

## Establecimiento *in vitro* de ápices de plantas de campo del híbrido cubano de Papaya IBP 42-99

Laisyn Posada Pérez\*, Rafael Gómez Kosky , Jorge Gallardo Colina , Maritza Reyes Vega , Idalia Herrera Ofarril.\*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 ½. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. e-mail: laisyn@ibp.co.cu, laisynpp@yahoo.es

### RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de desarrollar un protocolo para el establecimiento *in vitro* de ápices de papaya, a partir de plantas adultas en campo, las cuales tenían 11 meses de plantadas en campo. Se seleccionaron plantas a las cuales se les decapitó la zona apical y otras no, además de la aplicación foliar de una mezcla de los reguladores del crecimiento 6 BAP y ácido giberélico. Para la desinfección de los explantes se utilizaron diferentes sustancias, solas o en combinación: Hipoclorito de Sodio (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 %), Alcohol al 70% y una mezcla de antibióticos. Los mejores resultados se alcanzaron al utilizar el Hipoclorito de Sodio al 1.0 % durante 10 minutos, luego de la sumersión previa de los ápices en la mezcla de antibióticos por 30 minutos y utilizando brotes de 2 meses de edad, lo que permitió lograr un 68.5 % de establecimiento.

Palabras clave: *Carica papaya*, desinfección, mezcla de antibióticos, micropropagación

### ABSTRACT

The present work was carried out with the objective of developing a protocol for the establishment of shoot tips *in vitro* of papaya, starting from adult plants in the field, which had 11 months of having planted in field. Plants were selected which are beheaded the apical area and other not, besides the application to foliate of a mixture of growth regulators of 6 BAP and giberelic acid. For the disinfection of the explantes different substances were used, alone or in combination: Sodium Hypochlorite (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0%), Alcohol to 70% and a mixture of antibiotics. The best results were reached when using the Sodium Hypochlorite to 1.0% during 10 minutes, after the previous submersion of the apexes in the mixture of antibiotics for 30 minutes and using buds of 2 months of age, what allowed to achieve 68.5 % establishment.

Key word: antibiotics mixture, *carica papaya*, disinfection, micropropagation

### INTRODUCCIÓN

Drew y Manshardt (1997) plantearon que la multiplicación *in vitro* de la papaya solo se justifica económicamente si la misma se realiza para un genotipo híbrido. En esta especie uno de los grandes problemas que tiene la fase de establecimiento, cuando se emplean como explantes iniciales ápices o meristemas de plantas adultas cultivadas en campo es el alto porcentaje de contaminación *in vitro* (bacterias y hongos) (Brar y Khush, 1994; Wilson, 1996). Se han establecido varios protocolos para la propagación *in vitro* de este cultivo, sin embargo todos emplean como explante inicial yemas tomadas desde plantas en invernadero (Rajeevan y Pandey, 1986; Drew, 1988; Arrieta, Guevara y Sancho, 1995).

En el caso de la Papaya las principales dificultades que se presentan para su establecimiento *in vitro* desde plantas de campo son:

- Obtención de yemas laterales de un adecuado tamaño debido a una fuerte dominancia apical (Reuveni y Shlesinger, 1990).

- Descontaminación de las yemas laterales de plantas de campo (Arrieta, Guevara y Sancho, 1995).

- Lento coeficiente de multiplicación inicial de las yemas laterales (Fitch, Moore y Leong, 1997).

En base a esta problemática es que se realizó el presente trabajo el cual tuvo como objetivo

Desarrollar un protocolo para el establecimiento *in vitro* de ápices de plantas de campo del híbrido de papaya IBP 42-99.

### MATERIALES Y METODOS

#### Establecimiento *in vitro* de ápices del híbrido de papaya IBP 42-99. Fase preparativa

##### Material vegetal

Este experimento tuvo como objetivo obtener brotes axilares adecuados para ser establecidos *in vitro*, a partir de plantas adultas que crecían en campo. Las plantas del mejor cruzamiento F1 obtenido fueron divididas en dos grupos de 10 plantas cada uno, al primero se le realizó el decapitado de la

zona apical y en el segundo quedaron las plantas intactas, con el objetivo de mostrar la influencia del decapitado en la dominancia apical. Posteriormente a ambos grupos de plantas se les realizaron aplicaciones foliares de una solución compuesta por dos reguladores del crecimiento ( $500 \text{ mg.l}^{-1}$  de 6-Bencilaminopurina (6 BAP) y  $1\,000 \text{ mg.l}^{-1}$  de ácido giberélico), semanalmente, durante tres semanas consecutivas para inducir el desarrollo de las yemas laterales. Después de un mes de la última aplicación se comenzó la toma de los brotes jóvenes, para ser establecidos *in vitro*. Se realizó durante tres semanas el conteo del número de brotes obtenidos por semana.

### Fase de Establecimiento

Para lograr porcentajes altos de establecimiento se realizaron diferentes experimentos. Para la desinfección se emplearon distintas sustancias desinfectantes y antibióticos, los cuales se describen a continuación:

Como primer paso los brotes jóvenes con un tamaño aproximado de 2 cm fueron lavados con agua corriente durante cinco horas de forma continua, posteriormente fueron tratados con una solución jabonosa en agitación mediante un agitador orbital (RETOMED) durante 10 minutos a 90 r.p.m. Luego de este tiempo se enjuagaron con agua corriente nuevamente durante 10 minutos. Seguidamente se desinfectaron con diferentes sustancias. Para ello se conformaron varios experimentos utilizando estos solos o en combinación, los cuales se señalan a continuación:

#### *Experimento 1. Efecto del empleo de diferentes concentraciones de Hipoclorito de Sodio en la desinfección de ápices*

Tratamientos:

1. Lavado con agua corriente + Tween 20 + Hipoclorito de sodio 0.5 %.
2. Lavado con agua corriente + Tween 20 + Hipoclorito de sodio 1.0 %.
3. Lavado con agua corriente + Tween 20 + Hipoclorito de sodio 1.5 %.
4. Lavado con agua corriente + Tween 20 + Hipoclorito de sodio 2.0 %.
5. Lavado con agua corriente + Tween 20 + Hipoclorito de sodio 3.0 %.

#### *Experimento 2. Influencia del uso del alcohol en la desinfección*

Tratamientos:

- 1.-Lavado con agua corriente + Alcohol al 70 % 1 minuto + Tween 20 +Hipoclorito de Sodio 1.0 %.
- 2.-Lavado con agua corriente + Alcohol al 70 % 2 segundos + Tween 20 + Hipoclorito de Sodio 1.0 %.
- 3.-Lavado con agua corriente + Tween 20 + Hipoclorito de Sodio 1%.

#### *Experimento 3. Efecto de una mezcla de antibióticos en el establecimiento in vitro de ápices de plantas cultivadas en campo*

Tratamientos:

1. Lavado con agua corriente + Tween 20 + Hipoclorito de Sodio al 1.0 % durante 10 minutos + Mezcla de antibióticos (Sulfato de Gentamicina  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  (SIGMA), Estreptomocina  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  (SIGMA), Cefotaxima  $50 \text{ mg.l}^{-1}$ (IMEFA) por 30 minutos.
2. Lavado con agua corriente + Tween 20 +Hipoclorito de sodio al 1.0 % durante 10 minutos sin mezcla de antibióticos.

En todos los experimentos anteriormente señalados se utilizaron un total de 20 ápices por tratamiento como repetición.

#### *Experimento 4. Influencia del estado fisiológico de los brotes sobre el establecimiento in vitro de los ápices*

En este experimento se utilizaron 30 brotes apicales de plantas con 11 meses de edad y 30 brotes axilares de plantas a las cuales se le había aplicado la solución de reguladores del crecimiento y los mismos tenían dos meses de brotados (emergidos), la desinfección se realizó de la siguiente forma lavado con agua corriente + Tween 20 +Hipoclorito de Sodio al 1% durante 10 minutos + Mezcla de antibióticos (Sulfato de Gentamicina  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  (SIGMA), Estreptomocina  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  (SIGMA), Cefotaxima  $50 \text{ mg.l}^{-1}$ (IMEFA) por 30 minutos. El efecto del estado fisiológico de los brotes fue determinado por el porcentaje final de ápices establecidos *in vitro* y por el número ápices contaminados.

En todos los experimentos una vez que los ápices fueron reducidos dentro de la cabina de flujo laminar a un tamaño de  $1 \text{ cm}^2$  fueron colocados en tubos de ensayo ( $145.0 \text{ mm} \times 25.0 \text{ mm}$ ) con 1 ml de agua azucarada estéril ( $20 \text{ g.l}^{-1}$  de sacarosa). A los cinco días se realizó la evaluación del número de explantes contaminados por bacterias y hongos. Los ápices libres de contaminantes microbianos visibles se transfirieron a tubos de ensayo con 10 ml de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) líquido, al que se le adicionó 6 BAP  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  y ácido naftalenacético (ANA)  $0.1 \text{ mg.l}^{-1}$  sobre soporte de papel de filtro para evaluar la supervivencia de los explantes a los 30 días de cultivo. Estos fueron colocados en cámaras de crecimiento con luz solar con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos ( $\text{FFF}$ )  $50\text{-}62.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Los resultados expresados en porcentajes se procesaron en el Statistix 2.1 a los que se le realizó prueba de proporción.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Establecimiento *in vitro* de ápices del híbrido de papaya IBP 42-99. Fase preparativa.

El decapitado de las plantas en campo (Figura 1A) no fue determinante en la inducción de nuevos brotes de Papaya, pues al compararse con las plantas no decapitadas (Figura 1B), se obtuvo un total de 68 y 63 brotes por planta, respectivamente, durante tres semanas (Tabla 1) sin diferencias estadísticas significativas entre ambos tratamientos. Sin embargo la aplicación foliar de reguladores de crecimiento tuvo un efecto positivo en la formación de nuevos brotes axilares, dado por el efecto dominante de la yema apical en este cultivo. Similares resultados han señalado Reuveni y Shlesinger (1990) y Arrieta *et al.*, (1995) con la aplicación de reguladores del crecimiento a plantas de papaya en campo.

### Fase de establecimiento

#### *Experimento 1. Efecto del empleo de diferentes concentraciones de Hipoclorito de Sodio en la desinfección de ápices*

Con el empleo de 2 y 3% de hipoclorito de sodio existió un control total de los contaminantes microbianos, sin embargo se produjeron severos daños a los tejidos que ocasionaron la muerte de los ápices extraídos y establecidos *in vitro*. Con el uso de bajas

concentraciones de este desinfectante (0.5 – 1.0%) se obtuvo una mejor relación entre la supervivencia de los ápices y la eficiencia de la desinfección. Se alcanzaron valores entre un 19.7 a 27.0 % de ápices establecidos (Tabla 2). Aunque este resultado fue alentador resultó poco eficiente proponer una metodología para la desinfección e iniciación *in vitro* de un híbrido de papaya sobre este porcentaje de establecimiento, por lo tanto se continuaron estudiando alternativas para su incremento.

El Hipoclorito de Sodio es uno de los desinfectantes más comunes utilizados en la desinfección superficial de los tejidos y resulta importante determinar la dosificación óptima que garantiza el control de los microorganismos contaminantes y la supervivencia de los tejidos explantes (Castillo *et al.*, 1997; De Winnaar, 1997).

Varios autores han empleado el hipoclorito de sodio para la desinfección de los brotes o yemas de plantas donadoras que crecían en invernadero o campo, con las concentraciones de cloro activo entre 0.3, 1.0, 1.25 y 5.25 %, (Reuveni y Shlesinger, 1990; Reuveni *et al.*, 1990; Kataoka e Inoue, 1991). Arrieta *et al.* (1995) obtuvieron buenos resultados en el proceso de desinfección de los ápices al emplear concentraciones de hipoclorito de sodio de 0.75 %, pero durante 20 minutos de plantas crecidas en invernadero, no fue así cuando utilizaron como explantes brotes de plantas en campo.

Tabla 1. Efecto del decapitado y la aplicación de reguladores del crecimiento (BAP 500 mg.l<sup>-1</sup> y Acido giberélico 1000 mg.l<sup>-1</sup>) en plantas adultas de papaya sembradas en campo, sobre la formación de nuevos brotes.

Tratamientos	Número de brotes por árboles			
	1ra Semana	2da Semana	3ra Semana	Total
Plantas sin decapitar	23	20	25	68
Plantas decapitadas	18	21	26	63

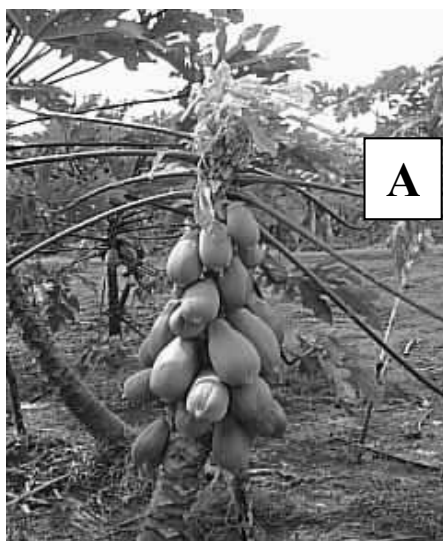


Figura 1. Formación de nuevos brotes a partir de la aplicación foliar de reguladores del crecimiento para el establecimiento *in vitro* del híbrido de papaya en campo (A) Planta sin decapitar (B) Planta decapitada.

Tabla 2. Efecto del empleo de diferentes concentraciones de Hipoclorito de Sodio en la desinfección de ápices del híbrido de papaya IBP 42-99.

Tratamiento	Hipoclorito de Sodio (%)	Contaminación con Bacterias (%)	Contaminación con Hongos (%)	% Ápices Muertos	% Ápices Establecidos
1	0.5	38.2	42.1	0	19.7 b
2	1.0	28.7	39.3	5.0	27.0 a
3	1.5	25.0	16.4	53.6	5.0 c
4	2.0	0	0	100	0
5	3.0	0	0	100	0

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para  $p < 0.05$

#### Tratamientos:

1. Lavado con agua corriente + Tween 20 + Hipoclorito de sodio 0.5 %.
2. Lavado con agua corriente + Tween 20 + Hipoclorito de sodio 1.0 %.
3. Lavado con agua corriente + Tween 20 + Hipoclorito de sodio 1.5 %.
4. Lavado con agua corriente + Tween 20 + Hipoclorito de sodio 2.0 %.
5. Lavado con agua corriente + Tween 20 + Hipoclorito de sodio 3.0 %.

#### Experimento 2. Influencia del uso del alcohol como desinfectante

La sumersión de los brotes en etanol (70%) previo a la desinfección con hipoclorito de sodio provocó quemaduras en los ápices. Se incrementaron por esta

causa los porcentajes de mortalidad. La incidencia de microorganismos contaminantes disminuyó en los brotes tratados con respecto a los no tratados con alcohol por la reducción de la tensión superficial del tejido, lo cual propició una mejor acción del desinfectante hipoclorito de sodio (Tabla 3).

Tabla 3. Influencia del uso del alcohol al 70 % como parte de la desinfección de ápices de plantas adultas del híbrido de papaya IBP 42-99. A los cinco días de establecidos *in vitro*.

Tratamientos	Contaminación con Bacterias (%)	Contaminación con Hongos (%)	% Ápices Muertos	% Ápices Establecidos
1	9.2	8.0	68.5 a	14.3 b
2	12.0	8.4	65.9 a	13.7 b
3	34.4	29.5	7.70 b	28.4 a

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para  $p < 0.05$

#### Tratamientos:

- 1.-Lavado con agua corriente + Alcohol al 70 % 1 minuto + Tween 20+Hipoclorito de Sodio 1%.
- 2.-Lavado con agua corriente + Alcohol al 70 % 2 segundos + Tween 20+Hipoclorito de Sodio 1%.
- 3.-Lavado con agua corriente + Tween 20+ Hipoclorito de Sodio 1%.

Similares resultados encontraron Arrieta *et al* (1995) al emplear alcohol al 95 % en el proceso de desinfección ya que afectó considerablemente la integridad de los explantes y provocó decoloración de los mismos y disminución en muchos casos del desarrollo posterior de estos.

#### Experimento 3. Efecto de una mezcla de antibióticos en el establecimiento *in vitro* de ápices de plantas cultivadas en campo

El uso de sustancias antimicrobianas es una alternativa para el control de la contaminación en los procesos de propagación *in vitro*. La sumersión de brotes de papaya en la mezcla de antibióticos favoreció los porcentajes de establecimiento de los ápices por la reducción de la contaminación bacteriana con lo que se logró que el 62.8% de los ápices

podían ser establecidos (Tabla 4). En los ápices tratados con la mezcla no se observaron síntomas de fitotoxicidad, lo cual pudo estar dado por los enjuagues con agua destilada estéril efectuados para eliminar los restos de las sustancias. Algunos autores son del criterio que para reducir la fitotoxicidad de los antibióticos deben tratarse mejor las plantas donantes y no incorporar tales sustancias a los medios de cultivo porque se modifica su composición y pueden ser metabolizados por los tejidos (Duhem *et al.*, 1988; Roca y Mogrinski, 1993; Falkier, 1996). Sin embargo, Singh *et al.* (1997), emplearon uno solo o la combinación de diferentes antibióticos para eliminar la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro*, en algunas especies de plantas y alcanzaron altos valores de establecimiento (78 %) cuando utilizaron brotes de plantas con 11 meses en campo similares a las empleadas en este trabajo.

Tabla 4. Efecto de una mezcla de antibióticos en el proceso de desinfección para el establecimiento *in vitro* de ápices de plantas cultivadas en campo del híbrido de papaya.

Tratamientos	Contaminación con Bacterias (%)	Contaminación con Hongos (%)	% Ápices Muertos	% Ápices Establecidos
Con mezcla de Antibióticos	3.13	29.69	4.30	62.88 a
Sin mezcla de Antibióticos	20.77	25.30	4.30	49.63 b

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para  $p < 0.05$

Tratamientos:

1. Lavado con agua corriente + Tween 20 + Hipoclorito de Sodio al 1.0 % durante 10 minutos + Mezcla de antibióticos (Sulfato de Gentamicina 50 mg.l<sup>-1</sup> (SIGMA), Estreptomina 25 mg.l<sup>-1</sup> (SIGMA), Cefotaxima 50 mg.l<sup>-1</sup>(IMEFA) por 30 minutos.
2. Lavado con agua corriente + Tween 20 +Hipoclorito de sodio al 1.0 % durante 10 minutos sin mezcla de antibióticos.

Fitch *et al.* (2003) emplearon también una mezcla de antibióticos (carbenicilina 500 mg.l<sup>-1</sup> y cefotaxima 200 mg.l<sup>-1</sup>) en el medio de cultivo de multiplicación de brotes de papaya para eliminar la presencia de bacterias en esta fase.

*Experimento 4. Influencia del estado fisiológico de los brotes sobre el establecimiento in vitro de los ápices*

El estado fisiológico de los brotes ejerce una gran influencia en la respuesta de los tejidos durante el establecimiento *in vitro*. El estado juvenil con crecimiento activo de los brotes axilares de papaya, contribuyó en gran medida a los resultados alcanzados en la desinfección y el establecimiento de los ápices de este cultivo a partir de plantas cultivadas en campo (Tabla 4). Similares resultados obtuvieron Fitch *et al.* (1997) los cuales apoyan los alcanzados en el presente trabajo.

Tabla 4. Influencia de la edad del brote sobre el establecimiento *in vitro* de ápices del híbrido de papaya IBP 42-99.

Edad del brote (meses)	Hipoclorito de Sodio (%)	Tiempo de desinfección (min)	Contaminación bacteriana (%)	Contaminación por hongos (%)	% Ápices establecidos
11	0.5	5	19.0	42.5	38.5 c
	1.0	10	21.8	38.2	40.0 c
2	0.5	5	8.4	31.6	60.0 b
	1.0	10	7.7	23.8	68.5 a

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para  $p < 0.05$

Fitch *et al.* (1997) obtuvieron altos porcentajes de establecimiento *in vitro* (75 %) al utilizar como explantes brotes laterales jóvenes. Con ello se redujeron los niveles de contaminación, lo cual corrobora los resultados obtenidos. No obstante, otros autores como Arrieta *et al.* (1995) refieren a la pérdida casi total del material vegetal adulto establecido *in vitro* de plantas creciendo en campo, así como de nuevas yemas brotadas y tomadas directamente de estas plantas. Además, también hacen referencia a la no multiplicación *in vitro* de los pocos explantes que lograron establecer desde estas plantas en campo.

## CONCLUSIONES

Las investigaciones realizadas en el presente trabajo han permitido establecer un protocolo para el establecimiento *in vitro* del híbrido de papaya IBP

42-99 con un 68.5 % de ápices establecidos. Esto se logró a través de un esquema repetible donde se utilizó como material vegetal de partida brotes axilares jóvenes con dos meses de edad, desinfección superficial durante 10 minutos con hipoclorito de sodio al 1.0 % y la sumersión en una mezcla de antibióticos durante 30 minutos antes de la siembra en medio de cultivo líquido con soporte de papel.

## REFERENCIAS

- Arrieta, G, Guevara E y Sancho G (1995) Cultivo *in vitro* de yemas axilares de papaya (*Carica papaya* L.) II. Determinación de las condiciones para la regeneración y multiplicación *in vitro* de Tallos. Boltec. 28 (2): 13-27
- Brar, D S, Khush, G S (1994) Cell and tissue culture for plant improvement. En: Basra, A (ed) Mechanisms of plant growth and improved productivity: Modern approaches pp 229-278. Marcel Dekker. New York.

- Castillo, B, MAL Smith, DLMadhavi (1997) Interactions of Irradiance level and iron chelate source during shoot tip culture of *Carica papaya* L. HortScience 32 (6): 1120-1123
- De Winnaar, W (1997) Micropropagation of *Carica papaya* L.J. Amer. Soc. Hort. Science 156 :735-738
- Drew, RA (1988) Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature field grown trees. HortScience 23:609-611
- Drew, RA, Manshardt, RM (1997) Biotechnology of Papaya. Proceedings of Int. Symp. Biotechnology of Tropical and Subtropical species. R.A.Drew ed. Queensland, Australia. 29 september –3 october. pp 514
- Duhem, K N, Le Mercier y Boxus P H (1988) Difficulties in the establishment of axenic *in vitro* cultures of field collected coffee and cacao germoplasm. Acta Horticulturae 225: 67 – 75
- Falkier, F(1996) Antibiotic in plant tissue culture and micropropagation. En: Cassells, AC & Hayes, B (eds), Abstracts of the Second International Symposium on Bacteria and Bacteria contaminants of plants tissue cultures. University College, Cork.
- Fitch, M, P Moore, Leong T ( 1997) Progress in transgenic papaya research: transformation for broader resistance among cultivars and micropropagating selected hybrid transgenic plants. Proceedings of Int. Symp. Biotechnology of Tropical and Subtropical species. RA Drew ed. Queensland, Australia. 29 september –3 october.
- Fitch M, Loeng T, Saito N, Yamamoto G, Dela Cruz A, Yeh A, White S, Maeda S, Ferreira S y Moore P (2003) Control of Bacterial contamination in Large Scale papaya Micropropagation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 39: 15-19
- Kataoka, I, H Inoue (1991) Rooting of tissue cultured papaya shoots under *ex vitro* conditions. Japanese Journal of Tropical Agriculture 35 (2): 127-129
- Murashige, T y Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture by giberellin. *Physiol Plant.* 15: 473 – 497
- Rajeevan MS y Pandey RM (1986) Economics of mass propagation of papaya through tissue culture. *Acta Hort.*,131: 131-139
- Reuveni, O, DR Shlesinger, U Lavi (1990) *In vitro* clonal propagation of dioecious *Carica papaya* L. *Plant Cell, Tissue ands Organ Culture* 2: 41-46
- Reuveni, O, DR Shlesinger (1990) Rapid vegetative propagation of papaya plants by cuttings. *Acta Horticulturae* 275: 301-305
- Roca, W M, Mogrinski, L A (1993) Cultivo de Tejidos en le Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT.
- Singh, SK, HC Sharma, Singh SP (1997) Antibiotics control endogenous contaminants of papaya. Proceedings of Int. Symp. Biotechnology of Tropical and Subtropical species. RA Drew (ed.) Queensland, Australia. 29 september –3 october.
- Wilson, J P (1996) Multiplication rates *in vitro* and by stem cutting propagation, and clonal development from *Eucalyptus globulus* seeding. *Forest Science.* 42: 415 – 418