

Micropropagación del *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) a partir segmentos nodales

Daniel Agramonte Peñalver^{1*}, Luis Delgado Fernández², Ana Trocones Boggiano², Marta Pérez Peralta¹, Daymi Ramírez Aguilar¹; Odalys Gutiérrez Martínez¹ *Autor para correspondencia.

- 1- 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: dagramonte@uclv.edu.cu
- 2- Instituto de Investigaciones Forestales. Calle 174 No. 1723 e/ 17 B y 17 C. Reparto Siboney. Playa. Ciudad Habana. Cuba. e-mail: iif@ip.etecsa.cu

RESUMEN

Con la finalidad de desarrollar una metodología para la propagación *in vitro* de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden), se realizaron investigaciones que abarcaron desde el pretratamiento de las plantas donantes hasta la evaluación de las plantas *in vitro* en el campo. Los resultados mostraron que la aplicación previa de fungicidas e insecticidas a las plantas donantes 21-30 días antes del establecimiento incrementó la eficiencia de esta fase, en la cual los mejores resultados en la desinfección se obtuvieron con la aplicación de hipoclorito de sodio al 1.0% durante 10 minutos. Con la adición de 6-bencilaminopurina y ácido naftalenacético (0.1 mg.l⁻¹) en la fase de multiplicación se obtuvieron brotes de mayor calidad, los que mostraron un 75% de enraizamiento cuando fueron individualizados y transferidos a un medio de cultivo con 0.3 mg.l⁻¹ de AIB. Las evaluaciones realizadas en el campo a las plantas *in vitro* demostraron una dinámica de crecimiento muy superior a las producidas a partir de semillas.

Palabras clave: multiplicación, enraizamiento, *in vitro* plants

ABSTRACT

With the purpose of developing a methodology for the propagation *in vitro* of *Eucalyptus grandis* (former Hill Maiden), they were carried out investigations that embraced from the pretratamiento of the donating plants until the evaluation of the plants *in vitro* in the field. The results showed that the previous application of fungicides and insecticides to the plants donating 21-30 days before the establishment it increased the efficiency of this phase, in which the best results in the disinfection were obtained with the application of hipoclorito of sodium to 1.0% during 10 minutes. With the addition of 6-bencilaminopurina and sour naftalenacético (0.1 mg.l⁻¹) in the multiplication phase buds of more quality were obtained, that showed 75% rooting when they were individualized and transferred to a means of cultivation with 0.3 mg.l⁻¹ of AIB. The evaluations carried out in the field to the *in vitro* plants demonstrated a dynamics of very superior growth to those taken place starting from seeds.

Key words: multiplication, rooting, *in vitro* plant

INTRODUCCIÓN

Los problemas que presenta la propagación de las especies leñosas forestales por los métodos convencionales, han motivado numerosos estudios relacionados con este tema en las últimas décadas. Se considera la micropropagación como la vía más efectiva para establecer poblaciones morfológica y genéticamente estables, a partir de individuos élites seleccionados en los programas de mejora genética convencional.

En Cuba se han realizado varios trabajos relacionados con la micropropagación de *E. globulus* var *bicostata* (Gil *et al.* 1990), *E. citriodora* y *E. saligna* (García, 1999) y *E. pellita* (Noda, 1999); sin embargo en ninguno de los casos se han establecido metodologías completas que permitan la propagación masiva de

estas especies y por lo tanto disponer de grandes cantidades de individuos con adecuadas características para realizar plantaciones en el campo. En cuanto al *E. grandis*, no existen referencias acerca de la micropropagación en Cuba. El presente trabajo se desarrolló con la finalidad de establecer un protocolo para la propagación *in vitro* del *E. Grandis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El banco de donantes se estableció a partir de plantas procedentes de estaquillas, que fueron enraizadas según la metodología propuesta por González *et al.* (1987). Para la colecta de las estaquillas se utilizaron árboles seleccionados de más de 15 años de edad. Las plantas del banco de donantes, después de 18

meses, fueron sometidas a un proceso de revigorización a través de podas intensas cada 60 días, previo a la toma de los explantes, los que consistieron en segmentos nodales de los rebrotes tiernos, con una longitud de 5 - 7 cm y con dos o tres yemas axilares. Las plantas fueron sometidas a dos aspersiones semanales con mezclas de fungicidas comerciales (Amistar, Bravo y Benomyl) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes y resultados de ensayos preliminares obtenidos en el IBP, para atenuar el efecto de los microorganismos contaminantes durante la fase de establecimiento.

Medios de cultivo

El medio de cultivo basal para todos los experimentos estuvo compuesto por las sales inorgánicas del medio propuesto por Murashige y Skoog (1962) (sales MS) suplementadas con tiamina (1.0 mg.l⁻¹), mioinositol (100 mg.l⁻¹), cisteína (25.0 mg.l⁻¹) y sacarosa (20 g.l⁻¹). Para la gelificación de los medios de cultivos se utilizó Agar (SIGMA Chemical Co.) a razón de 7.0 g.l⁻¹.

Condiciones de incubación

Se realizaron experimentos en condiciones de luz solar una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de 48.0–62.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Agramonte, 1999) y una temperatura de 25±2 °C y en condiciones de iluminación artificial (lámparas fluorescentes) con una DFFF de 80 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, así como una temperatura de 25±2 °C (García, 1999).

Establecimiento de los explantes nodales

Para evaluar la efectividad del hipoclorito de sodio (NaOCl) en la desinfección se estudiaron cuatro concentraciones (0.5, 1.0, 1.5, 2.0%), cada una de ellas durante tres intervalos de tiempo (5, 10 y 15 min.). Los explantes fueron reducidos a un tamaño aproximado entre 1.0–1.5 cm, luego de la desinfección y antes de su implantación en el medio de cultivo. Estos explantes fueron inicialmente colocados sobre un medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento. En un segundo experimento se evaluó el efecto del tipo de iluminación (artificial y solar) y la dosis de 6-bencilaminopurina (6-BAP) (0, 0.20, 0.35, 0.50, 1.0 mg.l⁻¹). En ambos ensayos se utilizaron un total de 20 réplicas por tratamiento.

Multiplicación de los brotes empleando reguladores del crecimiento

Las yemas axilares brotadas de los segmentos nodales con 5-10 mm de longitud fueron separadas del tejido original y utilizadas para los experimentos en esta fase. Diferentes combinaciones de 6-BAP (0, 0.10, 0.5, 0.50, 0.75) y de ácido naftalenacético (ANA) (0, 0.01) fueron adicionadas al medio de cultivo para evaluar su influencia sobre la formación de

nuevos brotes. Los explantes fueron subcultivados de forma continua en las mismas combinaciones durante cinco subcultivos cada 28 días. En el momento del subcultivo se evaluó en cada uno de los tratamientos, el número de brotes por explante, la longitud de los brotes y el coeficiente de multiplicación. En todos los casos los explantes fueron incubados en cámaras con luz solar y se utilizaron 20 réplicas por tratamiento.

Enraizamiento de los brotes

Explantes procedentes de la fase de multiplicación con una longitud de 15-20 mm fueron subcultivados en medios de cultivo con ANA, ácido indolbutírico (AIB), y ácido indolacético (AIA) (0, 0.10, 0.30, 0.50). Se evaluó el efecto del medio de cultivo en estado físico líquido y sólido (phytagel 2.0 g.l⁻¹). Las evaluaciones se realizaron a los 28 días y se utilizaron 20 réplicas por tratamiento.

Acclimatización

Plantas *in vitro* enraizadas de una longitud superior a los 35 mm fueron plantadas en contenedores de polietileno de 70 orificios, que contenían las siguientes mezclas de diferentes sustratos:

- 50% Fibra de coco + 50% Casting
- 100% Casting
- 15% Zeolita + 85% Casting
- 15% Fibra de coco + 85% Casting

En el caso del Casting se utilizó como materia prima cahaza descompuesta (más de un año). Esta etapa se desarrolló bajo condiciones de casa de cultivo con una reducción de la intensidad de la luz solar de 70% durante los primeros 30 días de crecimiento y de 35% durante los 15 restantes. La humedad relativa siempre se mantuvo superior al 85% y el riego se realizó con microaspersores, mientras que el régimen fue establecido a 30 seg./30 min. durante las primeras dos semanas y de 1 min./60 min. durante las cuatro semanas posteriores. Después de la tercera semana las plantas *in vitro* fueron asperjadas dos veces por semana con una solución líquida de nutrientes compuesta por macro y microelementos. Después de realizadas las evaluaciones a los 45 días en estas condiciones las plantas *in vitro* fueron trasplantadas a bolsas de polietileno de 250x100 mm y colocadas en condiciones de vivero (a pleno sol) durante 45 días. En esta última fase se realizaron dos riegos diarios de 5 min. y una aplicación semanal de nutrientes con las formulaciones líquidas COMBI I y II (suministradas por CARISOMBRA S.A).

Evaluación de las plantas *in vitro* en el campo

Las plantas *in vitro* procedentes del vivero con 90 días y una longitud del tallo de 250-300 mm fueron plantadas

en el campo a una distancia de 3.0x2.0 m sobre un suelo pardo sin carbonatos. Se realizaron mediciones del diámetro a 1.40 m de altura desde la base de las plantas con una cinta diamétrica y la longitud del tallo con el empleo de un hipsómetro a los 6, 11 y 18 meses de plantadas.

Procesamiento estadístico de los datos

Para el procesamiento estadístico se utilizó el Statistic Package for Social Science (SPSS) versión 8.1 para Windows. Todos los datos de los experimentos con diseño multifactorial fueron procesados inicialmente mediante modelos que cumplieran esos requisitos y a partir de los resultados obtenidos se derivaron los demás procesamientos. Los datos de cada variable evaluada se sometieron a la prueba de homogeneidad de varianzas. Para la comparación de medias se aplicó la prueba de Duncan. Los datos expresados en porcentaje fueron analizados mediante la prueba de Andevap.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de los explantes nodales

La concentración y el tiempo de aplicación del desinfectante influyeron de forma significativa en los resultados de este experimento. Como se aprecia en la tabla 1 los mejores resultados se lograron con la concentración 1.0% con 10 y 15 min. de aplicación obteniéndose un 80% de supervivencia, aunque estos tratamientos no difirieron de aquellos en que se utilizó 1.5% con 5 y 10 min. Como tendencia se observó que los tratamientos con 0.5 y 2.0% tuvieron menor efectividad en la desinfección. En el primer caso, debido a la baja concentración del producto, no fue posible eliminar los microorganismos y por lo tanto los índices de contaminación microbiana fueron mayores y en el segundo caso provocado por un aumento de la mortalidad por la efecto fitotóxico del producto sobre los explantes, el cual es mucho mayor cuando se trabaja con explantes tiernos procedentes de un proceso de revigorización del material vegetal.

Tabla 1. Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección de explantes nodales de *E. grandis*

NaOCl(%)	Tiempo (min.)	Mortalidad (%)	Contaminación(%)	Supervivencia. (%)
0.5	5	5 f	50 a	40 d
	10	10 ef	40 ab	50 cd
	15	10 ef	30 bc	60 bc
1.0	5	10 ef	30 bc	60 bc
	10	10 ef	10 c	80 a
	15	10 ef	10 c	80 a
1.5	5	15 de	10 c	70 ab
	10	20 de	10 c	70 ab
	15	30 cd	10 c	60 bc
2.0	5	30 cd	10 c	60 bc
	10	40 bc	10 c	50 cd
	15	55 a	-	40 d

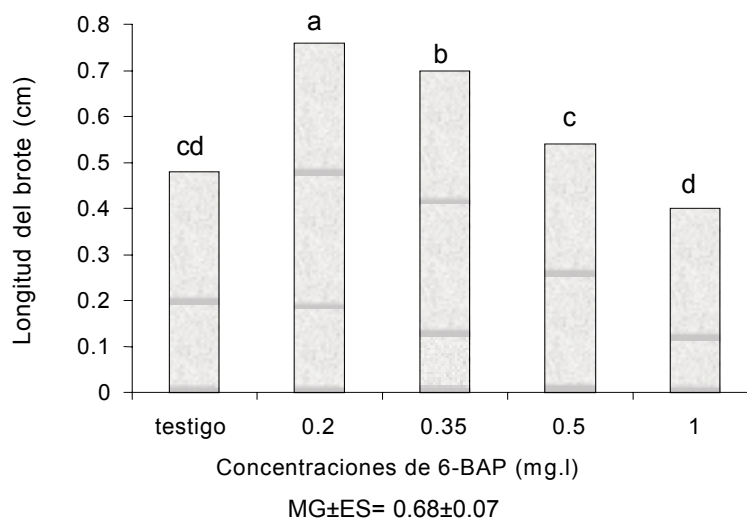
Letras desiguales difieren estadísticamente según Andevap $p < 0.05$.

Con relación al efecto del tipo de iluminación se pudo apreciar que este factor no tuvo influencia sobre las variables evaluadas. Sin embargo la dosis de 6-BAP utilizada afectó significativamente los resultados obtenidos. Como se observa en la figura 1 los mejores resultados sobre la variable longitud de los brotes se alcanzaron con la dosis 0.2 mg.l^{-1} , apreciándose una disminución significativa de los valores de esta variable con el aumento de la dosis de 6-BAP. Incluso con las dosis 0.5 y 1.0 mg.l^{-1} se obtuvieron resultados similares al tratamiento control.

Los resultados evidencian que esta especie requiere un adecuado balance entre auxinas y citoquininas para mejorar el crecimiento de los explantes en la fase de establecimiento, lo cual se logra con la adición de pequeñas dosis de 6-BAP, sin embargo dosis relativamente altas inhiben el crecimiento, lo que coincide con lo planteado por Vázquez y Torres (1995). Algunos autores como Correia, (1993) se refieren a la obtención de altas tasas de brotación

en esta fase, al trabajar con *E. grandis*, *E. grandis* x *E. urophylla* y *E. urophylla* x *E. grandis*, con el empleo de bajas concentraciones de 6-BAP ($0,3-0,5 \text{ mg.l}^{-1}$). En otras especies de la familia Myrtaceae se han obtenido resultados similares (Sotolongo, 1999).

Los resultados evidencian que esta especie requiere un adecuado balance entre auxinas y citoquininas para mejorar el crecimiento de los explantes en la fase de establecimiento, lo cual se logra con la adición de pequeñas dosis de 6-BAP, sin embargo dosis relativamente altas inhiben el crecimiento, lo que coincide con lo planteado por Vázquez y Torres (1995). Algunos autores como Correia, (1993) se refieren a la obtención de altas tasas de brotación en esta fase, al trabajar con *E. grandis*, *E. grandis* x *E. urophylla* y *E. urophylla* x *E. grandis*, con el empleo de bajas concentraciones de 6-BAP ($0,3-0,5 \text{ mg.l}^{-1}$). En otras especies de la familia Myrtaceae se han obtenido resultados similares (Sotolongo, 1999).



(Letras desiguales difieren estadísticamente según Duncan $P < 0.05$)

Figura 1. Influencia de las concentraciones de 6-BAP sobre la longitud de los brotes de *E. grandis* en la fase de establecimiento

Multiplicación de los brotes empleando reguladores del crecimiento

La dosis de 6-BAP utilizada en el medio de cultivo influyó sobre la multiplicación del *E. grandis*. Se observó una tendencia al aumento de los valores de la variable número de brotes por explante y una disminución de la longitud de los mismos, al comparar los tratamientos que solamente contenían 6-BAP como regulador del crecimiento (0.1, 0.35, 0.5 mg.l⁻¹) con el control. Sin embargo los resultados para la variable coeficiente de multiplicación no tuvieron una tendencia similar a las anteriores, ya que la dosis intermedia mostró el valor máximo. Los resultados obtenidos con el control y con la dosis 0.5 mg.l⁻¹, demostraron que es necesaria la adición de 6-BAP al medio de cultivo, pero que la dosis relativamente altas inducen un fuerte ahijamiento axilar y una reducción del tamaño de los brotes. Esto ocasiona una afectación del coeficiente de multiplicación, pues en el momento de la disección muchos de éstos no pueden ser individualizados (Tabla 2).

El efecto negativo de las dosis relativamente altas de 6-BAP en la multiplicación de este género ha sido observado por otros autores. Burguer (1987) y Carvalho

(1988) plantearon que concentraciones de 6-BAP superiores a 0.75 mg.l⁻¹ fueron perjudiciales para el desarrollo de los brotes y disminuyeron el coeficiente de multiplicación por los bajos índices de crecimiento que experimentaron los explantes. Estos mismos autores refieren que dosis de 6-BAP y ANA superiores a 4.0 mg.l⁻¹ y a 0.2 mg.l⁻¹ respectivamente, provocan hiperhidratación del tejido a medida que aumenta el número de subcultivos y una disminución del coeficiente de multiplicación (menor de 3.5) en los primeros subcultivos.

La mayor formación de brotes se obtuvo en el medio de cultivo con la combinación 0.5 mg.l⁻¹ 6-BAP + 0.01 ANA mg.l⁻¹, aunque no difirió de la variante con 0.35 mg.l⁻¹ 6-BAP+ 0.1 mg.l⁻¹ ANA. Sin embargo los máximos valores en cuanto a la longitud del tallo y el coeficiente de multiplicación se obtuvieron con la combinación 0.1 mg.l⁻¹ ANA+ 0.1 mg.l⁻¹ 6-BAP. En este caso el efecto del ANA consistió en mejorar la calidad de los brotes y por lo tanto favorecer una mayor individualización de los mismos, lo que permitió además incrementar el coeficiente de multiplicación. Estos resultados son similares a los obtenidos por Laskhmi y Rani (1985) en *E. grandis* y Jenq-Chuan *et al.* (1996) en *E. grandis x urophylla*.

Tabla 2. Influencia del ANA y el 6-BAP en la fase de multiplicación *in vitro* del *E. grandis*.

Tratamientos	Longitud de los brotes (cm)	Coeficiente de multiplicación	Número de brotes
testigo	2.09a	3.2 e	4.5 f
0.1BAP	1.76b	5.12 b	6.1 e
0.35BAP	1.58 bc	5.2 ab	7.2 c
0.5BAP	1.41cd	4.89 b	8.1b
0.1BAP+0.01ANA	1.57 bc	4.31 c	6.8 cd
0.35BAP+0.01ANA	1.24d	3.86 d	6.3 de
0.5BAP+0.01ANA	1.68 b	5.09 b	9.5 a
0.1BAP+0.1ANA	2.20a	5.5 a	8.3 b
0.35BAP+0.1ANA	1.76b	5.2 ab	9.2 a
0.5BAP+0.1ANA	1.65 b	4.14 cd	5.9 e
ES	0.04	0.03	0.20

Enraizamiento de los brotes

Los máximos valores en el total de plantas enraizadas y en la longitud del tallo, se obtuvieron con 0.30 mg.l⁻¹ de AIB con diferencias significativas con las restantes dosis evaluadas. Este tratamiento

permitió disponer de un 85% de plantas enraizadas con una calidad adecuada para plantarlas en la fase de aclimatización (Tabla 3). Las restantes plantas *in vitro* (15%), que no cumplieron los requisitos, fueron subcultivadas en un medio similar durante un nuevo ciclo de enraizamiento.

Tabla 3. Influencia de la concentración y el tipo de reguladores del crecimiento en la fase de enraizamiento del *E. Grandis*

Regulador del crecimiento	Dosis (mg.l ⁻¹)	Longitud del tallo (cm)	Total de plantas enraizadas (%)
Control	0.00	3.8 cd	50 cd
	0.10	4.2 bc	65 b
AIB	0.30	5.8 a	85 a
	0.50	4.1 c	70 b
ANA	0.10	4.2 bc	60 bc
	0.30	3.6 d	65 b
	0.50	3.4 d	70 b
AIA	0.10	4.4 b	45 d
	0.30	4.6 b	50 cd
	0.50	4.8 b	50 cd
MG±ES		4.3±0.15	

Letras desiguales en una columna difieren entre sí para p<0.05.

Aunque la tendencia en la micropropagación de muchas especies en la actualidad es a la eliminación de la fase de enraizamiento, en las especies forestales aún se hace necesaria la misma, ya que se requieren obtener brotes fuertes y enraizados que tengan capacidad de adaptarse con rapidez a las condiciones ambientales. Generalmente la fase de aclimatización en estas especies es muy lenta, al igual que su ciclo de crecimiento, si se comparan con las plantas herbáceas, por lo tanto el período que necesitan las plantas *in vitro* para restablecerse y comenzar a realizar la fotosíntesis también es largo, por lo que si éstas son pequeñas y poco desarrolladas, las posibilidades de supervivencia en la fase de aclimatización son muy pocas.

En los trabajos realizados por Major y col., (1995) en *Eucalyptus grandis* y Jenq-Chuan et al. (1995) en *E. grandis x urophylllos* los mejores resultados también se lograron con el empleo de AIB a una concentración de 0.5-1.0 mg.l⁻¹. En otras *Myrtaceas* como *Psidium salutare*, el enraizamiento sólo ha sido posible con una combinación de auxinas, según plantea Sotolongo (1999) y lo mismo ha ocurrido con el *Eucalyptus pellita* (Noda, 1999); pero en ambos casos estuvo presente el AIB.

Otros autores han utilizado el AIB para estimular el enraizamiento de estaquillas por los métodos tradicionales con buenos resultados (González et al., 1987; Xavier, 1997; García, 1999).

Aclimatización

Las variantes de sustrato empleadas influyeron significativamente sobre el porcentaje de supervivencia

y la longitud del tallo en la fase de aclimatización del *E. Grandis*. Los mayores valores en las dos variables correspondieron a la mezcla de casting (85%) + zeolita (15%), con resultados significativamente superiores a las restantes variantes (Tabla 4).

La zeolita influye sobre la calidad física del sustrato y permite una mayor oxigenación de las raíces, lo que beneficia el crecimiento general de la planta. También es conocido que este mineral es capaz de retener algunos nutrientes, disminuyendo las pérdidas por el lavado del agua de riego. De esta forma las plantas disponen durante todo el ciclo de desarrollo en esta fase de adecuadas cantidades de: N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mo, lo cual ha sido comprobado en otras especies como: la papa (*Solanum tuberosum* L.) (Agramonte, 1999), caña de azúcar (*Saccharum spp. híbrido*), bananos, plátanos (*Musa sp.*) (Pérez et al., 1999).

Evaluación de las plantas *in vitro* en el campo

Las plantas *in vitro* mostraron un rápido crecimiento en el campo alcanzando valores de 75 mm de diámetro y 10.3 m de altura a los 18 meses (Tabla 5). Estos valores son muy superiores a los obtenidos en las plantas que proceden de semilla, según se pudo comprobar al comparar los resultados obtenidos con los datos históricos. Según los datos aportados por González (1996) en un período similar una planta de semilla sólo alcanza un diámetro de 2.5 m y una altura de 3.0 m. Una característica fundamental que presentó la población de plantas *in vitro* fue la homogeneidad fonotípica, lo cual es un indicador de una gran estabilidad genética, a diferencia de las plantas propagadas por semilla que muestran una alta segregación (Pérez et al., 1998).

Tabla 4. Comportamiento de las *plantas in vitro* de *E. grandis* con diferentes variantes de sustrato en la fase de aclimatización.

Tratamientos	Supervivencia(%)	Longitud tallo (cm)
50% Fibra de coco + 50% Casting	65.0 c	10.5 c
100% Casting	54.6 d	9.82 c
15% Fibra de coco + 85% Casting	75.2 b	12.6 b
15% Zeolita + 85% Casting	90.2 a	14.5 a
MG±ES		11.85±0.6

Letras desiguales difieren estadísticamente según Duncan $p < 0.05$.

1. 3. 15% Fibra de coco + 85% Casting
2. 100% Casting
3. 4. 15% Zeolita + 85% Casting

Tabla 5. Mediciones de diámetro y altura promedios de las plantas *in vitro* de *Eucalyptus grandis* realizadas en el campo durante 18 meses después de plantadas.

Edad	Diámetro promedio (cm)	Altura promedio (m)
6 meses	3.3	4.5
11 meses	5.8	6.05
18 meses	7.5	10.03

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen un ejemplo importante de las posibilidades de la biotecnología para la propagación masiva de especies leñosas forestales, que presentan en la actualidad dificultades para su multiplicación a gran escala.

CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo para la propagación masiva del *eucalyptus grandis* que permite multiplicar a gran escala plantas con mayor vigor, precocidad y homogeneidad que las obtenidas a partir de semillas.

REFERENCIAS

Agramonte, D (1999) Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis para aspirar al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara

Carvalho, D (1988) Micropropagacao de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden através da cultura *in vitro* de segmentos nodais. Tesis de Maestría. Escuela Superior de Agricultura de Lavras. Brasil

Correia, D (1993) Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicacao de *Eucalyptus spp.* *In vitro* em meio da cultura liquido e solido. Tesis de maestría. Piracicaba. Sao Paulo. Brasil

García, L (1999). Desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* para la conservación de caña de azúcar *Saccharum ssp.* híbrido. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara

García, M (1999) Propagación clonal *in vitro* de *Eucalyptus saligna*. Tesis de maestría. Universidad de Pinar del Río. Pinar del Río

Gil, V, Pérez C y Rojas A (1992) Resultados en la micropropagación *in vitro* de *Hibiscus elatus* Sw. Centro Agrícola 19: 105-108

González, A (1987) Obtención de posturas de *Eucalyptus saligna* SM. en Topes de Collantes mediante el empleo de estaquillas. Centro Agrícola 12: 77- 84

Jenq Chuan, Y, JengDer C, ZennZong C, Yang J C, Chung J D y Cheng Z Z (1994) Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* and comparison of growth between micropropagated plantlets and root cuttings. Plant Cell Report. 15: 170- 173

Major, G S, Ross M y Krause I (1995) Micropropagación de árboles adultos de *Eucalyptus grandis* Maiden (Hill). Uruguay Forestal 8: 16-17

Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiol 15: 473-497

Noda A L (1999) Micropropagación clonal de *Eucalyptus pellita*. Tesis de maestría. Universidad de Pinar del Río. Pinar del Río

Pérez, J N (1998) Propagación y mejora de plantas por biotecnología. IBP. Santa Clara

Pérez, J N, Jiménez F A y Agramonte D (1999) Desarrollo y perfeccionamiento de la tecnología para la propagación masiva en las fases de enraizamiento y adaptación en la caña de azúcar, papa, plátanos y bananos y adaptación de semillas artificiales. Informe final de proyecto p. 85 IBP.Santa Clara

Rodríguez, R, Centeno I M, Fernández B y Fraga F M (1999) Bases fisiológicas del envejecimiento y revigorización vegetal. Libro de Reportes Cortos. 5^{to} Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara

Sotolongo, R (1999) Propagación de *Psidium salutare* por cultivo *in vitro*. Tesis de Maestría. Universidad de Pinar del Río. Pinar del Río

Vázquez, B E y Torres, G S (1995). Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación Segunda Edición. Ciudad de la Habana

Xavier, A (1997) Enraizamiento *ex vitro* de gemas de *Eucalyptus spp.* multiplicadas y elongadas *in vitro*. Scientia Forestalis 51: 29-36