

Caracterización fisiológica del enraizamiento *in vitro* de *Eucalyptus nitens* y *Eucalyptus globulus*

Physiological characterization of *in vitro* rooting of *Eucalyptus nitens* and *Eucalyptus globulus*

MARÍA PAZ JOFRÉ^{1*}, DARCY RÍOS¹, JOSÉ BECERRA² & MANUEL SÁNCHEZ-OLATE¹

¹Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Facultad de Ciencias Forestales y Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Casilla 160-D, Correo B, Concepción, Chile.

²Laboratorio de Química de Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

*majofre@udec.cl

RESUMEN

El entendimiento de los cambios bioquímicos que ocurren durante las distintas fases del enraizamiento hace posible obtener mayor porcentaje de enraizamiento de microbrotes en especies leñosas. Para diferenciar ambas especies y encontrar un marcador de la capacidad rizogénica, en el presente estudio se pretende caracterizar perfiles cinéticos de Ácido Indol Acético (AIA), Fenoles totales y Carbohidratos totales. Para esto se evaluaron microtallos de las especies *Eucalyptus nitens* (H. Deane & Maiden) Maiden y *Eucalyptus globulus* Labill. las cuales fueron tratadas con el método de la inducción lenta del enraizamiento en medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) (MS) con las sales a la mitad, 30 g/L de sacarosa, suplementado con Ácido Naftalen Acético (ANA) durante 7 días en oscuridad. Posteriormente transferidos a sustrato vermiculita estéril con riego de medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento. Se recolectó material vegetal los días 0, 2, 7 y 20 días desde la inducción, se tomaron muestras de base de estacas para los análisis fitoquímicos. El AIA en los días 0 y 2 presentó altos valores que disminuyeron drásticamente durante las siguientes fases del enraizamiento días 7 y 20. Los compuestos fenólicos presentaron diferencias entre las dos especies en el tiempo evaluado, con valores significativamente más altos en *Eucalyptus nitens* (136 ug/gPS) que en *E. globulus* (29 ug/gPS). Los carbohidratos totales no mostraron diferencias entre las especies y se mantienen altos durante todo el tiempo en las dos especies de *Eucalyptus*. De acuerdo a lo obtenido, los compuestos fenólicos son buenos marcadores de la capacidad de enraizamiento adventicio ya que se diferenciaron significativamente en las dos especies de *Eucalyptus*.

PALABRAS CLAVE: Flavonoides, Acido Indol Acético, enraizamiento adventicio.

ABSTRACT

The understanding of the biochemical changes that occur during the different phases of rooting makes it possible to obtain higher percentage microshoots rooting in woody species. To differentiate the two species and find a marker rhizogenic capacity in the present study is to characterize kinetic profile of Indole Acetic Acid content (AIA), total phenols and total carbohydrates. To this microshoots species *Eucalyptus nitens* (H. Deane & Maiden) Maiden and *Eucalyptus globulus* Labill. which were evaluated were treated with the method of the slow induction of rooting on Murashige & Skoog (1962) (MS) with the salts in half, supplemented with auxin naphthaleneacetic acid (NAA) for 7 days in darkness. Subsequently transferred to sterile vermiculite substrate irrigated crop MS medium without hormones. Plant materials on days 0, 2, 7 and 20 days from the induction manifolds, core samples were taken cuttings for analysis phytochemicals. The AIA on days 0 and 2, showed high values decreased dramatically during the next phases of rooting days 7 and 20. Phenolic compounds showed differences between the two species evaluated in time, with significantly higher values in *Eucalyptus nitens* (136 ug/gPS) in *E. globulus* (29 ug/gPS), total carbohydrates showed no differences between species and stay high all the time The AIA is essential for induction of rooting and is not subsequently required, as carbohydrates are not candidates for markers rhizogenic capacity not because they differ in the two species of *Eucalyptus*. According to the obtained phenolic compounds are good markers of the capacity of adventitious rooting since differed significantly in the two species of *Eucalyptus*.

KEYWORDS: Indol Acetic Acid, adventitious rooting, phenolic compounds.

INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes problemas que presentan las especies del género *Eucalyptus* durante el proceso productivo de propagación vegetativa corresponde a la pérdida de la competencia rizogénica en tejidos adultos, por lo que es necesario el desarrollo de métodos de clonación eficientes. En la actualidad existen pocos estudios referentes a optimizar los mecanismos de propagación en *Eucalyptus nitens* (H. Deane & Maiden) Maiden, por lo que el cultivo *in vitro* es una alternativa de propagación para obtener clones superiores con características deseadas para el desarrollo comercial que ha sido exitosa en *Eucalyptus* (Campbell *et al.* 2003, Delaporte & Sedgley 2004, Gaspar *et al.* 2005). El cultivo *in vitro* es una herramienta rápida de multiplicación que permite obtener individuos libres de patógenos con estabilidad genética, optimización de espacio y tiempo, y no depende de los periodos de producción (Badr & Desjardins 2007). Sin embargo dentro de sus desventajas, en *Eucalyptus* se encuentra el bajo porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de los explantes (Popsilová *et al.* 2000, Kozai & Kubota 2005), comportamiento también observado en condiciones *in vivo* (Fett-Neto *et al.* 2001).

El enraizamiento adventicio es una respuesta multifactorial que finalmente conduce a la formación de una raíz a partir del tallo. Ocurre en distintas fases que se caracterizan por presentar condiciones y requerimientos bioquímicos diferentes (Caboni *et al.* 1997, Kevers *et al.* 1997, De Klerk *et al.* 1999, Schwambach *et al.* 2008). En este sentido el cultivo *in vitro* presenta ventajas para el estudio de estas fases ya que se facilita la adición de auxinas y otros compuestos, inhibe la degradación microbiana, permite la adición de nutrientes inorgánicos y carbohidratos y estimula experimentos a pequeña escala, permitiendo hacer avances en experimentos en métodos moleculares (De Klerk *et al.* 1999).

Durante estas fases, cambios de factores físicos y químicos influyen la inducción y expresión de raíces adventicias, como fotoperiodo, contenido de AIA, compuestos fenólicos y poliaminas, entre otros (Martinez Pastur *et al.* 2003, Arena *et al.* 2005). El entendimiento de estos factores bioquímicos hace posible mejorar el enraizamiento *in vitro* en especies leñosas (Martinez *l.c.*).

El cofactor estimulador por excelencia del enraizamiento adventicio es la auxina AIA (Fett-Neto *et al.* 2001, Davies 2004, Woodward & Bartel 2005). El rol fundamental de AIA se basa en que es el único químico que consistentemente estimula el enraizamiento de forma directa, ya sea por fuente endógena o por abastecimiento exógeno, el transporte de auxinas endógeno es principalmente basipétalo y está de acuerdo a la formación polar de la raíz. Por otro lado, al inhibir el transporte de auxinas se bloquea la formación de la raíz (Assis *et al.* 2004). Además existe evidencia bioquímica y genética debido a la identificación de receptores de auxinas asociados con la

habilidad de enraizamiento (Woodward *et al.* 2005).

En especies de *Eucalyptus* con alto porcentaje de enraizamiento como *E. saligna* Sm. es suficiente con AIA endógeno para estimular el enraizamiento (Schwambach *et al.* 2008). En cambio, en *E. globulus* Labill. que presenta menor porcentaje de enraizamiento es necesaria una aplicación exógena (Martellet & Fett-Neto 2005).

Sin embargo, existen especies en las que es requerida una aplicación exógena de auxina para estimular la rizogénesis (Díaz-Sala *et al.* 1996). Por ejemplo en renovales apicales se reduce la disponibilidad de AIA, por lo que una aplicación exógena incrementa el número de raíces formadas (Nordstrom *et al.* 1991, Liu & Reid 1992). El Ácido Indol Butírico (AIB) es un precursor de AIA que dirige la expansión celular en tejidos específicos como pelos radiculares (Strader *et al.* 2010). Aplicado exógenamente AIB actúa a tres niveles: induce el movimiento basipétalo de AIA endógeno (Teale *et al.* 2006), su conversión en AIA (Nordstrom *et al.* 1991, Ludwig-Müller 2000, Bartel *et al.* 2001) y produce mayor estabilidad química al mantener niveles adecuados de AIA libre (Ludwig-Müller 2000).

El rol de las auxinas en el enraizamiento es directo (De Klerk *et al.* 1999), sin embargo, los demás factores que controlan el enraizamiento lo hacen a través de la homeostasis de AIA haciéndola más o menos disponible. En este sentido existe una coordinación bioquímica del proceso rizogénico controlada por el contenido de peroxidasas totales y compuestos fenólicos (Calderón Baltierra 1994, Pacheco *et al.* 1995, Caboni *et al.* 1997). Los compuestos fenólicos son factores de defensa contra varios tipos de estrés causados por patógenos, ambiente adverso o herida (Solar *et al.* 2006). La relación entre los fenoles y la rizogénesis inducida por auxina puede ser muy variada, en algunas ocasiones actúan como cofactores rizogénicos, apoyando la fase de iniciación radicular y en otras dependiendo de la calidad y cantidad en que se encuentren pueden influir sobre la oxidación de la auxina (Latsague & Lara 2003), impidiendo la formación de raíces adventicias. Además dentro de los compuestos fenólicos importantes en la regulación del proceso rizogénico se encuentran los flavonoles (Koes *et al.* 2005, Taylor & Grotewold 2005), que inhiben el enraizamiento al bloquear su transporte (Peer *et al.* 2004, Murphy *et al.* 2000).

En el presente estudio se pretende evaluar algunos componentes bioquímicos del enraizamiento para establecer un marcador de la capacidad rizogénica de dos especies de *Eucalyptus*, uno de mayor capacidad *E. globulus* y otro de baja capacidad como *E. nitens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Como explantes se usaron vitroplantas de clones de *Eucalyptus nitens* y *Eucalyptus globulus* pertenecientes a

vivero Forestal Mininco S.A., previamente multiplicadas y elongadas, para inducir el proceso de enraizamiento en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción.

INDUCCIÓN DEL ENRAIZAMIENTO

Las vitroplantas se enraizaron por el método de “Inducción lenta”, que consiste en la exposición a medio sólido MS con los macroelementos a la mitad de su concentración, suplementado con 3 mg/L de NAA durante 7 días en oscuridad en cámara de cultivo a 20 °C. Posteriormente se transfirieron a sustrato de vermiculita estéril tapado con plástico y se regaron cada dos días con solución nutritiva de medio MS líquido hasta el día 20 desde la inducción. Se colectó material consistente en base de tallos los días 0, 2, 7 y 20 para los análisis fitoquímicos correspondientes.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AIA

De los microtallos recolectados en los tiempos indicados como los tratamientos, se extrajo AIA con Metanol siguiendo el procedimiento descrito por Valenzuela *et al.* (1998). Se extrajo la fase orgánica y la fase acuosa que contienen la hormona libre y conjugada, respectivamente. Los extractos se resuspendieron en metanol absoluto y se analizaron a través de HPLC Shimadzu Japón Kyoto, anexado a un computador por el programa D 7000 HPLC ensamblado a una bomba D7200 y el detector UV L/7400.

Se separaron por HPLC RP-18 fase reversa 250-4mm (5 μ m) Bio Rad en columna Lychrospher 100 con dosificación 0,8 ml/min. La identificación fue obtenida por comparación con una curva patrón estándar de AIA Sigma.

DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

El contenido de fenoles totales se estimó como equivalentes de ácido gálico de acuerdo al método modificado de Gutiérrez *et al.* (2008), que utiliza el reactivo Folin Ciocalteu (agente oxidante) formando complejos con los fenoles cromógenos de coloración proporcional al número de hidroxilos presentes en éstos. Se cuantificaron por espectrofotometría en comparación a una curva de calibración.

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES

Se determinó por el Método del Fenol sulfúrico por espectrofotometría en comparación a una curva patrón de glucosa.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado con Modelos Estadísticos Lineales. Para el análisis de concentración de compuestos fenólicos, AIA y carbohidratos, se realizó un análisis de mediciones repetidas en el tiempo o también conocido como análisis longitudinal. Este análisis

permite identificar tanto el efecto medio del tratamiento (especie), el efecto del tiempo (tiempo), y la interacción tiempo por tratamiento, que corresponden a las tres hipótesis evaluadas, y que por lo tanto generan tres valores p. La estimación de parámetros se realizó por máxima verosimilitud restringida (REML). La selección del modelo se hizo con el criterio de información de Akaike (menor es mejor). Los modelos fueron estimados utilizando SAS versión 9.3 PROC MIXED (SAS Institute, 2006). Las comparaciones por pares entre asociaciones de especies fueron probados con los LSMEANS ajustados ($\alpha = 0,05$) (Littell *et al.* 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El enraizamiento *in vitro* es la etapa final del proceso productivo de micropropagación que precede a una etapa de multiplicación con subcultivos periódicos en medio rico en citoquinina y elongación de las vitroplantas en un medio rico en auxinas. En la Figura 1 es posible observar microtallos en estado de proliferación (a) y etapa de elongación (b). Estas etapas son claves en los resultados de enraizamiento que se quiere obtener. Ríos *et al.* (2002) señalaron que el proceso de enraizamiento está influenciado por diversos factores tales como el suministro de oxígeno, temperatura, sacarosa, potencial estomático, pH y nutrientes minerales que dependen básicamente de las condiciones físicas de cultivo (Assis *et al.* 2001). Otros factores importantes a considerar en la fase de enraizamiento son vigor, estado sanitario, longitud y diámetro de los microtallos, ya que diversos autores señalan altos porcentajes de enraizamiento a mayor diámetro y vigor de los explantos inducidos (Ríos *et al.* 2002). Por otro lado, en *E. urophylla* S.T. Blake y *E. grandis* W. Hill, se ha relacionado el contenido de AIA con el número de subcultivos a mayor frecuencia menor capacidad rizogénica (Mankessi *et al.* 2009).

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AIA

En la Tabla I se observa presencia de AIA en los dos primeros días desde la inducción del enraizamiento. Este tiempo corresponde a la etapa señalada como Inducción (Kevers *et al.* 1997, De Klerk *et al.* 1999) y este nivel de auxina es necesario para producir la diferenciación seguida de un proceso de dediferenciación en la inducción temprana (antes de 24 h). Las auxinas en esta etapa se transportan y canalizan a células diana. Allí actúan principalmente mediante la proteólisis selectiva de proteínas receptoras RIT1 (respuesta inhibitor del transporte 1) y ABP1 (Auxina-Binding Protein 1) (Schwambach *et al.* 2008). Posteriormente producen aflojamiento de la pared celular. La presencia de AIA es esencial en esta etapa ya que controla la expresión génica del enraizamiento a través de factores de respuesta a auxinas (Schwambach *et al.* 2008).

Flores (2009) en *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek encontró el más alto nivel de AIA al día 3 post inducción del enraizamiento y una disminución al día 6.

En la Tabla I se observa una significativa disminución de AIA el día 7 desde la inducción (0%), lo que podría corresponder a la fase de iniciación del enraizamiento en que ocurren sucesivas divisiones celulares que darán origen al primordio radicular. Los niveles de las auxinas libres permanecen altos durante la fase de inducción del enraizamiento y decrecen justo al comenzar la fase de iniciación (Nag *et al.* 2001). Después del establecimiento de la raíz, nuevos reguladores del crecimiento tienen lugar, las auxinas son requeridas en concentraciones más bajas sólo para el mantenimiento de estados diferenciados y citoquininas son necesarias para la diferenciación de los

tejidos de la raíz (Schwambach *et al.* 2008). En *Eucalyptus globulus* se observan cambios a partir del día 7 (Calderón Baltierra 1994) en el proceso de enraizamiento *in vitro*: desorganización celular de la base de microtallos, en el parénquima cortical con prominentes núcleos (Reinhard *et al.* 2000). Además, en esa fase los niveles de conjugados auxínicos se incrementan (Davies 2004). En contraste, las peroxidasas muestran baja actividad de AIA-ox durante la inducción, seguida de un aumento durante la iniciación (Nag *et al.* 2001, Qaddoury & Amsa 2004). Estas peroxidasas apoplásticas acidificarían las inmediaciones del tejido destino como señalización de membrana. Las auxinas a través del bombeo de H producen plasticidad de la pared celular para la elongación celular y crecimiento durante la etapa de iniciación (Robert-Klever *et al.* 2003).

TABLA I. Contenido de AIA libre en explantes inducidos a enraizar *in vitro*. Solo hay presencia de niveles detectables de AIA los días 0 y 2 y vuelve a aparecer el día 20 en que ya es posible observar raíz primordial.

TABLE I. Content of free IAA in root explants induced *in vitro*. There's only presence of detectable levels of AIA on days 0 and 2 and reappears on the 20th that it is possible to observe primary root.

DÍAS DE RECOLECTA	Conc. AIA ug/gPS <i>E. nitens</i>	Conc. AIA ug/gPS <i>E. globulus</i>
0	28 a	32 a
2	22 a	25 a
7	0	0
20	8 b	9b

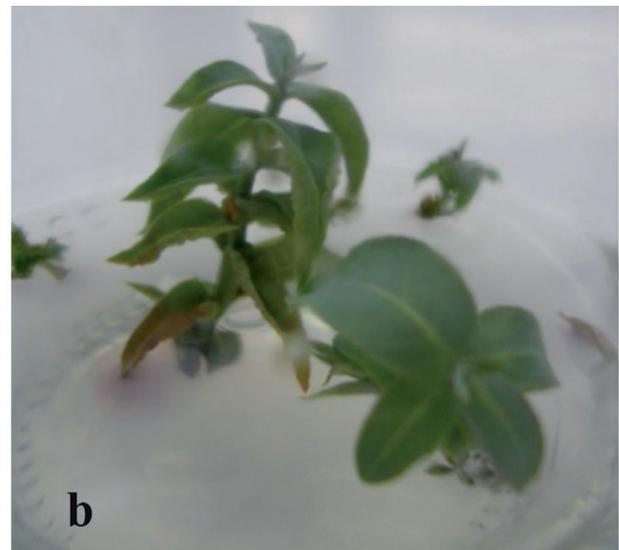
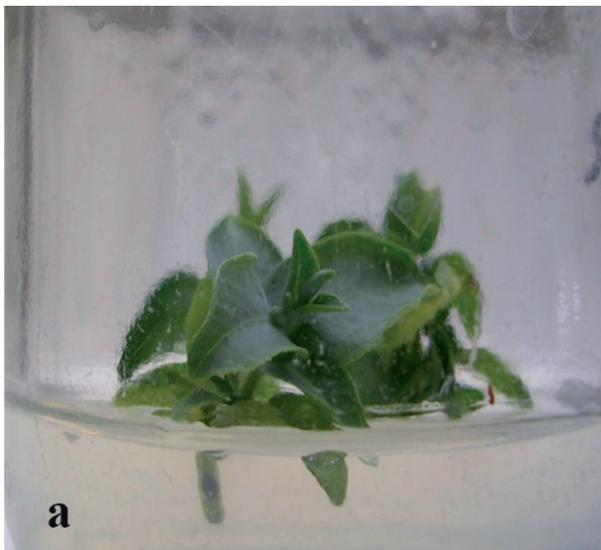


FIGURA 1: Microtallos creciendo *in vitro* (a) en multiplicación y (b) en elongación de 2cm de longitud.

FIGURE 1: *Eucalyptus nitens* microshoots growing *in vitro* (a) proliferation medium and (b) elongation medium of 2 cm in length.

El día 20 post inducción en la Tabla I se observa un leve aumento en el nivel de AIA en ambas especies, esta etapa *in vitro* es la de expresión en que ya se han formado los primordios radiculares (Kevers *et al.* 1997, De Klerk *et al.* 1999). En la Fig. 2A se observa un tallo de *E. nitens* con la aparición de las primeras raíces, la formación del meristema radicular es directa ya que no se produce callo en la base del tallo. Lo que es ventajoso, ya que la formación de este tejido puede interferir en la conexión vascular que se establece entre las nuevas raíces y el explanto original (Martínez Pastur *et al.* 2005, San José *et al.* 2012). Esta etapa en que AIA vuelve a aparecer probablemente para la diferenciación de

tejidos vasculares e independencia del primordio radicular el día 20, es semejante a la encontrada en el enraizamiento *in vitro* de otras especies, como manzano (Naija *et al.* 2008) y castaño (Ballester *et al.* 2009). Y en *Eucalyptus globulus*, a partir del día 18 (Calderón *et al.* 1994). Sin embargo, el tiempo requerido para la formación de las raíces adventicias varía con la especie, se observó al cabo de 8 días en el caso de *Camellia japonica* L., 5 días en *Malus* (Naija *et al.* 2008). En híbridos de *E. globulus x maidennii* se encontraron fases similares: inducción día 5, iniciación entre los días 5 y 15 y elongación después de los 15 días (Schwambach *et al.* 2008).

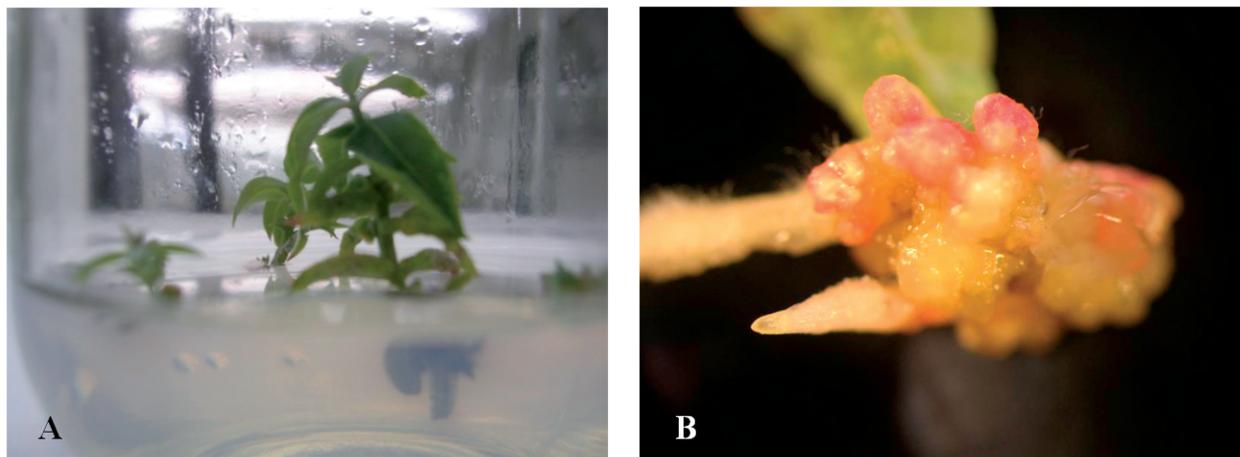


FIGURA 2. Enraizamiento *in vitro* de *Eucalyptus nitens*. A) Microtallo con formación de primordio radicular en la base del tallo a los 13 días desde la inducción. B) Primordio radicular mostrando dos raíces principales después de 20 días desde la inducción.

FIGURE 2. *In vitro* rooting of *Eucalyptus nitens*. A) Microshoot with incipient formation of root primordia after of thirteen days of induction. B) Root primordium with two roots after twenty days of induction.

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Al analizar los fenoles totales en ambas especies de *Eucalyptus* como lo muestra la Tabla II, se observa que *Eucalyptus nitens* presenta concentraciones significativamente mayores que *Eucalyptus globulus*. En las dos especies la dinámica es la misma con valores más altos durante la fase de inducción los dos primeros días y una disminución el día 7 y 20.

Un comportamiento similar ha sido observado en *Eucalyptus* en que genotipos con distinta habilidad para enraizar presentan altos niveles durante la fase de inducción del enraizamiento y decae durante la fase de iniciación, y se contradice con el contenido de AIA oxidasa, por lo que podría tratarse de inhibidores del enraizamiento (Caboni *et al.* 1997).

El elevado nivel de compuestos fenólicos en *Eucalyptus nitens* se puede relacionar con su baja capacidad de

enraizamiento. Si éstos corresponden a monofenoles que actúan como inhibidores del proceso rizogénico reduciendo la concentración de AIA. Estos monofenoles como el ácido p-coumárico, ferúlico y siríngico promueven la descarboxilación de AIA activando a la enzima AIA oxidasa (De Klerk 2011).

En *Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser se encontró que altas concentraciones de compuestos fenólicos solubles estarían induciendo la oxidación de la auxina aplicada al tratamiento de enraizamiento. Estos fenoles solubles puede pasar a ser inhibidor del enraizamiento dependiendo de la calidad y cantidad de éstos (Latsague & Lara 2003).

Para *Eucalyptus nitens* no se trataría de polifenoles ya que éstos inducen el enraizamiento, como el ácido clorogénico, protocatéuico y caféico, que suprimen

la degradación de AIA debido a que activan la enzima polifenol oxidasa que los oxida a quinonas y no serían capaces de unirse ni estimular a la enzima AIA oxidasa (Ríos *et al.* 2005, De Klerk *et al.* 2011).

Por otro lado, la baja capacidad de enraizamiento de *E. nitens* y su alto contenido de compuestos fenólicos indica que podría tratarse de flavonoides inhibidores competitivos del enraizamiento, que inhiben el transporte polar de auxinas al unirse a proteínas PIN ya que su estructura química es similar al inhibidor endógeno ácido naftilalámico NPA (Murphy *et al.* 2000, Brown *et al.* 2001, Peer *et al.* 2004).

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES

El contenido de Carbohidratos totales no presenta diferencias significativas durante los días evaluados en las dos especies. Como lo muestra la Tabla III, los niveles de carbohidratos presentes en todos los tiempos pueden estar indicando que solo están presentes para mantener funciones celulares constitutivas. Por otro lado, pueden indicar lo necesarios que son como fuente de energía, ya que durante

el enraizamiento ocurren numerosos procesos biológicos como la biosíntesis de ácidos nucleicos, formación de nuevas enzimas y división celular. Varias enzimas aumentan su actividad como las respiratorias y amilasa (Fett-Neto *et al.* 2001). No todos los carbohidratos influyen en el enraizamiento adventicio, por ejemplo, en *Arabidopsis*, la glucosa, sacarosa y fructosa estimulan el enraizamiento adventicio, pero manosa y sorbitol no tienen efecto (Takahashi *et al.* 2003). La interacción de los carbohidratos con la señalización de los reguladores del crecimiento vegetal y su influencia en la modulación de la expresión génica (Geiss *et al.* 2009, Li *et al.* 2009) podrían determinar su papel en el proceso del enraizamiento adventicio a través de rutas aún no dilucidadas. Por otro lado, se ha encontrado que células que rodean los haces vasculares que sufren desdiferenciación y se hacen competentes para ser inducidas por auxinas las primeras 24 h de la inducción, acumulan almidón durante esta fase para ser utilizado en la fase de iniciación en que ocurren sucesivas divisiones celulares (De Klerk *et al.* 1999).

TABLA II. Contenido de fenoles totales en explantes inducidos a enraizar *in vitro*. La especie *E. nitens* presenta concentraciones significativamente más altas que *E. globulus*.

TABLE II. Content of total phenols in explants induced to root *in vitro*. The species *E. nitens* has significantly higher concentrations than *E. globulus*.

DÍAS DE RECOLECCIÓN	<i>Eucalyptus nitens</i> ug/gPS	<i>Eucalyptus globulus</i> ug/gPS
0	45 a	13 b
2	48 a	11 b
7	20 b	9 b
20	51 a	8 b

TABLA III. Contenido de carbohidratos (CH) totales en explantes inducidos a enraizar *in vitro*. No hay diferencias significativas entre las dos especies de *Eucalyptus*.

TABLE III. Content of carbohydrates (CH) total explants induced to root *in vitro*. No significant differences between the two species of *Eucalyptus*.

DÍAS DE RECOLECCIÓN	Conc. CH ug/gPS <i>E. nitens</i>	Conc. CH ug/gPS <i>E. globulus</i>
0	406	501
2	397	430
7	270	420
20	320	380

CONCLUSIONES

La evaluación de los indicadores bioquímicos analizados para *Eucalyptus nitens* y *Eucalyptus globulus* que difieren en su capacidad de enraizamiento indica que:

- El AIA es fundamental en la fase de inducción del enraizamiento y no es requerido en alta concentración en la fase de iniciación. Sin embargo, no es un marcador de la capacidad de enraizamiento en *Eucalyptus*, ya que no presentó diferencias significativas entre las dos especies.
- El alto contenido de fenoles totales se relaciona con la baja capacidad de enraizamiento de *E. nitens*.
- El contenido de fenoles totales es un buen marcador de la capacidad de enraizamiento en *Eucalyptus* ya que presentó diferencias significativas entre las especies.
- El contenido de carbohidratos totales no es un marcador de la capacidad de enraizamiento en *Eucalyptus* ya que no presentó diferencias significativas entre las dos especies.
- Es necesario investigar más acerca de compuestos fenólicos específicos del tipo flavonoides para el entendimiento de un control negativo del proceso rizogénico.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este estudio ha sido posible gracias a la colaboración de la empresa Forestal Mininco S.A. por su aporte en material vegetal; a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, CONICYT, por beca estudio de María Paz Jofré, y a proyecto 1020F11 INNOVA Bio Bio, por financiamiento de Tesis en la que se enmarca este artículo.

BIBLIOGRAFIA

- ARENA, M.E., G. MARTINEZ PASTUR, M.P. BENAVIDES & N. CURVETTO. 2005. Polyamines used in successive culture media improve *in vitro* rooting in *Berberis buxifolia* Lam. New Zealand Journal of Botany 43: 373-380.
- ASSIS, T., A FETT-NETO & A. COULO. 2001 Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century, 2004: 303-333 ISBN: 81-7736-228-318.
- BADR, A. & Y. DESJARDINS. 2007. Sugar uptake and metabolism in tissue cultured potato plantlets cultured in liquid medium. In: J.M. Santamaría & Y. Desjardins (eds.), Proceedings II IS on Acclimatation and Establishment of Micropropagation Plants. Acta Horticulturae 748: 265-273.
- BALLESTER, A., N. VIDAL & A.M. VIEITEZ. 2009. Developmental stages during *in vitro* rooting of hardwoods trees with juvenile and mature characteristics. In: K. Niemi & C. Scagel (eds.). Adventitious Root Formation of Forest Trees and Horticultural Plants-from Genes to Applications Pp. 277-296. Research Signpost, Kerala, India.
- BARTEL, B., S. LECLERE. M. MAGIDIN & B.K. ZOLMAN. 2001. Inputs to the active indole- 3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid b-oxidation. Journal of Plant Growth Regulation 20: 198-216.
- BROWN, D., A. RASHOTTE, A. MURPHY, J. NORMANLY, B. TAGUE, W. PEER, L. TAIZ & G. MUDAY. 2001. Flavonoids Act as Negative Regulators of Auxin Transport *in Vivo* in *Arabidopsis*. Plant physiology 126: 524-535.
- CABONI, E., M.G. TONELLI, P. LAURI, P. IACOVACCI, C. KEVERS, C. DAMIANO & T. GASPAR. 1997. Biochemical aspects of almond microcuttings related to *in vitro* rooting ability. Biologia Plantarum 19: 91-97.
- CALDERON BALTIERRA, X. 1994. Changes in peroxidase activity during root formation by *Eucalyptus globulus* shoot raised *in vitro*. Plant Peroxidase Newsletter 4: 27-29.
- CAMPBELL, M., A. BRUNNER, H. JONES & S. STRAUSS. 2003. Forestry is fertile crescent the application of biotechnology to forest trees. Plant Biotechnology Journal 1: 141-154
- DAVIES, P.J. 2004. Plant Hormones, Biosynthesis, Signal Transduction, Action. Edition 3rd. Kluwer Academic Publishers Netherlands. XIV, 802 pp.
- DE KLERK, G., W. KRIEKEN & J. DE JONG. 1999. The formation of adventitious root: new concepts, new possibilities. *In vitro* cell development. Biology Plant 35: 189-199.
- DE KLERK, G., H. GUAN, P. HUISMAN & S. MARINOVA. 2011. Effects of phenolic compounds on adventitious root formation and oxidative decarboxylation of applied indoleacetic acid in *Malus 'Jork 9'*. Plant Growth Regulation 63: 175-185.
- DELAPORTE, K. & M. SEDGLEY. 2004. Breeding of *Eucalyptus* bud and flower lines. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Clonal Propagation. Pp 22-33.
- DIAZ-SALA, C., K.W. HUTCHISON, W. GOLDFARB & M.S. GREENWOOD. 1996. Maturation related loss in rooting competence by loblolly pine stem cuttings: the role of auxin transport, metabolism and tissue sensitivity. Plant Physiology 97: 481-490.
- FETT-NETO, A., J. FETT, L. VIEIRA, G. PASCUALI, R. TERMIGNONI & A. FERREIRA. 2001. Distinct effects of auxin on adventitious root development *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. Tree Physiology 21: 437-461.
- FLORES, C., A. CABAÑAS, I. PEÑALOSA, R. QUINTANAR, J. VÁSQUEZ & M. URZÚA. 2009. Auxina endógena, AIA-oxidada y enraizamiento en *Vigna radiata* L. Wilczek inducida por auxina exógena libre y conjugada. Revista Fitotecnia Mexicana 32(1): 61-66.
- FRIML, J. 2003. Auxin transport – zapping the plant. Current Opinion. Plant Biology 6: 7- 12.
- GASPAR, M.J., N. BORRALHO & A. LOPES. 2005. Comparison between field performance of cuttings and seedlings of *Eucalyptus globulus*. Annual Science 62: 837-841.
- GEISS, G., L. GUTIERREZ & C. BELLINI. 2009. Adventitious root formation: new insight and perspectives. Annual Plant Reviews 37: 127-156.
- GUTIÉRREZ, D., C.H. ORTIZ & A. GARCÍA Y MENDOZA. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. UAQ. México. Pp. 1-5.
- HARTMANN, H.T., D.E. KESTER, F.T. DAVIES & R.L. GENEVE. 2002. Plant Propagation. Principles and Practices. 8th ed., Prentice Hall, New Jersey. 880 pp.

- KEVERS, C., C. BRINGAUD, J.F. HAUSMAN & T.H. GASPAR. 1997. Putrescine involvement in the inductive phase of walnut shoots rooting *in vitro*. *Saussurea* 28: 47-57.
- KOES, R., W. VERWEIJ & F. QUANTTROCCHIO. 2005. Flavonoides: un modelo colorimétrico de la regulación y la evolución de las vías bioquímicas. *Plant Science* 10(5): 236-242.
- KOZAI, T. & C. KUBOTA. 2005. Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. In: T. Kozai, F. Afreen & S.M.A Zobayed (eds.), *Photoautotrophic (sugar free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system*. Pp. 19-30. Springer. Dordrecht.
- LATSAGUE, M. & J. LARA. 2003. Fenoles solubles y su relación con la inhibición de la rizogénesis en estacas de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. *Gayana Botánica* (60)2: 85-90.
- LITTELL, R.C., A.G. MILLIKEN, W.W. STROUP, R.D. WOLFINGER & O. SCHABENBERGER. 2006. SAS for Mixed Models, 2nd Edition. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA. 519 pp.
- LI, S., L. XUE, S. XU, H. FENG & L. AN. 2009. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *Botanical Reviews* 75: 230-247.
- LIU, J.H. & D.M REID. 1992. Adventitious rooting in hypocotyls of sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. IV. The role of changes in endogenous free and conjugated indole-3-acetic acid. *Physiology Plant* 86: 285-292.
- LUDWIG-MÜLLER, J.L. 2000. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation* 32: 219-230.
- MANKESSI, F., A.R. SAYA, C. BAPTISTE, S. NOURISSIER & O. MONTEUUIS. 2009. *In vitro* rooting of genetically related *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* clones in relation to the time spent in culture. *Trees* 23: 931-940.
- MARTELLET, C. & A. FETT-NETO. 2005. Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. *Plant Growth Regulation* 45: 1-10.
- MARTÍNEZ PASTUR, G., M.E. ARENA, N. CURVETTO, D. ZAPPACOSTA & E. ELIASCO. 2003. Successive media to improve *in vitro* rhizogenesis of *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. *New Forests* 26: 201-215.
- MARTÍNEZ PASTUR, G., M. ARENA, L. HERNÁNDEZ, N. CURVETTO & E. ELIASCO. 2005. Histological events during *in vitro* rooting of *Nothofagus nervosa* (Fagaceae). *New Zealand Journal Botanic* 43: 61-70.
- METAXAS, D.J., T.D. SYROS, T. YUPSANIS & A.S. ECONOMOU. 2004. Peroxidases during adventitious rooting in cuttings of *Arbutus unedo* and *Taxus baccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment. *Plant Growth Regulation* 44: 257-266.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.
- MURPHY, A., W.A. PEER & L. TAÍZ. 2000. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* 211: 315-324.
- NAG, S., K. SAHA & M.A. CHOUTHURI. 2001. Role of Auxin and Polyamines in Adventitious Root Formation in Relation to Changes in Compounds Involved in Rooting. *Journal Plant Growth Regulation* 20: 152-194.
- NAJJA, S., N. ELLOUMI, N. JBIR, S. AMMAR & C. KEVERS. 2008. Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured *in vitro*. *Cell Roots Biologies* 331: 518-525.
- NORDSTROM, A.C., A.C. JACOBS & L. ELIASSON. 1991. Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on the internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiology* 96: 856-861.
- PACHECO, P., X. CALDERÓN & A. VEGA. 1995. Flavonoids as regulators and markers of root formation by shoots of *Eucalyptus globulus in vitro*. *Plant Peroxidase News* 1 (5): 9-12.
- PEER, W., A. BANDYOPADHYAY, J. BLAKESLEE, S. MAKAM, R. CHEN, P. MASSON & A. MURPHY. 2004. Variation in Expression and Protein Localization of the PIN Family of Auxin Efflux Facilitator Proteins in Flavonoid Mutants with Altered Auxin Transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 16: 1898-1911.
- POPSILOVÁ, J., D. HASEL, H. SYNKOVÁ, J. CATSKY, N. WIHELMOVÁ, S. PIZAKOVÁ, D. PROCHAZKOVÁ & F. SRAMEK. 2000. Photosynthetic pigments and gas exchange during *ex vitro* acclimatation of tobacco plants as affected by CO₂ supply and abscisic acid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61: 125-133.
- QADDOURY, A. & M. AMSA. 2004. Effect of exogenous indole butyric acid on root formation and peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase activities and phenolic contents in date palm off-shoots. *Botanical Bulletin Academia Sinica* 45: 127-131.
- REINHARD, D., T. MANDEL & C. KUHEMEIER. 2000. Auxin regulates the initiation and Radial position of Plant Lateral Organs. *The Plant Cell* 12: 507-518.
- RÍOS, D., M. SÁNCHEZ-OLATE, M. GEA, R. RODRÍGUEZ. 2002. Nuevos sistemas experimentales para el estudio de la rizogénesis en nogal. *Agrociencia* 17: 221-228.
- RÍOS, D., D. AVILÉS, M. SÁNCHEZ-OLATE, R. ESCOBAR & C. PEREIRA. 2005. Rooting Rate Variation Related to Subculture Number and Diameter of Chestnut *Castanea sativa* Mill. Microshoots. *Agricultura Técnica (Chile)* 65(3): 258-264.
- ROBERT-KLEVER, N., J. ALBREECHLOVÁ, S. FLEIG, N. HUCK, W. MICHALKE, E. WAGNER, V. SPETH, W. NEUHRUS & CH. FISCHER-IGLESIAS. 2003. Plasma Membrane H⁺-ATPase Is Involved in Auxin-Mediated Cell Elongation during Wheat Embryo Development. *Plant Physiology* 131: 1302-1312.
- SAN JOSÉ, M.C., L. ROMERO & L. JANEIRO. 2012. Estudio anatómico del desarrollo de raíces adventicias en microestaquillas de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Revista Real Academia Galega de Ciencias* 31: 15-26.
- SOLAR, A., M. COLARIC, V. USENIK & F. STAMPAR. 2006. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinons in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Science* 170: 453-461.
- SCHWAMBACH, J., C. MICHELS RUEDELL, M. RODRIGUES DE ALMEIDA, R. PENCHEL, E. FRANK DE ARAU & A. FETT-NETO. 2008. Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* × *maidennii* mini-cuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. *New Forests* 36: 261-271.
- STRADER, L., A. HENDRICKSON, J. COHEN & B. BARTEL. 2010.

- Conversion of Endogenous Indole-3-Butyric Acid to Indole-3-Acetic Acid Drives Cell Expansion in *Arabidopsis* Seedlings. *Plant Physiology* 153: 1577-1586.
- TAYLOR, L.P. & E. GROTEWOLD. 2005. Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion Plant Biology* 8: 317-323.
- TEALE, W., I. PAPONOV & K. PALME. 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Review Molecular Cell Biology* 7: 847-859.
- TAKAHASHI, F., K. SATO-NARA, K. KOBAYASHI, M. SUZUKI & H. SUZUKI. 2003. Sugar-induced adventitious roots in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Research* 116: 83-91.
- VALENZUELA, S., F. HEVIA, M. TELLO, L. MINOLETTI, R. WILKENS & A. URBINA. 1998. Determinación de ABA en hojas de *Eucalyptus globulus* a través de HPLC. *Agrociencia* 14: 29-34.
- WOODWARD, A. & B. BARTEL. 2005. Auxin: Regulation, Action and Interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735.

Recibido: 21.01.14
Aceptado: 01.10.15