



## GUIA DE APOYO DOCENTE

# PRODUCCIÓN VEGETAL Y ESTABLECIMIENTO DE PLANTACIONES

## TEMA 3.- PROPAGACIÓN ASEXUAL DE PLANTAS

### I.- Generalidades

La propagación vegetativa es la forma práctica como el hombre usa los principios de la reproducción asexual agámica, en la cual se logra un desarrollo de plantas a través de tejidos diferenciados, en contraste a la otra forma de reproducción asexual, donde interviene un gameto sin que se cumpla el proceso de fecundación. Los principios bajo los cuales se trabaja con la propagación vegetativa en la mejora genética, son los de constancia genética y constancia fisiológica.

El principio de la constancia genética postula que las partes de una planta propagadas vegetativamente mantienen siempre la misma constitución genotípica que el individuo del cual provienen. Esto está determinado por el hecho de que el proceso de desarrollo se cumple a través de simples divisiones mitóticas, donde no hay la recombinación génica, manteniéndose por lo tanto la carga de los genes de las células que conforman el tejido base, salvo el caso de ocurrencia de alguna mutación.

El principio de la constancia fisiológica postula que las partes propagadas mantienen las mismas características fisiológicas del árbol original. En este sentido, si el árbol a propagar es fisiológicamente maduro, las partes propagadas también lo son, continuando su proceso reproductivo después de pasado el tiempo de reacción al formar sus propias raíces o consolidar su unión con otro tejido de sustentación independiente. La excepción a esta regla estriba en el fenómeno de ciclofisis, o de retroceso fisiológico a un estado juvenil, que a menudo está ligado a la condición de la parte de la cual se obtuvo la parte propagada.

El individuo a propagar, se denomina ortet u orteto; cada parte propagada se conoce como ramet o rameto, y el conjunto de ramets del mismo ortet forma un clon. El ortet y el clon son, entonces, lo mismo, con la diferencia de que el primero es el individuo original, mientras que el segundo es ya en condición seccionada.

### II.- Métodos Tradicionales de Propagación Vegetativa

Se pueden distinguir tres métodos tradicionales de la propagación vegetativa: estacas, acodos e injertos. Los dos primeros buscan promover el enraizamiento de una parte vegetativa, mientras que el tercero busca la soldadura o fusión de dos tejidos. Por otro lado, tanto la estaca como el injerto se realizan separados del ortet, mientras que el acodo se realiza aún adherido al mismo.

**2.1.- Estaca:** Una estaca o esqueje, es una parte seccionada del individuo, que se coloca en un medio propicio para la formación de raíces, la cual puede ser de ramas, de raíces, de hoja, etc. El enraizamiento está determinado, entre otros factores, por la edad y la condición de la estaca, viéndose favorecido por las condiciones del medio de enraizamiento, el tiempo de corte y el uso de sustancias estimulantes, como reguladores de crecimiento o fitohormonas.

Mientras más joven y sano es el ortet, mayores son las posibilidades de enraizamiento de las estacas, coincidiendo esto con la etapa de mayor tasa de crecimiento de las plantas, como lo es la edad juvenil. Al llegar a la edad adulta, se reduce el potencial de crecimiento vegetativo, a la par de incrementarse el desarrollo reproductivo; de la misma forma, muchas partes de la planta, especialmente ramas y fuste, se significan, con lo que se dificulta el poder regenerativo de las células.

En cuanto a la condición de las estacas, las partes pueden ser leñosas, semileñosas y herbáceas. Las estacas de una condición semileñosa tienen mejores posibilidades de desarrollo, que las muy leñosas y las herbáceas; entre las dos últimas, influyen en la primera la presencia de muchas células muertas y en la segunda la alta susceptibilidad al desecamiento. Un ambiente húmedo, con temperatura entre 25°C y 28°C y un substrato arenoso con cierto contenido de materia orgánica, favorecen la formación de raíces.

La aplicación de compuestos hormonales, estimula en muchas especies la formación de raíces. Entre las sustancias hormonales más usadas destacan el ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB), en soluciones entre el 0,1% y el 1%, o en mezclas con polvo en concentraciones de 1.000 a 6.000 ppm, según las características de las especies. Para algunas especies, de difícil enraizamiento, es posible usar concentraciones hasta de 10.000 ppm; en todo caso es necesario un proceso previo de investigación. En el caso de soluciones, se mantiene la parte basal de la estaca en la solución, por unas 24 horas en ambiente de salón (18-20 °C), en semi-oscuridad, o una media hora bajo condiciones de vacío. En el caso de mezclas sólidas, la aplicación de la misma a la parte basal (húmeda) de las estacas se hace inmediatamente antes de su establecimiento, evitándose el riego directo por unas 24 horas.

Para la preparación de la mezcla, se diluye primero la cantidad deseada de hormona en unos 25 ml de alcohol etílico, formando una pasta no muy gruesa y se deja secar un poco; luego, se esparce sobre la cantidad apropiada de talco o yeso, mezclándose bien, en forma continua, por una media hora, para garantizar que la hormona quede bien repartida en el adherente. Posteriormente, se tamiza usando una malla bastante fina. El polvo obtenido, se deja secar bien y se guarda bajo condiciones de poca luz.

Tanto para la forma líquida como para la sólida, es recomendable preparar solo la cantidad necesaria para un uso inmediato, en razón de la descomposición de la sustancia y el costo de la misma. La aplicación de riego es recomendable hacerla en forma de aspersión fina, idealmente de tipo nebuloso, lo que favorece el mantenimiento de una alta humedad en el ambiente y no propicia un drenaje muy acelerado, aún en suelos muy arenosos.

Debido al uso de alta humedad y alta temperatura, es conveniente la aspersión semanal de un fungicida, a fin de prevenir la proliferación de hongos. En caso de la aparición de ataques, se deben usar aspersiones dos o tres veces por semana. La dosis dependerá del producto en cuestión. El tiempo más favorable para la propagación de las estacas de especies de zonas con épocas de sequía y lluvia, es aquel en que las yemas están apenas comenzando a definirse. Esto ocurre unas dos a cuatro semanas antes del comienzo de las lluvias (mediados de marzo a mediados de abril, en Venezuela).

En todo caso, en la estaca debe asegurarse la presencia de por lo menos dos puntos bien definidos de yemas, lo que a veces es difícil en las estacas muy gruesas, en cuyo caso sirve como guía una consistencia no muy lignificada. Algunas especies son propagadas con facilidad a partir de rebrotes (ejemplo, los *Eucalyptus*), aprovechando la capacidad de ellas de retoñar después de que el tronco es cortado. El método es descrito en la sección siguiente.

Si bien el método más común de obtener estacas es a partir de partes leñosas o semileñosas (ramas y fustes), algunas especies han sido propagadas a partir de hojas o más comúnmente de fascículos de agujas, como en el caso de los pinos. Desde el punto de vista práctico, sin embargo, el método no ha tenido gran éxito, ya que muchas veces se estimula la producción de raíces, con altas concentraciones hormonales, pero eso actúa negativamente en el desarrollo de la parte aérea.

Las estacas deben establecerse lo más rápido posible después de cortadas, aunque se pueden mantener bajo condiciones de sombra y riego, o de almacenamiento en frío, por hasta 48 horas. Las estacas más gruesas (15 ó más cm) de ciertas especies, particularmente aquellas con buenos tejidos acuíferos (ejemplo, algunas Bombacáceas), pueden establecerse directamente en el campo, en un período de hasta cuatro semanas antes del comienzo de la época lluviosa, sólo protegiendo el corte superior de la misma, para minimizar el desecamiento.

## **2.2.- Método de Manejo de Rebrotos**

2.2.1.- Principios Generales: Aunque más utilizado en los eucaliptos, puede aplicarse a un gran número de especies cuyos tocones tienen la capacidad de rebrotar una vez cortado el árbol. Para la propagación clonal, con fines de plantación a gran escala, se utilizan árboles jóvenes, que tienen mayor potencial de rebrotos. Para fines de mejora genética, por ejemplo, en el establecimiento de huertos semilleros y pruebas de valoración genética (pruebas de desarrollo clonal), se prefieren árboles maduros, lo que reduce las posibilidades, ya que son numerosas las especies que pierden la capacidad de rebrote con la edad.

En las primeras fases de un programa, con el fin de contar en el futuro con una cantidad adecuada de material de propagación, las primeras estacas enraizadas se establecen en un jardín clonal, identificando los diferentes tipos genéticos, luego, por sucesivas podas, se obtendrá nuevo material de propagación.

**2.2.2.- Metodología:** La metodología puede resumirse de la forma siguiente:

- a. Se escogen árboles con grosor superior a 10 cm de diámetro a la altura de pecho y se cortan a una altura de tocón de 12 cm. Es deseable hacer esto al comienzo de la época de lluvia.
- b. Hacer observaciones de los tocones, a fin de controlar la cantidad y calidad de los brotes, así como los problemas de tipo fitosanitario, todo lo cual tiene importancia para el proceso de producción masal.
- c. A partir del momento en que el rebrote alcance un tamaño determinado, se van cortando los rebrotes, hasta dejar un líder, para la reconstitución del árbol. Una vez cortados y bajo ciertas condiciones fitosanitarias, se transportan a la brevedad posible al sitio de confección de la estacas.
- d. En el sitio de preparación, se cortan las estacas con tijeras a la longitud deseada, teniendo cuidado de dejarles uno o dos pares de hojas seccionadas por la mitad para disminuir la evapotranspiración.
- e. La estaca preparada se pasa por una solución fúngica y posteriormente se le aplica una solución enraizadora a la concentración adecuada y se coloca en el sustrato para finalmente ser llevadas al cuarto de propagación o de enraizamiento, donde se debe mantener un ambiente controlado (alta humedad relativa y temperatura entre 28 °C en el día y 20 °C en la noche).

**2.3.- Acodo:** Un acodo es una parte que se busca enraizar mientras está aún adherida al ortet, del cual se separa una vez que se constata la presencia del sistema radicular. Es bastante utilizado en coníferas, pero muy limitado en latifoliadas. Generalmente, se seleccionan ramas muy vigorosas, dejando el follaje entre la parte acodada y la parte terminal de la misma, por lo que al lograrse el enraizamiento ya disponemos de una planta con su parte aérea desarrollada. Los factores que afectan el enraizamiento de acodos son similares a los de las estacas, discutidos anteriormente.

El procedimiento general consiste en tomar una rama; escoger una parte de la misma, no mayor de un centímetro en diámetro y

limpiarla de hojas en una longitud de unos 10 cm y hacer un corte en anillo, sin afectar el cambium y retirar la corteza. Aplicar una sustancia hormonal, igual que en las estacas; luego se cubre con un medio promotor (musgo, algodón, o tierra) y se protege con una bolsa plástica o con papel aluminio, hasta que se formen las raíces.

Si la parte anillada se cubre con tierra, en el suelo o en un envase, se denomina acodo terrestre; si se usa otro material y no tiene contacto con tierra, se llama acodo aéreo. Después de formarse las raíces, se corta la rama por debajo de la parte enraizada y se planta en un medio arenoso, bajo sombra, con riego. Después de dos semanas empieza a eliminar progresivamente la sombra, pudiendo luego plantarse en el campo.

Debido a la gran fragilidad del sistema radicular formado por los acodos en algunas especies, frecuentemente se aconseja un segundo trasplante a envase, antes de la plantación definitiva en el campo, usando un sustrato más sólido que el anterior, pero menos que él encontrará en el medio definitivo.

**2.4.- Injerto:** Un injerto consiste en el apareamiento de dos porciones vegetativas, con el fin de lograr la soldadura de sus tejidos. Una parte, generalmente con su propio sistema radicular, sirve de soporte y constituye el patrón o porta-injerto, mientras que la otra parte es la púa o injerto, que es la que interesa que se desarrolle.

**2.4.1.- Normas Operativas:** Existe una serie de normas que permiten aumentar las posibilidades de éxito del injerto, entre las cuales se pueden mencionar:

Mantener la navaja bien limpia y afilada. Hacer cortes firmes y precisos, logrando superficies lisas, que aseguren el mayor contacto posible a los fines de la soldadura. No tocar con los dedos, o no permitir que se ensucien las superficies de corte de púa y patrón, para garantizar su efectivo contacto y evitar focos de contaminación. Hacer amarres lo suficientemente fuertes y compactos, sin exceso de presión, que permita que púa y patrón se adhieran plenamente y no haya entrada de agua, polvo u otro agente externo de contaminación.

**2.4.2. Técnicas y Tipos de Injertos:** Existen varias técnicas de injertado, pero el mayor o menor grado de éxito con alguna de ellas depende, en mucho de la habilidad del injertador y/o de la supervisión realizada.

Según el sitio del patrón donde se inserte la púa, se distinguen los injertos de tope o por arriba y los injertos laterales. De acuerdo a experiencias con especies leñosas, particularmente árboles, merecen citarse los injertos de cuña, de caballete, e inglés, para los de tope, y de empalme lateral y de yema, para los laterales.

**2.4.3.- Clases de Injertos:** Según las relaciones taxonómicas entre púa y patrón, se tienen injertos heteroplásticos, entre especies diferentes del mismo género o de géneros diferentes, ejemplo, *Cedrela odorata* en *C. angustifolia* o *Swietenia macrophylla* en *C. odorata*, y homoplásticos, dentro de la misma especie. Este último incluye los auto-plásticos, si son del mismo genotipo (ejemplo, cuando de un ramet de buen desarrollo se toma una púa y se injerta sobre otro ramet de pobre desarrollo, del mismo clon).

**2.4.4.- Ambiente de Injertación:** La injertación puede hacerse en vivero o directamente en el campo. En vivero, se puede mantener en condiciones de sombra suave o pleno sol, garantizándose un riego adecuado, recomendándose que los patrones estén en bolsas de polietileno de unos cuatro a ocho kg de capacidad.

La injertación directa en el campo requiere una protección para el injerto, debido a la mayor posibilidad de desecamiento, pues el riego es más difícil; en este caso, se pueden utilizar bolsas de papel o de tela, aseguradas con hilo en la base. En sitios con vientos constantes o fuertes, el papel tiende a romperse con frecuencia, por lo que puede cubrirse a su vez con una bolsa plástica. Este último tipo de bolsa no debe usarse sola, ya que produce quemaduras por su efecto de lupa.

### **III.- Problemas en la Propagación Vegetativa:**

En los injertos, se pueden presentar diversos problemas, no atribuibles al injertador.

**3.1.- Incompatibilidad Vegetativa:** Uno de los problemas graves en la injertación es el de la incompatibilidad vegetativa, que produce un rechazo de la púa por el patrón, ocasionando la falla del injerto.

Este fenómeno, de tipo histológico, puede ser de ocurrencia temprana, lo que implica la necesidad de realizar más injertos para cubrir una cuota dada, con los clones problemas o con clones alternativos. Más problemática es la ocurrencia tardía o dilatada, que puede reflejarse varios años (hasta 10) después de establecidos los injertos en el campo, ocasionando pérdidas mayores.

En algunas especies se han detectado evidencias externas de la ocurrencia de incompatibilidad vegetativa. Ellas incluyen: fallas consistentes tempranas con árboles particulares, tasas desiguales del crecimiento de púa y patrón, anomalías en coloración y desarrollo foliar de la púa y sobrecrecimiento en la zona de unión, o por encima o por debajo de la misma. Los casos de sobrecrecimiento son característicos del tipo de incompatibilidad tardía.

La incompatibilidad vegetativa se ha encontrado más frecuentemente a nivel heteroplástico, lo cual se esperaría por diferencias de

carácter genético taxonómico, pero también se ha reportado a nivel homoplástico, o sea entre genotipos dentro de una misma especie. Para contrarrestar este fenómeno, se puede utilizar el llamado patrón intermedio, que es un injerto con una púa compatible, que sirve a su vez de patrón a la púa deseada, con la cual el patrón original mostraba incompatibilidad.

**3.2.- Dureza de las Especies:** Algunas especies son llamadas duras, por su gran dificultad de propagarse vegetativamente, por poseer estructuras muy lignificadas, muy herbáceas o con pocas reservas acuíferas que faciliten la movilización de auxinas promotoras de raíces. Esto es de gran importancia cuando se trata de propagar árboles adultos para el establecimiento de huertos semilleros o jardines clonales.

**3.3.- Hábitos de Desarrollo:** Algunas especies tienden a reproducir en su forma de crecimiento las características de la parte del individuo del cual fueron tomadas. Esto constituye el fenómeno de topofísis, que puede ser de naturaleza reproductiva (ciclofísis) o vegetativa (perifísis). Las razones de estos fenómenos no se comprenden todavía; afortunadamente, estos casos son la excepción mas que la regla.

En el caso de la ciclofísis, por ejemplo, si la parte propagada es de una rama joven de un individuo de condición fisiológica adulto, la planta resultante será joven, debiendo esperarse bastante tiempo, antes de regularizarse su floración y fructificación, lo que constituye una excepción al principio de la constancia fisiológica. Por la relación planta propagada y planta original, se habla de una reversión en la condición fisiológica reproductiva.

En la perifísis, por ejemplo, si la parte propagada en un árbol con un fuste vertical definido, es una rama de crecimiento horizontal, los individuos resultantes mantendrán esa dirección de crecimiento (plagiotrópico), en vez de la vertical (ortotrópico). Algunos autores limitan el término topofísis al aspecto vegetativo, dejando el término perifísis como un efecto de localización, como en el caso de hojas de sombra y de sol en un árbol.

3.4.- Restricción de la Base Genética: El uso de la propagación vegetativa en plantaciones (clonales) a gran escala, ha traído a colación el problema de la restricción de la base genética, debido al riesgo que conlleva el tener un material genéticamente muy homogéneo, por ejemplo, con la aparición de plagas y enfermedades y por las variaciones que naturalmente existen en los medios de plantación.

Esto último ha sido de poca importancia en el caso agrícola, ya que, comparado al caso forestal, el ambiente es más fácilmente controlado y manipulado, considerándose más fácil, más flexible y más justificable económicamente. En el caso forestal se ha trabajado con la sectorización de los sitios de plantación, en bloques relativamente pequeños, de dimensiones entre 25 y 50 ha, en cada uno de los cuales se planta el clon más apropiado a sus características.

Mucho se ha discutido sobre cuanto puede reducirse la base genética de un cultivo forestal, no habiendo una muy clara definición al respecto. Por ahora, las decisiones parecen basarse en el conocimiento que se tenga sobre la variación de la especie con relación a las variaciones del ambiente de plantación.

Como principio fundamental, se debe mantener una base genética mínima que pueda soportar cualquier situación de naturaleza catastrófica. Se han dado recomendaciones que van desde seis hasta 700 clones, siendo los números entre 30 y 40 los más populares para el caso de huertos semilleros clonales, y entre 10 y 20 para plantaciones clonales.

Un hecho que se señala muy frecuentemente es la necesidad de ampliar al máximo las fuentes de selección, reduciendo al mínimo el número de ellas en un mismo sitio; esto permite trabajar con un número razonablemente bajo de tipos genéticos.

En las plantaciones clonales, se discute sobre la forma de distribuir los clones, siendo la opinión de muchos especialistas de que deben ser mezclados, como en el caso de huertos semilleros; para ello, se alega que son la mejor garantía contra una devastación ante el ataque de plagas y enfermedades. Una alternativa considerada es la mezcla de pocos clones con características similares.

#### **IV.- Usos de la Propagación Vegetativa en la Mejora Genética**

El uso de la propagación vegetativa en programas forestales es bastante antiguo; por más de 100 años se ha venido trabajando en propagación de especies de los géneros *Populus* y *Salix* en Europa. Con el desarrollo de los programas de mejora genética, dentro de grandes proyectos de plantaciones, se ha incrementado su importancia, particularmente en cuanto al establecimiento de huertos semilleros clonales, como alternativa a los huertos de brinzales, aprovechando el principio de la constancia fisiológica. Algunos usos en la mejora genética se señalan a continuación.

1. La propagación vegetativa permite mantener tipos excepcionales y complejos de genes con propósitos científicos o para usos posteriores en actividades de Mejora, lo cual se hace a través de bancos clonales.
2. Con el establecimiento de huertos semilleros clonales, se facilita la producción y la recolección de semillas de valor genético adecuado, así como la realización de polinizaciones dirigidas, de uso en diversas actividades básicas y prácticas.
3. Con la formación de jardines clonales, se produce material que va a ser usado en plantaciones clonales y en actividades

variadas de investigación y pruebas genéticas.

4. Las plantaciones clonales permiten aprovechar un máximo de ganancia genética, al tenerse un material genéticamente homogéneo plantado en las condiciones mas adecuadas a tal fin.

5. El proceso de valoración genética de individuos selectos y la obtención de parámetros genético-estadísticos, se ven muy favorecidos al permitir mantener un control adecuado de los genotipos, dentro y entre ambientes diferentes, con lo cual se puede medir la influencia de genotipo y ambiente en la expresión de un carácter dado.

#### V.- Formas de Propagación de Algunas Especies Forestales

Las experiencias a nivel mundial y local, han permitido clasificar las especies de acuerdo a su facilidad de respuesta a alguno o todos los métodos de propagación vegetativa.

Sin embargo, ciertos resultados reportados en un país no son fácilmente reproducibles en otro, por lo que, para algunas especies, la clasificación puede variar, como en el caso de la Caoba (*Swietenia macrophylla*), que en Venezuela ha sido de muy difícil propagación vegetativa, pero en Centro América es conceptuada una especie de moderada a fácil propagación.

Muchas veces, no se reportan las condiciones de la propagación, como el número y la edad de los árboles, la parte propagada, el substrato usado, etc., por lo que la comparación de resultados se hace bastante difícil y con ello parecieran acentuarse las diferencias halladas. En el Cuadro 1 se presenta una clasificación según la facilidad y técnica de propagación de algunas especies de interés forestal en Venezuela.

Cuadro 1.- Características de propagación vegetativa (facilidad y método) de algunas especies de interés forestal

Clases	Nombre Vulgar	Nombre Científico	Método
Fácil a Muy Fácil	Saqui-saqui	<i>Bombacopsis quinata</i>	E, I
	Teca	<i>Tectona grandis</i>	E
	Melina	<i>Gmelina arborea</i>	E
	Apamate	<i>Tabebuia rosea</i>	HI
	Cedro amargo	<i>Cedrela odorata</i>	HI
Moderadamente Fácil	Pardillo Blanco	<i>Cordia alliodora</i>	I, E
	Pardillo Negro	<i>Cordia thaysiana</i>	HI
	Balso	<i>Ochroma pyramidale</i>	E, A
	Pinos	<i>P. oocarpa, P. caribaea, P. patula, P. radiata</i>	I, A
	Jabillo	<i>Hura crepitans</i>	A
	Mijao	<i>Anacardium excelsum</i>	E, A
	Eucaliptos	<i>E. camaldulensis, E. grandis, E. tereticornis, E. urophylla, E.x urograndis</i>	I, E
Difícil a Muy Difícil	Pino rojo	<i>Podocarpus oleifolius</i>	E
	Caoba	<i>Swietenia macrophylla</i>	I
No Propagables	Aliso	<i>Alnus acuminata</i>	HI, E
	Samán	<i>Pithecellobium saman</i>	
	Pino laso	<i>Decussocarpus rospigliosii</i>	
	Caro	<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	
	Roble	<i>Platysmicium sp</i>	
Vera	<i>Bulnesia arborea</i>		

E: Estaca; I: Injerto; A: Acodo

#### VI.- Propagación *in vitro*

**6.1.- Definición e Importancia:** Los cultivos *in vitro* consisten en la manipulación de material vegetal bajo condiciones controladas y asépticas, el cual puede proliferar y dar origen a diferentes sistemas de tejidos, desde estructuras no organizadas (callos) hasta estructuras con diferentes tipos y grados de morfogénesis y organogénesis (plantas completas, embriones somáticos, brotes adventicios, etc.)

Los cultivos *in vitro* tienen como fundamento la totipotencia celular, es decir, la capacidad de cada célula de contener en su genoma la información genética necesaria que, en condiciones adecuadas, puede originar y desarrollar a una planta completa. Esta capacidad permite la manipulación de estructuras vegetales a diferentes niveles de organización, para ser utilizados tanto en la propagación como en la mejora genética sin recurrir al cruce sexual. Los métodos de micropropagación pueden incrementar significativamente la cantidad de plantas provenientes de árboles seleccionados, manteniendo en dichas plantas tanto la constancia genética como el comportamiento fisiológico. El cultivo de meristemas apicales permite obtener plantas libres de virus, lo que facilita el intercambio de material de superior calidad, tanto a nivel

nacional como internacional. La hibridación somática y la fusión de protoplastos ayudan a obtener híbridos deseables y/o resistentes a ciertas condiciones previamente determinadas.

Aunque estos métodos se han usado desde hace cierto tiempo, es recientemente cuando alcanza su mayor desarrollo. Requieren de técnicas de laboratorio, a veces un tanto sofisticadas, lo que limita por ahora su uso en el campo forestal. Sin embargo, se han logrado resultados espectaculares, al ser aplicados al campo de la genética, aumentando las posibilidades de aplicación de la biotecnología a la mejora de los cultivos.

En un sentido amplio, la biotecnología es el manejo de entes biológicos para el beneficio de la humanidad, e incluye los métodos convencionales de cruce y cultivo de plantas. Sin embargo, técnicas de reciente desarrollo, tales como la propagación *in vitro* de plantas y la ingeniería genética, prometen ser de gran valor en la mejora de árboles.

**6.2.- Tipos de Cultivos Asépticos:** Butcher e Ingram (1976) distinguen los siguientes tipos de cultivos asépticos de plantas:

**6.2.1.- Cultivo de órganos:** Se refiere al cultivo de órganos aislados; incluye el cultivo de ápices foliares, de raíces, anteras, granos de polen, primordios de hojas, y partes inmaduras de flores y frutos.

**6.2.2.- Cultivo de embriones:** Incluye el cultivo de embriones en diferentes estadios de desarrollo.

**6.2.3.- Cultivo de callos:** Son cultivos provenientes de una masa de células no organizadas que proliferan a partir de segmentos o explantes de órganos.

**6.2.4.- Cultivos en suspensión:** Consisten de células aisladas o muy pequeños agregados de células, que permanecen creciendo en medios líquidos con la aplicación de agitación.

**6.3.- Técnicas Específicas de Micro-propagación y Mejora Genética:** Los diferentes tipos de cultivos asépticos permiten la implementación de una serie de técnicas específicas de micro-propagación clonal, cuya utilidad y aplicación varían en función de las posibilidades tecnológicas, el desarrollo de la investigación y la respuesta de cada especie a los medios de cultivo.

**6.4.- Factores que Afectan los Cultivos *in vitro***

**6.4.1.- Factores Físicos**

**a.- Temperatura:** La temperatura afecta todos los procesos fisiológicos y es una variable de importancia en el desarrollo del explante. El rango óptimo de temperatura de incubación se encuentra entre 20°C y 28°C, aunque diversos autores sostienen que, aún dentro de ese rango, lo más importante es mantenerla constante.

**b.- Luz:** La utilización de la luz es importante desde tres aspectos, la intensidad lumínica, el fotoperíodo y la calidad de luz; el primero está referido a la cantidad de iluminación recibida por los cultivos, el segundo a la distribución de esa luz en el tiempo en relación a las horas en oscuridad y el tercero al espectro lumínico que contiene las diferentes longitudes de onda necesarias para los procesos morfogénicos y organogénicos.

**6.4.2.- Factores Químicos**

**a.- pH:** El pH se define como la concentración de iones hidrógeno (H<sup>+</sup>) o hidronio (OH) de una sustancia. La regulación del pH intracelular es un proceso fisiológico de gran importancia para el crecimiento y metabolismo de las células vegetales, pues tiene un amplio rango de consecuencias en el transporte de nutrientes y hormonas, así como en las reacciones enzimáticas de las células. Su valor se encuentra entre 6,5 y 7,5, aún cuando existen diferencias locales en el pH de orgánulos celulares. El pH del medio es isogénico con el citoplasmático y tiene que ser mantenido dentro de un rango estrecho para un crecimiento óptimo de las células. Estudios realizados sobre el efecto del pH del medio sobre cultivos de callos de algunas especies demostraron que éste afecta tanto el crecimiento del cultivo como su consistencia.

**b.- Medio de Cultivo:** Existen factores químicos que afectan a los cultivos *in vitro*, entre ellos los macro y micronutrientes, los reguladores del crecimiento vegetal, las fuentes carbonadas y las vitaminas. Todos pueden actuar tanto de manera individual como sinérgicamente y su respuesta se logra mediante su dosificación en los medios de cultivo. Un medio nutritivo es una combinación de macronutrientes y oligoelementos, una fuente carbonada (generalmente sacarosa), vitaminas, fitohormonas y ocasionalmente otros suplementos definidos o no definidos en el medio líquido o sólido.

No existe un medio de cultivo estandarizado para la inducción de callos, aún cuando las auxinas son las principales inductoras. No obstante, se han desarrollado medios básicos utilizados ampliamente en cultivo de tejidos; la mayoría de los medios son muy similares en su composición, variando principalmente en la adición o eliminación de una o varias sales, o en la concentración de ellas.

**6.4.3.- Factores Inherentes al Explante**

**a. Edad de la Planta Fuente:** De manera similar a los procesos de propagación vegetativa convencionales, en cultivos *in vitro* el grado de madurez puede afectar el éxito de la propagación. En especies forestales, debido a sus largos ciclos de vida,

este factor tiene mayor importancia. En general, a mayor edad del árbol donante (ortet) existe mayor dificultad de multiplicación; ésto se debe a desconocimiento de los factores fisiológicos que afectan el crecimiento y diferenciación en plantas adultas.

**b. Tipo de Explante:** La selección del tipo de explante es de gran importancia en cultivos *in vitro*. Según Bonga y Durzan (1987) en especies para los cuales los métodos de rejuvenecimiento no son aprovechables, son recomendables las siguientes reglas.

b.1. Colectar los tejidos somáticos lo más juvenil posible.

b.2. Usar explantes tan pequeños como se pueda, para interrumpir en buena parte los controles de madurez. Mediante la reducción del tamaño del explante, siempre que éste pueda sobrevivir y crecer en cultivo, se reducen los controles de madurez impuestos por otros tejidos y células vecinas.

b.3. Evitar tejidos que presenten fuertes patrones de fijación de desarrollo. Los tejidos juveniles provenientes de xilema tienen menor juvenilidad que los de brotes foliares.

b.4. Los cultivos deben ser acondicionados a los diferentes tipos de explante.

### **6.5.- Cultivo de Tejidos en Especies Forestales**

**6.5.1.- Desarrollo Histórico:** la utilización de técnicas de cultivos *in vitro* en especies forestales comienza por la década de 1930, con la obtención de callos a partir de explantes de *Salix caprea*, de los cuales pudieron diferenciarse algunos pequeños brotes. Entre 1940 y 1960, las investigaciones se concentraron hacia la formación de callos, principalmente con angiospermas. De importancia especial se citan los trabajos con *Tilia americana* y *Crataegus monogyna*, en los cuales se indujo la formación de callos a partir de explantes de tejido cambial. En gimnospermas, se mencionan los trabajos con *Pinus taeda*, *P. lambertina* y *P. monticola*. Es a partir de los años 70, cuando comienza el gran desarrollo experimental de estas técnicas, evidenciado por la gran cantidad de reportes sobre inducción de cultivos en diferentes especies forestales.

**6.5.2.- Usos en el Campo Forestal:** Es importante enfatizar que el gran mérito de la micropropagación, o propagación clonal, está en la utilización de material de valor probado, incluyendo aquellos valorados fenotípicamente (árboles selectos) y genéticamente (árboles élite). Instalar una infraestructura para la propagación clonal de "basura" (material sin valor genético), no justifica los esfuerzos y los costos que conlleva. Ello ha causado grandes desilusiones en algunos medios, porque lo han usado en forma incontrolada, solo por estar "supuestamente" al día con la nueva modalidad.

Las técnicas de micropropagación deben verse como una forma complementaria, más que sustitutiva, de las técnicas de macropropagación tradicionales. Las técnicas de cultivos *in vitro* pueden llegar a ser un medio alternativo para la propagación de muchas especies que presenten problemas con los métodos de propagación convencionales. El uso de brotes o meristemas apicales en la multiplicación de árboles selectos permitirá tener un stock de árboles genéticamente superiores, en una forma sencilla, libre de enfermedades, reproducible y fácilmente accesible.

### **6.5.3.- Ejemplos en Forestal**

**a.- Género *Eucalyptus*:** Los reportes sobre micropropagación comienzan hacia 1969, cuando se consigue regenerar algunas plantas completas a partir de un callo formado sobre explantes provenientes de lingnotubérculos de *E. citriodora*. En *E. grandis* se obtienen plantas enraizadas a partir de plantas de seis años de edad, por alargamiento de las yemas foliares y enraizamiento con ácido indol butírico. Con explantes de diez meses de edad de *E. nova-anglica* y *E. viminalis* se logran plantas que pueden transplantarse exitosamente al campo.

**b. Género *Pinus*:** Ha sido objeto de atención por un gran número de investigadores en la implementación de técnicas de micropropagación, habiéndose reportado más de 25 trabajos de investigación que se han realizado sobre este género entre 1974 y 1981. Numerosos investigadores han utilizado en sus experimentos plantas de pocas semanas de edad, y se han dirigido principalmente hacia la propagación clonal rápida, mediante la inducción de yemas foliares o yemas adventicias, y su posterior enraizamiento.

**6.5.4.- Experiencias en Venezuela:** Los primeros intentos de micropropagación de especies forestales se realizaron en el Laboratorio de Cultivos Vegetales *in vitro* de la Facultad de Ciencias Forestales, de la Universidad de Los Andes, por Contreras y Valera (1988) y Valera (1991) e incluyeron estudios exploratorios sobre *Pinus caribaea*, *P. oocarpa*, *Eucalyptus grandis* y *E. globulus*. Posteriormente, se ha logrado la propagación clonal rápida, inducción de organogénesis de novo y embriogénesis somática en otras especies como *Cedrela odorata*, *Swietenia macrophylla*, *Fraxinus americana*, *Leucaena leucocephala*, *Morus indica* y *Bombacopsis quinata*, con las que se han obtenido resultados prometedores, incluyéndose la posibilidad de la propagación masiva de árboles superiores, en cooperación con los programas de mejora genética de algunas empresas forestales del país.

## APOYO BIBLIOGRÁFICO

- Bonga, M. and D. Durzan (Editors). 1987. Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 1. General Principles and Biotechnology. Vol 2. Specific Principles and Methods: Growth and Development. Vol 3. Case Histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, Mass, USA.
- Butcher, D. and D. Ingram. 1976. Plant tissue culture. Studies in Biology No. 65. E. Arnold (Edit), Cambridge, Great Britain.
- Contreras, I y L. Valera. 1988. Micro-propagación de *Eucalyptus grandis* y *E. globulus* a través de cultivos *in vitro*. IX Congreso Venezolano de Botánica, Caracas, Venezuela.
- Fielding, J. M. 1960. Branching and flowering characteristics of Monterey pine (*Pinus radiata*). Canberra, Forestry and Timber Bureau. Bulletin, No. 37.
- Gardner, R. J. 1983. Manual del Injertador. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Hartmann, H. y D. Kester. 1982. Propagación de Plantas; Principios y Prácticas. C.E.C.S.A., México.
- Henke, R., K. Hughes, M. Constantin and A. Hollaender (Editors). 1985. Tissue Culture in Forestry and Agriculture. Basic Life Sciences, Vol. 32, Plenum Press, New York, USA.
- Mesén, F. 1998. Enraizamiento de estacas juveniles de especies forestales. Uso de propagadores de sub-irrigación. Centro Agronómico tropical de Investigación y Enseñanza. CATIE. Programa de Investigación. Proyecto de Semillas Forestales. PROSEFOR. Turrialba. Costa Rica.
- Morandini, R. 1964. Genética y mejora de las especies exóticas forestales. Unasylya, 18 (2-3):51-60.
- Pidi, N. 1981. La Multiplicación de las Plantas. Editorial De Vecchi, Barcelona, España.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Versión española: Luis Ayerbe Mateo-Sagasta. Edic. Mundi-Prensa. Castelló. Madrid.
- Quijada R., M. y V. Gutierrez. 1971. Estudios sobre la Propagación Vegetativa de Especies Forestales Venezolanas. Rev. For. Venez. 21:43-56.
- Valera, L. 1991. Propagación de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* y *Eucalyptus grandis* a través de cultivos *in vitro*. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias Forestales, Centro de Estudios Forestales de Postgrado, Mérida, Venezuela.
- Valera, L.; V. Garay; W. León; A. Flores y J. Sánchez. 1998. Estudio anatómico de la zona de unión en injertos incompatibles de *Pinus caribaeae* var. *hondurensis* del Huerto semillero de santa Cruz de Bucaral, estado Falcón. Anales de Botánica Agrícola. Vol 5.
- Zobel, B. and J. Talbert. 1984. Applied Forest Tree Improvement. John Wiley & Sons, N.Y., USA.