

CONTROL DE CONDICIONES AMBIENTALES Y MEDIO DE CULTIVO PARA LA PROPAGACIÓN DE *Eucalyptus grandis* EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

CONTROL OF ENVIRONMENTAL CONDITIONS AND CULTURE MEDIUM FOR THE PROPAGATION OF *Eucalyptus grandis* IN THE TEMPORARY IMMERSION SYSTEM

Dagoberto Castro¹ y Justo L. González²

Resumen

La introducción de técnicas avanzadas para la propagación en los sistemas de inmersión temporal incluye algunas estrategias como son la utilización de sistemas semiautomatizados en medios líquidos de cultivo y el control ambiental en los recipientes de cultivo. En la micropropagación de *E. grandis*, los factores ambientales como alto PFF $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, enriquecimiento del aire con CO_2 $1.200 \mu\text{mol mol}^{-1}$, y la adición de sacarosa (1.5%) al medio de cultivo en bajas concentraciones, permitieron el desarrollo mixotrófico de los brotes de *E. grandis*. Éstos afectaron de manera positiva las variables morfofisiológicas como altura de las plantas, relación entre masas seca y fresca, área foliar, lo cual demuestra el valor y la novedad de la aclimatación *in vitro* de *E. grandis* en el sistema de inmersión temporal. Los tratamientos de aclimatación *in vitro* incrementaron el desarrollo y la supervivencia de las plantas durante la fase de aclimatación *ex vitro*.

Palabras clave: inmersión temporal, *Eucalyptus grandis*, flujo de fotones fotosintéticamente activos (FFF), CO_2 , sacarosa, micropropagación, aclimatación *in vitro*.

Abstract

The introduction of technical advances for the propagation in the temporary immersion techniques includes some strategies, as they are the use of semiautomatic systems in liquids medium and the environmental control in the containers of culture. In the micropropagation of *E. grandis* the environmental factors like high PFD of $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, enrichment of the air with CO_2 $1.200 \mu\text{mol mol}^{-1}$, and the addition of sucrose to culture medium in low concentrations (1.5%), allowed the mixotrophic development of the buds of *E. grandis*. These affected of positive way the morphophysiological variables as height of the plants, relation between dry and fresh biomass, leaf area, which show the value and novelty of the acclimatization *in vitro* of *E. grandis* in the temporary immersion system. The procedures of *in vitro* acclimatization increased the development of the plants and the survival of the plants during the phase of *ex vitro* acclimatization.

Key words: temporary immersion, *Eucalyptus grandis*, photon flux density (PFD), CO_2 , sucrose, micropropagation, *in vitro* acclimatization.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las técnicas de micropropagación a escala comercial en especies forestales ha tenido limitaciones debido a los altos costos de producción por factores como las bajas tasas de

proliferación, los costos en labores como el subcultivo y enraizamiento y la baja supervivencia de las plántulas durante la fase de aclimatación *ex vitro* (Eldridge *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1999).

Recibido: agosto de 2000; aprobado para publicación: abril de 2001.

¹ Investigador, Unidad de Biotecnología, Universidad Católica de Oriente, apartado 008, Rionegro, Antioquia, Colombia. E-mail: dcastro@uco.edu.co.

² Investigador Titular, Laboratorio Propagación Masiva de Plantas, Centro de Bioplantas, UNICA, Carretera a Morón km 9, CP. 69450, Cuba. E-mail: justo@bioca.unica.cu.

El crecimiento y desarrollo de las plántulas *in vitro* se puede mejorar al controlar algunos factores ambientales como la concentración de CO₂, la sacarosa en el medio de cultivo, el flujo de fotones fotosintéticamente activos (FFF) y la humedad relativa en los recipientes de cultivo (Ermayanti *et al.*, 1999), lo que permite reducir costos de producción significativamente debido a que se logran disminuir algunas anomalías morfofisiológicas y se promueve un desarrollo más vigoroso durante la aclimatización (Kozai *et al.*, 1997).

Durante la aclimatización son necesarias algunas condiciones, tales como un ambiente físico definido con luminosidad controlada, el intercambio de gases (CO₂ y O₂) y el manejo de la humedad relativa (Kozai, 1991; Sutter *et al.*, 1992).

La introducción de técnicas avanzadas para la aclimatización *in vitro* incluye algunas estrategias como son la utilización de sistemas semiautomatizados en medios líquidos de cultivo y el control ambiental en los recipientes de cultivo (Ziv, 1995).

George (1996) y Jones y Van Staden (1997) reportan que se han investigado más de 55 diferentes especies de eucaliptos, mediante la utilización de las técnicas de micropropagación *in vitro*; sin embargo, se requiere desarrollar metodologías para mejorar la calidad de las plántulas y las fases de enraizamiento y aclimatización.

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la sacarosa, el CO₂ y las condiciones de FFF durante la fase de elongación de *Eucalyptus grandis* en el sistema de inmersión temporal sobre la calidad de las plantas en el momento de ser puestas bajo condiciones *ex vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología de la Universidad Católica de Oriente (Rionegro, Antioquia). Se utilizaron vitroplantas de *E. grandis* como fuente de material vegetal, procedentes del método de propagación convencional.

Descripción del sistema de inmersión temporal. El sistema consistió de un programador automático, un compresor, una caja de cultivo, tubos de silicona, filtros millipore de 0.22 mm y un frasco de un litro de capacidad como recipiente del medio de cultivo. La caja de cultivo, con una capacidad total de cuatro litros, es una cámara transportadora de bioseguridad (Nalgene Co., Rochester, NY). Un tubo de silicona se conectó a la cámara de cultivo con el frasco recipiente del medio de cultivo, el cual se aseguró con una tapa rosca de polipropileno equipada con dos puertos de salida: uno para conectarlo a la cámara de cultivo y el otro con un filtro millipore (0.22 µm). Para realizar los intercambios gaseosos con CO₂ se instaló un cilindro de gas, el cual se conectó a un flujómetro que reguló la cantidad de aire enriquecido que ingresó a las cajas de cultivo.

Condiciones generales del experimento. Se utilizaron nueve explantes, cada uno compuesto por cinco brotes. Para la fase de proliferación el medio de cultivo consistió en las sales minerales y vitaminas de MS (Murashige y Skoog, 1962), al que se le redujo el nitrato de amonio a 1.237.5 mg/l, más sacarosa (30 g/l) y 6 benciladenina BA (0.5 mg/l). El medio se esterilizó por autoclave (25 min, 121 °C), y previamente el pH se ajustó a 5.8 con NaOH. Los cultivos se incubaron a 24 ± 1 °C con un fotoperiodo de doce horas con luz fluorescente (FFF 80 µmol m⁻²s⁻¹). El FFF se midió con un sensor Modelo LI190 SB (LI-COR Inc., Lincoln). El sensor posee una longitud de onda de 400 a 700 nm. El receptor de fotones se puso en el interior de los recipientes y allí se realizaron las lecturas de condiciones de luz.

La frecuencia de la inmersión fue de doce horas con una duración de tres minutos. Después de tres semanas se efectuó el cambio de medio para inducir la elongación. El medio de cultivo tuvo la misma composición anterior, excepto que la BA se reemplazó por AIB (1 mg/l) y la sacarosa se adicionó de acuerdo con los tratamientos empleados (0, 1.5 y 3.0% P/V). Como fuente de luz se utilizaron lámparas fluorescentes y se evaluaron dos FFF: 80 µmol m⁻²s⁻¹ y 120 µmol m⁻²s⁻¹; la

temperatura se mantuvo en promedio en 28 °C. El fotoperiodo fue de doce horas luz.

Cada seis horas se inyectó un flujo de aire ($350 \pm 50 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2) o una mezcla de aire enriquecido con CO_2 ($1.200 \mu\text{mol mol}^{-1}$); el flujo del CO_2 a las cajas de cultivo fue de 15 ml/l durante treinta segundos. Las condiciones de FFF y la concentración de CO_2 que se proponen en el trabajo se tomaron del trabajo de Kirdmanee *et al.* (1995) en *Eucalyptus camaldulensis*. Se utilizó un experimento trifactorial en diseño completamente aleatorio. Los factores y los niveles fueron:

- (FFF) con dos niveles: $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (*bajo FFF*) y $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (*alto FFF*).
- Concentración de CO_2 con dos niveles: $350 \pm 50 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (*aire no enriquecido*) y $1.200 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (*aire enriquecido*).
- Concentración de sacarosa % (P/V) con tres niveles: 0, 1.5 y 3 (*sin*, *media* y *alta*, respectivamente).

Para evaluar el efecto de las condiciones ambientales establecidas en cada uno de los tratamientos, veintidós días después del cultivo en la fase de elongación en los sistemas de inmersión temporal, se determinaron las variables correspondientes a coeficiente de multiplicación, altura media de los brotes, porcentaje de brotes competentes (brotes mayores de 2 cm), área foliar y masa específica foliar. El área foliar se determinó mediante el método fotogravimétrico con el uso de una fotocopidora según la técnica descrita por Sestak *et al.* (1971). La masa específica de las hojas por brote se determinó por el cociente de la masa seca de los brotes entre el área foliar. El número total de muestras analizadas por tratamiento correspondió a 150.

Posteriormente se seleccionaron 40 brotes por tratamiento que se transplantaron a semilleros, en los cuales se utilizó como sustrato arena previamente esterilizada con vapor a 1.2 kg cm^{-2} y 121 °C du-

rante una hora. Para la aclimatización se utilizó un sistema de cámaras húmedas en donde se mantuvieron las plántulas durante tres semanas. Las condiciones ambientales fueron 28 °C , 90% de humedad relativa y un FFF de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; transcurrido este tiempo se destaparon paulatinamente y se dejaron completamente descubiertas, bajo las mismas condiciones de aclimatización descritas anteriormente. A los treinta días después de sembradas las plántulas se les evaluó el porcentaje de supervivencia.

RESULTADOS

En la figura 1 (A, B y C) se muestran los efectos de diferentes concentraciones de sacarosa, concentraciones de CO_2 y condiciones de luz (FFF), sobre algunas variables de crecimiento en plantas de *E. grandis*, durante la fase de elongación en los sistemas de inmersión temporal.

Las variables del coeficiente de multiplicación, altura y porcentaje de brotes competentes mostraron interacciones entre los factores evaluados. Condiciones de alto FFF, el enriquecimiento de la atmósfera con CO_2 y la adición de sacarosa (1.5 y 3.0%) en el medio de cultivo favorecieron los mayores coeficientes de multiplicación (figura 1A) y la altura promedio de los brotes (figura 1B), mientras que cuando se omitió la sacarosa estas dos variables mostraron los valores más bajos.

Respecto al porcentaje de brotes competentes (figura 1C) se observa que el factor correspondiente a la sacarosa tuvo un efecto positivo sobre el tamaño de los brotes; particularmente la concentración de sacarosa intermedia (1.5%) produjo los brotes de mayor tamaño en comparación con el tratamiento con mayor concentración. En la mayoría de los casos el FFF alto mostró las mejores respuestas.

Las variables correspondientes a la relación entre masa seca y fresca y masa seca específica no mostraron interacciones entre los factores evaluados; por tanto, se analizan los efectos individuales de los factores (tabla 1). La relación entre las

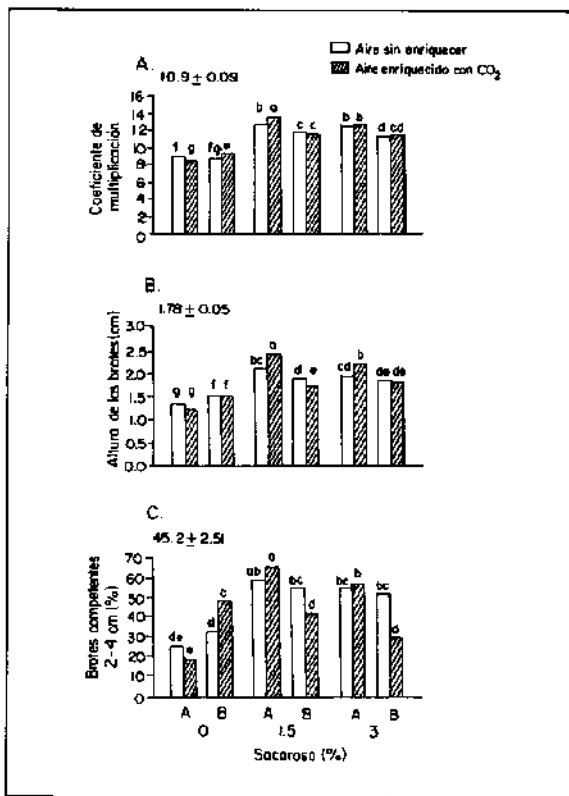


Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa, concentraciones de CO₂ y condiciones de luz sobre el coeficiente de multiplicación, altura media de los brotes y el porcentaje de brotes competentes. Las concentraciones de CO₂ fueron: aire sin enriquecer (350 ± 50 μmol mol⁻¹) y aire enriquecido (1.200 μmol mol⁻¹). Las condiciones de luz (FFF) fueron: A: 120 μmol m⁻²s⁻¹ y B: 80 μmol m⁻²s⁻¹. Los datos representan la media ± EE de tres repeticiones ± ES, cada una con 50 brotes. Los tratamientos con letras diferentes presentan significación para p < 0.05 por el test de Duncan

masas seca y fresca y la masa seca específica foliar logró sus mayores valores con las condiciones de alto FFF, enriquecimiento de la atmósfera con CO₂ y adición de sacarosa al medio de cultivo. La masa específica de las hojas presentó los mayores promedios con los tratamientos de alto FFF, aire enriquecido con CO₂ y sacarosa (1.5%) en el medio de cultivo.

En la figura 2 se muestran los resultados de la supervivencia de las plántulas de *E. grandis* durante la etapa de aclimatización *ex vitro*. Se encontraron interacciones significativas entre los tres factores evaluados durante la fase de elongación *in vitro*: condiciones de luz (FFF), concentraciones

Tabla 1. Efecto del flujo fotónico fotosintético (FFF), la concentración de CO₂ y las concentraciones de sacarosa sobre la relación entre masas seca y fresca (MS/MF) y masa específica de las hojas en plántulas de *Eucalyptus grandis* durante la fase de elongación mediante el sistema de inmersión temporal, veintiún días después de iniciados los tratamientos

Factor	MS/MF	Masa específica (mg/cm ²)
A. FFF (μmol m⁻²s⁻¹)		
80	0.080 b	29.4 b
120	0.087 a	34.2 a
MG ± EE	0.08 ± 0.001	31.8 ± 1.68
B. CO₂ (μmol mol⁻¹)		
350	0.081 b	27.7 b
1200	0.087 a	36.0 a
MG ± EE	0.08 ± 0.001	38.8 ± 1.68
C. Sacarosa (%)		
0.0	0.070 b	22.3 c
1.5	0.090 a	41.8 a
3.0	0.090 a	31.4 b
MG ± EE	0.08 ± 0.021	45.5 ± 2.05
Interacción A x B x C	NS	NS

Los datos representan la media de tres repeticiones ± EE, cada una con 50 brotes. Los tratamientos con letras diferentes presentan significación para p < 0.05 por el test de Duncan. NS = no significativa.

nes de CO₂ y sacarosa. Los mayores porcentajes de supervivencia entre el 90 y el 95% se presentaron cuando el FFF se incrementó a 120 μmol m⁻²s⁻¹ y se utilizó sacarosa en el medio de cultivo (1.5% y 3%).

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados de la figura 1A el incremento en el coeficiente de multiplicación se asocia con la mayor altura de los brotes y probablemente a la mayor actividad metabólica por efecto de los factores evaluados. En otras especies, como *Theobroma cacao*, considerada como recalcitrante en los sistemas convencionales de micropropagación (Figueira *et al.*, 1991), altas concentraciones de CO₂ tuvieron un efecto benéfico en la elongación de brotes. En *Gerbera hybrida* Hort., el enriquecimiento de la atmósfera en las cámaras de cultivo y un incremento en la intensidad lumínica mejoraron la respuesta de

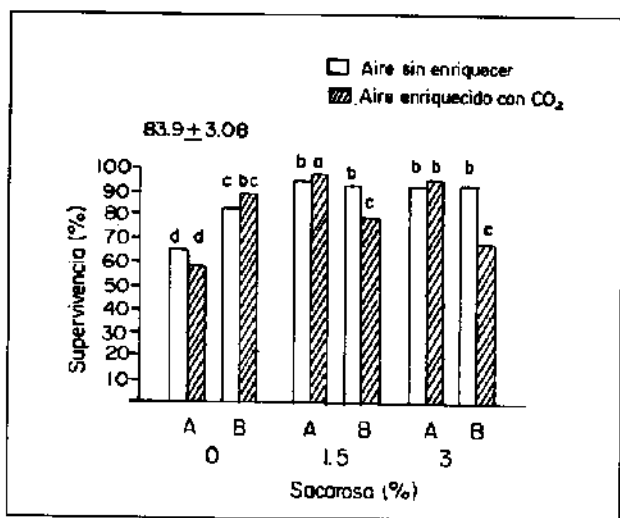


Figura 2. Efecto del flujo fotónico fotosintético (FFF), la concentración de CO₂ y las concentraciones de sacarosa durante la fase de elongación mediante el sistema de inmersión temporal, sobre la supervivencia de plántulas en *Eucalyptus grandis* durante la fase de aclimatización (treinta días después de sembradas las plántulas). Los datos representan la media \pm EE de tres repeticiones, cada una con 40 plantas. Los tratamientos con letras diferentes presentaron significación para $p < 0.05$ por el test de Duncan. Las condiciones de luz (FFF) fueron: A: $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y B: $80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

algunas variables como pesos secos y frescos y la altura de los brotes (Jeong *et al.*, 1996), lo cual coincide con los resultados que se observan en la figura 1 (B y C).

En otras especies, como *Paulownia fortunei*, *Coffea arabusta*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Solanum tuberosum*, se encontró un incremento en las masas frescas de las plántulas *in vitro* cuando se enriqueció el aire con una mezcla de CO₂ y se mantuvo un alto FFF (Kozai, 1991; Nguyen *et al.*, 1999).

Como se puede apreciar en la tabla 1, el enriquecimiento del aire con CO₂, alto FFF y la adición de sacarosa al medio de cultivo (1.5% y 3%) presentó la mayor relación entre las masas seca y fresca. Ésta disminuyó 22.2% cuando se omitió la sacarosa del medio de cultivo; resultados similares han sido informados por Serret *et al.* (1997) en *Gardenia jasmonoides*.

La masa seca es indicativa de la actividad biosintética generadora de biomoléculas y macromo-

léculas en la organización jerárquica celular. En efecto, las plantas procedentes de los tratamientos con alta luminosidad, enriquecimiento de la atmósfera con CO₂ y sacarosa (1.5% y 3%), presentaron los mayores porcentajes de masa seca y a la vez coincidieron con los mayores coeficientes de multiplicación, mayor altura de los brotes y mayor porcentaje de brotes por encima de 2 cm. Estas plantas son denominadas competentes, por su mayor capacidad de supervivencia y crecimiento durante la fase de aclimatización.

Un aumento en la masa específica de las hojas indica la existencia de hojas más densas. Esta mayor masa específica de las hojas puede ser atribuida a un incremento en el contenido de almidón en las mismas producto de una mayor fotosíntesis neta (Duvés y Vidaver, 1992).

Capellades *et al.* (1991) encontraron que la adición de bajas cantidades de sacarosa al medio de cultivo producía mayor fotosíntesis neta y promovía la acumulación de almidón en las hojas, lo cual permite que las plantas tengan mayor posibilidad de desarrollarse de manera mixotrófica y que durante la fase de aclimatización logren mayor supervivencia, tal como lo evidencian los resultados obtenidos en la investigación.

De acuerdo con los anteriores resultados los factores correspondientes a condiciones de alto FFF, el enriquecimiento de la atmósfera al interior de las cajas de cultivo con CO₂ y la sacarosa en concentraciones medias en el medio de cultivo tuvieron influencia sobre el crecimiento y desarrollo de los brotes de *E. grandis*, tal como ha sido informado para otras plantas por algunos autores (Miyashita *et al.*, 1996; Kubota *et al.*, 1997).

Los beneficios de la utilización de sacarosa en el proceso de aclimatización se atribuyen a la acumulación de almidón como fuente de reserva de nutrientes y energía (Capellades *et al.*, 1991), lo que explica la mayor supervivencia del mejor tratamiento.

Un aspecto que se debe tener en cuenta para explicar en general la alta supervivencia de las

plántulas procedentes del sistema de inmersión temporal durante la fase de aclimatización es la funcionalidad de los estomas, pues como se mencionó anteriormente, se encontró una adecuada respuesta a los cambios ambientales, como incremento en la densidad y alto porcentaje de estomas

parcialmente cerrados, lo cual es uno de los factores más importantes para mejorar la habilidad de las plantas *in vitro* para reducir la excesiva pérdida de agua por efecto de la transpiración (Ross-Karstens *et al.*, 1998).

REFERENCIAS

- Capellades M, Lemeur R, Debergh PC. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of Pn in rosa cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 25:21-25.
- Duvés SL, Vidaver W. 1992. Photosynthetic competence of plantlets grown *in vitro*. An automated system for measurement of photosynthesis *in vitro*. *Physil Plant* 84:409-416.
- Eldridge K, Davidson J, Harwood C, Van Wyk G. 1994. *Eucalypt domestication and breeding*. Oxford University Press Inc., New York, 281 p.
- Ermayanti TM, Imelda M, Tajuddin T, Kubota C, Kozai T. 1999. Growth promotion by controlling the *in vitro* environment in the micropropagation of tropical plant species. Proc. of Intl. Workshop on Conservation and Sustainable Use of Tropical Bioresources. Tokio, Japan. pp. 10-25.
- Figueira A, Whipkey A, Janick J. 1991. Increased CO₂ and light promote *in vitro* shoot growth and development of *Theobroma cacao*. *J Am Soc Hort Sci* 116:585-589.
- George EF. 1996. Plant propagation by tissue culture part 2. In practice. 2nd ed. Exegenetics Limited, England. pp. 976-978.
- Jeong BR, Kozai T, Watanabe K. 1996. Stem elongation and photoperiod, photosynthetic photon flux and difference between day and night temperatures influence growth of *Mentha rotundifolia* *in vitro*. *Acta Hort* 440:539-544.
- Jones NB, Van Staden J. 1997. Micropropagation of *Eucalyptus*. En: Bajaj YPS (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 39. High-tech and micropropagation V. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 286-330.
- Kirdmanee C, Kiyata Y, Kozai T. 1995. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. *In vitro Cell Dev Bio.-Plant* 31:144-149.
- Kozai T. 1991. Acclimation of micropropagated plantlets. En: Bajaj YPS (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 17. High-tech and micropropagation I. Springer Verlag, Berlin. pp. 127-139.
- Kozai T, Kubota Ch, Jeong BR. 1997. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 51:49-56.
- Kubota C, Fujiwara K, Kitaya Y, Kozai T. 1997. Recent advances in environmental control in micropropagation. En: Goto E *et al.* (eds.). *Plant production in closed ecosystems*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 153-169.
- Miyashita Y, Kitaya Y, Kubota Ch, Kozai T. 1996. Photoautotrophic growth of potato plantlets as affected by explant leaf area, fresh weight and stem length. *Sci Horticulturae* 65:199-202.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays whit tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nguyen QT, Kozai T, Niu G, Nguyen UV. 1999. Photosynthetic characteristics of coffee (*Coffea arabusta*) plantlets *in vitro* in response to different CO₂ concentrations and light intensities. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 55:133-139.
- Ross-Karstens G, Ebert G, Lüdders P. 1998. Influence of *in vitro* growth conditions on stomatal density, index and aperture of grape, coffee and banana plantlets. *Plant Tissue Cult Biotechnol* 4(1):26.
- Sestak Z, Catsky J, Jarvis PG. 1971. Plant photosynthetic production. En: Junk W (ed.). *Manual of methods*. NV Publishers, The Hague, The Netherlands. 519 p.
- Serret M, Trillas M, Matas J, Araus JL. 1997. The effect of different closure types, light and sucrose concentration on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 47:215-230.
- Sutter EG, Shackel K, Dáz JC. 1992. Acclimatization of tissue cultured plants. *Acta Hort* 314:115-119.
- Ziv M. 1995. *In vitro* acclimatization. En: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith MAL (eds.). *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Kluwer Academic Publishers. pp. 301-319.