

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Facultad de Ciencias Agrarias

Especialización en Manejo de Recursos Forestales

TRABAJO FINAL INTEGRADOR

“Micropropagación, embriogénesis somática y crioconservación para el incremento de la productividad de los bosques cultivados de *Eucalyptus spp.*”

PAULA GABRIELA AYALA.

Asesor: Dr. Ing. Agr. Gustavo Pedro Javier Oberschelp.



-2017-

Resumen

El género *Eucalyptus* incluye a un grupo de especies de árboles madereros extensamente plantados en el mundo. En la República Argentina se cuenta con más de 850.000 ha cultivadas. El mismo es explotado comercialmente como fuente de fibra para celulosa, madera, bioenergía y fines de recreación.

Aunque existen varios programas de mejoramiento para la domesticación del género, éstos aún se encuentran en etapas tempranas de desarrollo, entre ellos se incluye la propagación *in vitro*, destacándose la embriogénesis somática (ES), la cual se ha revelado como una de las mejores vías de regeneración.

Durante estos últimos años, la industria forestal ha apostado por la ES, debido a que presenta la ventaja de un elevado potencial de multiplicación, la capacidad de utilizar biorreactores para el crecimiento de los cultivos, la posibilidad o factibilidad de producir semillas sintéticas y la posibilidad de utilizar los cultivos embriogénicos para la transformación genética.

En el presente trabajo integrador se revisan los aspectos más importantes del cultivo *in vitro* de *Eucalyptus*, haciendo énfasis en la embriogénesis somática y crioconservación, como herramientas biotecnológicas que puedan contribuir en la generación, propagación y conservación de material elite de eucaliptos.

Abstract

The genus *Eucalyptus* includes a group of woody tree species widely distributed in the world. In the Argentine Republic there are over 850,000 ha cultivated. It is commercially exploited as a source of cellulose fiber, wood, bioenergy and recreation purposes.

Although several breeding programs for domestication of the genus have been developed, they are still in early stages. Among the techniques of in vitro propagation somatic embryogenesis (SE) stands out because it has proven to be one of the best forms of regeneration.

During the last years, the forestry industry has opted for SE due it has the advantage of a high multiplication potential, ability to use bioreactors for culture growth, the feasibility to produce synthetic seeds and the possibility of using embryogenic cultures for genetic transformation.

In the present work, the most important aspects of the *in vitro* culture of *Eucalyptus* are reviewed, with emphasis on somatic embryogenesis and cryopreservation, as biotechnological tools that can contribute to the generation, propagation and conservation of elite *eucalyptus* material.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1.-INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1- Importancia del eucalipto a nivel mundial..... | 1 |
| 1.2- Importancia del eucalipto en la región | 3 |
| 1.3- Objetivos | 6 |
| 1.4- Estructuración del trabajo integrador | 7 |
| 2.- DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA | 7 |
| 3.- MICROPROPAGACIÓN CLONAL A TRAVES DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> | 8 |
| 3.1.- El proceso de Embriogénesis Somática en el eucalipto. | |
| 3.2.- Embriogénesis primaria..... | 11 |
| 3.3.- Embriogénesis secundaria..... | 17 |
| 3.4.- Morfología embrionaria..... | 17 |
| 3.5.- Conversión de embriones a plantas..... | 20 |
| 4.- CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS..... | 21 |
| 4.1.- Técnicas de crioconservación | 23 |
| 5.- RESULTADOS Y CONCLUSIÓN | 28 |
| 6.- BIBLIOGRAFÍA | 30 |

1.-INTRODUCCIÓN

1.1- Importancia del eucalipto a nivel mundial

El género *Eucalyptus* spp. incluye alrededor de 900 especies nativas de Australia, donde las condiciones ambientales varían de templado húmedo a zonas áridas y calientes (Pita y Pardos, 2001; Granda et al., 2011). La misma pertenece a la familia Myrtaceae (Bedon et al., 2012; Brooker, 2000). El taxón se divide en ocho subgéneros; siendo el subgénero *Symphyomyrthus* el más grande y el que contiene la mayoría de las especies (Poke et al. 2005). Actualmente estas especies se encuentran distribuidas en diversas regiones, especialmente de climas mediterráneos, tropicales o subtropicales. Se estima que fue para el Siglo XVIII, cuando se inició su propagación en diferentes latitudes, llegando a distribuirse con éxito en varios países de Europa, Asia, África, América y en algunas islas del océano Pacífico (Beale y Ortiz, 2013). Los eucaliptos constituyen un conjunto de especies cultivadas y consideradas dentro de las más importantes del mundo ya que cubren un área estimada de aproximadamente 20,1 millones de hectáreas (Albaugh et al., 2013; Iglesias-Trabado y Wistermann, 2008). La importancia del género radica en diversos factores, la misma aporta una gran fuente de recursos para la humanidad; las especies se adaptan prácticamente a todos los climas; tienen la capacidad de producir grandes cantidades de madera en períodos de tiempo relativamente cortos. Por otro lado, tienen la capacidad de recuperarse ante la acción negativa del fuego, sequías, plagas, ramoneo, entre otras. Gracias a mecanismos de defensa propios de las especies, se adaptan a suelos pobres y deteriorados (por erosión o por manejo irracional); se puede utilizar su producción para diversos fines, tales como pasta para celulosa, madera, leñas, etc. Estas son las principales razones de su difusión mundial, especialmente en los países en vía de desarrollo, lo cual ha permitido en menos de treinta años, septuplicar la superficie plantada en el mundo (Beale y Ortiz, 2013).

La notable adaptabilidad de los mismos, junto con su rápido crecimiento y excelentes propiedades de la madera permitió su adopción a la silvicultura de

plantaciones en más de 100 países y en más de 20 millones de hectáreas (Iglesias-Trabadet al., 2009). La calidad de sus fibras, características como suavidad, brillo y baja resistencia a la fuerza de tracción hacen que estos árboles sean fiables para su uso en las industrias del papel. Además, los eucaliptos juegan un papel importante en el contrachapado, la fabricación de tableros y la industria mobiliaria debido a su madera alta y recta que varía de mediana a alta densidad.

Como se mencionó anteriormente, el eucalipto juega un papel fundamental en la industria forestal en Sudáfrica y en muchas otras partes del mundo, en servir a las industrias de madera, papel, celulosa y carbón vegetal (Eldridge et al., 1994; Turnbull 1999; Watt et al., 2003). Para satisfacer la creciente demanda de estos productos es necesario desarrollar enfoques y tecnologías que puedan asegurar una producción constante y confiable del recurso. Es importante tener plantaciones de tamaño y calidad uniformes del fuste. En este sentido, es crucial poder propagar material genético mejorado producido a través de programas de reproducción clonal de manera efectiva y económica.

Eldridge et al. (1994) clasificó las diez especies cultivadas de eucaliptos de mayor importancia económica para la producción de pulpa y para madera maciza en el mundo, las mismas son: *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. viminalis*, *E. saligna*, *E. deglupta*, *E. exserta*, *E. citriodora*, *E. dunnii*, *E. paniculata* y *E. robusta*.

A partir de estas especies, Potts y Dungey (2004) informaron que *E. grandis*, *E. urophylla* y sus híbridos son los más favorecidos para la obtención de pulpa y cada vez más para la producción de madera maciza en regiones tropicales y subtropicales, mientras que *E. globulus* es más común en regiones templadas (libres de heladas severas). *E. camaldulensis* es conocido por su capacidad de prosperar en zonas áridas y semiáridas, y *E. nitens* es reconocido por su adaptabilidad a climas más fríos (Teulieres y Marque, 2007).

1.2-Importancia del eucalipto en la región

Si bien el género *Eucalyptus* estuvo presente en nuestro territorio desde antes de la separación de los continentes, hecho demostrado por restos fósiles de *E. patagonicus* encontrados al norte de Bariloche (Hermsen et al., 2012); recién en el año 1.857, Domingo Faustino Sarmiento introduce semillas de *E. globulus*, que fueron plantadas principalmente en la provincia de Buenos Aires, a las que luego continuaron con introducciones puntuales, en especial con eucaliptos colorados como *E. camaldulensis* (sinónimo de *E. rostrata*) y *E. tereticornis*, y por último introdujeron semillas de *E. grandis*, siendo estas últimas la que más prosperaron y lograron adaptarse perfectamente. Dada esa plasticidad y resistencia (a frío, sequía, inundaciones, salinidad), es que comenzaron a difundirse en varias regiones del país, como Mendoza, Córdoba, Santa Fe, e incluso en el NOA. Merece destacarse una introducción acontecida en el NEA, a través de Misiones, con el fin de secar tabaco, lo cual dio origen a algunos pequeños montes en esa provincia y además en Corrientes, los cuales hoy día aún se están cortando. En Entre Ríos se plantaron como cortinas rompe viento principalmente, y montes de reparo del ganado, existiendo un par de núcleos de eucaliptos híbridos, uno al sur, en cercanías de la localidad de Larroque y otro en la localidad de La Paz, cerca de Paraná.

Debido a la existencia de una planta de celulosa en Capitán Bermúdez y dos de tableros MDF (Medium Density Fibreboard) en Guillermina y aglomerado en Calchaquí, la provincia de Santa Fe también introdujo plantaciones de eucaliptos colorados, a esto se suma la vecindad de una planta de tableros HDF (High Density Fibreboard) en Ramallo, Buenos Aires en su territorio. A este polo se le suma un pequeño núcleo en Mendoza que destinaba madera para una planta de aglomerado, y pisos, y otro en Jujuy con destino siderúrgico, además de los citados en Entre Ríos (Beale y Ortiz, 2013).

Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (MAGyP), la República Argentina cuenta actualmente con aproximadamente 1.200.000 hectáreas

de Bosques Cultivados. Estos bosques están conformados casi exclusivamente por especies exóticas de rápido crecimiento, donde predominan las coníferas (*Pinus* spp.), seguidas por los eucaliptos (*Eucalyptus* spp.) y las Salicáceas (*Salix* spp. y *Populus* spp.), de las cuales el 80% se concentra en la Mesopotamia (provincias de Misiones, Corrientes y Entre Ríos) y el delta del río Paraná. Aproximadamente un 25 % de los bosques cultivados corresponden a los eucaliptos, siendo *Eucalyptus grandis* y *E. saligna* los más plantados; luego, en menor cantidad, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. viminalis* y *E. globulus* (Beale y Ortiz, 2013).

En la Mesopotamia Argentina, en concordancia con las regiones ecológicas más favorables, aunque sin ocupar las mejores tierras que se destinan a la agricultura y ganadería intensiva, se han desarrollado plantaciones forestales con especies exóticas de rápido crecimiento. No sólo han influenciado las condiciones ecológicas, sino que en estecaso tuvo fundamental importancia la localización estratégica de la región respecto a los centros poblados, especialmente Buenos Aires, y la existencia de plantas celulósicas cercanas, lo que dio como resultado la formación de polos o cuencas forestales. Estos asentamientos forestales se crearon merced a la existencia de distintos sistemas de promoción y fomento del estado, los que actualmente han demostrado que más que un gasto ha sido una excelente inversión. Esta afirmación se basa no sólo en el desarrollo social logrado, sino también en el progreso económico, por los retornos monetarios que genera. Por ello es que hoy día casi el 80% de las plantaciones se encuentran en las provincias de Entre Ríos, Corrientes y Misiones, región geográfica conocido con el nombre de Mesopotamia Argentina. De las que, sin duda la provincia más importante es Misiones, dado que tiene la mayor superficie plantada y además dispone de los bosques nativos con mayor actividad industrial del país. Le sigue en importancia Corrientes, y en un tercer orden Entre Ríos. Las cifras de bosques cultivados para las principales zonas indican que la provincia de Misiones según el SIFIP (sistema de información foresto industrial) dispone de 419.008 ha, Corrientes cuenta con 473.983,41hs por el Consejo Federal de Inversiones de la provincia y Entre Ríos 154.000 ha según MAGyP- Dirección de Producción Forestal.

Por otra parte, la provincia de Entre Ríos cuenta con una alta densidad de industrias forestales, y existen otras en su radio de acción en provincias cercanas como Santa Fe y Buenos Aires. En este aspecto se pueden señalar actividades relacionadas a la industria celulósica, tableros, aserraderos, impregnadoras, entre otras, lo que alienta el accionar de pequeños inversionistas que desean asegurar la venta futura de su madera (Secretaría de Estado de la Producción de Entre Ríos & INTA Concordia 2002; Sánchez Acosta y Vera, 2005).

El desarrollo de una silvicultura intensiva orientada a aumentar la calidad de los productos a obtener y el desarrollo de nuevos procesos industriales de elaboración y secado de la madera, hoy llevan a considerar la producción de madera sólida de calidad en especies como *Eucalyptus urograndis*, *E. grandis*, *E. globulus* y los eucaliptos colorados como una realidad. Esta posibilidad ha llevado a INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) a nivel mesopotámico a concentrar las principales acciones de la silvicultura intensiva en *E. grandis*, *E. saligna* (en menor medida) y más recientemente en los híbridos interespecíficos (*E. grandis* x *E. camaldulensis* y *E. grandis* x *E. tereticornis*), particularmente por su excelente adaptabilidad a ambientes pedoclimáticos (suelos bajos y ambientes fríos) de la región mesopotámica, marginales para *E. grandis*. (Marcó, 2005).

La diversidad, la adaptabilidad y el crecimiento del género han hecho de ellos un gran recurso de fibra y energía, representando una opción adecuada para satisfacer las necesidades de madera del mundo y una gran manera de evitar la deforestación de los bosques naturales. Por lo tanto, parece inevitable que las áreas ocupadas por los eucaliptos sigan expandiéndose en todo el mundo.

A pesar de su importancia como árbol de cultivo ampliamente plantado, son bien conocidos por su recalcitrancia a la micropropagación y la manipulación genética (Girijashankar, 2011). Sólo unos pocos laboratorios no comerciales proficientes en el cultivo y transformación de tejidos de eucalipto han logrado protocolos de micropropagación y transformación, los cuales se producen rutinariamente para la investigación del sector público.

Para aprovechar al máximo la reciente secuenciación del genoma de eucalipto (Myburg et al., 2014), la genómica funcional, la ecofisiología y biotecnología requieren de una regeneración eficiente de las plantas. Sin embargo, la transformación genética del eucalipto se ve obstaculizada debido a la ausencia de un protocolo de regeneración eficiente, lo cual permanece restringido a unas pocas especies y genotipos (Girijashankar, 2011, Teulieres y Marque, 2007).

La propagación clonal representa la forma más eficaz de capturar tanto los efectos genéticos aditivos como los no aditivos producidos por el mejoramiento tradicional y la biotecnología, acelerando así la exploración de las ganancias genéticas en las plantaciones. La propagación vegetativa es una técnica utilizada en los programas de mejoramiento de árboles para optimizar la plantación (silvicultura clonal) (Mullin y Park, 1992). La propagación vegetativa del eucalipto se realiza principalmente con estacas enraizadas, un método explorado en varios de los programas de propagación clonal (de Assis et al., 2004; Watt et al., 2003). Sin embargo, esta estrategia está limitada por la heterogénea respuesta de la capacidad de enraizamiento entre clones, disminuyendo su potencial debido al envejecimiento de las plantas madres (Eldridge et al., 1994; Mankessi et al., 2010; Watt et al., 2003).

La propagación clonal a través del cultivo *in vitro* puede proporcionar métodos alternativos de multiplicación vegetativa, superando algunas de las dificultades mencionadas anteriormente y proporcionando una multiplicación alta de genotipos seleccionados, con ganancias forestales a corto plazo.

1.3- Objetivos

En el presente trabajo final integrador se ha resuelto abordar una revisión bibliográfica de las distintas herramientas utilizadas para la micropropagación del eucalipto, analizando los aspectos más importantes del cultivo *in vitro*, con especial énfasis en la embriogénesis somática, considerando las distintas técnicas de crioconservación utilizadas actualmente para su posterior preservación por tiempo

ilimitado, de esta manera contar con una revisión que sirva de guía para posteriores trabajos de investigación.

1.4- Estructuración del trabajo integrador

A continuación de esta primer parte introductoria, que tiene por finalidad principal presentar el problema, fundamentar la elección del tema y plantear los objetivos, se continúa con un espacio donde son presentadas las distintas revisiones bibliográficas de trabajos de investigación realizados hasta la fecha tanto en micropropagación haciendo énfasis en embriogénesis somática como en crioconservación del género, terminando con los resultados y conclusiones. Finalmente se cita la bibliografía consultada y analizada en el presente trabajo.

2.-DESCRIPCION DEL PROBLEMA

El eucalipto ha despertado un gran interés tanto a nivel mundial como a nivel regional por la rapidez de crecimiento y por presentar una madera con múltiples usos. La mayoría de los ejemplares selectos se propagan a partir de semilla, lo cual tiene un inconveniente por presentar una gran variabilidad genética entre los individuos plantados (Costa e Silva et al., 2004; Watt et al., 2003), dado que los eucaliptos consideran plantas alógamas, aunque se estima que poseen una frecuencia de autofecundación del 10% al 30% (Eldridge et al., 1994). Este inconveniente encuentra solución en la aplicación de un método de propagación que permita clonar árboles selectos o multiplicar líneas promisorias a partir de una semilla producto de un cruzamiento específico. La propagación a través del cultivo *in vitro* puede proporcionar métodos alternativos de multiplicación, superando algunas de las dificultades planteadas en la introducción y proporcionando una multiplicación alta de genotipos seleccionados, con ganancias forestales a corto plazo. Ahora bien, si además de optimizar su propagación, se logra que estos árboles o líneas selectas pudieran conservarse *in vitro*, por ejemplo por cultivo de embriones somáticos, se aseguraría

la conservación de estos genotipos. De esta forma se contaría con un paquete biotecnológico ideal para esta especie forestal.

3.-MICROPROPAGACIÓN CLONAL A TRAVES DEL CULTIVO *IN VITRO*.

Algunos de los primeros informes sobre metodologías de micropropagación datan de los años '60, en las últimas décadas se han hecho algunos progresos en el desarrollo de protocolos completos de regeneración de plantas (Pinto et al., 2016).

Le Roux y Van Staden (1991) informaron que entre 1968 y 1991 había sólo 30 de las 204 publicaciones de este género que incluían protocolos para la regeneración de plantas. Desde entonces, varias publicaciones nuevas se centraron en la regeneración, lo cual muestra un aumento sustancial aplicado a tal enfoque.

Los protocolos para la micropropagación de eucalipto han sido desarrollados para varias especies (Arya et al., 2009; Pinto et al., 2011). El método estándar de propagación vegetativa de los eucaliptos es a través de estacas caulinares (macro y mini-estacas) (de Assis et al., 2004). Sin embargo, la propagación a través de estacas es engorroso, sus rendimientos están limitados por la disponibilidad de brotes y nudos en el interior de las plantas, además de que la capacidad de enraizamiento de los clones es altamente variable y a su vez disminuye con la edad de la planta madre (Eldridge et al., 1994; Hartney et al., 1981). Por esto, la micropropagación aborda potencialmente tales deficiencias proporcionando un ambiente altamente controlado, permitiendo altas tasas de multiplicación de brotes, mayor potencial, velocidad y calidad del enraizamiento (Warrag et al., 1990; Le Roux y Van Staden, 1991; de Assis et al., 2004). También es a menudo el único método factible de propagación de genotipos difíciles de enraizar, muchos de los cuales son clones híbridos (Mokotedi et al., 2010; Watt et al., 2003; Yasodha et al., 2004; Nourissier y Monteuis, 2008).

De acuerdo con McComb y Bennett (1986), la micropropagación puede ser una alternativa valiosa cuando: (1) la propagación convencional es difícil de lograr, (2) existen problemas de rejuvenecimiento, y (3) se produce presión para aumentar las tasas de multiplicación.

Varias técnicas de micropropagación se emplean actualmente basadas en la embriogénesis somática (Muralidharan y Mascarenhas, 1995; Canhoto et al., 1999; Corredoira et al., 2015) y en la organogénesis (Lakshmi Sita, 1979; Diallo y Duhoux, 1984; Lainé y David, 1994; Azmi et al., 1997; Arezki et al., 2000; Aggarwal et al., 2010); por otro lado la proliferación de brotes axilares se utilizan actualmente en programas de plantación forestal para la multiplicación *in vitro* a gran escala de especies arbóreas importantes. (Nugent et al., 2001; 1983; Blomstedt et al., 1991; Chang et al., 1992; Sharma y Ramamurthy, 2000),

En los últimos años la micropropagación a gran escala se ha destinado para: seleccionar clones con mayores niveles de aceites esenciales (Goodger y Woodrow, 2008); conservar especies en peligro de extinción, como *E. physalis* (Bunn et al., 2005); criopreservar (Padayachee et al. 2009); propagar híbridos seleccionados (Watt 2014); e incluso mantener plantas madres para micro-estacas (Brondani et al., 2012).

La micropropagación del eucalipto puede ser una herramienta importante para el mejoramiento genético y programas de reforestación. Las plántulas se pueden utilizar para el establecimiento de huertos de semilleros. También se puede lograr un gran número de plántulas clonadas con uniformidad genética deseada por lo que el sector forestal está apreciando cada vez más el valor de la propagación vegetativa (Morabito et al., 1994).

3.1.- El proceso de Embriogénesis Somática en el eucalipto.

La embriogénesis somática (ES) es una de las técnicas de micropropagación utilizadas para producir plántulas en diferentes especies de *Eucalyptus*. Es el proceso mediante el cual células somáticas se diferencian en embriones somáticos los cuales se parecen morfológicamente a los embriones cigóticos. La ES se define como un proceso de desarrollo no sexual en el cual se produce un embrión bipolar el cual se encuentra formado por órganos, radícula, hipocótilo y cotiledones. Sin embargo, estos se desarrollan a través de un camino diferente (Merkle et al., 1995; Thorpe et al., 2000; Arnold et al., 2002). Durante el curso de evolución, muchas

especies vegetales han adoptado diferentes estrategias para la embriogénesis asexual, incluyendo la embriogénesis somática, para superar varias condiciones ambientales y genéticas que puedan llegar a impedir la fecundación (Arnold et al., 2002). Este proceso fue reportado como el mejor ejemplo de totipotencia en plantas (Fehér, 2015). La embriogénesis somática es una herramienta de alto potencial en la mejora de la productividad ya que la aplicación de esta técnica en la silvicultura clonal permite altas tasas de multiplicación, la propagación de genotipos seleccionados a gran escala, un gran potencial de aplicación a través de biorreactores, además es factible para la utilización de tecnologías de semillas sintéticas, así como proporcionar un método para regenerar plantas modificadas genéticamente, la producción de tejido adecuado para la transferencia de genes, y la crioconservación de materia seleccionada (Von Arnold, 2008). Permite una gran flexibilidad de utilización de genotipos adecuados en función de los objetivos de reproducción y/o las condiciones fundamentales para la diversidad y las ganancias genéticas en el contexto actual del cambio climático global. Además, la ES permite la producción en masa de progenies seleccionadas cuya producción de semillas es relativamente pequeña, ya sean aquellas plantas que particularmente posean bajo rendimiento en floración y/o bajo rendimiento en producción de semillas. La ES también permite explorar el concepto de silvicultura multivarietal, acelerando el despliegue de variedades sobresalientes identificadas en ensayos de pro genie, lo cual se integró en los programas de mejoramiento de árboles (Park et al., 2006). A pesar del uso exitoso de ES en los programas de mejoramiento, la propagación y transformación genética de eucaliptos sigue siendo difícil debido a las altas tasas de oxidación de los compuestos fenólicos; la asincronía en los procesos de inducción y maduración y la difícil regeneración de plantas. Además de las bajas tasas de inducción y conversión de embriones somáticos (Pinto et al., 2013). Hasta la fecha, la inducción de embriones somáticos se ha dado sólo en unos pocos de las más de 800 especies en el género *Eucalyptus*, incluyendo *E. grandis*, *E. citriodora*, *E. gunnii*, *E. dunnii*, *E. nitens*, *E. globulus*, *E. tereticornis*, *E. camaldulensis* y algunos híbridos (Chauhan et al., 2014; Corredoira et al., 2015; Pinto

et al., 2013; Pinto et al., 2002). El establecimiento exitoso de un sistema de ES depende de la elección correcta tanto del material vegetal como de las condiciones de crecimiento. Esto incluye la selección de explantes con la fuente más apropiada de células competentes (considerando su genotipo, edad y tipo), y la selección del mejor medio y de las mejores condiciones tales como, luz, temperatura, pH y humedad, entre otros; que conducen a la vía de desarrollo embriogénico (Phillips, 2004; Thorpe, 2000). La interacción entre estos factores es crucial para las fases de inducción y la expresión exitosa del proceso de ES lo cual determina el modo específico de diferenciación y desarrollo celular (Gaj, 2004). El éxito de cualquier sistema de propagación está dado por la cantidad y calidad del producto final de las plantas regeneradas. Cualquier investigación aplicada, con fines comerciales o industriales requiere de la producción a gran escala de “emblings” (plantas derivadas de ES), además del cuidado especial durante la fase de aclimatación y la implementación a campo, donde el seguimiento de la fidelidad genética y el rendimiento bajo condiciones *ex vitro* asumen una particular relevancia.

3.2.- Embriogénesis primaria

En el eucalipto, la embriogénesis somática se informó por primera vez a partir de callos de plantas de semillero de '*E. leichow*' (Ouyang et al., 1980, 1981). Unos años más tarde, la ES también fue implementada en callos derivados a partir de brotes de árboles de cuatro años de edad en *E. grandis* utilizando el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0,1 mg l⁻¹ de ácido 1-naftalenacético (ANA) y 5 mg l⁻¹ de kinetina (KIN) (Lakshmi Sita et al., 1986). Por otra parte, al igual que en otras especies leñosas, los embriones cigóticos son los explantes más sensibles para la inducción de embriogénesis somática en *Eucalyptus* sp. (Bandyopadhyay et al., 1999; Muralidharan y Mascarenhas, 1987; Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002; Pinto et al., 2008; Prakash y Gurumurthi, 2005; Termignoni et al., 1996). Otros estudios de Watt et al. (1991) en *E. grandis* indicaron la posibilidad de obtener embriones somáticos de hojas de plántulas micropropagadas, pero a tasas bajas (30%) y con problemas de

asincronía durante la germinación. En un estudio preliminar de la inducción embriogénica en *E. grandis*, describieron la formación de tres tipos de callos embriogénicos utilizando embriones cigóticos maduros e hipocótilos, haciendo uso del agente gelificante Phytigel® para el control de los problemas de oxidación del callo. En la mayoría de estos trabajos, el ANA fue el regulador del crecimiento de las plantas más utilizado para la inducción de ES (Chauhan et al., 2014; Pinto et al., 2013), pero recientemente el picloram se ha utilizado con éxito en explantes obtenidos de árboles adultos (Corredoira et al., 2015). Los embriones somáticos también se obtuvieron cultivando callos friables en medio líquido los cuales contenían 1 mg.l^{-1} BAP (6-bencilaminopurina), KIN, ANA y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Lakshmi Sita et al., 1986). Boulay (1987) logró ES con hipocótilos y con entrenudos derivados de plantas de semilla de *E. gunnii* utilizando dos medios basales diferentes y distintas combinaciones de hormonas. En *E. citriodora*, los embriones somáticos se obtuvieron de embriones cigóticos cultivados en medio B5 Gamborg (Gamborg et al., 1968) con 3 mg.l^{-1} ANA y 5% de sacarosa (Muralidharan et al., 1989; Muralidharan y Mascarenhas, 1987). Además, Qin y Kirby (1990) fueron capaces de inducir células embrionarias en cultivos de hipocótilos, cotiledones y hojas de jóvenes plántulas de *E. botryoides*, *E. dunnii*, *E. grandis* y *E. rudis*, así como también se lograron células embrionarias a partir de hojas jóvenes y de brotes de árboles adultos de *E. grandis* (Qin y Kirby, 1990), *E. saligna* y *E. dunnii* (Termignoni et al., 1998). Estos autores utilizaron una técnica de cultivo secuencial con un medio que contenía sales MS, vitaminas y aminoácidos (Qin y Kirby, 1990). A partir de brotes adventicios desarrollados se lograron protuberancias verdes de crecimiento lento las cuales se desarrollaron a partir de las superficies cortadas de los explantes después de dos semanas, luego las estructuras embrionarias fueron transferidas a un medio suplementado con 1 mg.l^{-1} de BAP. En 1991, Watt et al. (1991) informó acerca de la inducción de embriones somáticos de *E. grandis* en medio MS suplementado con 2,4-D a partir de hojas de brotes establecidos *in vitro*. Con *E. dunnii*, la inducción se logró con plantas provenientes de semilla de tres días mediante la adición de ANA solo o en combinación con 2,4-D (Termignoni et al., 1996).

Termignoni et al. (1998) informó acerca de la inducción de ES en explantes de árboles maduros de *E. saligna* y *E. dunnii*, con una alta tasa de regeneración de plántulas en este último (Patente No. PI 9801485-4 INPI). Prakash y Gurumurthi (2005) informaron ES y la regeneración de plantas de *E. tereticornis* a partir de callos embriogénicos obtenidos de embriones cigóticos maduros en medio MS suplementado con ANA. Los embriones somáticos desarrollados después de 1-2 semanas fueron transferidos al medio de inducción con BAP, lo cual permitió su germinación con éxito, finalmente se logró plantas fuertes y arraigadas efectivamente aclimatadas (Prakash y Gurumurthi, 2005). Regeneración por organogénesis directa y ES directa fueron reportados ocurriendo simultáneamente en explantes nodales de *E. camaldulensis* por Girijashankar (2012). Además se consideró un protocolo para la inducción de ES en *E. globulus*, el cual fue descrito por primera vez por Trindade (1996). Más tarde, Bandyopadhyay et al. (1999) y Nugent et al. (2001) también informaron sobre la inducción de ES y la formación de embriones en esta especie, pero con baja tasa de inducción. Por otra parte la formación de embriones somáticos también se informó en estudios de callogénesis indirecta de *E. nitens*, aunque con una frecuencia baja y condicionada por reguladores de crecimiento (Bandyopadhyay et al., 1999). Pinto et al. (2002) estudiaron los distintos tipos de explantes utilizados para la obtención de embriones, concluyendo que los explantes de cotiledones parecen ser más sensibles a la inducción de embriones somáticos que otros tipos de explantes (Pinto et al., 2013). Además estudiaron el efecto de los reguladores de crecimiento y el tiempo de exposición en la inducción del proceso de ES. Estos autores fueron capaces de inducir ES en presencia de ANA en explantes derivados de cotiledones y de embriones cigóticos maduros (Pinto et al., 2002). Oller et al. (2004) obtuvo una fase de callo embriogénico a partir de hojas de árboles adultos cultivados en un medio basal con IBA. Por otra parte el medio más utilizado para la inducción de ES en las angiospermas leñosas, incluyendo varias especies de *Eucalyptus* (Pinto et al., 2013), es el medio MS rico en nitrógeno. Pinto et al. (2008) evaluaron la eficacia de plantas leñosas con medios como MS, MS½, B5, WPM (Lloyd y McCown, 1980), DKW /

Juglans (Driver y Kuniyuki, 1984) y JADS (Correia et al., 1995) durante la inducción de ES y la expresión en *E. globulus*. Los resultados mostraron que MS y B5 fueron los mejores medios para la inducción de ES y para su regeneración (Pinto et al., 2008).

El éxito de la inducción de embriones somáticos en explantes derivados de plantas adultas ha sido recientemente descrito en *E. globulus* y un híbrido *E. saligna* x *E. maidenii* (Corredoira et al., 2015). En el mismo se utilizaron como fuentes de explantes iniciales brotes axilares para la inducción de ES previamente establecidas a partir de dos genotipos de *E. globulus* y un híbrido de *E. saligna* x *E. maidenii*, todos provenientes de árboles elite de 12 años de edad, por otro lado se usaron brotes apicales (1-2 mm de largo) y explantes foliares (las dos hojas más apicales en activo crecimiento) se cultivaron en medio de inducción basal consistente en MS, sales minerales, vitaminas, 500 mg.l⁻¹ de caseína hidrolizada, 40 mg.l⁻¹ goma arábica (GA), sacarosa (30 g.l⁻¹), vitroagar (6 g.l⁻¹) y diferentes concentraciones de ANA. En una segunda serie de experimentos, el medio de inducción basal se suplementó con 20, 30 y 40 µM de picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) y 40 mg.l⁻¹ de GA. Todos los cultivos se mantuvieron en la oscuridad a 25°C durante 8 semanas. La embriogénesis somática se logró con los brotes apicales de los tres genotipos evaluados, aunque la tasa de embriogénesis fue significativamente influenciada por la especie/genotipo, la auxina y el tipo de explante (Corredoira et al., 2015). El picloram fue más eficiente que el ANA para la formación de embriones somáticos. Aunque el picloram apenas ha sido probado en especies de *Eucalyptus*, éste compuesto se ha utilizado como estimulante en el proceso de embriogénesis somática en material derivado de otros árboles adultos (Correia et al., 2011, Steinmacher et al., 2007). Las tasas más altas de inducción de ES se obtuvieron en medio que contuvieran 40 µM de picloram y 40 mg.l⁻¹ de GA, en el que 64% fue de brotes apicales y 68,8% de los explantes provenientes de hojas (fig.1). La respuesta embriogénica fue mayor en el híbrido que en los genotipos de *E. globulus*, especialmente cuando se añadió ANA. Los cultivos embriogénicos iniciados en un medio que contenían picloram presentaron sus nódulos embriogénicos rodeados por una capa de revestimiento mucilaginoso que

surgió de un tejido de callo acuoso desarrollado a partir de los explantes iniciales. Se consideró que este revestimiento tenía un papel protector frente a los altos niveles de compuestos observados en el callo (Corredoira et al., 2015). Sin embargo, Bandyopadhyay y Hamill (2000) han observado que los embriones somáticos de *E. nitens* se mostraban completamente encerrados en una capa fina, estratificada y transparente la cual no parecía ser de naturaleza celular ni tener una composición cerosa. Estos autores plantearon la hipótesis de que los altos niveles de exudados marrón evidenciados en el cultivo de callos de *E. nitens* de embriones somáticos generados, facilitaron la producción de esterevestimiento exterior, que se podría formar para dar protección adicional al embrión en el desarrollo del mismo (Bandyopadhyay y Hamill 2000).

Eleucalipto posee, de hecho, una rica fuente de compuestos fenólicos (Close et al., 2001) y la oxidación de polifenoles puede representar un factor limitante en la multiplicación y mantenimiento adecuado de los tejidos. Pinto et al. (2008) probaron el efecto de la adición de compuestos anti-oxidativos (ácido ascórbico, carbón activado, ditioeritritolditiotreitól, polivinilpirrolidona, polivinilpolipirrolidona y nitrato de plata) en medios de inducción y expresión (MS) para el control de la oxidación de los tejidos en *E. globulus* durante el proceso de ES. Los resultados fueron desalentadores ya que todos los compuestos ensayados disminuyeron la respuesta de ES en el medio de expresión. El ditioeritritol, el carbón vegetal y el nitrato de plata fueron los más eficaces en la reducción de la oxidación de los explantes cuando son añadidos al medio de expresión. Cuando los agentes antioxidantes se consideraron sólo durante la inducción éstos redujeron la acumulación de compuestos fenólicos pero también redujeron severamente la inducción de ES y su exposición continua terminaron inhibiendo completamente la respuesta de ES (Pinto et al., 2008).

Además de las sales minerales (macro y micronutrientes), vitaminas y aminoácidos, una fuente de carbono también debe añadirse al medio nutritivo. En eucalipto, las concentraciones recomendadas de sacarosa para la inducción de ES varían de acuerdo con las diferentes especies, pero usualmente oscilan entre el 2% y

el 5% (p/v). A pesar de que otros carbohidratos (por ejemplo, glucosa, fructosa, maltosa, lactosa, celobiosa, manitol, sorbitol y myoinositol) promueven la ES en otras especies (Canhoto et al., 1999; Lipavská y Konrádová, 2004), la adición de manitol al medio de inducción inhibió la formación de callo en la superficie de los explantes en *E. globulus* (Pinto et al., 2002).

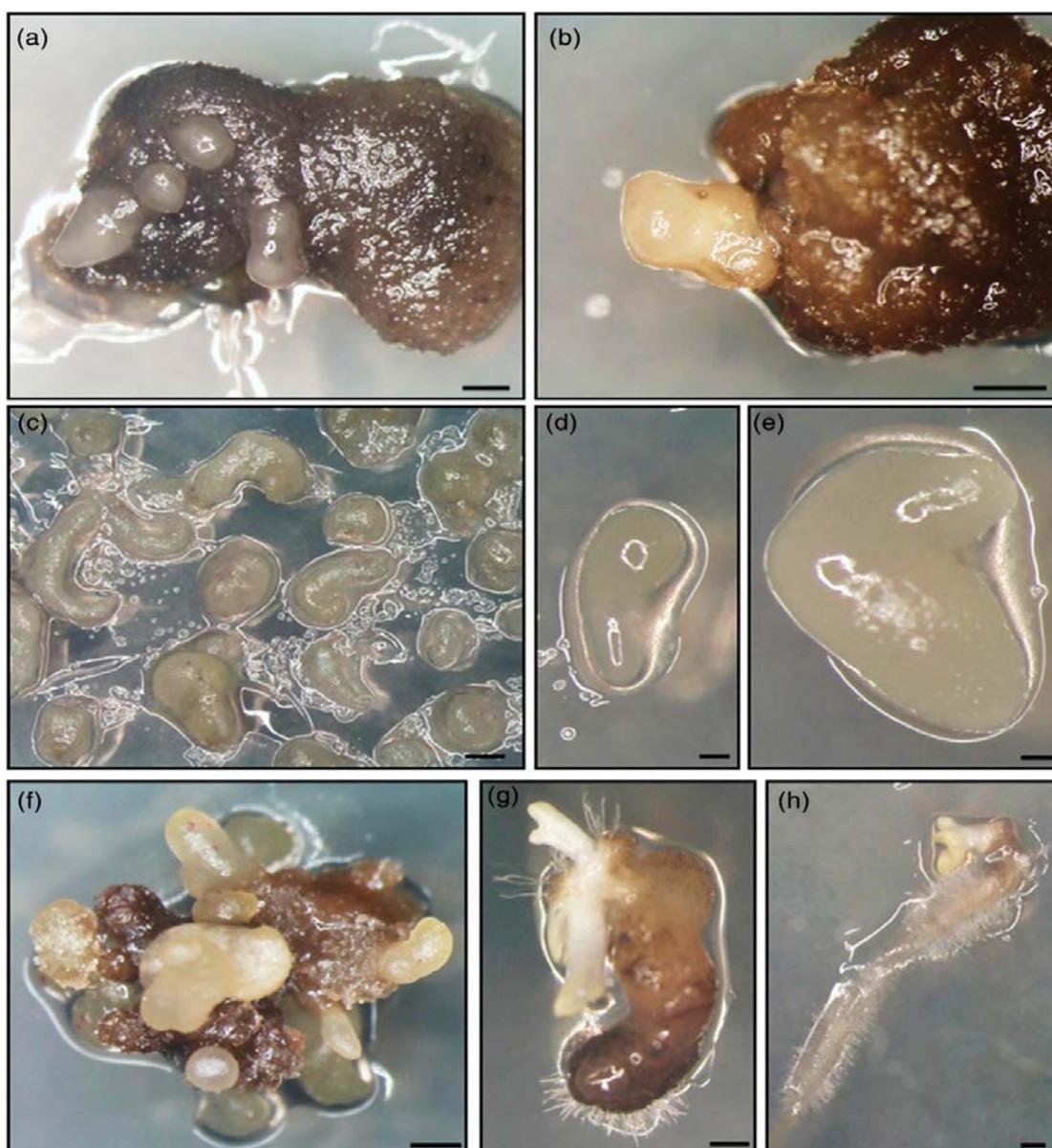


Figura 1. Inducción de embriogénesis somática con picloram tras 8 semanas de cultivo a partir de brotes axilares de *E. saligna* x *E. maidenii* (genotipo Sal-May) y *E. globulus* (41-1-AC y 22-6-RP genotipos). (a y b) Estructuras embriogénicas nodulares que surgen de un callo acuoso generado a partir de un explante foliar del genotipo 22-6-RP (a) y un explante del ápice del brote del genotipo 41-1-AC (b). (c-e) Estructuras embriogénicas aisladas separadas del callo acuoso inducido en explantes del genotipo Sal-May (c) y del genotipo 41-1-AC (d y e). Obsérvese las diferentes formas de las estructuras embriogénicas. f) El desarrollo de embriones somáticos (globulares y torpedos) obtenidos a través del subcultivo de estructura embriogénica nodulares en medio libre de hormonas. (g y h) Embriones en la etapa cotiledonar (g) y un embrión somático de origen precoz (h) después del subcultivo de estructuras nodulares embriogénicas en medio libre de hormonas. Barra de escala: a-h = 1 mm. Adaptado de Corredoira et al. (2015).

3.3.- Embriogénesis secundaria

Las dificultades en el mantenimiento de la embriogénesis secundaria parece ser inherente a diferentes especies de eucaliptos. En general la ES es un proceso muy lento, con baja tasa de proliferación (Pinto et al., 2013). El mantenimiento de la capacidad embriogénica a través desubcultivos de callos embriogénicos en medio basal MS y B5 medio (Gamborg et al., 1968) complementado con 5 mg l⁻¹ ANA fueron informados respectivamente para *E. gunnii* (Boulay, 1987) y *E. citriodora* (Muralidharan y Mascarenhas, 1995). Con respecto a *E. globulus*, Pinto et al. (2004) han desarrollado un protocolo en el que los embriones somáticos se cultivaron en medio MS con 16,11 μM de ANA. Más tarde, estos autores informaron que la reducción de los niveles de ANA aumentó la proliferación de embriones somáticos globulares, lo que permitió la utilización de MS libre de hormonas (Pinto et al., 2008). En el estudio de *E. globulus* y el híbrido *E. saligna* × *E. maidenii*, el mantenimiento de las líneas embriogénicas secundarias se consiguió subcultivando embriones cotiledonares individuales o pequeños grupos de embriones globulares y de torpedos en medio con 16,11 μM de ANA a intervalos de 4 a 5 semanas. Para lo cual permanecieron en estas condiciones durante más de 3 años, dando una baja tasa de proliferación de embriones secundarios (Corredoira et al., 2015). La formación anómala de embriones somáticos es una característica que también se encuentra en todos los sistemas embriogénicos descritos para *Eucalyptus* spp. y otros miembros de la familia Myrtaceae (Canhoto et al., 1999).

3.4.- Morfología embrionaria

Los embriones somáticos pueden originarse a partir de una sola célula o en pequeños grupos de células que se diferencian en una estructura organizada. Con algunas excepciones en especies de Mirtáceas (Canhoto y Cruz, 1996; Canhoto et al., 1999) y en *Eucalyptus* sp. en particular hay una escasez notoria de información citológica, histológica y ultraestructural sobre los diferentes aspectos de la inducción y el desarrollo de embriones somáticos. En eucalipto algunos informes describen que los

embriones somáticos muestran semejanza morfológica con embriones cigóticos en diversas etapas del desarrollo (Muralidharan et al., 1989; Watt et al., 1999). Según Watt et al. (1991), células embriogénicas de *E. nitens* presentan características típicas al del sistema embriogénico cigótico, tales como citoplasma denso, pequeño volumen, núcleo prominente y vacuolas pequeñas. Estos autores presentaron un análisis histológico de embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo, aunque no se dieron más detalles sobre el origen del embrión. Se hicieron observaciones similares para *E. grandis* (Lakshmi Sita et al., 1986) y para *E. globulus* (Trindade, 1996).

Por otra parte, Bandyopadhyay y Hamill (2000), examinaron la ultraestructura de los embriones somáticos de *E. nitens* los cuales se lograron a partir de embriones somáticos maduros o de material derivado de ellos, y por hojas de plantas propagadas *in vitro*, y los compararon con embriones cigóticos maduros. En un estudio comparativo describieron la morfología interna y la organización celular de los embriones somáticos, la cual resultó ser similar a la observada en embriones cigóticos de *E. nitens*. En ambos tipos de embriones, los cotiledones estaban formados por células muy compactas con un gran número de vacuolas y citoplasma denso. En las zonas meristemáticas de cada embrión las células eran pequeñas y presentaban núcleos prominentes y nucleolos. Secciones longitudinales de los embriones somáticos demostraron que se trataba de una estructura bipolar completamente encerrada en una cubierta translúcida y estratificada, sin encontrar diferencias en su morfología interna y organización celular con respecto a embriones cigóticos (fig.2). Akula et al. (2000) demostraron el papel del calcio en la ruta morfogénica para ES en *E. urophylla*. Pinto et al. (2002) demostraron que el protocolo disponible para lograr ES en *E. globulus* conduce a fluctuaciones en la acumulación de reservas en el embrión durante el proceso de ES hasta la etapa de maduración del mismo. Además, estos autores mostraron que las reservas dentro de los cotiledones de embriones somáticos difieren con respecto a las reservas en embriones cigóticos. Esto refuerza la importancia de las reservas embriogénicas y que la manipulación de las condiciones de los medios puede mejorar, resultando ser embriones aparentemente normales,

sanos y aptos para la producción industrial. En ese estudio, la acumulación de almidón aumentó con el tiempo en los embriones somáticos globulares, pero sin embargo no presentaban cuerpos proteicos. Los cotiledones de embriones cigóticos eran más ricos en almidón, lípidos y proteínas que los cotiledones de embriones somáticos.

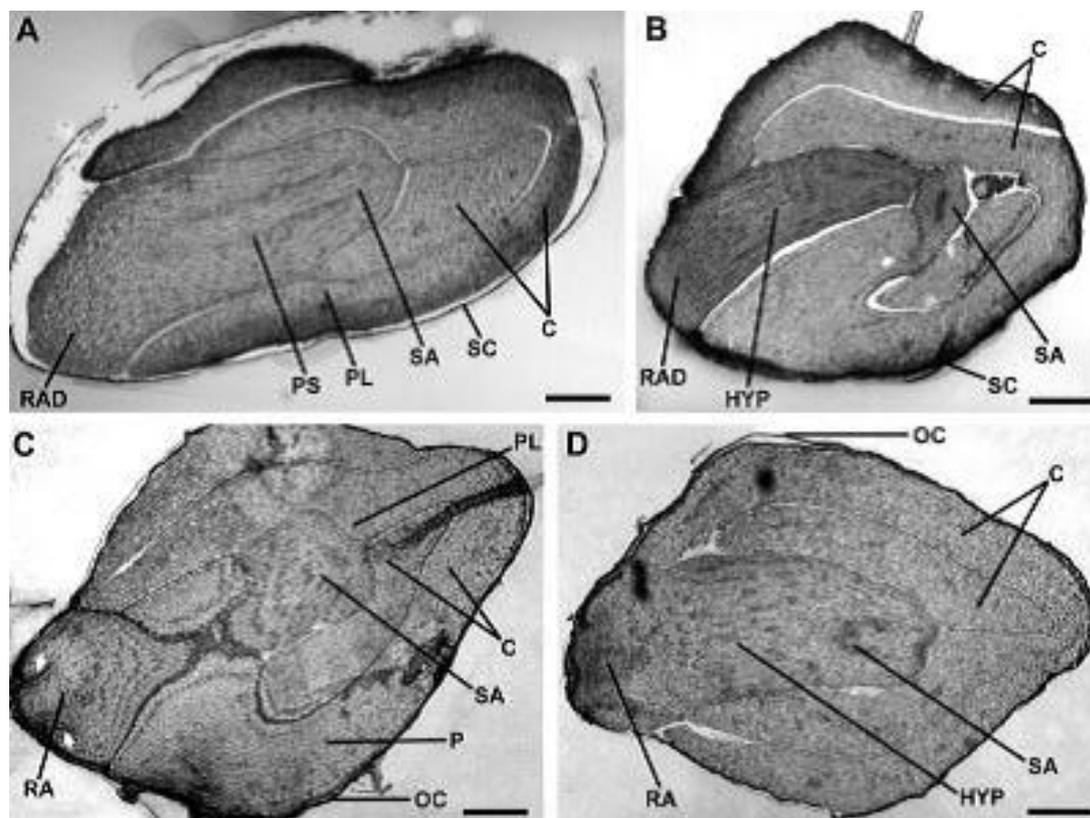


Figura 2. Microfotografía de embriones derivados de semillas maduras y embriones somáticos de *E. nitens*. A y B muestran secciones longitudinales de semillas con dos cotiledones doblados alrededor del eje raíz-brote del embrión. Obsérvese las cadenas procambiales entre la región hipocótilo y la conexión entre el cotiledón y el área meristémica apical (punta de flecha) en la Fig. 2 B. Barras 0,2 mm. C y D secciones longitudinales a través de embriones somáticos separados. Cada embrión somático contiene dos cotiledones, que poseen una epidermis superior e inferior, una capa de empalizada y tres \pm cuatro capas de células parenquimáticas. Los meristemas apicales de la raíz y del brote son bastante llamativos con paredes compactas y delgadas. Las flechas en la Fig. 2C indican la presencia de una capa celular que encierra parcialmente la región del meristema de la raíz que continua con la región cortical del embrión. Esta estructura no se observó en la región del meristema apical de la raíz de los embriones derivados de semillas. Barras 0,15 mm.

C, Cotiledón; HYP, hipocótilo; SC, cubierta seminal; OC, revestimiento exterior; P, parénquima en empalizada; PS, células procambiales; RAD, radícula; RA, meristema apical de la raíz; SA, meristema apical caulinar. Adaptado de Bandyopadhyay y Hamill (2000).

Por último, en un estudio comparativo mediante citometría de flujo, entre embriones somáticos y cigóticos con respecto a su contenido de material genético,

Pinto et al. (2004) no encontraron diferencias significativas entre los dos, lo que podría indicar que la embriogénesis somática es una técnica que mantiene la ploidía.

3.5.- Conversión de embriones a plantas

Al igual que en muchas especies leñosas, la recuperación de plantas provenientes de embriones somáticos del género *Eucalyptus* sigue siendo un paso difícil. Sólo se han descrito en un pequeño número de cultivos embriogénicos y con diferentes niveles del éxito. Por ejemplo en *E. dunnii*, *E. grandis* y *E. camaldulensis* la germinación se observó en tasas bajas (Watt et al., 1999; Prakash y Gurumurthi, 2010), mientras que en *E. citrodora* la frecuencia de germinación fue de 52% lo cual se obtuvo mediante la transferencia de embriones maduros en medio B5 libre de auxinas y consistencia líquida (Muralidharan y Mascarenhas, 1995).

Pinto et al. (2002) al utilizar material de embriones cigóticos maduros en *E. globulus*, lograron la inducción y finalmente la conversión de embriones somáticos a plantas con un 21% de éxito. Estos autores establecieron que la adición de suplementos nitrogenados como la caseína hidrolizada y la glutamina favorecen la inducción embriogénica; sin embargo, estimularon la formación de embriones somáticos anormales. Esta formación de embriones anormales, ya descrita previamente por Nugent et al. (2001) alcanzaron 61-100% en los tratamientos que indujeron la formación de embriones. Del mismo modo, Prakash y Gurumurthi (2005) describieron una alta frecuencia (54%) de formación de embriones somáticos maduros en *E. tereticornis* al transferir las células inducidas al medio MS (Murashige y Skoog, 1962) que contenía 2,22 μM BAP. En Corredoira et al. (2015), la conversión se realizó en medio basal MS obteniendo baja mortalidad al trasplantar las vitroplantas a los contenedores, el crecimiento de las raíces se produjo en la mayoría de los embriones somáticos, sin embargo, la conversión de embriones con desarrollo de raíces y brotes se observó en sólo unos pocos casos (<10%) de embriones somáticos (fig. 3).

Trindade y Pais (1999, 2003), trabajando con semillas y material adulto de *E. globulus*, describieron la formación de estadios globulares que representan embriones

somáticos y nódulos que posteriormente evolucionaron a plantas. Nugent et al. (2001) describieron la formación de todas las etapas del desarrollo, junto con la formación de embriones somáticos anormales.

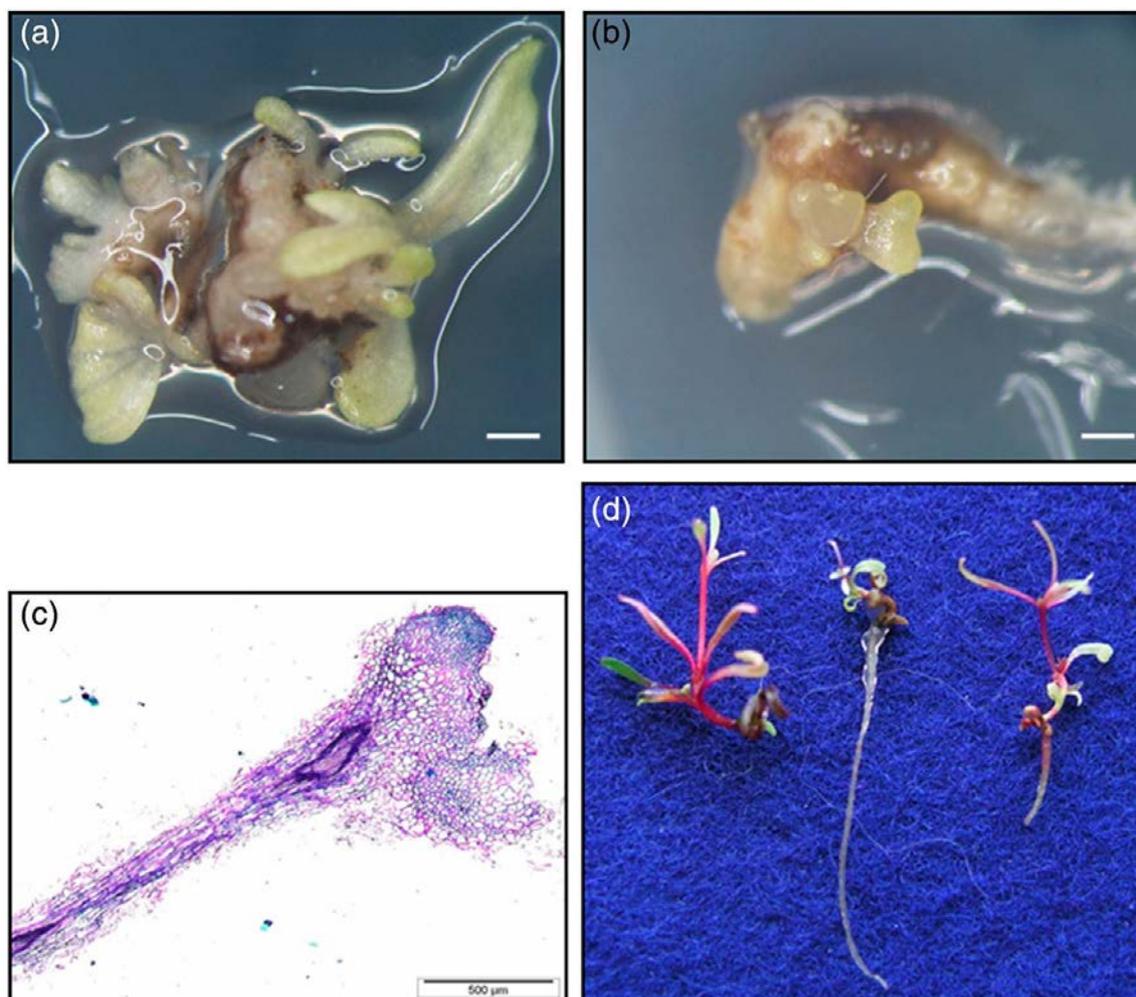


Figura 3. Proliferación a partir de embriogénesis secundaria y regeneración de plantas a partir de embriones somáticos de eucalipto. a) Embriones secundarios producidos a partir de un pequeño grupo de embriones somáticos en medio de regeneración conteniendo 16,11 μM de ANA. b) Embriones secundarios que se desarrollan en la región cotiledonar de un embrión somático primario. c) Sección longitudinal de un embrión en la fase cotiledonar que muestra un área celular meristemática en capas superficiales. d) Regeneración de plantas a partir de embriones somáticos después de 6 semanas de cultivo en medio de conversión a plantas de consistencia líquida. Barra de escala: a y b = 1 mm. a, byc = *E. globulus*; d = *E. saligna* x *E. maidenii*. Adaptado de Corredoira et al. (2015).

4.- CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

La producción de germoplasma con atributos especiales y que presentan capacidad de regenerar líneas celulares embriogénicas es de alto valor, lo que amerita sean almacenados de alguna manera. Los cultivos embriogénicos han sido utilizados para la aplicación de métodos biotecnológicos como la producción de semillas sintéticas (Lambardi et al., 2007), la producción a gran escala en biorreactores

(Denchev et al., 1992) o la realización de estudios de transformación genética (Jackson y Linskens, 2003).

La crioconservación implica el almacenamiento de tejidos vivos a muy bajas temperaturas (-196 °C) en Nitrógeno líquido para detener la mitosis y la actividad metabólica. El cese de la actividad biológica permite el almacenamiento de material sin alteración por un período de tiempo teóricamente ilimitado. Así, la crioconservación es una herramienta útil para el mantenimiento a largo plazo de germoplasma de plantas seleccionadas (Reed et al.,2008). Además, éste tipo de almacenamiento se considera que cumple con criterios básicos para la conservación *ex situ* como ser el mínimo mantenimiento de la integridad genética del material almacenado (Razdan y Cocking, 1997). Por otro lado, las técnicas de criopreservación proporcionan el almacenamiento de propágulos vegetales muy diferentes tales como polen, ápices de los brotes, ejes embrionarios, callos, cultivos embriogénicos y embriones somáticos. Por todas estas razones, la crioconservación puede aplicarse a una amplia gama de perspectivas como la preservación de los recursos genéticos, la conservación de productos biotecnológicos, la crioselección y crioterapia. Cuando la crioconservación se aplica a cultivos embriogénicos que derivan de explantes estables y cuya vía de regeneración sea directa, se evitan los efectos perjudiciales de los subcultivos a largo plazo, como la contaminación, la variación somaclonal o la pérdida de potencial morfogénico, que puede ocurrir con el tiempo. Además, el uso integrado de la embriogénesis somática y la crioconservación permitirían el almacenamiento y la recuperación eficiente de clones obtenidos a partir de tejidos jóvenes, genotipos élite, líneas celulares con buenos atributos y material genéticamente transformado hasta que los resultados de la prueba de campo estén disponibles (Engelmann, 1992). La totipotencia de tejidos juveniles de cultivo embriogénico puede ser asegurada, concomitante con los ensayos de selección de campo a largo plazo de 'árboles madres' élite (Benson,2008).

4.1.- Técnicas de crioconservación

Diferentes técnicas de crioconservación se utilizan en todo el mundo según el tipo de planta, las necesidades de la instalación involucrada, como personal, equipo o experiencia, y los objetivos de la misma. Los procedimientos exitosos de crioconservación tienen como objetivo niveles en los que la formación de cristales de hielo no es letal (Touchel et al., 1994). Es decir cuando un material biológico se somete a una temperatura de congelación, mientras menor sea su contenido de agua, menor será la probabilidad de que ocurran daños letales por la cristalización de la fase acuosa en el medio intracelular. Esto demuestra, que para cualquier proceso criogénico, el primer paso clave estará asociado a la reducción máxima posible del contenido de agua que puede llegar a congelar.

Dependiendo del mecanismo físico en el que se basan, hay dos tipos de crioconservación, por un lado, la que se utilizan protocolos convencionales o clásicos, y por otro lado, los nuevos procedimientos de vitrificación. En las técnicas clásicas de crioconservación, la congelación tiene lugar en presencia de hielo, mientras que en los protocolos basados en vitrificación se evita la formación de cristales de hielo (González-Arno et al., 2008).

Como se mencionaba anteriormente en los métodos convencionales o clásicos (fig.4.1), la deshidratación de las muestras se alcanza fundamentalmente durante el proceso de descenso de la temperatura. Para ello, el enfriamiento se realiza de forma lenta hasta un nivel intermedio, usualmente -40°C , antes de proceder a efectuar la inmersión rápida en el nitrógeno líquido. Para disminuir gradualmente la temperatura, se utilizan por lo regular equipos de congelación programable y se ajusta la tasa de enfriamiento al régimen deseado, más frecuentemente a $0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Para lograr el éxito de este proceso se requiere también del uso de soluciones que contengan sustancias con propiedades crioprotectoras. Entre ellas se destacan el dimetilsulfóxido (DMSO), la sacarosa y el glicerol. Los crioprotectores pueden actuar desde el interior o el exterior de las células, pero entre sus funciones más importantes está la

disminución del punto de congelación, la protección de la integridad de la membrana y el incremento de la viscosidad de la solución celular (González-Arno et al., 2008). Entre los procedimientos de crioconservación, la encapsulación-deshidratación, vitrificación, encapsulación-vitrificación y gotita-vitrificación son los más comúnmente disponibles (Engelmann, 2009; Reed, 2008). La encapsulación-deshidratación (fig.4.2) se considera uno de los métodos convencionales más usados, se basa en la tecnología desarrollada para la producción de semillas artificiales, donde los embriones somáticos son encapsulados en alginato, parcialmente deshidratados y luego sumergidos en Nitrógeno líquido (Dereuddre et al., 1992). Esta técnica ha sido aplicada en brotes apicales, así como también para suspensiones celulares y embriones somáticos de numerosas especies. Este procedimiento tiene la ventaja de ser relativamente simple, ya que facilita manipular al unísono una gran cantidad de tejidos atrapados en cápsulas de alginato de calcio y utiliza solamente la sacarosa como agente osmótico, además de que reemplaza el uso de equipos de congelación programable por la inmersión rápida al nitrógeno líquido. Acorde a este método, para el enfriamiento se colocan solamente en los crioviales las muestras encapsuladas, sin necesidad de adicionar la solución crioprotectora como en los métodos convencionales (González-Arno y Engelmann 2006). Otra ventaja de tipo práctico es que, después de la crioconservación, el retorno a la temperatura de cultivo normal se realiza generalmente de forma lenta, para lo cual se expone el material encapsulado al aire corriente en una campana de flujo laminar en lugar de utilizar un baño María a 40 °C. La selección del método de calentamiento rápido o lento dependerá del nivel de deshidratación que se logre alcanzar en las muestras, pues si no están lo suficientemente deshidratadas, puede ocurrir el fenómeno de la recristalización, al elevarse la temperatura y provocar un efecto letal en esta etapa del procedimiento. A la fecha, diversos protocolos de encapsulación-deshidratación se han adaptado para más de 20 especies vegetales, mediante los cuales se han obtenido resultados repetitivos y generalmente altos índices de recuperación después del almacenamiento en nitrógeno líquido (González- Arno y Engelmann, 2006). La vitrificación

(fig.4.3) implica la deshidratación de muestras con una solución altamente concentrada denominada Plant Vitrification Solution (PVS), tales como PVS2 (Sakai et al., 1990) y PVS3 (Nishizawa et al., 1993) seguidamente los explantes se sumergen en Nitrógeno líquido. El tratamiento con las PVS facilita la ocurrencia de la transición vítrea durante el enfriamiento rápido de las muestras por la inmersión directa al Nitrógeno líquido (Sakai y Engelmann, 2007). Para que los tejidos adquieran mayor tolerancia frente a la deshidratación con la PVS y a la crioconservación, antes de estos dos procesos se realiza un tratamiento breve, el cual se denomina "tratamiento de carga", en el que se utiliza una mezcla de sacarosa y glicerol, usualmente de 0,4 M de sacarosa+ 2 M de glicerol. Dado que los crioprotectores son tóxicos para las células vegetales, el rápido recalentamiento del crioprotector es importante para la recuperación de material. El lavado de los crioprotectores se lleva a cabo con una solución que contiene las sales minerales del medio de cultivo suplementada con 1,2 M de sacarosa (Sakai y Engelmann, 2007). Este procedimiento se los puede utilizar en los brotes apicales, las suspensiones celulares y los embriones somáticos de numerosas especies (Sakai y Engelmann, 2007; Sakai et al., 2008). La encapsulación-vitrificación es una combinación de procedimientos de encapsulación y vitrificación, y ha tenido éxito con los brotes apicales de un número creciente de especies (Sakai y Engelmann, 2007). La gota-vitrificación es un método de vitrificación la cual se diferencia del procedimiento que le dio origen en que se logra una ultra rápida velocidad de enfriamiento y de calentamiento de las muestras, dado que en lugar de usar crioviales, los tejidos se transfieren a una gota o a un volumen muy reducido de la solución vitrificadora colocada sobre una pequeña lámina de papel aluminio, en la que son inmersas directamente al Nitrógeno líquido (Panis et al., 2005). La vitrificación por gotita se ha aplicado ampliamente a varias especies incluyendo patatas, espárragos y manzanas (Sakai y Engelmann, 2007). Una ventaja de esta técnica es el gran aumento de refrigeración y calentamiento, gracias al pequeño volumen de solución crioprotector utilizado en las tiras de aluminio. Esto evita el efecto amortiguador del criotubo y el gran volumen de crioprotector utilizado, lo que en otras técnicas de

vitrificación ralentizan los procesos de congelación y descongelación (Sakai y Engelmann, 2007).

Hasta ahora sólo se ha informado la criopreservación de una colección de germoplasma de brotes cultivados en *in vitro* de trece líneas de *Eucalyptus* spp. La cual consta de dos líneas de *E. grandis* x *E. camaldulensis*, siete líneas de *E. urophylla* x *E. grandis*, una línea de *E. grandis*, dos líneas de *E. grandis* x *E. urophylla*, y una línea de *E. camaldulensis*. Utilizando el método de vitrificación por gotita, logrando entre un 38% y el 85% de sobrevivencia después del Nitrógeno líquido, con una exposición de 30 minutos en la PVS2 (Kaya et al., 2013).

Por otro lado se logró en *E. citriodoralis* conservación de embriones somáticos a través de procedimientos de encapsulación (Muralidharan y Mascarenhas, 1995). La aplicación de este método de conservación, junto con la criopreservación, todavía es incipiente para este género, pero su éxito depende en gran medida del desarrollo de protocolos fiables (Padayachee et al., 2009).

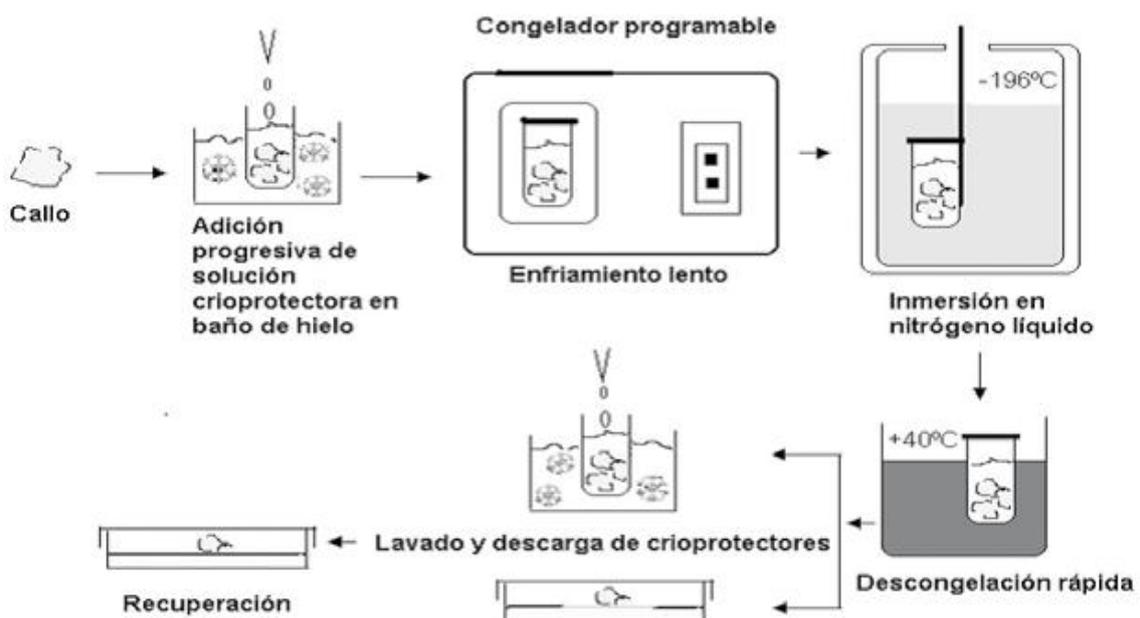


Figura 4.1. Representación gráfica de un protocolo convencional. Fuente: González-Arno (2012).

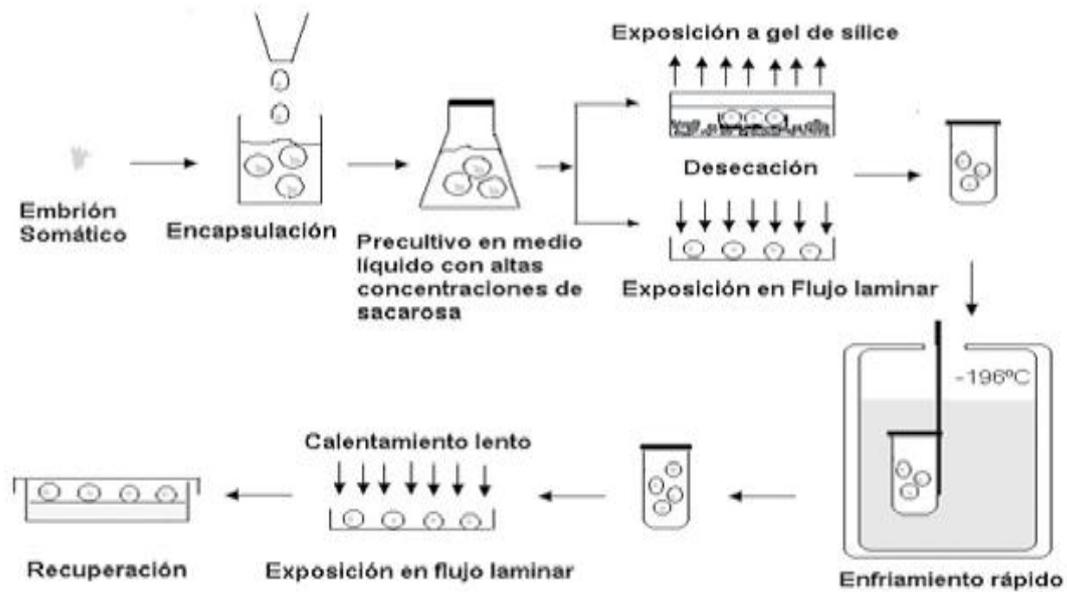


Figura 4.2. Representación gráfica de un protocolo de encapsulación-deshidratación. Fuente: González-Arno (2012).

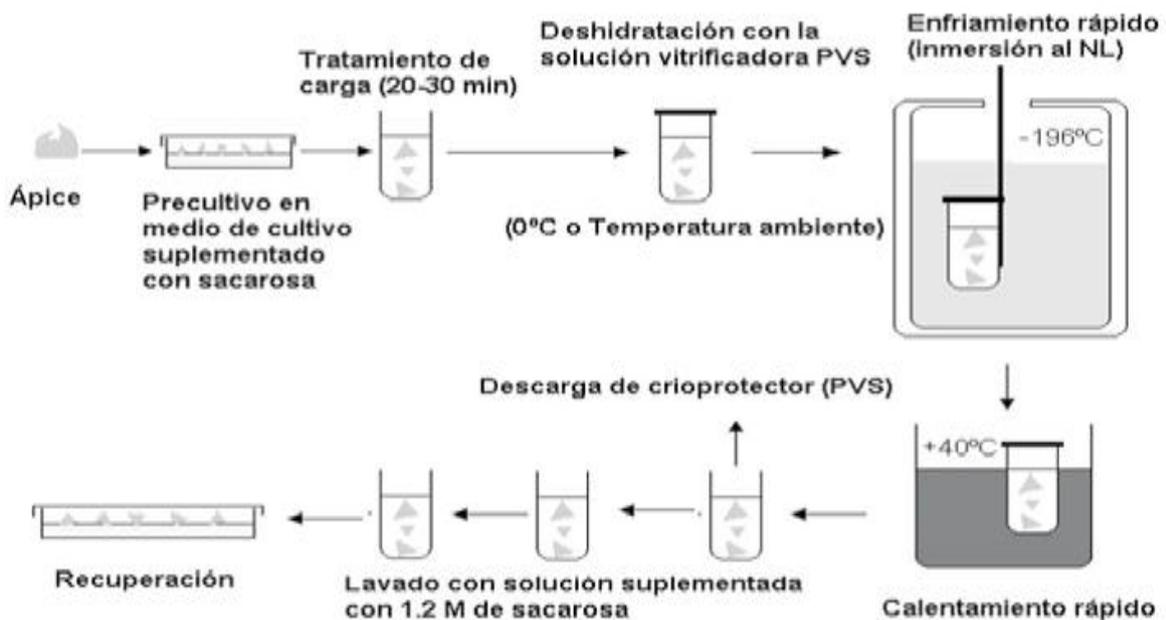


Figura 4.3. Representación gráfica de un protocolo de vitrificación. Fuente: González-Arno (2012).

5.- RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

La propagación a gran escala de genotipos, asociada a un sólido programa de mejoramiento, es necesaria para lograr bosques más productivos. Un número creciente de trabajos están siendo publicados actualmente relacionados con la propagación *in vitro* de distintas especies de eucalipto debido a su importancia comercial ascendente en el mercado mundial. En este trabajo se revisaron los avances más relevantes y recientes sobre el cultivo *in vitro* de eucalipto. Se prestó especial atención al proceso de ES, a partir de la inducción de embriones somáticos culminando en plantas enteras.

De acuerdo a las distintas revisiones bibliográficas tenidas en cuenta se puede considerar que el ANA es el regulador del crecimiento de las plantas más utilizado para la inducción de ES, aunque recientemente el picloram se ha utilizado con éxito en explantes obtenidos de árboles adultos. El medio MS es el más utilizado para la inducción de ES en las angiospermas leñosas, incluyendo varias especies de eucaliptos. Asimismo se registraron resultados con el medio B5 para la inducción de ES y para su regeneración.

También se observó que debido a los altos inconvenientes de oxidación a causa de los polifenoles de los eucaliptos, se realizaron ensayos con distintos antioxidantes, dando como resultado que si bien redujeron la acumulación de compuestos fenólicos también se redujo severamente la inducción de ES y su exposición continua terminó inhibiendo completamente la respuesta de ES.

Por otra parte, las dificultades en el mantenimiento de la embriogénesis secundaria parece ser inherente a diferentes especies de eucaliptos. En general la ES es un proceso muy lento, con baja tasa de proliferación. Aun así, más tarde, ciertos autores informaron que la reducción de los niveles de ANA aumenta la proliferación de embriones somáticos globulares, lo que permitió la utilización de MS libre de hormonas.

Se examinó la ultraestructura de los embriones somáticos y los compararon con embriones cigóticos maduros, lo cual resultaron ser embriones aparentemente normales, sanos y aptos para la producción a gran escala.

Al igual que en muchas especies leñosas, la recuperación de plantas provenientes de embriones somáticos del género *Eucalyptus* sigue siendo un paso difícil, aun así varios autores lograron obtener plantas en bajas proporciones pero sanas y normales.

No obstante debido a la gran cantidad de investigaciones que se vienen realizando desde los años '80, todavía hay una brecha en el conocimiento de los mecanismos implicados en la regulación de la ES. Por esto es necesario continuar con investigaciones dirigidas a establecer una metodología de ES para las distintas especies de eucalipto, ya sea utilizando diversos explantes en particular de partes vegetativas, medios de cultivo, reguladores de crecimiento, material elite, etc. con el objeto de elaborar una mejor estrategia para establecer un sistema capaz de ser aplicado a nivel industrial.

A pesar de que hay varios métodos de crioconservación, en eucalipto solo se registraron resultados con las técnicas de encapsulación y vitrificación por gotita, quedando un abanico de posibilidades para aplicar.

De la misma manera, es necesario continuar con las investigaciones dirigidas a establecer una metodología de crioconservación, que permitan no solo la conservación de los embriones a largo plazo provenientes de individuos selectos, sino también promover la embriogénesis secundaria con el objeto de crear semillas sintéticas en un futuro no muy lejano.

6.-BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal D, Kumar A, Gupta P, Reddy M (2010) Factors affecting *in vitro* propagation and field establishment of *Chlorophytum borivillianum*. Biol Plant 54:601.
- Akula A, Becker D, Bateson M (2000) High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in a selected tea clone, 'TRI-2025', by temporary immersion. Plant Cell Rep 19:1140-1145.
- Albaugh J, Dye P, King, J (2013) *Eucalyptus* and Water Use in South Africa. Int J For Res (852540):11.
- Arezkzi O, Boxus P, Kevers C, Gaspar T. (2000) Hormonal control of proliferation in meristematic agglomerates of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, v. 36, n. 5, pp. 398-401.
- Arnold R, Harwood C, Matheson C, Spencer D (2002) Choice of species and opportunities for genetic improvement. In: Nambiar S., Cromer R. and Brown A. (eds), Restoring Tree Cover to the Murray-Darling Basin. CSIRO Forestry and Forest Products, Canberra, pp. 13–20.
- Arya I, Sharma S, Chauhan S, Arya S (2009) Micropropagation of superior *Eucalyptus* hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn x *E. tereticornis* Sm) and FRI-14 (*Eucalyptus torelliana* FV Muell x *E. citriodora* Hook): A commercial multiplication and field evaluation. Afr J Biotech 8:5718-5726.
- Azmi A, Noin M, Landré P, Prouteau M, Boudet A, Chriqui D (1997) High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls: ontogenesis and ploidy level of the regenerants. Plant Cell Tissue Organ Cult 51:9-16.
- Bandyopadhyay S, Cane K, Rasmussen G, Hamill J (1999) Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. Plant Sci 140:189-198.

- Bandyopadhyay S, Hamill J (2000) Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and Comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. *Ann Bot* 86:237–244.
- Beale I, Ortiz E (2013) El Sector Forestal Argentino: Eucaliptos. *Revista de Divulgación Técnica Agrícola y Agroindustrial-FCA (UNCa)* p. 53.
- Bedon F, Villar E, Vincent D, Dupuy J, Lomenech A, Mabialangoma A, Chaumeil P, Barré A, Plomion C, Gion J (2012) Proteomic plasticity of two *Eucalyptus* genotypes under contrasted water regimes in the field. *Plant Cell Environ* 35:790-805.
- Benson E(2008). Cryopreservation theory. In: Reed, B. (ed). *Plant cryopreservation. A practical guide*. Covallis, USA. Springer.pp. 23-29.
- Blomstedt C, Taylor P, Singh M, Knox R (1991) The Identification of an Anther Specific Antigen in Brassica Species using a Heterologous Monoclonal Antibody. *Ann Bot Vol. 80 (2)* pp: 197-204.
- Boulay M (1987) Recherches préliminaires sur l'embryogenèse somatique d'*Eucalyptus gunnii*. *Ann Rech Silvi Assoc Cellulose* 23-37.
- Brondani G, de Wit Ondas H, Baccarin F, Gonçalves A, de Almeida M (2012) Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal microgarden. *In vitro Cell Dev Biol-Plant* 48:478-487.
- Brooker M (2000) A new classification of the genus *Eucalyptus*. *Austral. Syst. Bot.* 13(1) pp: 79–148.
- Bunn E, Senaratna T, Sivasithamparam K, Dixon K (2005) *In vitro* propagation of *Eucalyptus physalis* L. Johnson and K. Hill., a critically endangered relict from Western Australia. *In vitro Cell Dev Biol-Plant* 41:812-815.
- Canhoto J, Cruz G (1996) Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). *Protoplasma* 191:34-45.
- Canhoto J, Lopes M, Cruz G (1999) Somatic embryogenesis in myrtaceous plants. In: Jain S, Gupta P, Newton R (eds) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol 55. Saskatoon, Canada. Springer, pp 293-340.

- Chauhan R, Veale A, Cathleen M, Strauss S, Myburg A (2014) Genetic Transformation of *Eucalyptus* Challenges and Future Prospects. In: Ramawat K, Mérillon J, Ahuja M (eds) Tree Biotechnology. CRC Press, p 392.
- Chang M, Hadwiger L, Horovitz D (1992) Molecular characterization of a pea P-1,3-glucanase induced by *Fusarium solani* and chitosan challenge. Plant Mol Biol 20 609-618.
- Close D, Davies N, Beadle C (2001) Temporal variation of tannins (galloylglucoses), flavonols and anthocyanins in leaves of *Eucalyptus nitens* seedlings: implications for light attenuation and antioxidant activities. Functional Plant Biol 28:269-278.
- Corredoira E, Ballester A, Ibarra M, Vieitez A (2015) Induction of somatic embryogenesis in leaf and shoot apex explants of shoot cultures derived from adult *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus saligna* x *E. maidenii* trees. Tree Physiol 35:678-690.
- Correia D, Gonçalves A, Couto H, Ribeiro M (1995) Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. IPEF, Piracicaba 48:107-116.
- Correia S, Lopes M, Canhoto J (2011) Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.(tamarillo). Trees 25:1009-1020.
- Costa e Silva J, Borralho N, Potts B (2004) Additive and non-additive genetic parameters from clonally replicated and seedling progenies of *Eucalyptus globulus*. Theor Appl Genet 108:1113-1119.
- de Assis T, Fett-Neto A, Alfenas A (2004) Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: Walter C, Carson M (eds) Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century. Research Signpost, Trivandrum, pp 303-333.
- Denchev P, Kuklin A, Scragg A (1992) Somatic embryo production in bioreactors. Journal Biotechnol.26: 99-109.

- Dereuddre J (1992) In: Dattée Y, Dumas C y Gallais A (eds) Reproductive Biology and Plant Breeding, (eds), Springer Verlag, Berlin, pp 291-300.
- Diallo N, Duhoux. E (1984) Organogenese et multiplication "*in vitro*" chez l' *Eucalyptus camaldulensis*, J. Plant Physiol, Vol.115; pp.177-182.
- Driver J, Kuniyuki A (1984) *In vitro* propagation of paradox walnut rootstocks. HortSci, 19: 507-509.
- Engelmann F (2009) Use of Biotechnologies for Conserving Plant Biodiversity. ISHS Acta Horticulturae 812: III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. ActaHort. 812:63-82
- Engelmann F (1992) Cryopreservation of embryos. Reproductive biology and plant breeding. Berlin: Springer Verlag, pp. 281–290.
- Eldridge K, Davidson J, Harwood C, van Wyk G (1994) Eucalypt Domestication and Breeding. Clarendon Press, New York: Oxford University Press. 288 p.
- Fehér A (2015) Somatic embryogenesis stress-induced remodeling of plant cell fate. Biochim Biophys Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms 1849:385-402.
- Gaj M (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regul 43:27-47.
- Gamborg O, Miller R, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experim Cell Res 50:151-158
- Girijashankar V (2011) Genetic transformation of *Eucalyptus*. Physiol Molec Biol Plants 17:9-23.
- Girijashankar V (2012) *In vitro* regeneration of *Eucalyptus camaldulensis*. Physiol Molec Biol Plants 18:79-87.
- González-Arno M, Engelmann F (2006) Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane. CryoLetters 27:155-168.
- González-Arno M, Panta A, Roca W, Escobar R, Engelmann F (2008) Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and

somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 92:1-13.

- González-Arno M, Mascorro-Gallardo J, Osorio-Sáenz A, Valle-Sandoval M, Engelmann F (2012) Improvements in tolerance to cryopreservation using shoot tips of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitam.) from genetically modified plants that accumulate trehalose. In: Allyson EH (ed) *Cryogenics: theory, processes, and applications*. Nova Science, New York, pp 137-148.
- Goodger J, Woodrow I (2008) Selection gains for essential oil traits using micropropagation of *Eucalyptus polybractea*. *For Ecol Manag* 255:3652-3658.
- Granda V, Cuesta C, Alvarez R, Ordas R, Centeno M Rodriguez A (2011) Rapid responses of C14 clone of *Eucalyptus globulus* to root drought stress: Time-course of hormonal and physiological signaling. *J Plant Physiol* 168(7):661-70.
- Iglesias-Trabad G, Carbaeira-Tenreiro R Folgueiia-Lozano J (2009) *Eucalyptus universalis*. Global cultivated eucalypt forest map. Version 1.2 In: GITForestry Consulting's *Eucalyptologies: Information resources on Eucalyptus cultivation worldwide*. Key: INRMM:13780278
- Iglesias-Trabad G, Wilstermann D (2008). *Eucalyptus universalis*. Global cultivated eucalypt forests map 2008. In GIT: Forestry Consulting's *Eucalyptologies: Information resources on Eucalyptus cultivation worldwide*. Retrieved from <http://www.git-forestry.com/> (Jan 19, 2009).
- Hartney V (1981) Vegetative propagation of the eucalypts. *Aust For Res*, pp. 10-191.
- Hermesen E, Gandolfo M, Zamaloea M (2012) The fossil record of *Eucalyptus* in Patagonia. *Am. J. Botany* 99(8): 1356–1374.
- Jackson J, Linskens H (2003) *Genetic Transformation of Plants. Molecular Methods of Plant Analysis*. Vol. 23. Springer, Berlin. ISBN 3-540-00292-8, pp 127–146.
- Kaya E, Alves A, Rodrigues L, Jenderek M, Hernandez-Ellis M, Ozudogru A, Ellis D (2013) Cryopreservation of *Eucalyptus* genetic resources. *CryoLetters* 34 (6), 608-618.

- Lainé E, David A (1994) Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. Plant Cell Rep 13: 473-476.
- Lakshmi Sita G, Raghava Ram N, Vaidyanathan C (1979) Differentiation of embryoids and plantlets from shoot callus of sandalwood. Plant Sci Lett 15: 265-270.
- Lakshmi Sita G, Rani S, Rao K (1986) Propagation of *Eucalyptus grandis* by tissue culture. In: Eucalyptus in India. past, present and future. Proc Natl Semi Kerala Forest Resh Inst, Peechi Kerala India, pp 318-321.
- Lambardi M, Halmagyi A, Benelli C, Carlo A, de Vettori C (2007) Seed cryopreservation for conservation of ancient Citrus germplasm. Adv Hortic Sci 21: 198-202
- Le Roux J, Van Staden J (1991) Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* a review. Tree Physiol 9:435-477.
- Lipavská H, Konrádová H (2004) Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. *In vitro* Cell Dev Biol-Plant 40:23-30.
- Lloyd G, McCown B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. In: Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society, pp 421-427.
- Mankessi F, Saya AR, Toto M, Monteuis O (2010) Propagation of *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* clones by rooted cuttings: Influence of genotype and cutting type on rooting ability. Propag Ornament Plants 10:42-49.
- Marcó, M. (2005) Programa de Mejoramiento Genético de *Eucalyptus grandis* en INTA. En: Jornadas de Actualización Técnica "Mejoramiento genético de pinos y eucaliptos subtropicales". EEA INTA Concordia. ISBN: 978-987-679-144-1.
- Merkle S, Parrott W, Flinn B (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In vitro* Embryogenesis in Plants 20:155-203.
- Mokotedi M, Watt M, Pammenter N (2010) Analysis of differences in field performance of vegetatively and seed-propagated *Eucalyptus* varieties II: vertical uprooting resistance. Southern For 72:31-36.

- Morabito D, Mills D, Prat D, Dizengremel P (1994) Response of clones of *Eucalyptus microtheca* to NaCl *in vitro*. *Tree Physiol.* 14, 201-210.
- Mullin T, Park Y (1992) Estimating genetic gains from alternative breeding strategies for clonal forestry. *Can J For Res* 22:14-23.
- Muralidharan E, Gupta P, Mascarenhas A (1989) Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Rep* 8:41-43.
- Muralidharan E, Mascarenhas A (1987) *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *E. camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Rep* 6:256-259.
- Muralidharan E, Mascarenhas A (1995) Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol 44-46. *Forestry Sciences*. Springer, The Netherlands, pp 23-40.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Myburg A, Grattapaglia D, Tuskan G, Hellsten U, Hayes R, Grimwood J, Jenkins J, Lindquist E, Tice H, Bauer D (2014). The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* 510: 356–362.
- Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matsuzawa T (1993). Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Sci* 91: 67-73.
- Nourissier S, Monteuis O (2008) *In vitro* rooting of two *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* mature clones. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 44: 263-272.
- Nugent G, Chandler SF, Whiteman P y, Stevenson T (2001) Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 67:85-88.
- Oller J, Toribio M, Celestino C, Toval G (2004) The culture of elite adult trees in a genetic improvement programme through *Eucalyptus globulus* Labill. Clonal micropropagation. *Eucalyptus in a Changing World*. Proc. Of IUFRO congress, Portugal October. Aveiro 11-15.

- Ouyang Q, Li Q, Peng H (1980) Preliminary report on the development of embryoid from *Eucalyptus*. Acta Phytophysiol Sin 6: 429-432.
- Ouyang Q, Peng H, Li Q (1981) Studies on the development of embryoids from *Eucalyptus callus*. Sci. Silvae Sin17:1-7.
- Padayachee K, Watt M, Edwards N, Mycock D (2009) Cryopreservation as a tool for the conservation of *Eucalyptus* genetic variability: concepts and challenges. Southern For 71:165-170.
- Panis B, Piette B, Swennen R (2005) Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. Plant Sci 168:45-55.
- Park Y, Lelu-Walter M, Harvengt L, Trontin J, MacEacheron I, Klimaszewska K, Bonga J (2006) Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. Plant Cell Tissue Organ Cult 86:87-101.
- Phillips G (2004) *In vitro* morphogenesis in plants-recent advances. In Vitro Cell Develop Biol. 40:342-345.
- Pinto G, Araújo C, Santos C, Neves L (2013) Plant regeneration by somatic embryogenesis in *Eucalyptus* spp.: current status and future perspectives. Southern For 75:59-69.
- Pinto G, Correia S, Corredoira E, Ballester A, Correia B, Neves L, Canhoto J (2016) *In vitro* culture of *Eucalyptus*: where do we stand? In: Park Y, Bonga J, Moon H (eds) Vegetative Propagation of Forest Trees. National Institute of Forest Science, Seoul pp 441-462.
- Pinto G, Loureiro J, Lopes T, Santos C (2004) Analysis of the genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. somatic embryos by flow cytometry. Theor Appl Genet 109:580-587.
- Pinto G, Santos C, Neves L, Araújo C (2002) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. Plant Cell Rep 21:208-213.

- Pinto G, Silva S, Loureiro J, Costa A, Dias MC, Araújo C, Neves L, Santos C (2011) Acclimatization of secondary somatic embryos derived plants of *Eucalyptus globulus* Labill.: an ultrastructural approach. *Trees* 25:383-392.
- Pinto G, Silva S, Park Y, Neves L, Araújo C, Santos C (2008) Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 95:79-88.
- Pita P, Pardos J (2001) Growth, leaf morphology, water use and tissue water relations of *Eucalyptus globulus* clones in response to water deficit. *Tree Physiol* 21(9):599-607.
- Poke F, Vaillancourt R, Potts B, Reid J (2005) Genomic research in *Eucalyptus*. *Genetica* 125:79-101.
- Potts B, Dungey H (2004) Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. *New For* 27:115-138.
- Prakash M, Gurumurthi K (2010) Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Tissue Org Cult* 100(1):13–20.
- Prakash M, Gurumurthi K (2005) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis* Sm. *Current Sci* 88:1311-1316.
- Qin C, Kirby E (1990) Induction of shoots and embryo-like structures in cultures derived from juvenile and adult explants of *Eucalyptus* spp. In: Abstracts, VII International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. pp 24-29.
- Razdan M, Cocking E (1997) Conservation of plant genetic resources *in vitro*. General aspects. Science Publishers, Enfield, NH. Vol. 1.
- Reed B (2008) In *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, (ed) Reed BM, Springer, New York, USA, pp 333-364.
- Sharma S, Ramamurthy V (2000) Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. *Plant Cell Reports*, v. 19, n. 5, pp 511-518.

- Sakai A, Engelmann F (2007) Vitrification, encapsulation-vitrification and dropletvitrification: a review. *CryoLetters* 28:151-172.
- Sakai A, Hirai D, Niino T (2008) In *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, (ed) Reed BM, Springer, New York, USA, pp 33–57.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. (1990) Cryopreservation of Nucellar Cells of Navel Orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by Vitrification. *Plant Cell Rep* 9: 30-33.
- Sánchez Acosta M, Vera L (2005) Situación forestoindustrial de Argentina al 2005. III Simposio Iberoamericano de Gestión y Economía Forestal, Ubatuba, San Pablo Brasil, pp 23-44.
- Secretaría de Estado de la Producción de Entre Ríos. (2002) VIII Relevamiento de Industrias Forestales primarias y plantaciones de la costa del Río Uruguay de Entre Ríos. XVII Jornadas Forestales de Entre Ríos. INTA Concordia. p.11.
- Steinmacher D, Clement C, Guerra M (2007) Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 89:15-22
- Termignoni R, Jobin C, Morais L (1998) Somatic embryogenesis in *Eucalyptus* spp.: regeneration systems from elite clones. In: IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Jerusalem, Israel. pp 14-19.
- Termignoni R, Wang P, Hu C (1996) Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 45:129-132.
- Teulier C, Marque C (2007) *Eucalyptus*. In: Pua E-C, Davey MR (eds) *Transgenic Crops V*, Vol 60. Springer, Berlin Heidelberg, pp 387-406.
- Thorpe T (2000) Somatic embryogenesis: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *Kor J Plant Tissue Cult* 27:245-258.
- Touchell D, Dixon K (1994) Cryopreservation for seedbanking of Australian species. *Ann. Bot.* 40:541-546
- Trindade M (1996) *Eucalyptus globulus* Labill: systems for *in vitro* regeneration. PhD thesis, Universidade de Lisboa.

- Trindade M, Pais M (2003) Meristematic nodule culture: A new pathway for *in vitro* propagation of *Eucalyptus globulus*. *Trees* 17(4):308-315.
- Trindade H, Pais M (1999) Morphogenesis induction and somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. En Proc. Cong. Int. Aplicación de la Biotecnología a la Genética Forestal. Vitoria-Gasteiz. España. pp. 189-193.
- Turnbull J (1999) Eucalypt plantations. *New Forests* 17: 37-52.
- Van Staden J, Elmer-English CW, Finnie JF (1991) Physiological and anatomical aspects related to *in vitro* shoot initiation in *Bowiea volubilis*. *S. African J. Bot.* 57, 352-355.
- Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2008) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:233-249.
- Warrag E, Lesney M, Rockwood D (1990) Micropropagation of field tested and superior *Eucalyptus grandis* hybrids *New Forests* 4, pp. 67-79.
- Watt M, Blakeway F, Cresswell C, Herman B (1991) Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. *South Afric For J* 157:59-65.
- Watt M, Blakeway F, Termignoni R, Jain S (1999) Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunnii*. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Vol 59. Forestry Sciences, Springer, pp 63- 78.
- Watt M, Berjak P, Makhathini A, Blakeway F (2003) *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 75:233-240.
- Watt M (2014) Genotypic-unspecific protocols for the comercial micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *nitens* and *E. grandis* × *urophylla*. *Turkish J Agric For* 38:125-133.
- Yasodha R, Sumathi R, Gurumurthi K (2004) Micropropagation for quality propagule production in plantation forestry. *Indian J Biotechnol* 3:159-170.

