

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Eucalyptus grandis* HILL EX MAIDEN Y *Eucalyptus urophylla* S. T. BLAKE

**R. Martínez-Ruiz; H. S. Azpiroz-Rivero; J. L. Rodríguez de la O;
V. M. Cetina- Alcalá; M. A. Gutiérrez-Espinosa**

Colegio de Postgraduados. Instituto de Recursos Naturales: Programa Forestal. C. P. 56230.
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. C. P. 56230.
Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. C. P. 56230.

RESUMEN

Con el objetivo de inducir callo y formación de embriones somáticos en forma indirecta en explantes de hoja de eucalipto se utilizó el medio de cultivo Gamborg B5 con concentraciones de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) a 0.0, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mg·L⁻¹ y Thidiazuron (TDZ) a 0.0, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mg·L⁻¹, los cuales produjeron callos. Posteriormente los callos y formaciones embrionarias fueron transferidos para su subcultivo a otros medios con diferentes concentraciones de: glutamina (0.0, 50, 150 y 250 mg·L⁻¹), l-prolina (0.0, 100, 200 y 300 mg·L⁻¹), nitratos (al 25, 50, y 75 %), caseína hidrolizada, (100 y 200 mg·L⁻¹), kinetina (0.1 y 2.0 mg·L⁻¹), ácido indolacético (AIA) a 0.1 mg·L⁻¹ y ácido giberélico (GA₃) a 1.0 mg·L⁻¹. La diferenciación de estructuras globulares o proembriones fue cuantificada utilizando un microscopio estereoscópico WILD TYPE 38700 Heerbrugg, Switzerland, con un lente Plan 1X y 10X21. Se cuantificó su frecuencia de aparición en los callos asignándoles un porcentaje de valor observable. La obtención de estructuras embrionarias se obtuvieron en el medio Gamborg B5 complementado con Thidiazuron a 0.1 mg·L⁻¹ en medio sólido.

PALABRAS CLAVE: eucalipto, *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla*, embriogénesis, propagación *in vitro*.

SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *Eucalyptus grandis* HILL EX MAIDEN AND *Eucalyptus urophylla* S. T. BLAKE

SUMMARY

Eucalyptus leaf explants were used to induce callus and embryos. Gamborg B5 culture medium was used with different concentrations of dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 0.0, 0.1, 0.3, 1.0 and 3.0 mg·L⁻¹ and Thidiazuron (TDZ) 0.0, 0.1, 0.3, 1.0 and 3.0 mg·L⁻¹ which produced calluses. Thereafter the calluses were subcultured to other medium with different concentrations of glutamine (0.0, 50, 150 and 250 mg·L⁻¹), l-proline (0.0, 100, 200 and 300 mg·L⁻¹), nitrates (at 25, 50, and 75 %), hydrolyzed casein, (100 and 200 mg·L⁻¹), kinetin (0.1 and 2.0 mg·L⁻¹), indolacetic acid (AIA) at 0.1 mg·L⁻¹ and giberelic acid (GA₃) at 1.0 mg·L⁻¹. Differentiation of globular structures or proembryos was assessed using a microscopic stereoscopic WILD TYPE 38700 Heerbrugg, Switzerland with plan lens 1X and 10X21 Frequency on calluses appearance was also evaluated. Embryos structure were obtained on Gamborg B5 medium supplemented with thidiazuron at 0.1 mg·L⁻¹ on solid medium.

KEY WORDS: *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla*, embryogenesis, *in vitro* propagation.

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática asexual o adventicia, consiste en el desarrollo *in vitro* de embriones a partir del cultivo de células que no son el producto de una fusión gamética. Se pueden obtener embriones somáticos de muy diversas partes de la planta, así podemos utilizar como explantes: ápices radicales y caulinares, hipocótilos, pecíolos, pedúnculos, hojas jóvenes y en general tejidos y órganos con características embrionarias, meristemáticas,

reproductivas (embriones e inflorescencias inmaduras, trozos de escutelo, nucela, óvulos, tejido ovárico y endospermo) (Sánchez, 2000).

Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*: directa e indirecta. La forma directa implica la existencia de células somáticas predeterminadas a seguir la vía embriogénica y las células del explante primario se desarrollan para formar embriones (Smith y Wood, 1998).

La forma indirecta implica la necesidad de una inducción para que las células sigan la vía embriogénica, tras pasar por una fase proliferativa (callo) y cambiar su competencia a la expresión de embriogénesis (Agúndez *et al.*, 1999). La embriogénesis somática como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas frente a otros sistemas; una enorme capacidad de multiplicación aplicable a la industria, es la que se produce a nivel de biorreactores, que permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, y que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente por un largo periodo (Rajora, 1999).

Sin embargo, presentan una serie de problemas, produciéndose anomalías morfológicas, fisiológicas y genéticas en los cultivos, fenómenos de poliembrionía indeseables, falta de maduración y dormancia o germinación prematura de los embriones en cultivo (Agúndez *et al.*, 1999). Todos estos conocimientos tienen su aplicación en propagación y mejora de plantas, en saneamiento de enfermedades e intercambio y/o conservación de germoplasma y en ingeniería genética y selección de especímenes transformados (Haggman *et al.*, 1999).

La generación de plantas vía embriogénesis se ha efectuado principalmente utilizando: secciones de tallo, ápices, meristemos, eje embrionario, tejido nucelar, callo, pecíolos y cotiledones (Agúndez *et al.*, 1999). La formación de estructuras embriogénicas y la conversión posterior de brotes y de las raíces está determinado por características propias del inóculo (la fuente de éste, la edad, el tamaño, la orientación, la época de colecta y el genotipo), componentes químicos y físicos del medio de cultivo (sales, fuentes de carbono, reguladores del crecimiento, estado sólido o líquido, presión osmótica y otros) y las condiciones de incubación (luz, oscuridad, temperatura) (Castro, 1998), la diferenciación depende de la interacción cuantitativa entre auxinas y citocininas: predominancia de auxinas estimula formación de raíces; predominancia de citocininas estimula la brotación (Agúndez *et al.*, 1999).

Los factores que afectan la regeneración vía embriogénesis son:

Componentes del medio de cultivo. Los compuestos químicos más importantes para el desarrollo de embriones somáticos son las auxinas y las fuentes de nitrógeno; una relación alta entre nitratos y auxinas es importante para la inducción de callo; una vez que esto ocurre, las auxinas restringen severamente el desarrollo de células embriogénicas. El nitrógeno es adecuado, pero éste es superado por las formas orgánicas (Bueno *et al.*, 1992).

Aloísio (1997), señaló que para la iniciación de callo embriogénico, un elemento esencial es el hierro y las sales del medio MS al 50 %, así como concentraciones de 2,4-D

hasta de 5 mg·L⁻¹ y niveles de sacarosa de 4 a 6 %. Para inducir embriogénesis la auxina debe retirarse y la sacarosa reducirse de 2 a 3 %. La maduración y germinación de los embriones son favorecidos por las citocininas.

Factores físicos. Para la inducción de callo, las condiciones de oscuridad son preferibles. La capacidad embriogénica disminuye cuando los subcultivos son más espaciados; es decir, el tiempo que tarda en volver a sembrarse un explante en medio de cultivo nuevo. En medios líquidos, el tipo de recipientes ejercen efectos significativos, obteniéndose embriones normales cuando hay mayor espacio para la aireación, al igual que cuando se agita vigorosamente (Gómez *et al.*, 1999).

En ocasiones es necesario dar tratamientos de frío al inóculo antes de iniciar la formación de callo; situación particularmente válida cuando se hacen cultivos de anteras. En aquellas especies cuyas semillas requieren de frío para germinar en la propagación convencional, los embriones somáticos obtenidos *in vitro* también pueden requerir de tratamientos de frío para desarrollar las plántulas (Ahuja, 1993; Filonova *et al.*, 2000).

El cultivo *in vitro* presenta en nuestros días, una gran expansión y ha desarrollado nuevos procedimientos en los últimos años. Su utilización se ha extendido a los diversos aspectos del quehacer botánico y es más, se ha hecho necesaria su utilización. Gracias a este método las investigaciones en fisiología y genética vegetal han avanzado a pasos agigantados (Smith y Wood, 1998).

De las plantas que se han introducido en México; las especies del género *Eucalyptus*; han demostrado una gran adaptación a las muy variadas condiciones de suelo y clima de nuestro país, teniendo en cuenta que estas plantas son originarias de Australia y Tasmania, las cuales han observado incluso sus características naturales de desarrollo y, en la mayoría de los casos, las han mejorado. Las diferentes especies de eucalipto aclimatados en nuestro territorio, ofrecen una amplia gama de productos tales como: leña, postes, aceites esenciales, madera aserrada, pasta celulósica, carbón, chapas, taninos, plantaciones para barreras cortavientos, cinturones de protección, conservación de cuencas, conservación y protección de suelos (Inoue *et al.*, 1999; Castro, 1998).

La habilidad para regenerar árboles completos a partir de cultivo *in vitro* de células, protoplastos y tejidos, es requerimiento necesario que debe estudiarse y establecerse en forma anticipada para el mejoramiento genético, por lo cual el objetivo de este trabajo es lograr la embriogénesis somática a partir de explantes de hojas de *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus urophylla* especies adaptadas a condiciones tropicales en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo, México. Las plantas de seis meses de edad utilizadas para la obtención de material vegetativo de eucalipto -fueron propagadas asexualmente-. Estas plantas de vivero fueron proporcionadas por la compañía Planfosur, S. A. de C. V., ahora Forestaciones Operativas de México S. A. de C. V., ubicada en las Choapas, Veracruz. Los árboles están mejorados genéticamente para la realización de las plantaciones forestales comerciales de eucalipto de la empresa, éstos presentan características de buen crecimiento y adaptabilidad a la región.

Establecimiento del cultivo aséptico

A las plantas de eucalipto, se les aplicó el fungicida sistémico (Cuprimicin®)¹ 1.0 g·L⁻¹ quince días antes de obtener secciones de tallo con hojas, las cuales se desinfectaron en una solución de agua con detergente comercial Roma® 1.0 g·L⁻¹, se enjuagaron con agua esterilizada. En la cámara de flujo laminar el proceso de desinfección constó de someter a los explantes a siete minutos en agua oxigenada al 10 %, posteriormente 10 minutos en hipoclorito de sodio al 10 %, enjuagando perfectamente con agua esterilizada con antioxidantes (ácido ascórbico 100 mg·L⁻¹ y ácido cítrico 150 mg·L⁻¹). Se mantuvieron en solución antioxidante en un vaso de precipitado aproximadamente 10 minutos, hasta el momento de la siembra.

Antes de la siembra, el material de laboratorio se esterilizó en autoclave durante 40 minutos a una temperatura de 121 °C y 1 kg·cm⁻² de presión. La cámara de flujo laminar se limpió con alcohol al 70 %, así como todo el material utilizado en la desinfección y siembra del material vegetativo.

Siembra *in vitro*

Se cortaron segmentos de hojas que incluyeran parte del pecíolo, sembrando cinco segmentos en cada frasco de 60 x 55 mm con 25 ml de medio de cultivo. Se taparon con tapones de polipropileno y se sellaron con parafilm.

Durante el desarrollo del establecimiento del cultivo aséptico, el material *in vitro* se mantuvo en el cuarto de incubación del laboratorio de cultivo de tejidos bajo un ambiente controlado. La iluminación fue proporcionada por lámparas fluorescentes DURO-TEST, con un termoperíodo

promedio de 26 °C durante el día y de 22 a 24 °C durante la noche, sometiendo los explantes a un fotoperíodo de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad (con una intensidad luminosa de 54 $\mu\text{m m}^2 \text{s}^{-1}$).

Embriogénesis somática

Se presentan las metodologías que se emplearon en el estudio de embriogénesis somática para las dos especies de acuerdo a los resultados obtenidos.

Para la inducción de embriones en forma indirecta a partir del cultivo de callos en medios de forma líquida y sólida, se tomaron callos obtenidos a partir de segmentos de hoja con un peso fresco aproximado de 500 mg para cada unidad experimental. Para medio líquido se colocaron los frascos en un equipo LAB-LINE Shaker Melrose Park ILL. No. 03590 orbit empleando una velocidad de agitación de 80 rpm.

Los cultivos en agitación se mantuvieron por 45 días a intensidad luminosa de 20 $\text{mm m}^2 \text{s}^{-1}$ y ocho horas de oscuridad. Las variables observadas fueron color de callos, peso fresco, formación de estructuras globulares, oxidación y embriones completos para cada tratamiento.

La embriogénesis somática se evaluó en dos partes: a) formación de embriones y b) la germinación de los embriones.

a) Formación de embriones

Se utilizó como medio básico GAMBORG B5 (Berjak, 1999) con Thidiazuron (TDZ)² y como fuente de auxinas al ácido 2,4-D diclorofenol acético (2,4-D) con concentraciones de 0.0, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mg·L⁻¹ en cada caso (Cuadro 1). Se ajustó a un pH de 5.7 \pm 0.1 complementado con 0.4 mg·L⁻¹ de tiamina, 1.0 mg·L⁻¹ de ácido nicotínico, 1.0 mg·L⁻¹ de piridoxina, 100 mg·L⁻¹ de mio inositol, sacarosa al 3 %, ácido cítrico 100 mg·L⁻¹ y ácido ascórbico 150 mg·L⁻¹. Todos los experimentos llevaron esta concentración de antioxidantes tanto en medio sólido como en líquido.

CUADRO 1. Concentraciones de thidiazuron (TDZ) y 2,4-D diclorofenol acético (2-4 D) empleados en la fase de formación de embriones.

Factores	Niveles mg·L ⁻¹
TDZ	0.0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0
2,4-D	0.0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0

¹Cuprimicin 100. sulfato estreptomycin 18.75 % y clorhidrato de oxitetraciclina 2 %. Formulado por Bravo Agroquímicos (Ing. Industrial S. A. de C. V.)

²TDZ. Shering SA. Berlin. Urea sustituta (N- phenyl-N'-1,2,3-thiazol-5-ylurea)

En esta etapa se utilizó un diseño experimental completamente al azar con una distribución factorial completa (5 x 5) con 25 tratamientos y 10 repeticiones, dando un total de 250 unidades experimentales.

Las variables a evaluar fueron la formación de callo (FC) mediante el peso fresco del callo formado en gramos y formaciones globulares o proembrionarias.

Para determinar el efecto de la combinación de reguladores de crecimiento, se realizó un análisis de varianza en un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Se usó la prueba de Tukey con una significancia de $P=0.05$ para la comparación de medias. Se utilizó la transformación de la raíz cuadrada para las variables donde se tuvieron valores de cero.

El modelo estadístico empleado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \xi_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Valor de la variable respuesta del uso del i-ésimo nivel de concentración de thidiazuron y el j-ésimo nivel de concentración de 2,4-D, en la k-ésima repetición.

μ = Media general.

A_i = Efecto del i-ésimo nivel de concentración de thidiazuron.

B_j = Efecto del j-ésimo nivel de concentración de ácido 2,4-D.

$(AB)_{ij}$ = Interacción del i-ésimo nivel del factor thidiazuron y el j-ésimo nivel del factor 2,4-D.

ξ_{ijk} = Error experimental.

b) Germinación de embriones

Los callos y las formaciones proembrionarias se utilizaron para montar los diferentes experimentos que, consistieron en tomar las mejores masas de células y las mejores formaciones globulares sometiéndolos a los cuatro diferentes experimentos (Cuadro 2, 3, 4 y 5) que son los siguientes:

1. En el primer experimento se utilizó un Medio MS complementado con caseína hidrolizada $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiamina, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido nicotínico, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de piridoxina, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mio inositol, sacarosa al 3 % y se evaluaron los dos factores siguientes:

CUADRO 2. Factores y niveles utilizados en el ensayo factorial para germinación de embriones de *Eucalyptus* utilizando diferentes aminoácidos.

Factores	Niveles ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Glutamina	0, 50, 150, 250
I-Prolina	0, 100, 200, 300

En esta etapa se utilizó un diseño experimental completamente al azar con una distribución factorial completa (4 x 4) con 16 tratamientos y 10 repeticiones, dando un total de 160 unidades experimentales, 80 para medio líquido y 80 para medio sólido. La variable a evaluar fue la germinación de embriones.

Para determinar el efecto de la combinación de reguladores de crecimiento, se realizó un análisis de varianza en un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Se usó la prueba de Tukey con una significancia de $P=0.05$ para la comparación de medias. Se utilizó la transformación de la raíz cuadrada para las variables donde se tuvieron valores de cero.

El modelo estadístico empleado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \xi_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Valor de la variable respuesta del uso del i-ésimo nivel de concentración de glutamina y el j-ésimo nivel de concentración de I-prolina, en la k-ésima repetición.

μ = Media general.

A_i = Efecto del i-ésimo nivel de concentración de glutamina.

B_j = Efecto del j-ésimo nivel de concentración de ácido I-prolina.

$(AB)_{ij}$ = Interacción del i-ésimo nivel del factor glutamina. y el j-ésimo nivel del factor I-prolina.

ξ_{ijk} = Error experimental.

2. En esta segunda etapa se utilizaron cuatro diferentes medios MS (al 50 % y 100 %) complementado con vitaminas y reguladores de crecimiento para evaluar la formación y germinación de embriones (Cuadro 3).

En esta etapa se utilizó un diseño experimental completamente al azar en los cuatro tratamientos con 20 repeticiones, dando un total de 80 unidades experimentales.

CUADRO 3. Medios con diferente concentración del medio MS para la germinación de embriones de eucalipto.

Medio A 50 %	Medio B 100 %	Medio C 50 %	Medio D 100 %
Tiamina 100 mg·L ⁻¹		Tiamina 100 mg·L ⁻¹	
Mio inositol 100 mg·L ⁻¹		Mio inositol 100 mg·L ⁻¹	
Ac. Nicotínico 1.0 mg·L ⁻¹		Ac. Nicotínico 1.0 mg·L ⁻¹	
Piridoxina 1.0 mg·L ⁻¹		Piridoxina 1.0 mg·L ⁻¹	
Caseína hidrolizada 200 mg·L ⁻¹		Caseína hidrolizada 100 mg·L ⁻¹	
Kinetina 2,0 mg·L ⁻¹		Kinetina 0.1 mg·L ⁻¹	
		Giberelinas 1.0 mg·L ⁻¹	
		AIA 0.1 mg·L ⁻¹	

3. El medio utilizado para esta etapa fue Gamborg B5 complementado con 0.4 mg·L⁻¹ de tiamina, 1.0 mg·L⁻¹ de ac. nicotínico, 1.0 mg·L⁻¹ de piridoxina, 100 mg·L⁻¹ de mio inositol y sacarosa al 3 % más diferentes concentraciones de nitratos que son los siguientes:

CUADRO 4. Medios con diferentes concentraciones de nitrato de potasio (KNO₃) y de nitrato de amonio (NH₄NO₃) para la germinación de embriones.

Medio I	Medio II	Medio III	Medio IV
NH ₄ NO ₃ (25 %)	NH ₄ NO ₃ (25 %)	NH ₄ NO ₃ (50 %)	NH ₄ NO ₃ (50 %)
KNO ₃ (75 %)	KNO ₃ (50 %)	KNO ₃ (50 %)	KNO ₃ (75 %)

En esta etapa se utilizó un diseño experimental completamente al azar en los cuatro tratamientos y 20 repeticiones, dando un total de 80 unidades experimentales.

4. El medio de cultivo fue un MS + 0.4 mg·L⁻¹ de tiamina, 1.0 mg·L⁻¹ de ácido nicotínico, 1.0 mg·L⁻¹ de piridoxina, 100 mg·L⁻¹ de mio inositol y sacarosa al 3 % y se evaluaron los dos factores siguientes:

CUADRO 5. Factores y niveles utilizados en el ensayo factorial para germinación de embriones de eucalipto.

Factores	Niveles (%)
Sorbitol	0.0 2.0 4.0 6.0
Manitol	0.0 2.0 4.0 6.0

En esta etapa se utilizó un diseño experimental completamente al azar con una distribución factorial completa (4 x 4) con 16 tratamientos y 10 repeticiones, dando un total de 160 unidades experimentales. La variable a evaluar fue la germinación de embriones.

Para determinar el efecto de la combinación de reguladores de crecimiento, se realizó un análisis de varianza en un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Se utilizó la prueba de Tukey con una significancia de $P=0.05$ para la comparación de medias. Se utilizó la transformación de la raíz cuadrada para las variables donde se tuvieron valores de cero.

El modelo estadístico empleado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \xi_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Valor de la variable respuesta del uso del i-ésimo nivel de concentración de sorbitol y el j-ésimo nivel de concentración de manitol, en la k-ésima repetición.

μ = Media general.

A_i = Efecto del i-ésimo nivel concentración de sorbitol.

B_j = Efecto del j-ésimo nivel concentración de ácido manitol.

$(AB)_{ij}$ = Interacción del i-ésimo nivel de sorbitol y el j-ésimo nivel de manitol.

ξ_{ijk} = Error experimental.

En todas los experimentos se realizaron de 10 a 20 repeticiones por tratamiento, como variables las frecuencias observables de formación de estructuras proembrionarias de tipo globular, necrosamiento (oxidación) y de germinación de embriones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A) Formaciones proembrionarias

Diversas investigaciones han sido dirigidas hacia el estudio de los factores que controlan la capacidad de células y tejidos para regenerar plantas *in vitro*, como requerimiento previo a la aplicación de cualquier técnica biotecnológica. En el mejoramiento genético del género *Eucalyptus* se han venido explorando diversas técnicas de tipo biotecnológico. Entre ellas, se destacan las de micropropagación, estudio de diferentes reguladores de crecimiento en la etapa de enraizamiento para planta *in vitro* y estudios de caracterización molecular.

En el desarrollo de la embriogénesis, el mantenimiento, la madurez y el tamaño de los embriones somáticos desarrollados *in vitro*, son aspectos importantes que influyen en la germinación hasta obtener plantas completas.

Con base en el análisis de varianza (SAS, 1992) se encontró que hay diferencias estadísticamente significativas entre los factores evaluados individualmente 2,4-D y thidiazuron pero no así para su interacción. La concentración de 0.1 mg·L⁻¹ de TDZ fue la que presentó un número mayor de embriones y mayor peso fresco en callos (Cuadro 6 y 7).

CUADRO 6. Análisis de varianza para la comparación de cinco niveles de TDZ y 2,4-D a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.

Factores	Modelo General	TDZ	2,4-D	Interacción
F calculada	1.34	4.65	4.91	2.25
Pr > F	0.0939 NS	0.0107 *	0.0117 *	0.0826 NS
Alpha = 0.05				

NS: no significativo

*Estadísticamente significativo

CUADRO 7. Efecto de cinco niveles de TDZ sobre la cantidad de callo y número de embriones a los 45 días de incubación.

Tratamientos con thidiazuron (mg)	Callo Fresco (g)	Número de Embriones
0.0	0.1 b	1.0 c
0.1	2.5 a	10 a
0.3	0.1 b	1.0 c
1.0	0.8 b	3.0 b
3.0	0.1 b	4.0 b

Valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05)

De manera general se puede observar en el Cuadro 6 y en la Figura 1 la importancia del manejo de estos dos elementos para la formación de raíces y embriones. La concentración más favorable para la obtención de callo y formaciones proembrionarias para multiplicación del eucalipto es el tratamiento con 0.1 mg·L⁻¹ de TDZ y para la obtención de raíces 1.0 mg·L⁻¹ de 2,4-D (Cuadro 7 y 8).

CUADRO 8. Efecto de cinco niveles de 2,4-D sobre el número de raíces a los 45 días de incubación.

Tratamientos con 2,4-D (mg)	Número de Raíces
0.0	0.0 c
0.1	1.0 b
0.3	2.0 b
1.0	5.0 a
3.0	1.0 b

Valores con la misma letra en sentido vertical son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05)

Embriogenesis somática...

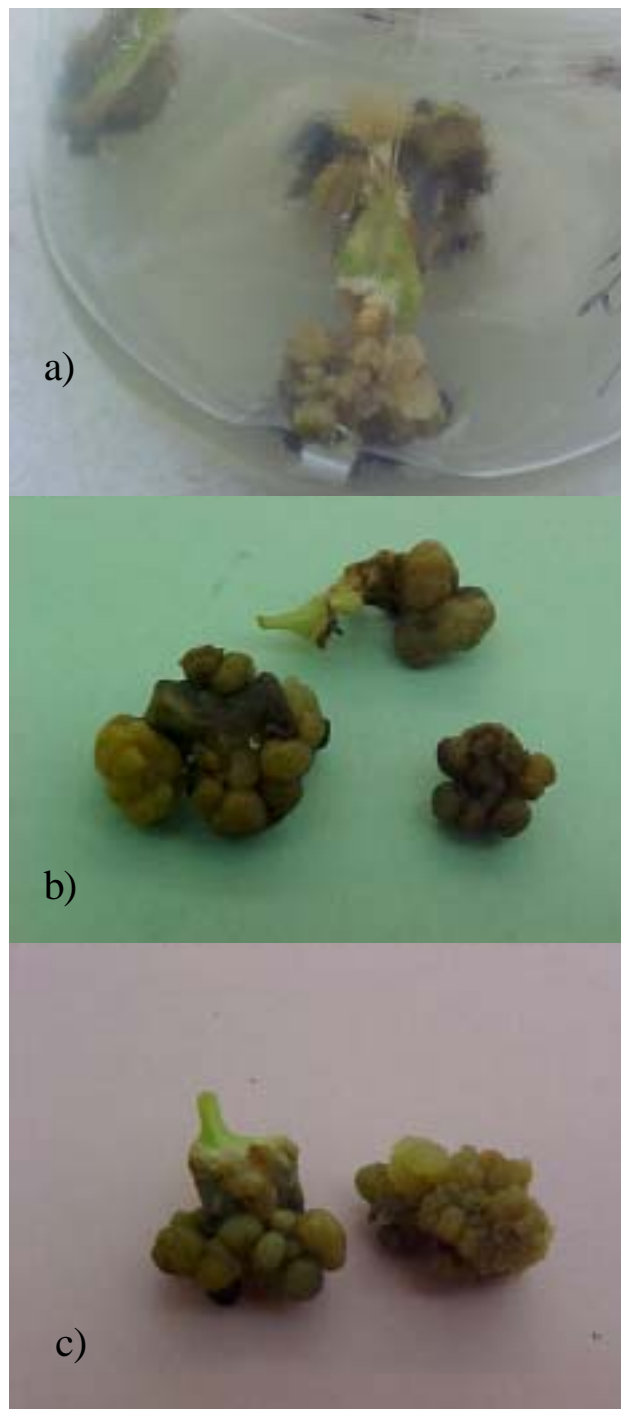


FIGURA 1. Embriogénesis somática. a) Siembra *in vitro* de segmentos de hojas, b) y c) Formaciones globulares proembrionarias en hojas.

B) Germinación de embriones somáticos

Efecto de la interacción de aminoácidos para la germinación y formación de embriones de eucalipto

El análisis de varianza mostró que no hubo un efecto significativo de la concentración del medio MS, y tampoco

se encontró efecto de la glutamina y l-prolina en el medio ni en la interacción de estos factores sobre el número de embriones germinados (Cuadro 9).

CUADRO 9. Análisis de varianza para la comparación de cuatro niveles de glutamina y l-prolina a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.

Factores	Modelo General	Glutamina	L-Prolina	Interacción
F calculada	1.34	1.45	1.91	1.25
Pr > F	0.0939 NS	0.0897 NS	0.0817 NS	0.0912 NS
Alpha = 0.05				

NS: no significativo

*Estadísticamente significativo

La realización de este ensayo fue en un medio MS al 100 % con agar (sólido) y sin agar (líquido). En el medio sin agar no se obtuvo ninguna respuesta para las variables evaluadas, pudo haberse debido al control de las temperaturas ya que en las mesas rotatorias del laboratorio no se cuenta con el equipo necesario para controlar la temperatura; según Frampton *et al.*, (1998) para inducir a estructuras bipolares en mesas rotatorias es necesario mantener la temperatura constante a 27 °C.

Los callos de eucaliptos obtenidos con combinaciones de los dos aminoácidos subcultivados con un medio MS mantuvieron respuestas homogéneas para diferenciar estructuras embriogénicas durante el mayor tiempo del experimento.

Los callos subcultivados de eucaliptos evaluados utilizando los medios de cultivo con aminoácidos después de siete semanas de cultivo presentaron fuertes niveles de oxidación, lo anterior corrobora lo reportado por Villar *et al.* (1999) y Diez y Gil (1999), con relación a los periodos largos en los que pueden exponer los tejidos o las células a la acción del 2,4-D, cuyos efectos subsecuentes pueden a la larga limitar las respuestas embriogénicas.

Los diferentes niveles de glutamina conjuntamente con l-prolina y el resto de las sales MS al 100 % después de 45 días de cultivo no estimularon la formación ni germinaciones en cultivo *in vitro* de callos de las especies de eucaliptos experimentados.

De acuerdo con el análisis estadístico realizado evaluando por otra parte, tanto el crecimiento de callos, germinación de embriones y los niveles de oxidación, únicamente destacó el medio con glutamina a 0.1 mg·L⁻¹ y l-prolina 1.0 mg·L⁻¹ que mostró importantes diferencias en cuanto al crecimiento de callos y permanencia del color verde de los embriones.

Los tratamientos de glutamina como factor independiente en callos de eucaliptos tampoco influyeron

para promover la formación de embriones en los callos subcultivados. El crecimiento de callos los niveles de oxidación fueron menores a los observados en los otros materiales experimentados.

El cultivo de células en suspensión de eucalipto desarrolló respuestas embriogénicas en crecimiento hasta 30 %, cuando se emplearon callos de estructura compacta en los 16 tratamientos. Los demás tipos de callos sembrados friables verdes y amarillentos no tuvieron ningún incremento en peso.

Efecto de la concentración de medio MS y Reguladores de crecimiento para la germinación y formación de embriones

Las mejores respuestas observadas en la formación de raíces y tallos (germinación) se obtuvieron a las cuatro semanas de sembrados los embriones. Los embriones de 5 a 6 mm de diámetro sembrados en el medio con las sales MS y complementado con las vitaminas normales, kinetina, GA₃ y AIA fueron los embriones que se mantuvieron como estructuras verdes pero sin lograr su germinación.

En algunos casos la obtención de plantas completas a través de estos esquemas ha sido un factor crítico aun cuando se tenga la reproducción de gran número de embriones somáticos, pues se han encontrado bajos porcentajes de conversión haciendo muy difícil y prácticamente nula la recuperación de plantas.

Las sales inorgánicas MS, diluidas al 50 % con la incorporación de 2.0 mg·L⁻¹ de kinetina promovió la formación de callos en los embriones cultivados *in vitro*. Esto coincide con lo reportado por Inoue *et al.*, (1999) quienes mencionan que la utilización de los niveles elevados de citocininas o de auxinas promueven el establecimiento de callos en muchos de los explantes cultivados *in vitro*.

Una producción continua de embriones como se puede apreciar en la Figura 1, se explica desde el punto de vista del número de divisiones mitóticas que en forma repetida se pueden presentar en las células individuales, generalmente localizadas sobre la superficie de los tejidos potencialmente embriogénicos. Las células que son destinadas a originar embriones pueden caracterizarse por la densidad de su citoplasmas, grandes núcleos y con contenidos elevados de plastidios de almidón. Las características y la habilidad de la conversión de embriones a plantas, incluye la participación de diversos factores como sistemas de cultivo, genotipos, balances de reguladores de crecimiento y sobre todo influencia del control genético, ya que hay investigaciones recientes que demuestran que en el desarrollo de embriones somáticos y su germinación existe un control con base genética que evidencia la formación de embriones.

Efecto de nitratos en el desarrollo *in vitro* de embriones de eucaliptos

Desde el punto de vista del mejoramiento genético las plantas resultantes de la embriogénesis somática obtenida a partir de hoja se pueden salvar barreras sexuales de hibridación. En callos, los embriones somáticos pueden derivarse de manera indirecta a partir de células embriogénicas, promoviendo divisiones mitóticas repetidas de las células periféricas de masas celulares. Se ha reportado que los nitratos son importantes para lograr la diferenciación de las células (Diez y Gil, 1999).

Aun cuando existen callos con excelente habilidad para formar embriones, existen algunas limitantes que contrarrestan la posibilidad de su explotación, debido a que en los eucaliptos las células bajo cultivo *in vitro* pueden estar expuestas a niveles de amonio (NH₄) y nitratos (NO₃) que pueden en algunos casos resultar tóxicos. Las respuestas para promover la formación de estructuras embriogénicas de callos en las dos especies, fueron escasamente promovidas después de que estos fueron obtenidos *in vitro*.

Efecto del sorbitol y manitol en el desarrollo *in vitro* de embriones de eucaliptos

Los callos cultivados en el medio MS al 100 % con la adición de sorbitol y manitol no propició la diferencia de estructuras de tipo embriogénica y únicamente se mantuvieron viables por más tiempo en comparación con los otros medios ensayados (Cuadro 10).

CUADRO 10. Análisis de varianza para la comparación de cinco niveles de sorbitol y manitol a los 45 días de incubación. Prueba de Tukey.

Factores	Modelo general	Sb	Mn	Interacción
F calculada	1.34	1.41	1.31	1.46
Pr > F	0.0939 ^{NS}	0.0841 ^{NS}	0.0934 ^{NS}	0.0863 ^{NS}
Alpha = 0.05				

^{NS}: no significativo
*estadísticamente significativo

Los estudios histológicos confirmaron lo expuesto, aunque fue posible apreciar la existencia de otras estructuras. El porcentaje de explantes con embriones somáticos viables a los 45 días de sembrados fue mayor en los medios que contenía 2.0 mg·L⁻¹ de sorbitol y 4.0 mg·L⁻¹ de manitol (Figura 2).

Los embriones somáticos fueron subcultivados separadamente con el enriquecimiento del medio de diferentes concentraciones de sorbitol y manitol con el fin de inducir a germinación. Se apreciaron embriones

individuales muertos después del subcultivo en medios que no contenían estos elementos, a diferencia de lo que ocurría con los embriones somáticos en los otros tratamientos donde los embriones permanecían viables (Figura 3).

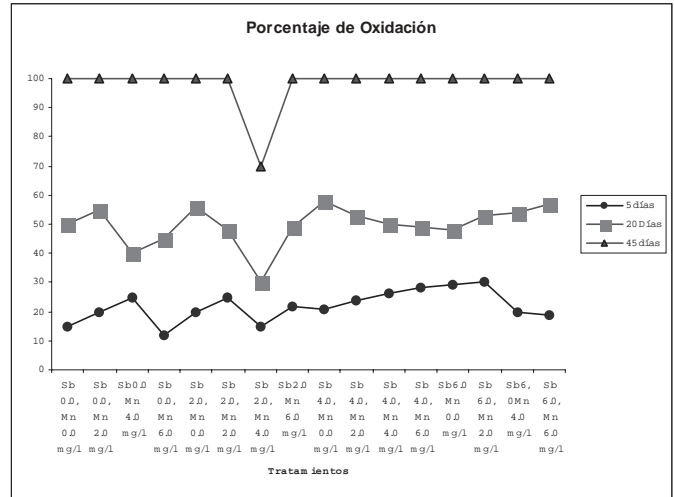


FIGURA 2. Efecto de la combinación de tratamientos con sorbitol (Sb) y manitol (Mn) sobre la formación de raíces a los 45 días de incubación.

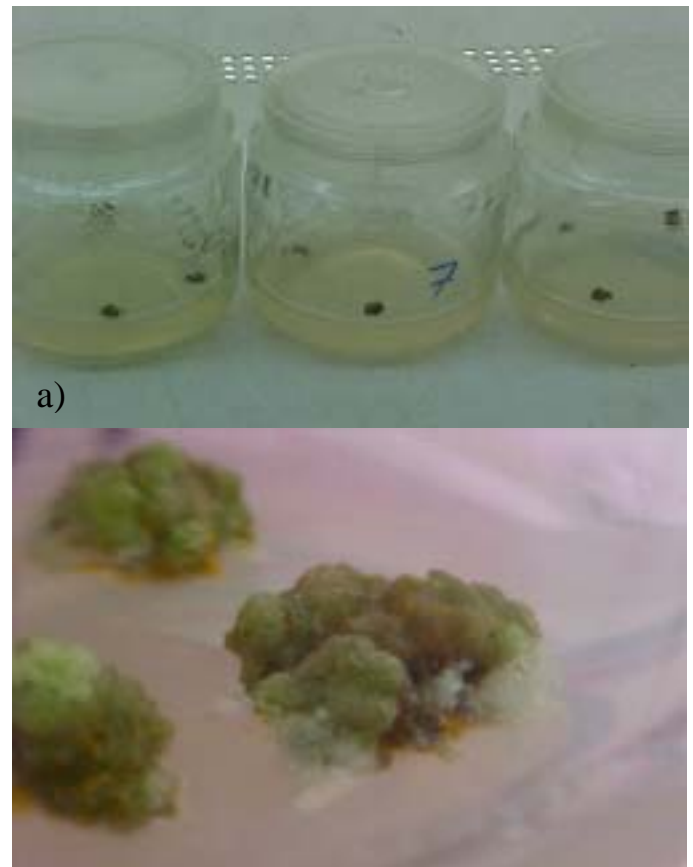


FIGURA 3. Embriogénesis somática. a) Siembra de embriones b) Siembra de callos.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en la primera fase se puede afirmar que los tratamientos derivaron callos, embriones y raíces.

Los explantes de secciones de hoja de eucalipto promovieron durante su subcultivo las respuestas embriogénicas en la mayoría de los experimentos.

La capacidad para producir embriones somáticos a partir de explantes de hoja de eucaliptos está muy influenciada por diversos factores como: tipo de explantes, luz, oscuridad, y medio de cultivo.

El medio de cultivo resultó un factor importante para las respuestas embriogénicas de los explantes, donde hay que destacar la disponibilidad de los nitratos-amonio, reguladores de crecimiento, la presencia de diferentes aminoácidos así como la aplicación *in vitro* de coadyuvantes como el extracto de malta y la caseína hidrolizada.

Fue posible la obtención de embriones somáticos y posteriormente el cultivo de embriones de diferentes tamaños, donde se pudo determinar que los embriones de mayor tamaño fueron los que se conservaron durante mas tiempo viables.

El medio de cultivo Gamborg B5 promovió la formación de estructuras embrionarias, y callos con alta capacidad regenerativa destacando la naturaleza poliembriónica del eucalipto.

Las mejores respuestas para la formación *in vitro* de embriones fue con la adición de TDZ con 0.1 mg·L⁻¹ complementado con vitaminas.

La incorporación al medio de cultivo de kinetina, giberelinas y AIA conjuntamente con la modificación de niveles de sales promovieron la viabilidad de los embriones somáticos a partir de callos cultivados.

LITERATURA CITADA

- AGÚNDEZ, D.; CERVERA, M. T.; ALBA, N.; MARTÍNEZ, J. M.; GRAU, J. M. 1999. Genetic identification of commercial clones of *Populus* based on isozymes and AFLPs. In: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel, S.; Ritter, E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, España. pp. 549-552.
- AHUJA, M. 1993. Micropropagation of woody plants. Kluwer Acad. Publ. 356 p.
- ALOÍSIO, X. 1997. Enraizamiento *in vitro* de gemas de *Eucalyptus* multiplicadas e alongadas. Scientia Forestalis. 51: 29-26.
- BERJAK, P. 1999. Strategies for *in vitro* conservation of hydrated. In *In vitro* conservation of plant growth genetic resources. De. M. N. Normah, IPGRI. pp. 5-10.
- BUENO, M. A.; ASTORGA, R.; MANZANERA, J. A. 1992. Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. Physiologia Plantarum 85: 30-34.
- CASTRO, R. D. 1998. Propagación *in vitro* de árboles élites adultos de *Eucalyptus camaldulensis* y *E. tereticornis*. III Encuentro latinoamericano de Biotecnología vegetal. REDBIO'98. Resúmenes. FAO-CUBA. pp. 28-29.
- CELESTINO, C.; FERNÁNDEZ, B.; HERNÁNDEZ, I.; MOLINAS, M.; PUIGDERRAJOLS, P.; MARTÍNEZ, I.; HORNERO, J.; GALLEGU, F. J.; MANJÓN, J. L.; DÍEZ, J.; TORIBIO, M. 1999. Somatic embryogenesis in cork oak (*Quercus suber* L.). In: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel, S.; Ritter, E. (Ed.). 22-25 September. Vitoria-Gasteiz. Spain. pp. 195-197.
- DAQUINTA, G. M.; RAMOS, L.; LEZCANO, R.; ESCALONA, M. 2000. Algunos elementos en la micropropagación de la Teca. Biotecnología Vegetal. 1: 39-44.
- DÍEZ, J.; GIL, L. 1999. Culturing of cell tissues within the Spanish breeding programme against Dutchelm disease. In: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S.; Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, España. pp. 307-311.
- ESPINEL, S.; ARAGONES, A.; RITTER, E. 1999. Application of RAPD markers to analysis genetic relationships and variability of *Pinus radiata* populations. In: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel, S., Ritter, E. (Ed.). 22-25 September. Vitoria-Gasteiz. España. pp. 107-114.
- FILONOVA, L. H.; BOZHKO, P. V.; ARNOLD, S. V. 2000. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. Journal of Experimental Botany 51: 249-264.
- FRAMPTON, L. J.; AMERSON, H. V.; LEACH, G. N. 1998. Tissue culture method affects *ex vitro*, Growth and development of loblolly pine. New Forests 16: 125-138.
- GÓMEZ, A.; ARAVANOPOULUS, P. A.; ALÍA, R.; BUENO, M. A. 1999. *Pinus halepensis* RAPD markers: Linkage and genetic diversity. In: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September. Vitoria-Gasteiz. España. pp. 143-146.
- HAGGMAN, H.; JOKELA, A.; KRAJNAKOVA, J.; KAUPPI, A.; NIEMI, K.; ARONEN, T. 1999. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. Journal of Experimental Botany 50: 1769-1778.
- HORNERO, J.; MARTÍNEZ, I.; CELESTINO, C.; GALLEGU, F. J.; TORRES, V.; TORIBIO, M. 2000. Early checking of genetic stability of cork oak somatic embryos by AFLP analysis. International Journal of Plant Sciences pp. 14-25.
- INOUE, M. T.; VIEIRA, J. D.; CORREA, G. 1999. Estudio comparativo del desempeño fotosintético entre posturas micropropagadas y de estacas de cuatro clones del híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. In: Congreso Forestal Brasileiro, 6., Campos de Jordao. Anais. pp. 493-496.
- RAJORA, O. P. 1999. Molecular biology in sustainable forest management. In: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel, S., Ritter, E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, España. pp. 29-39.
- SÁNCHEZ, O. 2000. Micropropagación de algunas leñosas nativas. Editorial Trama. Universidad de Concepción, Chile. 322 p.
- SAS Institute INC. 1992. SAS User's Guide: Statistics, Statistical versión 6. Cary, North Carolina, U.S.A. pp. 9-56.

- SMITH, C.; WOOD, J. E. 1998. *Biología molecular y biotecnología*. Addison Welsley Longman. España. 247 p.
- TIMMIS, R. 1998. Bioprocessing for tree production in the forest industry: conifer somatic embryogenesis. *Biotechnology Progress* 14: 156-166.
- VILLAR, B.; OLLER, J. J.; TEULIERES, C.; BOUDET, A. M.; GALLEGO, P. P. 1999. *In planta* transformation of adult clones of *Eucalyptus globulus* spp; using an hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain. *In: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel, S.; Ritter, E. (Ed.). 22-25. September. Vitoria-Gasteiz. España. pp. 373-385.