

REVISION

Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas

Oswaldo H. Caso

RESUMEN

El trabajo está dedicado a presentar el estado actual del conocimiento en lo que se refiere a la multiplicación por métodos no sexuales de especies forestales, a la necesidad de obtener material juvenil o rejuvenecido para lograr éxito en la propagación vegetativa o **clonación**. En las especies frutícolas es común la propagación por medio de injertos sobre porta-injertos juveniles, un método eficaz para rejuvenecer parcialmente material adulto o, en otros términos, maduro. Durante el desarrollo se hará hincapié tanto en métodos aplicables a la planta madre como aquellos empleados en el cultivo *in vitro*.

En los últimos años han tomado incremento las investigaciones sobre este tipo de propagación en varias especies forestales, aunque son escasas en las cuales exista producción masiva de individuos. Entre las ventajas que presentan su empleo se ubican la posibilidad de lograr un mejoramiento rápido de individuos seleccionados por su productividad, calidad, resistencia a patógenos, etc., por medio de técnicas convencionales (injertos, enraizamiento de estacas, acodos, etc.) o por el cultivo *in vitro* de meristemas, tejidos o células, además de permitir la clonación de híbridos e individuos poliploides. Desde la formación de la cigota hasta la muerte, el ciclo ontogenético de todo individuo pasa por distintas fases o etapas, cada una de las cuales presenta características morfológicas, histológicas, fisiológicas y bioquímicas diferentes. La capacidad de propagación vegetativa, por medio de cualquier técnica, está asociada con el carácter juvenil. Cuanto más joven sea el ejemplar, más rápida y fácil será su propagación. Este carácter juvenil persiste en las áreas basales de un árbol, lo que posibilita su empleo para la multiplicación vegetativa, mientras que las partes más altas y periféricas son las primeras en manifestar características adultas; por lo tanto, puede darse el caso que aun cuando se provoque una floración, ésta no se manifieste en las ramas basales.

Luego de discutir las teorías que se conocen sobre la coexistencia de tejidos con distinta edad fisiológica, los conceptos de topofisis y ciclofisis, se analizan los procedimientos que se pueden emplear para lograr el rejuvenecimiento de las partes adultas de ejemplares selectos para utilizarlas en la propagación vegetativa. Ellos pueden separarse en dos clases: empleo de órganos juveniles separados de plantas adultas (enraizamiento de estacas, injertos sucesivos, brotes epicórmicos) o mediante el rejuvenecimiento de partes adultas (brotes luego de una poda severa, tratamientos con reguladores del crecimiento, cultivos *in vitro* de meristemas, etc.).

Palabras Clave: Rejuvenecimiento, especies leñosas, topófisis, injerto.

Oswaldo H. Caso, 1992. Juvenility, rejuvenation and plant propagation in woody plants. Agriscientia IX N° 1 : 5-16.

ABSTRACT

This paper attempts to present the state of the art in the knowledge of multiplication of woody species by nonsexual methods, given the need to obtain juvenile or rejuvenated material for the success of vegetative propagation or cloning. In fruit species, propagation by grafts on juvenile stocks is an effective method for partially rejuvenating adult material, or in other terms, mature material. In the course of the presentation, emphasis will be made on methods applicable to the mother plant as well as those used for *in vitro* culture. In forest trees, research on this type of propagation has increased in the last few years, however, there are few instances of massive production of individuals. The advantages of this method are the possibility of achieving rapid multiplication of individuals (selected for their productivity, quality, resistance to pathogens, etc), the cloning of hybrids and polyploid organisms by means of conventional techniques (grafting, rooting of cuttings, etc.) or by *in vitro* culture of meristems, tissues or cells.

From zygote to death, the ontogenetic cycle of every individual goes through different phases or stages, each characterized by typical morphological, histological, physiological and biochemical features. The capacity for vegetative propagation, by means of any technique, is associated with juvenile characteristic. The younger the specimen, the faster and easier its propagation. Juvenile characteristics persist in the basal parts of the tree, capable for vegetative propagation, while higher, more peripheral parts of the plant are the first to show adult characteristics, thus, even in flowering induced, it may not be expressed in the basal branches.

Current theories on the coexistence of tissues of different physiological age, the concepts of topophysis and cyclophysis will be discussed. Procedures employed to achieve rejuvenation of adult parts of specimens selected for vegetative propagation will also be presented. These can be divided into two broad categories: use of juvenile organs excised from adult plants (rooting of cuttings, successive graftings, epicormic shoots) and rejuvenation of adult parts (buds developed after severe pruning, treatments with growth regulators, *in vitro* meristem culture, etc.)

Oswaldo H. Caso. Centro de Ecofisiología Vegetal (CONICET)
Serrano 665 - 1414 Capital Federal. Argentina.

INTRODUCCION

Aunque la mayor parte del trabajo estará dedicado a presentar el estado actual del conocimiento en lo que se refiere a la multiplicación por métodos no sexuales de especies forestales, la necesidad de obtener material juvenil o rejuvenecido para lograr éxito en la propagación vegetativa o **clonación** también es válida para las especies frutícolas. En éstas es común la propagación por medio de injertos sobre porta-injertos juveniles, un método eficaz para rejuvenecer parcialmente material adulto o, en otros términos, maduro. Durante el desarrollo de este tema se hará hincapié tanto en métodos aplicables a la planta madre como a aquellos empleados en el cultivo *in vitro*.

Si bien, la propagación clonal de sauces y álamos se practica desde hace bastantes años, y la

de eucalipto puede considerarse un éxito en algunos países, como Brasil y Francia, la multiplicación asexual de muchas especies forestales no ha alcanzado una difusión importante. La excepción es el caso de *Cryptomeria japonica*, cuya multiplicación clonal se practica en Japón desde hace varios siglos. En algunas especies de coníferas (*Picea abies*, *Pinus radiata*, *P. pinaster* y, hasta cierto punto, *P. taeda*, *Pseudotsuga menziesii*, *Sequoia sempervirens*, *Sequoiadendron*), en países como Francia, Suecia, Nueva Zelanda y Estados Unidos de Norteamérica, se emplean métodos de propagación *in vivo* o *in vitro* con un relativo desarrollo. Sin embargo, el número de especies en las que se investiga la posibilidad de la propagación clonal es mucho mayor (Paranjothy *et al.*, 1990). Todo esto permite afirmar que a medida que se vayan solucionando aspectos tecnológicos la clonación de individuos superio-

res será una práctica común. Por ello, es conveniente fijar algunos conceptos básicos que permitirán un mayor avance en la aplicación de estas tecnologías.

En primer lugar, conviene preguntarse por qué razón es necesario multiplicar por métodos no sexuales a las especies vegetales de interés para el hombre. Tratándose de especies forestales, la posibilidad de obtener ejemplares superiores, por medio de cruzamientos y selecciones repetidas es extremadamente difícil y complejo. La selección del mejor material que se empleará en un nuevo lugar forestal, mediante los tests de origen, exige una duración prolongada hasta llegar a determinar los mejores árboles. La mayoría de las especies forestales tienen un alto grado de heterocigocidad y un prolongado ciclo de vida, lo cual requiere un número variado de generaciones para lograr una pequeña ganancia genética. En cambio, la clonación de individuos seleccionados por su productividad, calidad, resistencia a patógenos, etc., por medio de técnicas convencionales (injertos, enraizamientos de estacas, acodos, etc.) o por el cultivo *in vitro* de meristemas, tejidos o células puede dar como resultado una ganancia importante en una sola generación (Bonga, 1982) (*). Por otra parte, la propagación vegetativa permite la multiplicación de híbridos e individuos poliploides.

Si se pretende mejorar el porte de una especie forestal determinada por medio de selección, se buscará elegir y propagar los árboles más altos. En esta forma podrá disminuirse la variabilidad en altura de una plantación (Fig. 1). Sin embargo, la ganancia genética será mínima; en todo caso, lo que se habrá conseguido será menor variabilidad en el stand de árboles considerados. Si, por lo contrario, se logra propagar por métodos vegetativos a los árboles más altos, se conseguirá una ganancia genética mayor y una menor variabilidad. Es decir, que en este caso el mejoramiento logrado será apreciable.

Sin embargo, la posibilidad de clonar individuos selectos que han alcanzado el estado adulto para tener la seguridad de su alta calidad es casi imposible pues, en la mayoría de las especies, dicha condición de adultez restringe las capacidades morfogenéticas del individuo. Por ello, para que todo intento de clonación tenga éxito asegurado deberá emplearse material juvenil o

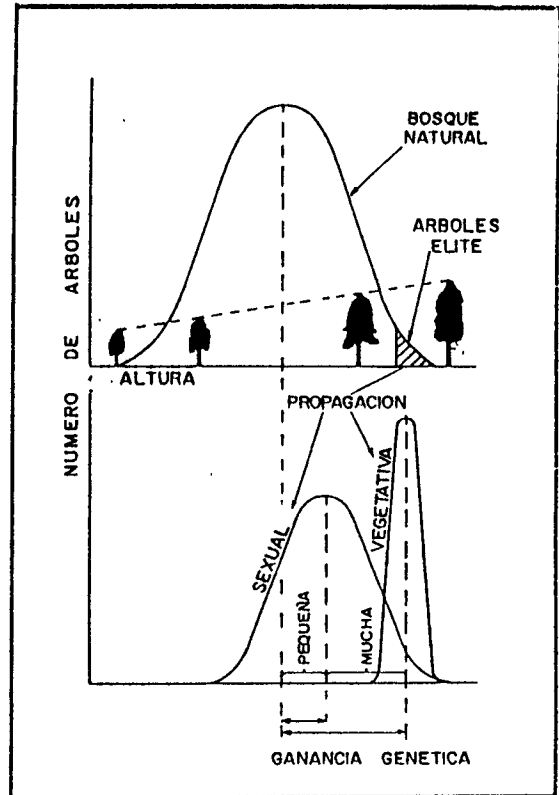


Fig. 1: Ganancia genética que puede lograrse de acuerdo a que se emplee propagación sexual o vegetativa de árboles selectos (Adaptado de Bonga, 1982.)

rejuvenecido. La capacidad de propagación vegetativa, por medio de cualquier técnica, está asociada con el carácter juvenil, por lo que cuanto más joven sea el individuo, más rápido y fácil será su propagación. En la bibliografía son abundantes los ejemplos de multiplicación vegetativa de ejemplares juveniles pero, si bien estos trabajos son importantes para incrementar el conocimiento, no significan el desarrollo de técnicas con posibilidades de aplicación práctica.

Fases en el ciclo de vida de un individuo

Desde la formación de la cigota, todo individuo atraviesa una serie de fases o estados ontogénicos que culminan en su senescencia y la muerte. Cada uno de ellos tiene características bioquímicas, fisiológicas, histológicas, etc. peculiares (Franclet, 1983; Neri, 1991; Trippi, 1990). En este tema de la propagación vegetativa interesan dos fases, juvenil y adulta, y la posibilidad de lo-

(*) Por lo general, sólo se citarán trabajos generales o revisiones, salvo algunos otros considerados relevantes.

grar rejuvenecimiento o reversión mediante métodos y técnicas adecuadas.

Durante el desarrollo de toda planta perenne, a partir de la germinación de la semilla, se reconoce la existencia de un período juvenil, de crecimiento muy activo y durante el cual no ocurre la floración ni es posible inducirla, aún cuando se suministren las condiciones ambientales o los tratamientos posibles para que ello ocurra (Hackett, 1985). El período juvenil puede durar unos pocos días, como en algunos cultivares híbridos de *Rosa*, uno o pocos años o 30 a 40 como es el caso en especies de *Quercus*, *Picea*, *Abies* o *Fagus* (Tabla 1).

Tabla 1. Duración del período juvenil en algunas especies leñosas (Adaptado de Hackett, 1985)

ESPECIE	DURACION
<i>Rosa sp.</i>	20-30 días
<i>Vitis spp.</i>	1 año
<i>Prunus spp.</i>	2-8 años
<i>Malus spp.</i>	4-8 años
<i>Citrus spp.</i>	5-8 años
<i>Pinus sylvestris</i>	5-10 años
<i>Sequoia sempervirens</i>	5-15 años
<i>Larix decidua</i>	10-15 años
<i>Pseudotsuga menziessi</i>	20 años
<i>Picea abies</i>	25 años
<i>Quercus robur</i>	30 años
<i>Fagus sylvatica</i>	40 años

Debe tenerse en cuenta que la duración de la etapa juvenil está marcada genéticamente. Así pueden encontrarse dentro de una población a individuos que alcanzan la fase o estado adulto varios años antes que el promedio para la especie.

Por lo general el período juvenil está relacionado con el tamaño final de la planta y, en la mayoría de los casos, los arbustos presentan un período o fase juvenil más corto.

Si bien pueden existir distintas condiciones o requerimientos para que se alcance la fase o estado adulto, se considera que el inicio de la floración marca la terminación del estado juvenil. Sin embargo, en distintas especies se reconocen diferencias morfológicas, fisiológicas y bioquímicas

que pueden servir para reconocer el estado ontogénico de un individuo (Tabla 2)

Existen otras características diferenciales entre ambos estados, como ser longitud y diámetro de traqueidas, resistencia al frío y a los patógenos. Un avance importante en la caracterización de las fases ontogénicas ha sido la determinación de la existencia de un polipéptido unido a membrana que es típico de la fase juvenil (Monteuuis et Bon, 1990). La generalización de su presencia permitirá contar con un parámetro muy apto para reconocer los cambios de fase.

Una característica importante en el cultivo *in vitro* de células y tejidos y, aún en la micropropagación por cultivo de yemas, es la pérdida o, al menos, la disminución de la capacidad morfogenética, ya sea en los procesos de organogénesis o embriogénesis. Sin embargo, la característica que en todas las especies marca el final del estado juvenil es la iniciación de la floración. Esto indica que la planta ha alcanzado la madurez sexual. Si bien es posible inducir una floración precoz en plantas juveniles, mediante tratamientos con giberelinas (Pharis and Morf, 1968) y en ciertas situaciones de stress (Hield *et al.*, 1966), dicha floración es temporaria, desapareciendo cuando cesa el estímulo.

Las diferencias entre el estado juvenil y el adulto en algunas especies ha llevado a la creación de una nueva entidad botánica. Tal es el caso de algunos miembros de la familia Cupresaceae, cuyas formas juveniles se conocieron durante muchos años como género *Retinospora* (Dodd and Power, 1988).

Como regla general puede decirse que las partes más altas y periféricas de un árbol son las primeras en manifestar características adultas; por lo tanto, puede darse el caso que aún cuando se provoque una floración, esta no se manifiesta en las ramas basales. Otra indicación de la existencia de gradientes en la juvenilidad se tiene en la diferencia en la capacidad de formar raíces adventicias por los distintos nudos de algunas especies como ser *Picea abies* (Olesen, 1982). *Eucalyptus grandis* (Patton *et al.*, 1970). En plantas jóvenes de esta última especie, la capacidad de enraizamiento decrece desde el nudo cotiledonar cesando completamente al alcanzarse el 15º nudo, aun cuando todavía la planta no ha llegado al estado reproductivo.

El comienzo de la fase adulta en el ciclo ontogénico de un individuo es controlado por distintos factores genéticos y fisiológicos. El control genético puede ser monogénico, como en *Betula*

Tabla 2. Caracteres diferenciales entre los estados o fases juvenil y adulto (Adaptado de Bonga, 1982; Franclet, 1983)

	JUVENIL	ADULTO
NUCLEO	Pequeño, rodeado por una delgada capa de citoplasma. Cromatina con escasa condensación.	Reticulado, rodeado por membranas del retículo endoplásmico. Cromatina condensada, eucromatina poliploide.
RIBOSOMAS	Libres	Asociados a membranas
MERISTEMA APICAL	Domo pequeño, con pocas células de gran tamaño	Domo alto, con numerosas células de menor tamaño, gran contenido de RNA.
HOJAS	Generalmente simple, con bordes enteros (<i>Passiflora</i> , <i>Ipomea</i> , tomate, etc.) En <i>Eucalyptus</i> son oblongas, ceríceas. En <i>Hedera</i> y <i>Taraxacum</i> son lobadas. Retención en invierno.	Complejas, lobadas (<i>Passiflora</i> , <i>Ipomea</i> , tomate), lanceoladas en <i>Eucalyptus</i> , runcinadas en <i>Taraxacum</i> . Células epidérmicas pequeñas, nervadura compleja.
RAMAS	Forman ángulo obtuso con el tronco, corteza gruesa. Puede haber presencia de espinas.	Angulo agudo con el tronco, corteza delgada, sólo muy raramente hay presencia de espinas.
EMPLEO DE ESTACAS PARA LA FORMACION DE RAICES ADVENTICIAS	Generalmente son de fácil enraizamiento. Buena recuperación del crecimiento ortotrópico si la estaca formó parte de una rama. Crecimiento vigoroso. Buena raíz pivotante.	Pobre o nulo enraizamiento. Poco crecimiento. Generalmente no hay formación de raíz pivotante. Si formó parte de una rama, crecimiento plagiotrópico.
DIFERENCIAS BIOQUIMICAS	Bajo contenido de ABA y otros inhibidores, alto contenido de auxinas endógenas. Alta actividad de peroxidasas en la base de las estacas. Alta relación K/Ca.	Alto contenido de ABA y otros inhibidores. Bajo contenido de auxinas y de actividad total de peroxidasas. Relación baja K/Ca.

Obs. Las características enumeradas no son válidas para todas las especies; por lo general, sólo a algunas pueden aplicarse varias de ellas.

verrucosa o tener un componente aditivo en la heredabilidad del carácter, como es el caso de manzano, peral, duraznero y cítricos (Neri, 1991). La revisión de Brink (1862) es un trabajo clásico sobre los aspectos genéticos de los cambios de fase en las plantas superiores. Entre los factores fisiológicos puede citarse el nivel de las giberelinas y del ácido abscísico como condicionantes para la iniciación de la fase adulta (Hackett, 1985). También las condiciones ambientales durante la vida del individuo tienen incidencia en la duración de la fase juvenil (Hackett, 1985).

Una vez lograda, la fase adulta es estable y la floración ocurrirá toda vez que el estímulo ambiental o el tratamiento necesario esté presente. La reproducción sexual significa la forma natural de la iniciación de la etapa adulta de un nuevo individuo. La formación de yemas adventicias en cultivos *in vitro* y la embriogénesis somática son formas de reversión a condiciones de juvenilidad. Por lo tanto, es más fácil lograr organogénesis en cultivos *in vitro* cuando éste se inicia a partir de explantos separados de ejemplares juveniles o de distintas partes del embrión. En forma experi-

mental, también ha sido posible provocar una reversión mediante tratamientos con giberelinas (Robbins, 1957) o en ciertas situaciones de stress (Allsopp, 1954; Trippi, 1964).

Aunque una planta leñosa haya alcanzado su estado adulto, algunas partes de ellas retienen las características juveniles. Un hecho que demuestra esto ocurre cuando se provoca la brotación de la yema interfascicular en algunas especies de *Pinus*, como ser *P. taeda* (Caso, 1989). Luego de una poda severa de ramas en árboles de 6 años de edad se produce la brotación de la yema apical del braquiblasto, dando origen a un brote con hojas similares a las que se forman en las primeras etapas del crecimiento de una plántula.

En la figura 2 se presentan distintos ejemplos de manifestaciones juveniles en un árbol adulto. La posición de un meristema, tanto a lo largo del tronco como de las ramas determina el grado de juvenilidad. El meristema apical del tallo o de una rama es menos juvenil que aquellos que están ubicados a distancias menores de la raíz. En el tronco de muchos árboles pueden originarse brotes con caracteres juveniles, que se denominan brotes **epicórmicos**. Otros tipos de brotes juveniles pueden formarse sobre raíces horizontales, más bien superficiales (**brotes de raíz**) o tener por origen los **esferoblastos**, unas estructuras anormales que pueden presentarse en los troncos de ár-

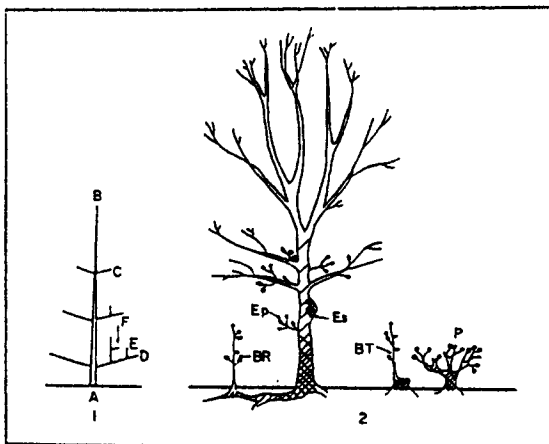


Fig. 2: 1. El grado de juvenilidad de un meristema en un ejemplar adulto es inversamente proporcional a la distancia que existe entre la zona del cuello de la raíz (A) y dicho meristema, ya su locación sea B, C, D, E o F. Lo indicado es válido para todo tipo de árbol. 2. Distintas posibilidades de formación de brotes juveniles en ejemplares adultos de árboles: BR= brotes de raíz; BT= brote de tronco, posible luego de tala; Ep: brote epicórmico; Es: esferoblasto; P= poda severa. (Adaptado de Bonga, 1982)

boles como manzano y peral (Wellensiek, 1952) o *Araucaria brasiliensis* (Feltan y Caso, 1987). También pueden aparecer brotes juveniles cuando individuos adultos de especies como *Eucalyptus grandis*, *E. viminalis*, *Sequoiadendron giganteum* (Monteuuis, 1989) son talados. Como ya se dijo antes, la poda severa de árboles adultos puede provocar la formación de brotes juveniles.

Topoflisis, cicloflisis y rejuvenecimiento

La coexistencia de tejidos con características juveniles en individuos que alcanzaron la madurez sexual es reconocida desde hace bastantes años. Existen dos teorías que tratan de representar este concepto (Monteuuis, 1989). El concepto de Krenke (1940), retomado por Franclet (1983) considera que **durante el desarrollo ontogénico de un individuo ocurre el fenómeno de maduración de acuerdo a un modelo reiterativo en función de unidades de crecimiento sucesivas**. A este concepto se opone el de Passecker (1947) que atribuye un **carácter irreversible al proceso de maduración que ocurre durante el desarrollo**. Mientras que Krenke considera que en un árbol coexisten áreas de diferente maduración, que se repetirían en cada ciclo de crecimiento, siempre influenciadas por los tejidos subyacentes, o sea a fenómenos correlativos que serían el resultado de su posición en la planta en un momento dado. Franclet (1983) completa el concepto de Krenke agregando que "territorios juveniles pueden determinarse en la copa de los árboles", pero que "la duración del estado juvenil de los meristemas apicales es más breve en cada uno de los ciclos de crecimiento de una planta plurianual".

En cambio, en el concepto de Passecker se otorga un carácter irreversible al avance de la maduración desde las áreas basales del vástago hasta los extremos de las ramas; es decir, que los caracteres que marcan al estado juvenil estarían genéticamente programados y, por ello, serían irre recuperables.

Para ambos autores, las áreas con mayor juvenilidad están ubicadas en las zonas más cercanas al sistema radical. En estos conceptos, el término **maduración** se emplea para indicar la transición del individuo desde una fase juvenil a una adulta, según el concepto expresado por Wareing (Hackett, 1982).

Esto lleva a considerar el concepto de **determinación** de los meristemas. Los silvicultores conocen que, en muchas especies arbóreas, si se consigue enraizar una estaca de rama es casi im-

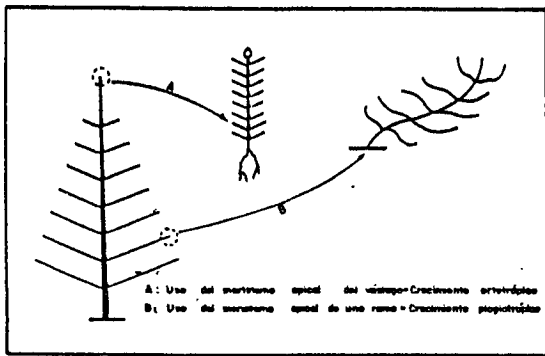


Fig. 3: Diferencias en el crecimiento de una estaca de pino enraizada según que ella provenga de un individuo joven o de la rama de un árbol adulto.

posible obtener un tronco recto, de crecimiento ortotrópico. Aunque es más común encontrarlo en Coníferas, el crecimiento será plagiotrópico (Fig. 3). En algunos géneros de Coníferas, como *Araucaria*, existe una determinación muy marcada de sus meristemas; extremos apicales de las ramas crecen en forma diageotrópica aún luego de injertos sucesivos sobre pies juveniles.

Es decir, que si un meristemo apical es separado de la planta y colocado en condiciones de dar origen a un nuevo individuo (ya sea por injerto o enraizamiento), el tipo de crecimiento que producirá estará determinado por la posición que ocupaba en la planta adulta. Este fenómeno ha sido denominado **Topofisis**, término que fue introducido por Molisch (1915) al describir experimentos de Vöchting (1904) con *Araucaria excelsa*. Si la estaca incluía la yema terminal, la nueva planta presentaba un crecimiento ortotrópico; por el contrario, si era una estaca de rama, el crecimiento era más o menos oblicuo, dependiendo del lugar de la planta de donde se la había separado (Schaffalitzky, 1959; Olesen, 1978). Esta distinta condición fisiológica se observa claramente en individuos adultos caducifolios que, al llegar el invierno, pierden más rápido las hojas de las partes superiores de la copa, mientras que quedan retenidas en las ramas más bajas. La existencia de este gradiente fisiológico a lo largo de una planta también se expresa cuando se cultivan *in vitro* yemas o en la capacidad de formar raíces adventicias por brotes separados a distintas alturas de una planta. Así Evers (1984) demostró las diferentes características metabólicas, estructurales y en capacidad de morfogénesis de

yemas cultivadas *in vitro* separadas de distintos nudos de plantas de *Pseudotsuga menziesii*. Este efecto de la posición topográfica de los meristemas tiene, además de su importancia teórica, una gran implicancia práctica.

No debe confundirse este término con el de **clorofisis**, que alude a las propiedades que tienen los meristemas apicales condicionados por su estado de desarrollo (Schaffalitzky, 1959). En este caso se alude a los cambios motivados por la edad del individuo y relacionados con el **envejecimiento ontogénico** (Fortanier and Jonkers, 1976; Hackett, 1985) mientras que topofisis se refiere a la distinta potencialidad que tienen los meristemas apicales ubicados en diferentes lugares del individuo (Trippi, 1964; 1990). A este fenómeno, también, se lo llama **envejecimiento fisiológico**.

Estas condiciones ontogénicas y fisiológicas de los distintos meristemas apicales de una planta leñosa deben ser consideradas cuando se desea multiplicar por métodos no sexuales a ejemplares adultos. En estos casos debe procederse a emplear yemas de áreas juveniles, siempre presentes en las áreas basales del tronco o en las raíces. En caso contrario será necesario lograr el **rejuvenecimiento** del material adulto, ya sea mediante tratamiento de la planta dadora o de los materiales que se emplearán en la propagación (púas para injertar, trozos de ramas para enraizar, etc.). Esto es válido tanto para cuando se deseen usar métodos tradicionales o para la micropropagación. No debe confundirse esta reversión temporaria de las características adultas ya adquiridas por los tejidos con la denominada **rejuvenecimiento** (Franclet *et al.*, 1987; Neri, 1991), en la cual se obtiene una completa reversión del estado adulto al juvenil. Esto ha sido conseguido en el cultivo *in vitro* de embriones nucleares de vid (Mullins and Srinivasan, 1976), cítricos, mango (Litz *et al.*, 1985). En estos casos se inicia el ciclo ontogénico de un nuevo individuo.

Procedimientos para lograr el rejuvenecimiento

Como se aclaró, la capacidad de formar órganos adventicios es una característica juvenil que tiende a desaparecer una vez alcanzada la etapa madura. Sin embargo, por lo general, recién es cuando se conoce bien la calidad de un árbol. Existen distintos procedimientos que se pueden aplicar a la planta dadora de órganos capaces de ser empleados en la clonación de individuos

selectos. Ellos pueden ser separados en dos clases (Hackett, 1985):

1. Empleo de órganos juveniles separados de plantas adultas,

2. Rejuvenecimiento de partes adultas.

1.1. Empleo de estacas enraizadas. Como se dijo, las partes basales de los troncos y de las ramas basales retienen características juveniles. Sólo en el caso de los álamos y de *Cryptomeria* es posible emplear estacas tomadas de cualquier parte de la planta con relativamente el mismo éxito. No obstante, por lo menos con los álamos, existen diferencias según que la estaca proceda de las partes bajas, medias o altas de la copa, ya que la respuesta morfogénica se ve afectada tanto por topofisis como por ciclofisis. Por ello, la población que se obtendrá con estacas tomadas de distintas partes de una misma planta será heterogénea (Martínez Pastur *et al.*, 1991)

En la bibliografía existen ejemplos de propagación clonal mediante el empleo de estacas separadas de áreas basales en las que se indujo la formación de raíces adventicias. Propagación clonal de este tipo se ha logrado con *Pseudotsuga menziessi* (Franclet, 1979), *Picea abies*, *Pinus strobus*, *P. radiata*, *P. virginiana* (Hackett, 1985). En dos especies de *Eucalyptus*, *E. viminalis* y *E. ficifolia*, se demostró que la capacidad de formar raíces adventicias disminuye a medida que se empleaban nudos más alejados del nudo cotiledonar. Esta cualidad fue atribuida a la mayor concentración de un inhibidor G en los nudos superiores (Patton *et al.*, 1970). Aun plantas jóvenes pueden presentar diferencias morfogénicas según la ubicación de los nudos en plantas de 2 años de *Ps. menziessi* (Evers, 1984).

1.2. Empleo de brotes epicórmicos, que se originan por la brotación de yemas latentes en la base de los troncos y ramas basales de individuos adultos. Si bien este tipo de brotes no se observa en la mayoría de las especies, han sido determinados en *Gleditsia triacanthos*, *E. rostrata*, *E. polyanthemos* y en *Olea europea*. En plantaciones de Misiones he tenido oportunidad de observar la formación natural de brotes epicórmicos en *Pinus oocarpa* (muy abundantes), en *P. taeda* (poco comunes) y en *A. angustifolia*. También pueden presentarse como resultado de una situación de stress; en Gob. Virasoro (Corrientes), se observó la formación de una gran cantidad de brotes epicórmicos en un árbol de *P. elliotii*, muy dañado por granizo. Igualmente existen citas de que fue posible forzar la formación de brotes epicórmicos,

luego de una poda severa de individuos adultos de especies como manzano, *P. radiata* y en varias especies de *Eucalyptus* (Hackett, 1985). No se conoce la influencia que puede tener la edad del individuo y las condiciones ambientales sobre la brotación de esas yemas latentes.

Tratamiento con citocininas de la base de los troncos pueden llegar a inducir la brotación de las yemas latentes, con formación de brotes epicórmicos (Mazalewski and Hackett, 1979). En árboles de 6 años de edad de *P. taeda* fue posible inducir este tipo de brotación con la inyección de 10 ml de una solución de BA en la base del tronco (Caso, trabajo no publicado).

Existen discrepancias entre distintos autores con respecto a la implicancia fisiológica del proceso de formación de brotes epicórmicos por poda severa o tala. Mientras algunos consideran que puede ser considerado como un verdadero rejuvenecimiento, para otros sería una reversión del envejecimiento fisiológico (cf. Hackett, 1985)

2. El rejuvenecimiento de las partes de una planta adulta se basa en el conocimiento de que si bien las características de un individuo maduro son relativamente estables, en ciertas condiciones puede lograrse una reversión parcial o total al estado juvenil.

2.1. Iniciación de yemas adventicias y embriones. Por regla general, las plantas crecidas a partir de yemas adventicias tienen, hasta cierto punto, características juveniles, que puede reflejarse en la forma de las hojas, capacidad de enraizamiento, demora en la primera floración, etc. Los renuevos que se originan en las raíces o en lignotubérculos (como puede ser en ciertas especies de *Eucalyptus*) tienen caracteres juveniles. Lo mismo ocurre con las yemas adventicias que pueden formarse en hojas, como fue observado en yemas adventicias formadas en primordios foliares de vid, cultivados *in vitro* (Barlass and Skene, 1980)

En algunas especies, como ser manzano, peral (Wellensiek, 1952; Baldini and Scaramuzzi, 1956), *Ilex aquifolium* (Garner and Hatcher, 1962, cit. en Hackett, 1985), olivo (Baldini and Mosse, 1957), *Araucaria angustifolia* (Feltan y Caso, 1987) se forman esferoblastos (estructura de apariencia tumoral, con células de tipo meristemático y yemas adventicias). Estas formaciones pueden ser producidas en forma natural o como consecuencia de situaciones de stress. Las yemas pueden originar tallos con características juveniles (Hackett, 1985), con buena capacidad de enraizamiento y retardo en la floración.

Las yemas adventicias inducidas en el cultivo de callos, también tienen características juveniles (Montaldi, 1963; Banks, 1979) y podrían resultar un excelente material para la propagación clonal de individuos adultos. La principal dificultad con este tipo de rejuvenecimiento radica en que, por lo general, este tipo de formación adventicia presenta anomalías cromosómicas que lo alejan del tipo que se quiere multiplicar (Bonga, 1982).

Otra forma de rejuvenecimiento es la formación de embriones adventicios a partir del nucelo, como ocurre en especies poliembriónicas de cítricos, mango, etc. (Litz, 1985). Como se dijo antes, la formación del embrión, ya sea por medios sexuales, apomixis y, en este caso, a partir del tejido materno, sin reducción meiótica, constituye el inicio de un nuevo ciclo ontogénico. Sin embargo, este proceso de rejuvenecimiento está reducido a unas pocas especies con tales características de regeneración.

2.2. Injerto de yemas adultas sobre pies juveniles. Este tipo de propagación vegetativa es el más común en la fruticultura. Uno de los primeros trabajos sobre el efecto de este tipo de injerto sobre la reversión al estado juvenil de ejemplares adultos lo constituye el trabajo de Doorenbos (1954) con *Hedera helix* (citado por Hackett, 1985). Similares resultados se obtuvieron con injertos de púas adultas sobre pies juveniles de *Passiflora caerulea* (Montaldi *et al.*, 1963).

En especies forestales, los ejemplos de rejuvenecimiento logrados con injertos son poco abundantes y algunos son contradictorios. Autores franceses como Chaperon, Francllet y Marton, todos de la Association Forêt-Cellulose (AFOCEL), afirman haber conseguido rejuvenecer especies de *Eucalyptus* por medio de injertos sucesivos de púas adultas sobre ejemplares juveniles (Francllet, 1977, 1983). En todos los casos se trata de injertos de yemas muy pequeñas sobre porta-injertos juveniles, realizados en forma sucesiva y a cortos intervalos. El tiempo que transcurría entre cada injerto tenía relación con el rejuvenecimiento alcanzado, medido por el hábito de crecimiento, características del follaje, incremento de vigor y por el potencial de enraizamiento (Francllet, 1979).

Otros ejemplos de este método de rejuvenecimiento se citan para *Hevea brasiliensis*, *Cupressus dupreziana* y en *Hedera canariensis*. Otro detalle que debe tenerse en cuenta es la presencia de hojas, ya sea en el injerto o en el patrón. Doorenbos (1954) demostró que si el porta-injerto (maduro) tiene hojas, el rejuvenecimiento obtenido

es menor que si el injerto tiene hojas. El trabajo de Patton *et al.* (1970) tiene relación con este efecto; estos autores demuestran la existencia de un factor de inhibición del enraizamiento en las hojas adultas de *Eucalyptus*. El principio en este procedimiento está relacionado con la posible existencia de factores de juventud en las hojas de los porta-injertos; los injertos sucesivos buscarían la acumulación de los factores en la parte injertada.

En todos los trabajos de este tipo falta una contraprueba, como sería el injerto de una púa madura sobre un pie del mismo tipo. Por ello, existe dificultad en conocer si lo que se produjo es rejuvenecimiento o una reversión temporal del envejecimiento fisiológico. (Hackett, 1985).

2.3. Tratamiento con reguladores del crecimiento. En la literatura existen varias citas de reversión al estado juvenil de plantas adultas como resultado de tratamientos con giberelinas, en especial con GA₃, como ser peral, *Citrus*, *Acacia*, *Prunus*, *Hedera*. Sin embargo, en ningún caso se presentan datos sobre el potencial de enraizamiento de las plantas rejuvenecidas (Hackett, 1985), siendo posible que esos brotes juveniles tuviesen incrementada la capacidad de enraizamiento.

2.4. Poda severa de la copa de árboles adultos. Como se dijo antes, las áreas del tronco más próximas al sistema radical son, fisiológicamente, juveniles. Por ello, los brotes de raíz que se forman en ciertas especies, como ser en paraíso (*Melia azedarach*) tienen esas características y, por lo tanto, forman raíces adventicias con cierta facilidad.

En especies, tales como las Coníferas, donde ello no ocurre, la poda severa de sus ramas o la tala en las cercanías de la unión tronco-raíz puede dar origen a brotes con caracteres juveniles (Francllet *et al.*, 1987). Por medio de este tipo de poda, es posible formar "setos" (hedging), siendo una práctica cultural que se aplica a cultivos de manzano que se emplean como porta-injertos, lo que permite lograr una alta cantidad de brotes aptos para enraizar en vivero o para ser empleados como injertos. La poda debe realizarse en forma periódica y las plantas podadas deben estar bien abastecidas de agua y nutrientes (Libby, 1976, Francllet, 1983). En casos como en *Ps. menziessi*, *Picea abies* (Francllet, 1979) y en *P. taeda* (Caso, 1989), esta poda indujo la brotación de la yema interfascicular de los braquiblastos, con formación de brotes juveniles con buena capacidad de enraizamiento

2.5. Cultivo *In vitro* de meristemas. Toda una serie de trabajos con especies forestales y frutícolas han demostrado que el cultivo *in vitro* de meristemas ofrece la posibilidad de rejuvenecer material adulto, aún de ejemplares con edades cercanas al siglo, como es el caso de *Sequoia sempervirens* (Franclet, 1987). Algunos géneros en los cuales ha sido posible producir material rejuvenecido por medio de esta técnica son: *Eucalyptus*, *Pinus*, *Sequoia*, *Sequoidendron*, *Cupressus*, *Cryptomeria*, *Thuja*, *Pseudotsuga*, *Prunus*, *Malus*, *Vitis*, *Rubus*, *Rhododendron*.

Walker (1986) logró rejuvenecimiento parcial, expresado como capacidad de enraizamiento, de un clon antiguo de *Sequoia sempervirens* por cultivos sucesivos (en cascada) de meristemas en un medio sin reguladores del crecimiento. Las plantas obtenidas recuperaron progresivamente algunos caracteres juveniles, como ser la capacidad de enraizamiento, la reactividad del meristema aislado y la formación de yemas adventicias en las hojas separadas de la planta y cultivadas *in vitro*. Sin embargo, las plantitas obtenidas siguieron mostrando crecimiento plagiotrópico, luego de 3 meses de cultivo en vivero. Para los investigadores de AFOCEL, los trabajos con esta especie pueden servir de modelo para los intentos de rejuvenecer, por cultivo *in vitro* de meristemas, ejemplares adultos valiosos (Franclet *et al.*, 1987).

De acuerdo a los resultados obtenidos con distintas especies, y en particular con los trabajos emprendidos con *S. sempervirens*, existen una serie de medidas que deben tomarse para lograr éxito en el rejuvenecimiento:

a) Puede ser necesaria una serie previa de injertos de púas adultas sobre pies jóvenes.

b) El medio de cultivo de los meristemas debe contener una citocinina, debiendo graduarse la concentración según la respuesta que se obtenga. Se considera que este regulador del crecimiento tendría un efecto de juvenilidad sobre el explanto cultivado.

c) El período de los subcultivos tiene incidencia sobre el rejuvenecimiento. En el caso de *Sequoia*, subcultivos cada 7 días provocaron más rápido y efectivo rejuvenecimiento que lapsos más prolongados.

d) La separación del meristema luego de un cierto alargamiento del brote y su subcultivo a un medio con citocinina puede ser beneficioso. También los cultivos sucesivos serán útiles.

Conviene destacar que el rejuvenecimiento alcanzado con *S. sempervirens* fue mayor en los cultivos de meristemas extraídos de árboles de 50 años de edad que cuando procedían de árboles de 500 años. En los primeros se logró la formación de algunos individuos con crecimiento ortotrópico, lo que no ocurrió en el caso de los de mayor edad (Walker, 1986). Esta autora considera que los cultivos sucesivos permiten un rejuvenecimiento progresivo. Nozeran (1978) explica que el rejuvenecimiento, parcial o total, que se logra con los subcultivos sucesivos de meristemas en medios con citocininas es una consecuencia de la eliminación en los fenómenos de correlación que existen en la planta entera. También considera que al tratarse de un grupo pequeño de células se está en presencia de una situación muy semejante a la que ocurre durante la formación del embrión.

Otra posibilidad de lograr rejuvenecimiento es la formación de yemas adventicias. Así, por ejemplo, el cultivo de hojas, ya sea de Coníferas o Fanerógamas, puede provocar la formación de un callo, en el cual pueden diferenciarse yemas. Estas yemas tendrán caracteres juveniles. La dificultad que se presenta con este tipo de propagación se refiere a la inestabilidad genética que se presenta en esos callos, generalmente mayor cuando más prolongado es el período de cultivo o el número de subcultivos. Hay ejemplos en la literatura de formación de yemas adventicias en explantos, sin previa formación de callo y, por lo tanto, con mayor seguridad de fidelidad al tipo vegetal que se pretende multiplicar (Brand and Lineberger, 1988, y otras referencias allí citadas).

Como se dijo, la formación de embriones constituye el rejuvenecimiento total, ya que allí se inicia un nuevo ciclo ontogénico. Esto que se aplica en el caso de embriones sexuales, también es válido para los casos de embriogénesis somática, proceso en el cual una célula inicia la formación de un embrión somático, recapitulando las etapas de la formación de un embrión sexual (Durzan, 1990). No es motivo de este trabajo profundizar sobre este aspecto de la propagación clonal, pero el desarrollo de esta tecnología ofrecerá la posibilidad de la clonación de individuos seleccionados, en gran cantidad y bajo costo. Los trabajos publicados hasta ahora, con pinos, *Pseudotsuga menziessi* y algunos frutales, describen casos de embriogénesis somática logrados a partir del cultivo de órganos jóvenes, como ser embriones inmaduros. Este procedimiento tendrá un gran futuro en la propagación clonal de muchas especies leñosas, una vez que pueda ser contro-

lado y se logre una buena sincronización en la formación de embriones (Merkle *et al.*, 1990; Paranjothy *et al.*, 1990).

CONCLUSIONES

Si bien es posible lograr la propagación vegetativa de individuos adultos de especies leñosas, debe tenerse en cuenta que para tener éxito deberá contarse con material rejuvenecido. Las características del ejemplar seleccionado se expresarán totalmente, a partir de las células rejuvenecidas. El rejuvenecimiento será total o parcial, dependiendo de la especie, la edad del árbol, el procedimiento que se emplee y las condiciones externas. Existe una suma de conocimientos sobre los aspectos fisiológicos del proceso de rejuvenecimiento, así como de la aplicación de distintas técnicas, *in vivo* e *in vitro*, como para asegurar un buen futuro al desarrollo de la propagación vegetativa de especies arbóreas de interés económico.

BIBLIOGRAFIA

- Allsopp, A., 1964.- The metabolic status and morphogenesis. *Phytomorph* 14: 1-23
- Baldini, E. and B. Mosse, 1956 - Observations on the origin and development of sphaeroblasts in the apple. *J. Hort. Sci.*, 31:156-162.
- Baldini, E. and F. Scaramuzzi, 1957.- Indagini e osservazioni sugli sferoblasti dell'olivo. *Ann. Sper. Agr.*, 11:723-740.
- Banks, M S., 1979.- Plant regeneration from callus from two phases of English ivy *Hedera helix* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 92:349-353
- Bonga, J M., 1982.- Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation, en *Tissue Culture in Forestry* (Bonga, J.M. and D. J. Durzan eds.) 387-412; Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ.
- Brand, M.H. and R. D. Lineberger - In vitro adventitious shoot formation on mature-phase leaves and petioles of *Liquidambar styraciflua* L., *Plant Science*, 53:173-179.
- Brink, R. A., 1962 - Phase change in higher plants and somatic cell heredity. *Quart. Rev. Biol.*, 37:1-22.
- Caso, O H., 1989.- Formación de brotes juveniles en árboles de *Pinus taeda* y el efecto de la orientación de las ramas. X Reunión Latinoamericana. Pto. Iguazú (Misiones), Setiembre 1989:127
- Dodd, R. S. and A. B. Power, 1988.- Clarification of the term topophysis. *Silv. Genet.*, 37 14-15.
- Doorenbos, J., 1954.- Rejuvenation of *Hedera helix* in graft combinations. *Proc. Kon. Akad. Wet.*, 57:99-102.
- Durzan, D.J., 1990.- Adult vs. juvenile explants: Direct totipotency en *Plant Aging: Basic and Applied Approaches* (R. Rodríguez *et al.*, eds.):19-25; Plenum Press, New York.
- Evers, P. W., 1984.- Growth and morphogenesis of shoot initials of Douglas fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, in vitro. *Uitvoerig Versl. Rijksinst. Onderzoek Bos-Landschapsbouw "De Dorschkamp", Wegeningen* (partes I-VI).
- Feltan, J. y O. H. Caso, 1987.- Esferoblastos en *Araucaria angustifolia*: su empleo potencial en micropropagación. XVII Reunión Nacional de Fisiología Vegetal.96. Corrientes (Argentina), Octubre 1987.
- Fortanier, E. J. and H. Jonkers, 1976 - Juvenility and maturity of plants as influenced by their ontogenetical and physiological ageing. *Acta Hort.*, 56 37-44
- Francllet, A., 1977.- Manipulations des pieds-mères et amélioration de la qualité des boutures. AFOCEL, *Etudes et Recherches*, N° 8, 20 pp
- Francllet, A., 1979.- Rajeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation vegetative, en *Micropropagation d'arbres forestiers*, AFOCEL:3-18
- Francllet, A., 1983 - Rejuvenation: Theory and Practical Experiences in Clonal Silviculture, en 19th Meeting Canadian Tree Improvement Association, Agosto 22-26, Ontario, Canada: 96-134.
- Francllet, A., M. Boulay, F. Bekkaoui, Y. Fouret, B. Verschoore-Martouzet and N. Walker, 1987 Rejuvenation, en *Cell and Tissue Culture in Forestry* (J. M. Bonga and D. J. Durzan, eds.), vol. 1:232-247; Martinus Nijhoff
- Hackett, W. F., 1985.- Juvenility, Maturation and Rejuvenation in Woody Plants, *Hort. Rev.*, 7: 109-155.
- Hield, H. Z., J.R. Coggins and L.N. Lewis, 1966.- Temperature influence on flowering of grapefruit seedlings. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 89:175-181
- Litz, R., G. Moore and C. Srinivasan, 1985.- *In vitro* systems for propagation and improvement of tropical fruits and palms. *Hort. Rev.*, 7: 157-200
- Martinez Pastur, G., C. Buduba, W. Abedini y J. Beltrano, 1991 - Análisis de los fenómenos de ciclofisis y topofisis en *Populus deltoides*. Congreso Forestal Mundial, Paris, Setiembre 1991.
- Mazalewski, R. L. and W. P. Hackett, 1979.- Cutting propagation of *Eucalyptus ficifolia* using cytokinin-induced basal trunk sprouts. *Proc. Int. Plan Prop. Soc.*, 29:118-124
- Merkle, S.A., W.A. Parrot and E. G. Williams, 1990.- Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning, en *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, (Bhojwani, S. A., ed.):67-101, Elsevier Amsterdam.
- Montaldi, E. R., O.H. Caso e I. Lewin, 1963.- Algunos factores que afectan la forma de las hojas de una planta de desarrollo heteroblástico. *Rev. Inv. Agric.*, 17:321-327

- Montaldi, E.R., 1963.- Rejuvenecimiento de plantas por diferenciación de yemas de callos. *Rev. Inv. Agric.*, 17:441-445.
- Monteuuis, O., 1989.- Méristemes, vieillissement et clonage d'arbres forestiers. *Annales de Recherches Sylvicoles, AFOCEL* 1988:8-39.
- Monteuuis, O. et M.C. Bon, 1990. Phase change in *Sequoiadendron giganteum*, en *Plant Aging: Basic and Applied Approaches* (R. Rodríguez et al., eds.):377-382; Plenum Press, New York.
- Mullins, M.G. and C. Srinivasan, 1976.- Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-Sauvignon) by apomixis *in vitro*. *J. Exp. Bot.*, 27:1022-1030.
- Neri, D., 1991.- Giovanilità e ringiovanimento nelle piante arboree. *Revista di FRUTTICOLTURA*, N° 12:69-73.
- Nozeran, 1978.- Polimorphisme des individus issus de la multiplication végétative des végétaux supérieurs, avec conservation du potentiel génétique. *Physiol. Vég.*, 16:177-194.
- Olesen, P.O., 1978.- On cyclophysis and topophysis. *Silvae Genetica*, 27:173-178.
- Olesen, P.O., 1982.- The effect of cyclophysis on tracheid width and basic density in Norway spruce. *Forest Tree Improvement*, 15:5-80.
- Paranjothy, K., S. Saxena, M. Barenjoe, V.S. Jaiswal and S.S. Bhojwani, 1990.- Clonal multiplication of woody perennials, en *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, (Bhojwani, S.S., ed.): 190-219, Elsevier Amsterdam.
- Paton, S.M., R.R. Willing, W. Nicholls and L.D. Pryor, 1970.- Rooting of stem cuttings of *Eucalyptus*: A rooting inhibitor in adult tissues. *Aus. J. Bot.*, 18:175-183
- Pharis, R. P. and W. Morf, 1968.- Physiology of gibberellin induced flowering in Conifers, en *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances* (Wigtham, F. and G. Setterfield, eds.): 1341-1365. Runge Press, Ottawa, Canada.
- Robbins, W.J., 1957.- Gibberellic acid and reversal of adult *Hedera* to a juvenile state. *Amer. J. Bot.*, 44:743.
- Rodríguez, R., R. Sánchez Tamés and D. J. Durzan, 1990.- *Plant Aging: Basic and Applied Approaches*, NATO ASI Series, Life Sciences, vol. 186, 450 pps, pps, Plenum Press, New York and London.
- Schaffalitzky de Muckadell, M., 1959.- Investigations on ageing of apical meristems in woody plants and its importance in silviculture. *Forstl. Forsgsv. Danm.*, 25:310-455.
- Trippi, V.S., 1964.- Studies on ontogeny and senility in plants. VII. Aging of the apical meristems, physiological age and rejuvenation in tomato plants. *Phyton*, 22:113-121.
- Trippi, V. S., 1990.- Maturation and Senescence: Types of Aging, en *Plant Aging: Basic and Applied Approaches* (R. Rodríguez et al., eds.):11-17; Plenum Press, New York.
- Walker, N., 1986.- Réjuvenilisation et culture de méristemes en cascade chez *Sequoia sempervirens*. *AFOCEL, Ann. Rech. Sylvic.*:26-47.
- Wellensiek, S.J., 1952 - Rejuvenation of woody plants by formation of sphaeroblasts. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.*:567-573.