

Influencia del calcio y ácido giberélico en el alargamiento de brotes adventicios *in vitro* de *Eucalyptus globulus*

Calcium and gibberelic acid influence on *in vitro* adventitious elongement of *Eucalyptus globulus*

C.D.O.: 181.51-181.525

XIMENA V. CALDERON-BALTIERRA

Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca, Chile

SUMMARY

The *ex vitro* establishment of *Eucalyptus globulus* plantlets obtained by *in vitro* micropropagation is successful only when elongement is achieved before rooting. In order to know the role of calcium and gibberelic acid (GA₃) in the elongement of adventitious shoots these were grown on Murashige and Skoog medium (MS) and modified as follows: calcium full strength (440 mg/l) half strength (220 mg/l) and fourth strength (110 mg/l); GA₃, 0.1 and 0.5 mg/l.

A combination of MS with a normal concentration of calcium (440 mg/l) and 0.5 mg/l of GA₃ resulted in a good development of roots. However leaves suffered a notorious deformation. It is recommended to use a lower concentration of GA₃ (0.1 mg/l) in combination with a treatment of short dark periods.

RESUMEN

El mayor porcentaje de sobrevivencia en invernadero de plántulas de *Eucalyptus globulus* obtenidas *in vitro* se logra cuando los brotes adventicios se alargan previamente antes de enraizar. Con el objeto de conocer el rol del calcio y ácido giberélico (GA₃) sobre el crecimiento en altura de brotes adventicios se cultivaron éstos en medio Murashige y Skoog, (MS, 1962) con la concentración original de calcio del medio (440 mg/l) y modificándola a 220 mg/l (1/2x) y 110 mg/l (1/4x). Se ensayó además el GA₃ a 0.1 y 0.5 mg/l en combinación con los diferentes niveles de calcio. Todos los medios se suplementaron con 0.5 mg/l de bencilaminopurina (BAP) y 0.01 mg/l de ácido naftalenacético (ANA).

El resultado de la combinación de calcio normal del MS (440 mg/l) con 0.5 mg/l de GA₃ resultó ser altamente significativo. En esta situación, sin embargo, se presenta una deformación foliar notable. Se recomienda utilizar una concentración menor de GA₃ (0.1 mg/l) en combinación con tratamientos de oscuridad por períodos cortos.

INTRODUCCION

Eucalyptus globulus es una especie de crecimiento rápido, que además de poseer madera de buena calidad es usada como fuente de fibra corta en la industria de la celulosa. Estas ventajas han despertado gran interés, lo que se ha traducido en un aumento de la forestación con esta especie en Chile.

Para producir individuos genéticamente mejorados se requiere establecer huertos semilleros clonales, lo cual demanda mucho tiempo. Lo anterior implica la necesidad de establecer siste-

mas de propagación a corto plazo que estén destinados a suplir las demandas de semilla mejorada.

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son una alternativa adecuada para superar parcialmente esta dificultad. Es por tanto necesario establecer la especie vegetal *in vitro*. En algunas especies leñosas, como la de esta investigación, se reconocen cuatro etapas: establecimiento en condiciones axénicas, multiplicación, alargamiento y enraizamiento. Para transferir con éxito *E. globulus* a condiciones *ex vitro* es necesario que los brotes pasen por todas estas etapas. El alargamiento permite al tejido acondicionarse fisiológicamente para que cese la división celular y comience el alargamiento celular. Por otra parte, cuando los brotes

arrosetados se inducen a enraizar, se necrosan rápidamente si se transfieren muy pequeños a medio de enraizamiento. Esta observación se ha reportado para otras especies (Riffaud y Cornu, 1981).

Sin embargo, aunque es posible enraizar brotes adventicios transfiriendo directamente del medio de multiplicación al de enraizamiento (Calderón *et al.*, no publicado), no es aconsejable hacerlo ya que es esencial que las hojas tengan pigmentación y morfología normal para el rápido restablecimiento de la termodinámica de la planta después que se han inducido las raíces. Tales condiciones se logran en el medio de alargamiento que se caracteriza por tener una menor concentración de citoquininas o ausencia total de las mismas, cuya finalidad es evitar o disminuir la división celular.

Das y Mitra (1990) han mencionado que es posible alargar los entrenudos de brotes adventicios arrosetados antes del enraizamiento en medios con ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP), si se adicionan tanto ácido giberélico (GA_3) como carbono activado, o si éstos se aplican aisladamente.

La presente investigación tiene por objeto mostrar el efecto de diferentes niveles de calcio y giberelina sobre el crecimiento en altura de brotes *in vitro* y evaluar la condición más adecuada para establecerla como paso previo al enraizamiento.

MATERIAL Y METODOS

FUENTE DE EXPLANTE Y CONDICIONES DE CULTIVO *IN VITRO*

Las semillas de *Eucalyptus globulus* se obtuvieron de árboles del Rodal # 39, predio Chivilingo, Forestal Colcura.

Los ensayos se realizaron con brotes adventicios de *Eucalyptus globulus* en etapa de multiplicación, provenientes de yemas laterales de plantas jóvenes germinadas *in vitro*.

Se tomaron brotes arrosetados con altura promedio de 0.5 cm y se cultivaron en cámara de crecimiento bajo un fotoperíodo 16/8, con una intensidad lumínica de 2.000 lux y una temperatura constante a $25^\circ \pm 2^\circ C$, en un total de 40 repeticiones/ensayo y 10 de los controles.

MEDIOS DE CULTIVO

Se probó el medio basal Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementado con 0.5 mg/l de BAP más

0.01 mg/l de ANA y vitaminas completas para todos los tratamientos. La concentración normal de calcio de este medio basal (440 mg/l) fue modificada a 220 (1/2x) y 110 (1/4x) mg/l.

Se probaron además dos concentraciones de GA_3 (0.1 y 0.5 mg/l), tomando como controles los medios sin GA_3 (cuadro 1). Los medios fueron gelificados con agar (6 g/l). Como fuente de carbono se utilizó azúcar comercial (30 g/l) y el pH fue ajustado a 5.8. La esterilización de los medios de cultivo se realizó en autoclave a $121^\circ C$ a 1.5 bares por 15 minutos.

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados del crecimiento en altura real de los brotes adventicios para cada tratamiento se evaluaron a los 10, 20 y 30 días de cultivo con un análisis de varianza de una vía, luego con un test de rangos múltiples (LSD) para verificar la homogeneidad de varianza.

RESULTADOS

El alargamiento de los brotes adventicios, cultivados en medio con 440 mg/l de calcio, es notablemente superior al resto de los tratamientos cuando se adiciona 0.5 mg/l de GA_3 (cuadro 1, fig. 10) y estadísticamente significativo a los 30 días con respecto a todos los tratamientos (cuadro 2), pero con un costo muy alto para los brotes, ya que esta concentración causa deformaciones foliares considerables, junto con una menor área foliar (fig. 1). Si se disminuye el GA_3 a 0.1 mg/l, el alargamiento es significativamente menor (cuadro 1, figs. 2 y 10) a los 30 días ($P=0.01$), según la prueba de la media de la población. Sin embargo, en esta última situación las hojas son en su mayoría normales, no presentando deformaciones.

Le sigue en magnitud de respuesta el nivel 6, con 220 mg/l calcio y 0.5 mg/l GA_3 , pero cuya diferencia es altamente significativa sólo con su control (nivel 2) y los niveles 3 y 8, que tienen crecimiento considerablemente menor (cuadro 1).

Ensayos realizados con posterioridad en el laboratorio han probado que la situación del nivel 5 es superable si a continuación del tratamiento con 0.1 mg/l de GA_3 se etiolan los brotes por 7-10 días. Los brotes tratados con este método combinado logran incrementos superiores a los 2 cm (fig. 4). Se detecta una diferencia significativa

CUADRO 1

Resultados del análisis de rangos múltiples.
Analysis of multiple ranks.

Nivel	Tiempo							
			10 días		20 días		30 días	
	GA ₃ mg/l	Ca mg/l	X cm	G.H. abcde	X cm	G.H. abcde	X cm	G.H. abcde
1	0	440	0.160	abc	0.35	ab	0.620	bcd
2	0	220	0.100	ab	0.12	a	0.170	a
3	0	110	0.150	a	0.16	a	0.190	a
4	0.5	440	0.507	e	0.75	c	0.960	e
5	0.1	440	0.375	bcd	0.56	ab	0.647	cd
6	0.5	220	0.420	cd	0.65	b	0.715	d
7	0.1	220	0.407	cd	0.55	ab	0.552	bcd
8	0.5	110	0.282	abcd	0.33	ab	0.345	ab
9	0.1	110	0.367	bcde	0.46	a	0.480	abc

GA₃ = Acido giberélico
Ca = Calcio
G.H. = Grupos homogéneos

(P=0.01) respecto a los controles 2 y 3 (figs. 3 y 6) a los 30 días.

Aunque el enraizamiento no es el objetivo de esta investigación, es interesante comentar que después de haber seguido el tratamiento recién mencionado ha sido posible obtener plantas con raíz en diferentes medios de enraizamiento (fig. 5), cuyas hojas son normales.

Cuando se cultivan los brotes con 220 mg/l de calcio (fig. 11) el crecimiento en altura es menor y similar con ambas combinaciones hormonales, respecto al tratamiento anterior, sin haber una diferencia significativa (P=0.01) entre ambos (fig. 6). Se registra una diferencia altamente significativa entre los tratamientos 4 y 6 a partir de los 20 días de cultivo (cuadro 2).

Entre los dos niveles de GA₃ ensayados no hay diferencias significativas, pero sí respecto a los controles.

Hay deformaciones foliares con 0.5 mg/l de GA₃ (fig. 6); sin embargo cuando se adiciona 0.1 mg/l (fig. 7), éstas son mucho menos frecuentes, observándose en algunos hojas más alargadas cercano a lo normal.

Los valores más bajos en crecimiento en altura se obtienen al utilizar 110 mg/l de calcio en el medio de cultivo (fig. 12). Con ambas combinaciones hormonales se favorece la formación de brotes adventicios con un normal desarrollo foliar (figs. 8 y 9). Con respecto a los tratamientos 4, 5 y 6 se encontraron diferencias altamente significa-

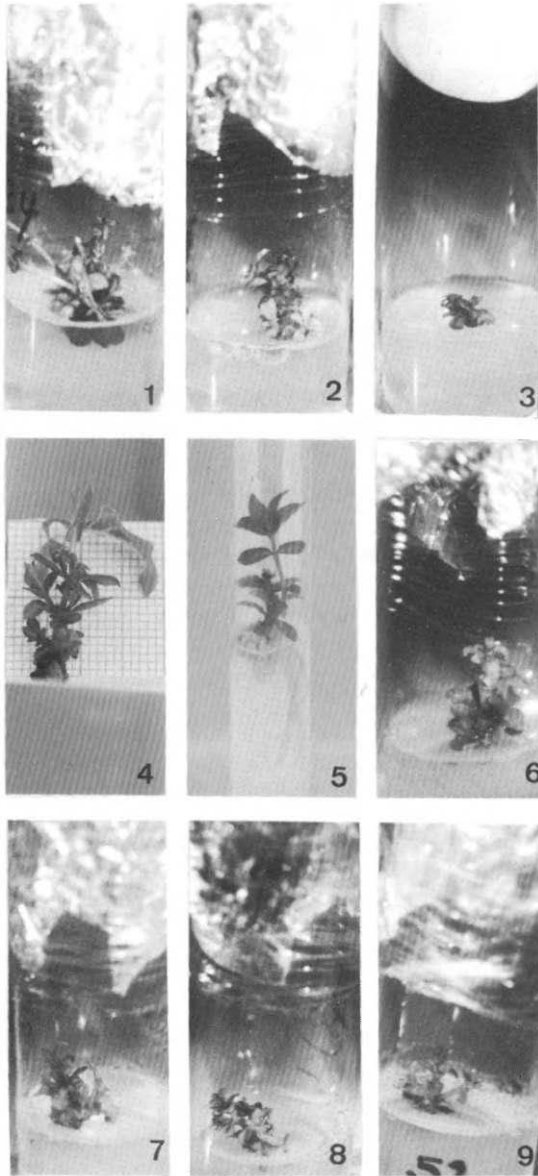
CUADRO 2

Contrastes entre las medias de los tratamientos.

Se muestran sólo los resultados obtenidos en 22 de 36 contrastes realizados y se indica con (*) aquellos en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Contrast between the means of treatments. Results of only 22 of the 36 contrasts are given. Significant statistical differences are indicated (*).

Contrastes entre medias	10 días de cultivo	20 días de cultivo	30 días de cultivo
1 - 2	-	-	*
1 - 3	-	-	*
1 - 4	*	*	*
1 - 6	*	-	-
1 - 7	-	-	-
2 - 4	*	*	*
2 - 5	-	-	*
2 - 6	*	*	*
2 - 7	*	-	*
2 - 9	*	-	*
3 - 4	*	*	*
3 - 5	*	-	*
3 - 6	*	*	*
3 - 7	*	-	*
4 - 5	-	*	*
4 - 6	-	*	*
4 - 7	-	*	*
4 - 8	-	*	*
4 - 9	-	-	*
5 - 8	-	-	*
6 - 8	-	*	*
6 - 9	-	-	*



Figuras 1-9. Respuesta de los brotes adventicios a los diferentes tratamientos: 1) Calcio 1x y 0.5 mg/l GA₃. 2) Calcio 1x y 0.1 mg/l GA₃. 3) Control sin GA₃. 4) Brotes elongados con GA₃ y oscuridad. 5) Brote alargado y enraizado. 6) Calcio 1/2x y 0.5mg/l GA₃. 7) Calcio 1/2x y 0.1 mg/l GA₃. 8 y 9 Calcio 1/4.

Answer of adventitious shoots to the different mediums: 1) Calcium 1x and 0.5 mg/l GA₃. 2) Calcium 1x and 0.1 mg/l GA₃. 3) Control without GA₃. 4) Shoots elongated with GA₃ and darkness. 5) Elongated and rooted shoot. 6) Calcium 1/2x and 0.5 mg/l GA₃. 7) Calcium 1/2x and 0.1 mg/l GA₃. 8 and 9) Calcium 1/4.

tivas (P=0.01) en cuanto al crecimiento en altura (cuadro 2, fig. 13).

El escaso incremento registrado en los controles con calcio 1x, 1/2x y 1/4x indica la evidente necesidad de adicionar GA₃ para alargar los entrenudos (cuadro 2, fig. 13).

DISCUSION

Para una óptima elongación con desarrollo normal de hojas la combinación propuesta en este trabajo consiste en un tratamiento hormonal con 0.1 mg/l de GA₃ y 440 mg/l de calcio seguido por un tratamiento de oscuridad.

El fundamento fisiológico radica en que al parecer la etiolación estimularía la acumulación de calmodulina en las regiones apicales y por consiguiente incrementaría el número de células, conduciendo esto a un alargamiento de las plántulas en mayor proporción que si se aplica sólo un tratamiento hormonal.

Una de las razones del ensayo presentado obedece a que el calcio unido a la calmodulina ejercería un importante efecto regulador en el proceso de alargamiento celular (Roberts y Harmon, 1992). Además el calcio se necesita para amplificar e integrar la señal con otras señales reguladoras.

Tanto el GA₃ como el calcio contribuyen al crecimiento celular. El ácido giberélico estimula el crecimiento al incrementar la extensibilidad de la pared (Davies, 1987).

Se encontró que el alargamiento es significativamente menor en el nivel más bajo de calcio (110 mg/l). Se ha observado en plantas sometidas a deficiencia de calcio que algunos organelos, como mitocondria y retículo endoplasmático, se desintegran. Además de alterarse la membrana celular. Esto sugiere que su rol principal es mantener la integridad de la membrana (Poovaiah *et al.*, 1988).

Los experimentos reportados sobre el alargamiento al parecer son necesarios porque los brotes se necrosan rápidamente cuando se transfieren muy pequeños al medio de enraizamiento. Tales observaciones coinciden con las de Riffaud y Cornu (1981) y experiencias anteriores en mi laboratorio con esta especie.

Vieitez *et al.* (1985) utilizan explantes de 0.5 cm para mayor uniformidad, alargados en dos conocidos medios basales (SH y B5), pero el mayor enraizamiento se logra con estacas de 5-6 cm con

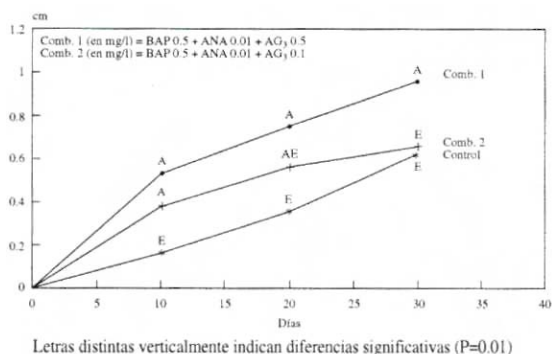


Figura 10. Crecimiento en altura con distintas combinaciones hormonales (Ca 1x).
Height growth with different hormone combinations.

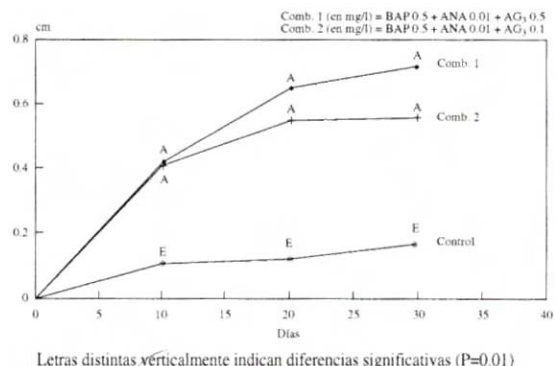


Figura 11. Crecimiento en altura con distintas combinaciones hormonales (Ca 1/2x).
Height growth with different hormone combinations.

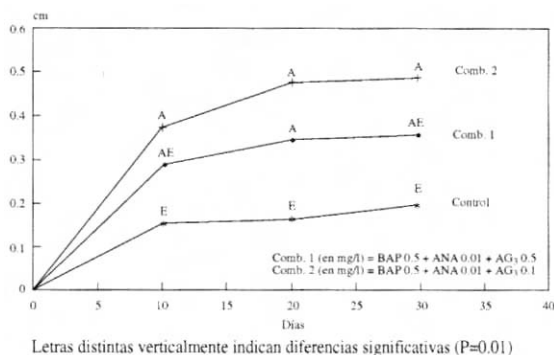


Figura 12. Crecimiento en altura con distintas combinaciones hormonales (Ca 1/4x).
Height growth with different hormone combinations.

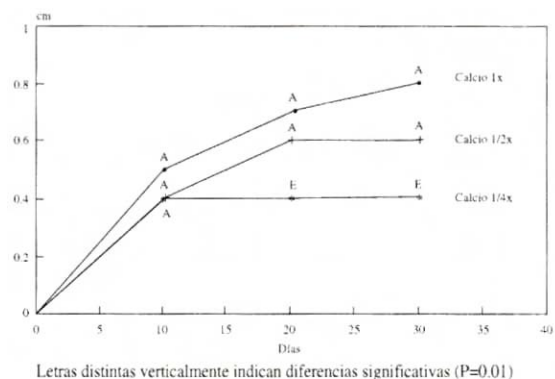


Figura 13. Crecimiento en altura con distintos niveles de calcio.
Height growth with different calcium levels.

2-3 entrenudos. En el caso de la especie en estudio, el calcio a 440 mg/l estimula considerablemente el crecimiento en altura, pero combinado con 0.5 mg/l de GA₃ causa deformaciones foliares considerables. Vieitez *et al.* (1985), sin embargo, cuando ensayan estas mismas condiciones obtuvieron hojas de mayor tamaño, apariencia normal y sin callo, pero introdujeron dos variables más al mismo tiempo (disminuyeron NO₃⁻ a la mitad y duplicaron el MgSO₄).

El ácido giberélico no es el único inductor de alargamiento que se puede aplicar en leñosas. Manzanera y Pardos (1990) elongan *Quercus* con BAP con y sin ANA, tanto en explantes juveniles como adultos; San-José *et al.* (1988) sólo con citoquininas (BAP o Zeatina). Sin embargo en *Eucalyptus gunni*, Cortezzi y Méndez (1989) lo-

gran alargar 2-2.5 cm con 0.1 y 0.5 mg/l de GA₃ en presencia de BAP y AIB antes de enraizar, aunque no todos los vastagos elongados logran enraizar. En otras especies leñosas, como raulí (Calderón y Salazar, no publicado), hemos observado que la presencia de carbono activado estimula notablemente el alargamiento celular.

Chevre *et al.* (1983) elongan castaña adulta adecuadamente con 0.5% de carbono activado. Ellos mencionan que el alargamiento es más difícil cuando se tiene material adulto que cuando se trabaja con material joven y señalan, además, que la elongación es necesaria para que cese la multiplicación vegetativa. Por otra parte, Roberts y Harmon (1992) han observado que la región apical de los vastagos etiolados de avena tiene células meristemáticas con mayor concentración de

calmodulina que los tejidos maduros. Los niveles de calmodulina-mRNA son 3.5 veces mayores en las regiones de desarrollo en hojas de siete días que tienen tejido meristemático en la parte basal.

Esto sugiere que las condiciones de oscuridad estimularían la actividad de la calmodulina, lo cual se traduce en una mayor síntesis proteica. Los tejidos se comportarían como más jóvenes, no producirían lignina y por lo tanto se favorecería el alargamiento celular.

Un período de elongación después de la multiplicación *in vitro* puede inducir los vástagos a enraizar en respuesta a auxinas (Quoirin *et al.*, 1974).

Esta investigación ha probado que el alargamiento de los vástagos, previo al enraizamiento, es fundamental para la sobrevivencia de las plántulas en condiciones *ex vitro*.

McCown y Amos (1978) elongan *Betula* en medio Greshoff & Doy (GD) con BAP por 6-8 semanas, luego tienen 100% de enraizamiento.

Nuestra experiencia indica que los brotes adventicios pueden enraizar si el medio inductor es adecuado (Calderón *et al.*, no publicado) pero la sobrevivencia es escasa. No ocurre lo mismo si previo al enraizamiento éstos se alargan en un promedio de 1 cm. En estas condiciones no sólo sobreviven sino que son capaces de multiplicarse normalmente estando en el medio de inducción.

CONCLUSIONES

Al contrastar los niveles 4 y 5 se observa que hay una diferencia altamente significativa a partir de los 20 días de cultivo, es decir, que la mayor concentración de GA₃ (0.5 mg/l) en combinación con 440 mg/l de calcio permite el mayor crecimiento en altura. En esta situación se encontró una diferencia altamente significativa (P=0.01) respecto al resto de los tratamientos. Esto significaría que estamos en presencia de medio más adecuado para el alargamiento. Sin embargo, debido a que las alteraciones foliares fueron tan evidentes, se sugiere recurrir a un estímulo más moderado con 0.1 mg/l

de GA₃, combinado con un tratamiento de 7-10 días de oscuridad. Es posible obtener así un alargamiento adecuado con una vigorosa producción de hojas normales de mayor tamaño y de buena pigmentación como se indica en la figura 4.

AGRADECIMIENTOS

A Aurora Marín por su colaboración en el trabajo *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

- CORTEZZI, M.E., S. MENDEZ. 1989. "Micropropagation of *Eucalyptus dunnii* Maid", *Ann. Set. For.* 46 suppl., 140-144.
- CHEVRE, A.-MARIE, S.S. GILL. A. MOURAS, G. SALESSES. 1983. "In vitro vegetative multiplication of chesnut", *Journal of Horticultural Science* 58(1): 23-29.
- DAS, T., G.C. MITRA. 1990. "Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22: 95-103.
- DAVIES, P.J. 1987. *Plant hormones and their role in plants growth and development*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht/Boston/Lancaster.
- MCCOWN, B., R. AMOS. 1979. "Initial trials with commercial micropropagation of birch selection", *Proc. Intl. Plant. Prop. Soc.* 29: 387-397.
- MANZANERA, J.A., J.A. PARDOS. 1990. "Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber*L.", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21: 1-8.
- MURASHIGE, T., F. SKOOG. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiol. Plant.* 15: 437-497.
- POOVAIAH, B.M., G.M. GLENN, A.D.N. REDDY. 1988. Calcium and Fruit Softening: Physiology and Biochemistry. En: J. JAMICK (ed.). *Horticultural Review* 10: 107. Timber Press Portland, Oregon.
- QUOIRIN, M., P. BOXUS, TH. GASPARD. 1974. "Root initiation and isoperoxydases of stem tip cuttings from mature *Prunus* plants", *Physiol. Veg.* 12: 165-174.
- ROBERTS, D., A. HARMON. 1992. "Calcium-modulated proteins target of intracellular calcium signals in higher plants", *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 43: 375-414.
- SAN-JOSE, M.C., A. BALLESTER, M. VIEITEZ. 1988. "Factors affecting *in vitro* propagation of *Quercus robur* L.", *Tree Physiology A*: 281-290.
- RIFFAUD, J.-L., D. CORNU. 1981. "Utilization de la culture *in vitro* pour la multiplication de merisiers adults (*Prunus avium* L.) selectiones en foret", *Agronomie* 1: 633-640.
- VIEITEZ, A., C. SAN-JOSE, E. VIEITEZ. 1983. "In vitro plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L.", *Journal of Horticultural Science* 60(1): 99-106.