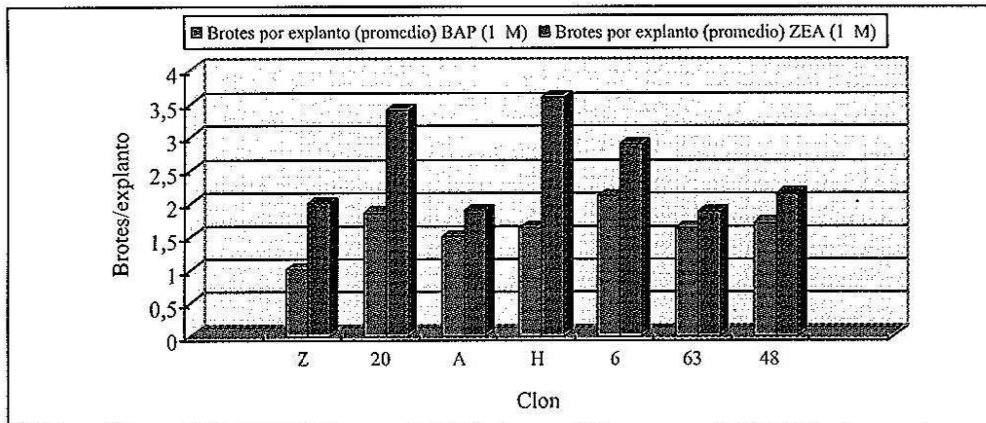


Figura 11. Efecto del tipo de citokinina en la cantidad de nuevos brotes por explanto en *E. grandis*. La cantidad de brotes (mayores a 3 mm) por explanto fue evaluada a los 30 días de cultivo. El promedio de brotes por explanto fue calculado a partir de 10 explantos por clon en cada tratamiento.

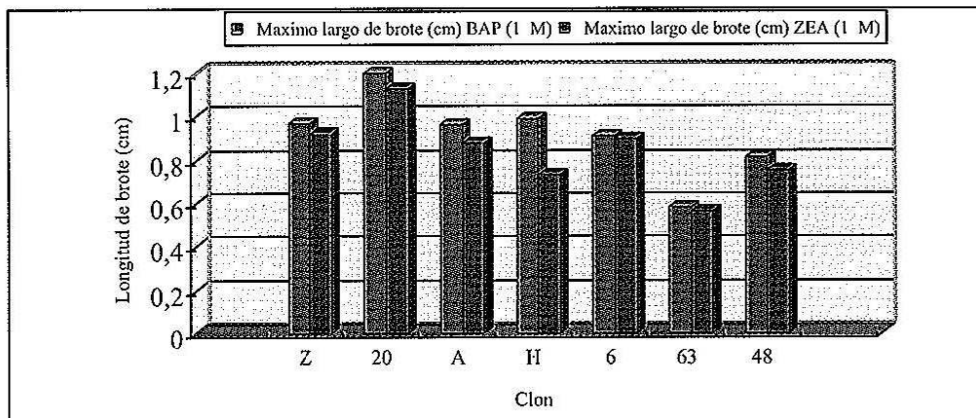


Figura 12. Efecto del tipo de citokinina en la longitud de brote en *E. grandis*. La longitud máxima de brote por explanto fue evaluada a los 30 días de cultivo. La longitud de brote promedio fue calculada a partir de 10 explantos por clon en cada tratamiento.

Elongación de brotes

La adecuada elongación de los brotes multiplicados es un factor importante en la frecuencia de enraizamiento. En el caso que el material este suficientemente rejuvenecido o si el explanto proviene de árboles muy jóvenes, la elongación ocurre sin dificultad.

Rutinariamente y por facilidad de manipuleo, los brotes múltiples (rosetas) obtenidos en la fase de multiplicación se separan en 4-6 fracciones mas pequeñas y se

transfieren al ME. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron al transferir los brotes individualmente, pero con un aumento considerable en las labores de manipuleo.

Generalmente los mejores resultados se registraron en la ME suplementado con bajos niveles de BAP (0.1 µM). Sin embargo para algunos clones, el mismo medio suplementado con una pequeña dosis de ANA (0.05-0.1 µM) tuvo buenos resultados. Contrariamente a lo reportado para algunas especies de *Eucalyptus* (Le Roux y Van Staden, 1991),

en nuestros experimentos el uso del ácido giberelico no tuvo mayor impacto en la elongación de brotes de *E. grandis*.

Generalmente, la elongación de los brotes ocurre con facilidad en los primeros periodos de subcultivo, dificultándose progresivamente a medida que aumenta el periodo en la fase de multiplicación. Aunque no se realizaron análisis al respecto, esta tendencia sugiere que la dificultad de elongación esta asociada a la alta acumulación de citokininas utilizadas continuamente en los procesos de multiplicación. En estos casos es recomendable transplantar los brotes a un ME libre de hormonas suplementado con carbón activado (0.2-1.5% p/v) por 1-2 periodos de subcultivo para reducir la acumulación de hormonas en el tejido. En algunos casos, con este tratamiento, se observo la elongación y subsecuente enraizamiento del brote.

Enraizamiento de brotes

En la Figura 13 se muestran los resultados del efecto del medio de cultivo (concentración de sales minerales y de AIB) en la frecuencia de enraizamiento de 7 clones de *E. grandis*. Después de 1 mes de cultivo, las diferencias en la frecuencia de enraizamiento entre clones fue notoria, fluctuando en rangos de 0 a 100%. En la mayoría de los casos, la adición de AIB en el medio incremento considerablemente la frecuencia rizogenica.

Las diferencias obtenidas en los medios suplementados con AIB muestran una ligera superioridad en el MR con sales minerales reducidas a la cuarta parte de la formulación original y conteniendo 0.5% (p/v) de sacarosa (1/4 WPM). El promedio general para todos los clones con el mejor tratamiento fue de 48.6% de enraizamiento. La máxima respuesta de enraizamiento fue obtenida con el clon 6 (100%), mientras que el clon 63 no formo raíces en ninguno de los tratamientos.

La emergencia de las primeras raíces se observo entre la primera y segunda semana de iniciado el tratamiento, desarrollándose rápidamente durante los siguientes días y sin la formación de callo. En otros ensayos realizados con concentraciones mayores de AIB y combinación de AIB con AIA (ácido indolacético) o ANA, la formación de raíces ocurrió vía formación de callo en la base del brote. En estos casos se recomienda reducir el tiempo de aplicación de tratamiento con auxinas (según la concentración, de 1-7 días) y transferir luego a medio libre de hormonas.

La formación de abundante callo durante la fase de enraizamiento es un síntoma de exceso de auxinas acumuladas en el tejido o en el medio. La presencia de callo en brotes enraizados no es recomendable, debido a que generalmente se desprende junto con las raíces en el momento del trasplante, dificultando la fase de aclimatación.

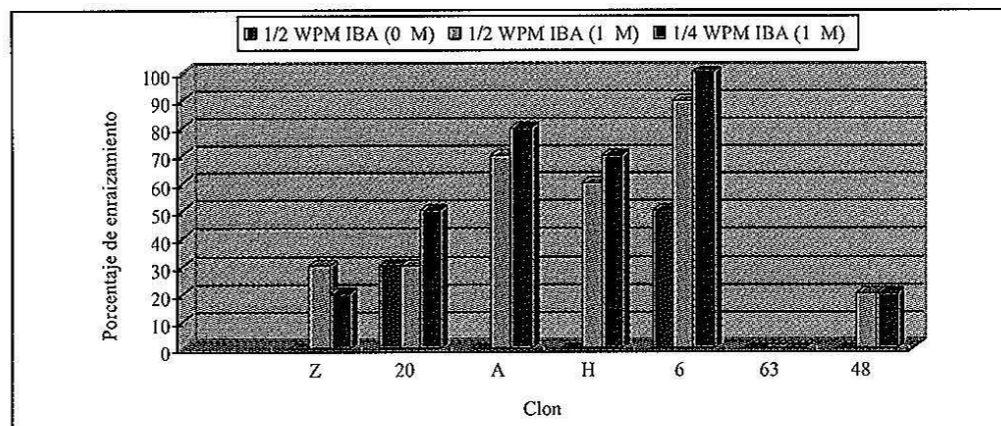


Figura 13. Efecto del medio de cultivo en la frecuencia de enraizamiento de brotes en *E. grandis*. La frecuencia de enraizamiento fue evaluada a los 30 días de cultivo. Los porcentajes fueron calculados a partir de 10 explantos por clon en cada tratamiento.

En busca de la optimización del proceso de enraizamiento y en base a citas bibliográficas (Aloísio Xavier y Joao Comério, 1997) se probó la eliminación de la etapa de enraizamiento *in vitro*. Esta alternativa sería ventajosa desde el punto de vista económico y de la calidad del sistema radicular pero en nuestro caso no se lograron resultados satisfactorios.

Aclimatación de plántulas

Las plantas micropropagadas son susceptibles al shock del trasplante. La transición entre las condiciones *in vitro*, con 100% de humedad relativa a un ambiente *ex vitro* donde la humedad es aproximadamente de 50% es crítico para las plantas. Para aumentar la supervivencia al trasplante se debe reducir la intensidad de luz, aumentar la concentración de anhídrido carbónico, mantener una alta humedad y una temperatura moderada.

Las plántulas de mas de 3 cm con un buen desarrollo radicular fueron transplantadas a tubetes con vermiculita y aclimatadas bajo las condiciones descritas anteriormente. Sin embargo, para obtener un mayor porcentaje de éxito, es conveniente en algunos casos, transplantar los brotes del MR cuando las primeras raíces emergen y alcanzan hasta aproximadamente los 10 mm de longitud (mayor tamaño dificulta el manipuleo) a un sustrato *in vitro* (vermiculita, rock wool, perlita, fibra de coco, etc.) irrigada con 0.1% (v/v) de fertilizante liquido (NPK 5-10-5) para su crecimiento previo a la aclimatación, con lo cual se disminuyen considerablemente los riesgos de daños y malformaciones en las raíces. En nuestro laboratorio, dependiendo del clon, se registraron rangos que fluctuaron entre el 80 y 100% de éxito en la aclimatación. Las plántulas aclimatadas se trasladaron y permanecieron en el invernáculo hasta su trasplante al campo. (Figura 14).



Figura 14. Plántula transplantada al campo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados de esta técnica son muy variables y dependen en gran medida del árbol que queremos clonar.

Al trabajar con árboles adultos que se encuentran creciendo en el campo es necesario extremar las medidas de desinfección del material vegetal con que se inicia el cultivo. Luego que se logra trabajar con material "limpio" son necesarios varios repiques sucesivos para que el material logre rejuvenecer lo suficiente como para poder originar un sistema radicular adecuado. Esta etapa de enraizamiento es en general la más difícil y dependiente del clon, existiendo clones que enraízan con mucha facilidad, otros que lo hacen con dificultad y otros que no enraízan.

El tener un protocolo lo más estandarizado posible nos permite avanzar rápidamente en aquellos clones que no presentan dificultad y diseñar estrategias alternativas para aquellos más recalcitrantes. Los resultados obtenidos hasta el momento nos han permitido instalar en el campo un jardín clonal integrado por 12 árboles superiores, el cual será ampliado con nuevos clones que se logren micropropagar. Este jardín clonal es manejado con el objetivo de formar pie madres para la obtención de estacas para realizar test clonales y liberar luego clones superiores al mercado. (Figura 15).



Figura 15. Pie madre manejado para la obtención de estacas.

BIBLIOGRAFÍA

- CASSELLS, A.C.** 1991. Problems in tissue culture: culture contamination. In: Micropropagation (Technology and Application), (eds. P. Debergh and R. Zimmerman). Pp. 31-44. Dordrech: Kluwer Academic Publishers.
- CASSELLS, A.C.** 1997. Pathogen and microbial contamination management in micropropagation-An overview. In: Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation, Developments in Plant Patology Vo. 12, (ed. A. Cassells). Pp. 1-13. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- DE FOSSARD, R.A.; NITSCH, C.; CRESSWELL, R.J and LEE E.C.M.** 1974. Tissue and organ culture of *Eucalyptus*. N.Z.J. For. Sci. 4: 2678-278.
- IKEMORI, Y.K.** 1987. Epicormics shoots from the branches of *Eucalyptus grandis* as an explant source for *in vitro* culture. Comm. For. Rev. 66: 351-355.
- LE ROUX, J.J. and VAN STADEN, J.** 1991. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus*- a review. Three Physiology 9: 435-477.
- LLOYD, G. And MCCOWN, B.** 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30: 421-427.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- XAVIER, A. and COMÉRIO, J.** 1997. Enraizamento "ex vitro" de gemas de *Eucalyptus spp.* Multiplicadas e alongadas "in vitro". Scientia Forestalis n 51. P. 29-36.

Impreso en los Talleres Gráficos de
Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L.
Montevideo - Uruguay

Edición Amparada al Decreto 218/98
Depósito Legal 324.788/02

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL NORTE
INIA-TACUAREMBÓ**

PROGRAMA NACIONAL FORESTAL

Ruta 5 km 386 Tacuarembó - URUGUAY

Tel: (+598-63) 22407 Int. 1348

Fax: (+598-63) 23969

Contactos: Zohra Bennadji: e-mail: zobenn@inia.org.uy

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA
DIRECCIÓN NACIONAL**

Andes 1365 Piso 12 - Montevideo - URUGUAY

Tel: (+598-2) 902 0545

Fax: (+598-2) 902 3633

Contactos: John Grierson: e-mail: jgrier@inia.org.uy