

ACLIMATACIÓN DE PLANTAS DE *EUCALYPTUS GRANDIS* (HILL EX MAIDEN) OBTENIDAS A TRAVÉS DEL CULTIVO *IN VITRO*

M. Sc. LUIS A. DELGADO FERNÁNDEZ,¹ M. Sc. ANA TROCONES BOGGIANO,¹
DR. DANIEL AGRAMONTE PEÑALVER,² LIC. ANÍBAL GONZÁLEZ ROQUE,¹
M. Sc. DAYMÍ RAMÍREZ AGUILAR,² M. Sc. FELIPE JIMÉNEZ TERRY,² T. M. MARTHA
PÉREZ PERALTA² Y T. M. ODALYS GUTIÉRREZ MARTÍNEZ²

¹ Instituto de Investigaciones Forestales. Calle 174 no.1723
e/ 17B y 17C, Rpto. Siboney, Playa, La Habana
anibal@forestales.co.cu

² Instituto de Biotecnología de las Plantas. Carretera
a Camajuani Km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba,
ibp@uclv.etecsa.cu

RESUMEN

Se presentan los resultados durante la fase de aclimatación de las plantas de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) producidas a través del cultivo *in vitro*. Los experimentos realizados estuvieron relacionados con la influencia de tres factores: régimen de riego, sustrato e iluminación. Se comprobó que existe necesidad de establecer tres etapas con diferentes regímenes de riego para lograr elevados porcentajes de supervivencia, cuya duración promedio debe mantenerse entre 10 y 15 días. En la primera etapa los mejores resultados se obtuvieron con un riego de 30 s cada 60 min. En la segunda, un régimen de 60 s cada 120 min, y en la tercera etapa un régimen de 120 s cada 240 min. En cuanto a los sustratos utilizados se observó que una mezcla de casting (85%) + zeolita (15%) brindó los mejores resultados, mientras que en cuanto a la iluminación el mayor porcentaje de supervivencia se logró cuando se retira el zarán a los 30 días de iniciada la fase.

Palabras clave: *Eucalyptus grandis*, aclimatación, sustrato, riego, iluminación

ABSTRACT

The results obtained are shown during the acclimatization phase of the *Eucalyptus grandis* produced the culture *in vitro*, the experiments done were related to the influence to the three factors: the watering regime, substrate, illumination. It was proved that it is needed to establish three stages different watering regime to archive high percentages of survival, which average lasting should be kept between ten and fifteen days. In the first stage the best result were obtained with a watering of 30 seconds every 60 minutes; in the second one a regime of 60 seconds every 120 minutes and in the thirist stage a regime of 120 seconds every 240 minutes. The sustrate utilized it was observed that a mixing of casting (85%) + zealot (15%) gone the best results, mean while regarding illumination the major percentage of survival was fulfilled when the saran was retired at 30 days after loving begun the phase.

Key words: *Eucalyptus grandis*, acclimation, substrate, irrigation, illumination

INTRODUCCIÓN

Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen bajo un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa. Estas condiciones provocan cambios en la morfología y la fisiología de las plantas, que las hacen diferir de las que crecen en invernaderos o en el campo. Los cambios fenotípicos que son inducidos por las condiciones ambientales provocan que una gran parte de las plantas micropropagadas no sobrevivan al trasplante en las condiciones naturales, lo que hace necesario aplicar técnicas de aclimatación *in vitro* o *ex vitro* que garanticen un retorno gradual a sus características morfológicas normales [Agramonte *et al.*, 1993].

En las especies forestales esta fase cobra particular importancia debido a que por sus propias características anatomorfológicas requieren un especial manejo de todos los factores involucrados, sobre todo la humedad, intensidad luminosa y sustratos. El presente estudio tuvo como objetivo determinar las condiciones óptimas para la aclimatación de plántulas de *Eucalyptus grandis* producidas a través del cultivo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizaron brotes multiplicados y enraizados *in vitro* con una altura superior a 2,5 cm.

Características y condiciones en la fase de aclimatación. El estudio se llevó a cabo en un invernadero sin control

activo de clima, caracterizado por la presencia de una capa de plástico transparente (nailon) y un sombreado interior que se garantizó con el empleo de una malla de color negro llamada *zarán*, que puede recogerse o desplegarse según se requiera. Se utilizó además un sistema de nebulización de baja presión para garantizar el control de la temperatura y la humedad, las cuales tuvieron valores medios de 28°C y 87% respectivamente.

El tipo de riego utilizado fue aéreo, mediante microaspersores cronometrados con un caudal de 2 L/min. En esta fase se emplearon bolsas de polietileno con una capacidad de 800 cm³.

Influencia del régimen de riego durante la aclimatación de las vitroplantas

Teniendo en cuenta que esta etapa resulta compleja cuando se trabaja con especies leñosas, este experimento se llevó a cabo con el objetivo de optimizar la fase y lograr vitroplantas de mayor calidad; el sustrato utilizado fue una mezcla de zeolita y casting (15-85%). Se estudiaron dos tiempos de riego con tres frecuencias cada uno, con lo que se conformaron seis tratamientos en cada caso.

Este experimento se dividió en tres etapas, teniendo en cuenta los factores tiempo y frecuencia de riego, que fueron diferentes en cada una. Cada etapa tuvo una duración máxima de 15 días y las evaluaciones se realizaron al término de este período. La intensidad de la luz se mantuvo constante durante todas las etapas y estuvo reducida al 35% mediante el *zarán* y el nailon transparente. Los tratamientos evaluados en cada etapa se muestran en las *Tablas 1, 2 y 3*.

Se tuvieron en cuenta las variables supervivencia (%) y longitud promedio del tallo (cm). Sobre la base de

estos resultados se seleccionó el mejor tratamiento de cada etapa para pasar a la siguiente.

TABLA 1

Tratamientos de riego evaluados durante la fase de aclimatación en la primera etapa

<i>Tratamientos</i>	<i>Tiempo de riego (s)</i>	<i>Frecuencia de riego (min)</i>
1	30	30
2	30	60
3	30	90
4	60	30
5	60	60
6	60	90

TABLA 2

Tratamientos de riego evaluados durante la fase de aclimatación en la segunda etapa

<i>Tratamientos</i>	<i>Tiempo de riego (s)</i>	<i>Frecuencia de riego (min)</i>
1	30	60
2	30	120
3	30	180
4	60	60
5	60	120
6	60	180

TABLA 3

Tratamientos de riego evaluados durante la fase de aclimatación en la tercera etapa

<i>Tratamientos</i>	<i>Tiempo de riego (s)</i>	<i>Frecuencia de riego (min)</i>
1	60	120
2	60	240
3	60	360
4	120	120
5	120	240
6	120	360

Para el procesamiento estadístico de los resultados se utilizó un ANOVA bifactorial para el estudio de las interacciones entre los factores. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Duncan.

Influencia del tipo de sustrato

En este experimento se evaluó el comportamiento de las vitroplantas durante la fase *ex vitro* para determinar el mejor sustrato, una vez seleccionado el mejor régimen de riego. Se probaron cuatro variantes tomando como base los resultados en investigaciones anteriores con otros cultivos [Jiménez, 1994; Cabrera y col., 1999; Pérez y col., 1999].

- a) Zeolita 100%.
- b) Casting 100%.
- c) Zeolita (50%) + casting (50%).
- d) Zeolita (15%) + casting (85%).

TABLA 4

Tratamientos evaluados en cuanto a iluminación durante la fase de aclimatación

<i>Tratamientos</i>	<i>Tiempo al cabo del cual se eliminó el sombreado</i>
1	Primer día
2	A los 10 días
3	A los 20 días
4	A los 30 días
5	A los 40 días

Las variables evaluadas en cada tratamiento fueron supervivencia, longitud del tallo y número de entrenudos. Para el procesamiento estadístico de los datos se aplicó un ANOVA simple, y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Duncan.

Se evaluó la supervivencia y la longitud de las plantas a los 40 días. Para el análisis estadístico de los datos de este experimento se utilizó un ANOVA simple, y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Duncan.

Influencia de la iluminación sobre la aclimatación de las vitroplantas

Este experimento se realizó con el objetivo de incrementar la calidad de las vitroplantas y disminuir su permanencia en la fase de aclimatación, mediante el manejo de la intensidad luminosa. Se estudiaron cinco tratamientos que se muestran en la *Tabla 4*. La iluminación estuvo regulada por los cobertores plásticos descritos anteriormente, que en su conjunto permitieron el paso del 35% de la luz solar. Los tratamientos consistieron en eliminar el sombreado proporcionado por el zarán cada determinado tiempo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia del régimen de riego durante la aclimatación de las vitroplantas

La interacción entre los factores influyó sobre la supervivencia en la pri-

mera etapa, con los mejores resultados para el tratamiento de 30 s cada

60 min, con diferencias significativas respecto al resto (Tabla 5).

TABLA 5

Comportamiento de la supervivencia con respecto a la frecuencia de riego durante la primera etapa

<i>Régimen de riego (s/min)</i>	<i>Supervivencia (%)</i>
30/30	70 b
30/60	85 a
30/90	65 c
60/30	65 c
60/60	70 b
60/90	70 b
MG $\pm$ ES	70,8 $\pm$ 0,12

Letras desiguales difieren estadísticamente según Duncan $p < 0,05$.

Durante esta primera etapa se observó que el régimen de riego de 30 s cada 60 min favoreció la supervivencia de las vitroplantas. No obstante, se comprobó que después de los 15 días la supervivencia disminuyó como consecuencia del exceso de humedad.

En la segunda etapa se apreció que la interacción entre los factores influyó sobre las variables evaluadas.

Los mejores resultados correspondieron al régimen de riego de 60 s cada 120 min (Tabla 6).

TABLA 6

Influencia de la interacción tiempo de riego-frecuencia de riego en la segunda etapa

<i>Régimen de riego (s/min)</i>	<i>Supervivencia (%)</i>	<i>Longitud del tallo (cm)</i>
30/60	75 bc	6,35 ab
30/120	80 b	6,75 a
30/180	65 c	6,62 a
60/60	75 bc	6,06 b
60/120	95 a	6,50 a
60/180	80 b	6,01 b
MG $\pm$ ES	78,3 $\pm$ 0,12	6,38 $\pm$ 0,06

Letras desiguales difieren estadísticamente según Duncan $p < 0,05$.

Durante esta etapa se observó que la supervivencia de las plantas se afectó tanto por el exceso de hume-

dad (60 s cada 60 min) como por el déficit (30 s cada 120 min, y 30 s cada 180 min).

Para la tercera etapa, la interacción entre los factores influyó solamente sobre la supervivencia, con los

mejores resultados para el tratamiento de 120 s cada 240 min (Tabla 7).

TABLA 7
Influencia del tiempo y frecuencia de riego sobre el número de plantas vivas en la tercera etapa

<i>Régimen de riego (s/min)</i>	<i>Supervivencia (%)</i>
60/120	85 b
60/240	90 ab
60/360	85 b
120/120	85 b
120/240	100 a
120/360	95 a
MG $\pm$ ES	86,6 $\pm$ 0,08

Letras desiguales difieren estadísticamente según Duncan ($p < 0,05$).

A las dos semanas de estar en esta etapa, las plantas habían alcanzado una longitud superior a los 10 cm, y un sistema radical fuerte, lo cual permitió su traslado a condiciones de pleno sol con el régimen de riego que se aplica en los viveros convencionales (tres veces al día).

Numerosos autores se han referido a la necesidad de una alta humedad relativa durante la fase de aclimatación de vitroplantas, tanto herbáceas como leñosas, sobre todo para evitar el exceso de la transpiración, hasta que estas logren un adecuado desarrollo de los estomas, la cutícula y el sistema radical [Ziv, 1991; Pérez, P., 1997; Cabrera y col., 1999]; sin embargo, casi ninguno ha realizado un análisis profundo acerca de las características del régimen de riego necesario ni al período de tiempo que deben permanecer las vitroplantas en esas condiciones.

Influencia del tipo de sustrato

Se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de supervivencia y la longitud del tallo entre las variantes de sustrato. Los mejores resultados correspondieron a la mezcla de casting (85%) + zeolita (15%), como se observa en la Tabla 8.

Esta variante de sustrato proporciona al explante una gran cantidad de elementos para su aclimatación, tales como N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mo. Por su parte, la zeolita es capaz de retener agua utilizable por la planta lo que reviste gran importancia ya que se puede reducir el número de riegos. Resultados similares obtuvo Jiménez (1997) en experimentos de aclimatación los cuales lograron una alta supervivencia de las vitroplantas de papa, caña y plátano con una mezcla similar de sustrato.

TABLA 8

Comportamiento de las vitroplantas de *Eucalyptus grandis* con diferentes variantes de sustrato en condiciones *ex vitro*

<i>Sustrato</i>	<i>Supervivencia(%)</i>	<i>Longitud tallo (cm)</i>
a	66,6 c	12,5 a
b	56,4 d	9,64 b
c	73,8 b	12,3 a
d	84,8 a	12,7 a
MG $\pm$ ES	70,4 $\pm$ 2,4	11,7 $\pm$ 0,6

Letras desiguales difieren estadísticamente según Duncan ($p < 0,05$).

Influencia de la iluminación sobre la aclimatación de las vitroplantas

En este estudio se pudo corroborar que los tratamientos 4 y 5 superan significativamente a los restantes. Se demostró que es posible retirar el cobertor (zarán) a los 30 días sin

provocar grandes afectaciones a las vitroplantas y por tanto lograr su endurecimiento más rápido con lo que se reduce el período de aclimatación y de transferencia a las condiciones de vivero, lo que tiene una repercusión importante en la reducción de los costos de producción. En la *Tabla 9* se presentan los resultados.

TABLA 9

Comportamiento de las vitroplantas de *Eucalyptus grandis* con diferentes variantes de iluminación en condiciones *ex vitro*

<i>Tratamientos</i>	<i>Longitud tallo (cm)</i>	<i>Supervivencia (%)</i>
1	9,2 d	58 b
2	10,6 c	68 b
3	11,8 b	80 a
4	12,6 a	89,2 a
5	13,1 a	88,4 a
MG $\pm$ ES	11,2 $\pm$ 0,22	76,7 $\pm$ 0,29

Letras desiguales difieren estadísticamente según Andevap ($p < 0,05$).

Existen muy pocas referencias acerca de la influencia que ejerce la intensidad luminosa sobre el desarrollo de las plantas en condiciones *ex vitro*; sin embargo, todo parece indicar que se debe prestar una gran atención a este factor. Cuando se emplean los métodos tradicionales de propagación de eucaliptos, sobre todo el enraizamiento de estaquillas, uno

de los requisitos más importantes que se recomienda es el control de la intensidad de la luz, y en este sentido se ha mencionado el hecho de que los mejores resultados se obtienen con una reducción del 50% [González, 1987].

Otros autores como Xavier (1987) han mencionado la importancia de este factor para la supervivencia de

vitroplantas de *Eucalyptus* spp. enraizadas *ex vitro*.

CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias significativas entre las variantes estudiadas en las tres etapas en que se subdividió el tiempo y la frecuencia de riego.

- En la frecuencia de riego de 30 s cada 60 s se logró una supervivencia de 85% durante las primeras dos semanas.
- En la frecuencia de riego de 60 s cada 120 min se logró una supervivencia de 95% durante la tercera y cuarta semanas.
- En la frecuencia de riego de 120 s cada 240 min se logró una supervivencia de 100% durante la quinta y sexta semanas.
- La mezcla de suelo de zeolita 15% + casting 85% resultó significativamente superior que el resto de las combinaciones probadas, y se logró un 84,4% de supervivencia y 12,7 cm de crecimiento en altura a los 40 días.
- La eliminación del sombreado a los 30 días resultó significativamente superior al resto de los tratamientos probados, y se logró una supervivencia de 89,2% y un crecimiento en altura de 12,6 cm.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRAMONTE, D.; J. PÉREZ; M. PÉREZ; A. PÉREZ: «Empleo del hipoclorito de sodio (NaOCL) en sustitución del flameo en el cultivo de tejidos», *Centro Agrícola* 88-89, 1993.
- CABRERA, M.; M. V. GARCÍA, M. ESPINOSA, E.; LOPEZ, J.; VENTURA, DE LA C. J.; DEL SOL, L.; M. OLIVA; H. TOLEDO; Y. TORRES: «Aclimatación de vitroplantas de yuca en *Manihot sculenta*, (Grantz)», VI Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1999, pp. 170-172.
- GONZÁLEZ, A.: «Obtención de posturas de *Eucalyptus saligna* SM en Topes de Collantes mediante el empleo de estaquillas», *Centro Agrícola*, 1987, pp. 77-84.
- JIMÉNEZ, G. E.: «Propagación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido)». Tesis de Doctorado, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de las Villas, Cuba, 1994.
- : Curso teórico-práctico de propagación masiva de plantas, Santa Clara, Cuba, pp. 25-30. 1997.
- PÉREZ PONCE, J. N.: Curso teórico-práctico de propagación masiva de plantas, Santa Clara, Cuba, 1997.
- PÉREZ PONCE, J. N.; F. A. JIMÉNEZ; D. AGRAMONTE: «Aclimatación (fase IV), características y problemáticas», Libro de reportes cortos del V Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba, 1999, pp. 188 y 189.
- XAVIER, A.: «Enraizamiento *ex vitro* de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas y alargadas *in vitro*», *Scientia Forestalis* 51:29-36, 1997.
- ZIV, M.: «Vitrification: Morphological and Physiological Disorders of *in Vitro* Plant», *Micropropagation*, Dordrecht Kluwer Academic, 1991, pp. 49-69.