

## Cultivo *in vitro* y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales

Felipe Jiménez-Terry\*, Daniel Agramonte. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: felipe@ibp.co.cu

### RESUMEN

Las especies forestales, constituyen cultivos de gran importancia económica. Para su propagación se utilizan diferentes vías. Estas se relacionan con la especie, los recursos y las tecnologías disponibles. Este trabajo se realizó con el objetivo de compendiar diferentes métodos de propagación que se utilizan en especies forestales de gran importancia en Cuba y como aspecto específico se destaca la factibilidad de la integración del cultivo *in vitro* y la macropropagación como vía para garantizar la sostenibilidad de la propagación de dichas especies. Como ejemplos se describe el uso del corte de esquejes en casa de cultivo para lograr plantas de calidad. Esta vía alternativa permite trazar una estrategia sostenible para la producción de semillas de calidad de valiosos materiales vegetales.

Palabras clave: embriogénesis somática, organogénesis, segmentos nodales.

### *In vitro* culture and macropropagation as way of sustainability of forest species propagation

#### ABSTRACT

Forest species are economically important crops. In order to its propagation different ways are used. Those are relating to the species, resources and technologies available. This work was performed with the aim to summarize different propagation methods used in forest species of great importance in Cuba. As a specific aspect, the feasibility of integrating the *in vitro* culture and macropropagation as a way to ensure the sustainability of the propagation of these species was analyzed. Examples using cut plant in growing house to achieve plants quality is described. This alternative approach allows designing a sustainable strategy in the production of quality seeds of valuable plant materials.

Key words: nodal segment, organogenesis, somatic embryogenesis.

#### CONTENIDO

##### INTRODUCCIÓN

##### ALGUNAS ESPECIES FORESTALES DE IMPORTANCIA EN CUBA

##### PROPAGACION CONVENCIONAL. ASPECTOS GENERALES Y PRINCIPALES DIFICULTADES

##### CULTIVO *IN VITRO* DE ESPECIES FORESTALES

##### MACROPROPAGACIÓN

##### *Injertos*

##### *Estaquillado*

##### *Corte de esquejes*

##### COMBINACIÓN DEL CULTIVO *IN VITRO* Y EL CORTE DE ESQUEJES

##### CONCLUSIONES

##### REFERENCIAS

#### INTRODUCCIÓN

La deforestación es uno de los problemas más graves que atraviesa la humanidad debido fundamentalmente a la necesidad del hombre de obtener recursos del ecosistema. La tala abusiva, los incendios forestales y el inadecuado manejo silvícola sin pensar en las

futuras generaciones pueden conllevar a la desaparición de los bosques del planeta (Luján, 2003).

En Cuba existe un reto urgente enfocado a lograr mayor supervivencia así como mejorar el ritmo de crecimiento y desarrollo en las poblaciones de plantas forestales maderables.

La multiplicación de estas especies se efectúa de forma convencional por medio de semillas y por estacas, por falsas estacas y por margullos. Sin embargo, la reproducción por injerto generalmente se emplea en los programas de mejoramiento genético; su uso es más frecuente en la fruticultura.

Estas vías de propagación son limitadas, aún más cuando se desea introducir las plantas a gran escala en sistemas integrales de producción con respuesta directa a la industria. Las especies forestales tienen muchos problemas de propagación que responden más a las peculiaridades fisiológicas de las semillas de las plantas leñosas, que a la variabilidad genética de las especies (Barbón, 2011).

El éxito de una plantación forestal es fuertemente dependiente de la calidad de las plantas que se utilicen. En este sentido, la calidad de una planta está definida por su comportamiento final en el terreno, el que está regulado por sus atributos morfológicos y fisiológicos y por su interacción con el ambiente del sitio de plantación (Navarro y Palacios, 2004; Chávez y de Fera, 2012).

Los métodos de cultivo *in vitro* constituyen una vía de propagación con resultados satisfactorios en los coeficientes de multiplicación y por las posibilidades de éxito de las plantaciones forestales en campo. Los principales avances del cultivo *in vitro* de tejidos han permitido la multiplicación de especies de interés mediante organogénesis y embriogénesis somática (ES) (Daquinta *et al.*, 2000; Barbón, 2011).

Sin embargo, Pérez *et al.* (2000) señalaron que los altos costos en reactivos e infraestructura de estas tecnologías hacen necesaria la búsqueda de soluciones viables y sostenibles que permitan menores desembolsos financieros y resultados similares en los coeficientes de multiplicación así como el crecimiento y desarrollo de las plantas. Esto ha obligado a los investigadores a buscar o combinar alternativas de reproducción vegetativa que permitan lograr altas tasas de multiplicación y apropiada calidad de las características morfológicas y fisiológicas de las plantas.

La macropropagación es una vía de reproducción acelerada de pocos insumos y

bajos costos. Puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas entre las que se pueden considerar el injerto, el estaquillado y el corte de esquejes. Entre las ventajas de esta técnica se ha mencionado que puede combinarse con los métodos de cultivo *in vitro*, se garantiza estabilidad genética de especies de interés para el hombre, y permite obtener altos coeficientes de multiplicación de forma sostenible (Pérez *et al.*, 2000; Daquinta *et al.*, 2004).

Este trabajo se realizó con el objetivo de compendiar diferentes métodos de propagación que se utilizan en especies forestales de gran importancia en Cuba y como aspecto específico se destaca la factibilidad de la integración del cultivo *in vitro* y la macropropagación como vía para garantizar la sostenibilidad de la propagación de dichas especies. Como ejemplos se describe el uso del corte de esquejes en casa de cultivo para lograr plantas de calidad.

## ALGUNAS ESPECIES FORESTALES DE IMPORTANCIA EN CUBA

Las especies forestales, constituyen cultivos de gran importancia económica y ecosistémica, por ser fuentes de materia prima para el sector maderero, que posee de forma sostenida elevados precios en el mercado por sus aplicaciones en la fabricación de muebles, papel, barcos, útiles del hogar, construcción, embalajes de equipos, producción de aceites, fármacos, así como la reforestación que tiene relevancia en la remoción y retención de carbono atmosférico y la producción de oxígeno para mejorar el medio ambiente y mitigar el cambio climático (Álvarez, 2012).

La explotación de especies forestales está mayoritariamente considerada en el país como bosques protectores y de conservación, donde no se permite o se limita rigurosamente el aprovechamiento. Las actividades forestales responden a objetivos productivos asociados a las especies capaces de satisfacerlos, con orden de prioridad según Álvarez (2000) y Labaut *et al.* (2001):

1. La producción de madera aserrada a partir de plantaciones manejadas intensivamente, utilizando las especies acacia (*Acacia mangium*), algarrobo indio (*Ceratonia siliqua* L.), majagua (*Hibiscus elatus* Sw.), melina (*Gmelina arborea* Roxb.), pino de Mayarí (*Pinus*

*cubensis* Griseb.), pino macho (*Pinus caribaea* Morelet), teca (*Tectona grandis* L.) y varía (*Cordia gerascanthus* L.).

2. La producción de postes de servicio público a partir de plantaciones, manejadas tradicionalmente, de *Eucalyptus urophylla* y pino macho (*Pinus caribaea* Morelet).

3. La producción de madera aserrada a partir de plantaciones, manejadas tradicionalmente, de acacia, algarrobo indio, caoba africana (*Khaya nyasica* Stapf), caoba antillana (*Swietenia mahogani*), caoba híbrida (*Swietenia macrophylla* King x *Swietenia mahogani*), caoba hondureña (*Swietenia macrophylla*), casuarina (*Casuarina equisetifolia*), cedro (*Cedrela odorata* L.), eucalipto (*Eucalyptus* sp.), majagua (*Hibiscus elatus* Sw.), melina, ocuje (*Calophyllum inophyllum* L.), pino de Mayarí (*Pinus cubensis* Griseb.), pino de la Sierra Maestra (*Pinus maestrensis*), pino hembra (*Pinus tropicalis* Morelet), pino macho, soplillo (*Lysiloma latisiliqua*), teca, varía y yarúa (*Caesalpinia violaceae*).

De las 21 especies seleccionadas por las prioridades forestales, 10 han sido objeto de selección de procedencias (todos los pinos, *T. grandis*, *H. elatus*, *G. gerascanthoides*, *A. mangium*, *G. arborea* y *S. macrophylla*) y siete de selección familiar (todos los pinos, *H. elatus*, *C. odorata* y *C. equisetifolia*) según Álvarez (2000). Un balance de los resultados alcanzados en este campo en Cuba ha sido publicado por Mercadet *et al.* (2001).

Estas especies han sido abordadas en proyectos de investigación-producción y de mejoramiento genético, por su interés para la producción de madera, postes y otros usos generales. Además, algunas de ellas ocupan los mayores volúmenes productivos de la empresa nacional forestal con un balance económico y de rendimiento favorable y una alta tasa de supervivencia de las poblaciones en el campo (Álvarez, 2012).

A continuación se presenta una abreviada síntesis sobre las características principales de algunas de especies de importancia en Cuba.

### Pino

Los pinos [pino de Mayarí (*Pinus cubensis* Griseb.), pino macho (*Pinus caribaea* Morelet), casuarina (*Casuarina equisetifolia*), pino de la

Sierra Maestra (*Pinus maestrensis*), pino hembra (*Pinus tropicalis*)] son coníferas pertenecientes a las gimnospermas que poseen gran importancia maderable y paisajística, con un gran valor ecológico, económico, social y medioambiental. Los pinos influyen en los procesos funcionales del ecosistema y son hábitat y fuente de alimento para la fauna silvestre. Tienen un alto valor económico ya que de ellos se produce madera, leña, pulpa, resinas, semillas y otros productos. Además, ofrecen importantes servicios ambientales (agua, oxígeno, recreación, captura de carbono (Farjon, 2003).

Los pinares constituyen una fuente renovable para la producción de diversos productos relacionados con la madera. Los reportes anuales indican que el área de bosques de Cuba aumenta sostenidamente y en ellos estas especies ocupan un lugar importante en las prioridades de reforestación (Earle, 2007).

### Cedro

El cedro (*Cedrela odorata* L.), conocido como cedro o cedro hembra, en español, es la especie del género *Cedrela* de mayor importancia comercial y de mayor extensión. Su madera de excelente calidad y belleza, está considerada como una de las más finas del mundo. La aromática madera, conocida como 'spanish-cedar' en las esferas comerciales en inglés, posee una alta demanda en los trópicos americanos debido a que es naturalmente resistente a las termitas y a la pudrición Mascarenhas y Muralidharan (1993).

El cedro está ampliamente distribuido, pero no es muy común a través de los bosques tropicales americanos. Su número de individuos se ve constantemente reducido debido a la explotación sin una regeneración exitosa. Es necesario conocer sus estrictos requisitos en cuanto a las características del sitio e investigar el daño causado por los insectos con el objeto de establecer plantaciones productivas. Muy susceptible al ataque del barrenador *Hypsipyla grandella* Zeller., que daña la yema principal y deforma los fustes al causarles bifurcaciones. La siembra se hace en almácigos sin necesidad de sombra y sus semillas germinan en 12 días. Para la plantación se recomienda una densidad de 60 plantas por hectárea, en

asociación con otras especies, a fin de reducir los posibles ataques de este insecto.

Se utiliza para fabricar muebles de alta calidad, artículos torneados, chapa decorativa, instrumentos musicales y decoración de interiores. Sus flores son melíferas, el néctar es buscado por las abejas para la elaboración de miel. En diversas poblaciones el cedro se cultiva para establecer cortinas rompivientos y cercas vivas para delimitar terrenos de cultivo y tierras de pastoreo. También se planta como árbol de sombra y ornato. Se le observa con frecuencia alrededor de las viviendas, en los huertos familiares y a lo largo de los caminos. Se considera como un árbol de uso múltiple de importancia agroforestal (Maruyama y Ishii, 1997; Valverde *et al.*, 1998).

### Caoba

Las caobas [(caoba africana (*Khaya nyasica* Stapf), caoba antillana (*Swietenia mahogany*), caoba híbrida (*Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahogany*), caoba hondureña (*Swietenia macrophylla* King)] son especies meliáceas de gran importancia para los programas de construcción y de fabricación de muebles, entre otras aplicaciones. Poseen un alto valor comercial, que ha provocado la disminución acelerada de un gran número de sus ejemplares en los países tropicales. La alta variabilidad producida por la reproducción sexual en estas especies ha tenido como consecuencias la pérdida de características importantes tales como: velocidad de crecimiento, rectitud del fuste y resistencia a plagas y enfermedades (Metzger *et al.*, 2006; Croitoru, 2007).

Las caobas son las especies maderables más importantes comercialmente en el neotrópico, pero no se reproducen a menudo con éxito debido a la baja eficiencia de los métodos de propagación convencionales. Entre las denominadas caobas se encuentran diferentes especies pertenecientes a los géneros *Khaya* y *Swietenia*. En diversas localidades de Cuba se pueden encontrar árboles aislados, pequeñas parcelas y plantaciones del género *Khaya* (*Khaya nyasica* Stapf., *Khaya senegalensis* A. Juss., y su híbrido natural). Llama la atención en estas especies su vigoroso desarrollo, la excelente conformación

fenotípica, así como la resistencia que presentan al ataque de *Hypsipyla grandella* Zeller, ya que según estudios realizados en parcelas experimentales, las dos especies de caobas africanas y su híbrido natural, mostraron resistencia al ataque de esta plaga, lo que fue confirmado posteriormente en plantaciones (Croitoru, 2007). *Khaya nyasica* Stapf es originaria de África por lo que en Cuba se le conoce como caoba africana (Bisse, 1981; Collado *et al.*, 2005).

La caoba cubana ha sido objeto de la explotación irracional lo que ha ocasionado que la especie casi no se comercialice y haya sido incluida en la lista de especies amenazadas. La caoba híbrida es una meliácea originada a partir del cruzamiento natural de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahogany* por lo que en Cuba se le conoce como caoba híbrida. Entre las características particulares de esta especie está el vigor con respecto a sus progenitores, por lo que disponer de un método de propagación que permita clonar las pocas plantas disponibles en el país es de mucha importancia para los programas de mejoramiento genético (Álvarez, 2000). La caoba hondureña (*Swietenia macrophylla* King) es el cuarto árbol del corazón. Su nombre evoca las más dramáticas historias de colonización y exóticas aventuras y leyendas en las selvas tropicales de la América continental, en donde cientos de miles de estos árboles fueron cortados para extraer su exquisita madera, la cual se pagó muy caro con la vida de cientos de miles de personas que sucumbieron víctimas del paludismo en la empresa de buscar y explotar esta madera. Este árbol es originario y nativo de América continental, desde las tierras tropicales de México hasta la porción central de América del Sur, pasando por todos los países de América Central. Por naturaleza no es un árbol muy abundante, y la explotación desmedida de su madera desde hace muchas décadas ha reducido su población a niveles tan bajos que hoy en día sólo se le encuentra en forma muy aislada en los potreros, barrancos y cejas de montaña de las áreas protegidas. Es un árbol en apariencia muy exigente y prefiere los suelos más bien profundos, planos, sueltos y fértiles como los que se encuentran en los alrededores de los ríos de cauce amplio y perezoso (Betancourt, 1987; Mercadet *et al.*, 2001).

## Majagua

La majagua se encuentra entre las especies forestales más explotadas en Cuba. Su madera es utilizada para la fabricación de muebles finos, carpintería, artesanía, objetos torneados decorado interior, bates de pelota, etc. Por otra parte, es una especie altamente melífera, por lo que juega un papel importante en la apicultura, tiene además propiedades textiles, pues de su súber o epidermis se obtiene una excelente fibra que es utilizada para la fabricación de cuerdas para amarrar tercios de tabaco y otros usos. Se le conoce también como planta medicinal sobre todo por las propiedades aperitivas, emolientes y laxantes de sus flores. También se utiliza como planta ornamental (Capote y Berazaín, 1984; Trocones *et al.*, 2005).

En Cuba se han obtenido 12 clones mejorados de esta especie, con los que se han conformado bancos clonales localizados en diferentes provincias, entre ellas el de Villa Clara, situado en Las Breas, carretera a Camajuaní. A partir de estas poblaciones se han seleccionado en campo alrededor de 150 árboles plus y se cuenta con unas 130 ha de masas semilleras como parte de los trabajos de mejoramiento genético realizados por métodos tradicionales (Trocones *et al.*, 2005; Mercadet, 2007).

A pesar de que esta especie está inmersa en uno de los programas de mejoramiento más avanzados en el país, su propagación ha sido engorrosa debido a la poca disponibilidad, viabilidad y segregación de las semillas. Por todas estas causas la producción anual de posturas no satisface la demanda nacional (Betancourt, 1987; Herrero, 2007).

## Eucaliptos

Los eucaliptos han sido adoptados en forma amplia para cultivos industriales y de esparcimiento, no solamente en las regiones donde se dan naturalmente, sino como especies exóticas en la mayoría de las zonas de clima tropical, subtropical o templado cálido (Jenq *et al.*, 1994).

Cada vez cobran más importancia para Cuba y para el mundo por sus múltiples usos, entre los que sobresalen: madera para aserrío, madera para pulpa materia prima de la industria

del papel, paneles aglomerados, postes, producción de leña y cujes para la cosecha del tabaco (Betancourt, 1987 referido por Delgado *et al.*, 2004).

## Teca

La teca es una de las plantas forestales de gran importancia ecológica y comercial por la calidad de su madera, fortaleza, durabilidad e idoneidad. Fue introducida de la India y se importa por los países del primer mundo para usar en acabado de cielos rasos, pisos, paredes, muebles, puertas, ventanas, etc. La rotación de las nuevas plantaciones de estos árboles se realiza cada 20 a 25 años. El incremento anual medio por año esperado es superior a 10 m<sup>3</sup> por hectárea. Es una planta que se adapta a las condiciones ecológicas del país y presenta un crecimiento rápido, con fuste recto y alta resistencia al fuego en estado natural del cultivo (Betancourt, 1987).

## PROPAGACION CONVENCIONAL. ASPECTOS GENERALES Y PRINCIPALES DIFICULTADES

La propagación convencional de las principales especies forestales maderables de Cuba se realiza fundamentalmente a través de semillas botánicas, aunque las excepciones de esa regla son los eucaliptos, muy propagados por estacas y la teca, propagada por falsas estacas. Además, para multiplicar algunos cultivares élites se ha utilizado ocasionalmente el injerto, lo cual ha permitido una clonación verdadera de los árboles promisorios. La reproducción de estos forestales mediante estas vías, presenta como ventajas esenciales la diversidad genética de las poblaciones y las posibilidades de utilizarlas en programas de mejoramiento genético con una elevada garantía de que los individuos con mejora por la segregación natural mantienen la identidad (Ajete-Hernández *et al.*, 2009).

En la rama forestal, la necesidad de multiplicar íntegramente individuos de caoba seleccionados ha despertado interés por los métodos de propagación vegetativa. Se han realizado estudios donde se ha evaluado diferentes profundidades de siembra y diversas formas de preparación del suelo y los porcentajes de regeneración son inferiores al 49% (Negreros-Castillo *et al.*, 2003).

La caoba africana es particularmente susceptible a la necrosis cortical, por lo que disponer de un método de propagación para clonar las plantas que muestren síntomas de resistencia a esta enfermedad es de mucha importancia para los programas de mejoramiento genético (Collado *et al.*, 2005).

La propagación convencional de los eucaliptos en Cuba incluye tanto el empleo de semilla botánica, como el empleo de estacas. En el caso de la semilla botánica, la falta de semilla y los problemas fisiológicos son descartables, porque un solo árbol produce cientos de miles de pequeñas semillas que germinadas en semillero y manejadas por repique en envases, garantizan cualquier plan de producción. En el caso de las estacas, al constituir un método agámico de reproducción, dan lugar a la misma estabilidad genética que el material vegetal obtenido por micropropagación (Álvarez, 2000).

Acerca de la reproducción de la majagua por semilla botánica se señalan problemas derivados de la impermeabilidad de la cubierta, así como de postmaduración del embrión luego de la cosecha. Sin embargo, el principal problema de manejo esta especie deriva de la presencia de células somáticas que contienen series cromosómicas diferentes en una misma planta lo que unido a algunas experiencias experimentales han hecho pensar que los mejores resultados esperables no provendrán del mejoramiento genético de la especie, sino de su manejo silvícola, en especial de la oportuna y sistemática aplicación de la poda (Betancourt, 1987).

La propagación convencional de estas especies forestales, de forma general, se ve afectada por los bajos índices de brotación y supervivencia de las semillas en campo así como el inadecuado manejo silvícola de las plantaciones. Las plantas que se propagan por el método convencional de semillas, generalmente tienen un ritmo de crecimiento inferior a las plantas multiplicadas por métodos biotecnológicos y presentan variaciones muy amplias en el fenotipo de las plantas y heterogeneidad en el crecimiento y desarrollo de los árboles. Los coeficientes de multiplicación son relativamente bajos en el caso de las plantas propagadas por estacas e injertos, además de que implican mayor

número de actividades por operario y mayor gasto promedio por planta (Duryea y McClain, 1984).

## CULTIVO *IN VITRO* DE ESPECIES FORESTALES

El éxito de una plantación forestal depende principalmente de la calidad de las plantas que se utilicen. La calidad de una planta está definida por su comportamiento final en terreno, el que está regulado por sus atributos morfológicos y fisiológicos, por su interacción con el ambiente y la vía de propagación (Eldridge *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 2000; Álvarez, 2012).

La micropropagación contribuye a mantener el equilibrio del ecosistema forestal y del medio ambiente ya que como herramienta de rescate permite la producción de plantas y la conservación de la biodiversidad genética y la innovación de procedimientos tecnológicos en los bosques tropicales (Farjon, 2003).

Para la propagación *in vitro* de especies forestales es necesario utilizar material vegetal establecido en casas de cultivo y viveros que permitan reducir la incidencia de microorganismos patógenos y saprofitos y así obtener una respuesta rápida del explante. Los tejidos vegetales a cultivar deben proceder de plantas jóvenes. Las características del explante y su procedencia son importantes para lograr la homogeneidad necesaria en las plantas propagadas *in vitro* (de Fera *et al.*, 2008; Cantillo *et al.*, 2011).

Tanto la organogénesis y como la embriogénesis somática constituyen vías novedosas de propagación de especies forestales de interés y herramientas de trabajo para la conservación *in vitro* del germoplasma y el mejoramiento genético. Además, estas técnicas de cultivo *in vitro* permiten producir un mayor número de plantas en un periodo relativamente corto (Daquinta *et al.*, 2004; Chávez *et al.*, 2010).

La implementación de dichas tecnologías ha permitido acometer la propagación de diferentes especies forestales de gran interés en Cuba. Estas se han multiplicado en instalaciones productivas denominadas Biofábricas, las cuales se distinguen por el

empleo de la luz solar en las cámaras de cultivo, modificaciones en los métodos de esterilización de los medios de cultivo y en la aplicación de una adecuada organización productiva (Pérez *et al.*, 2000).

En Cuba, el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, el Centro de Bioplasmas de Ciego de Ávila, de conjunto con el Instituto Nacional Forestal (INAF) han abordado diferentes estudios sobre la propagación de estas especies forestales. En los trabajos publicados se hace referencia a resultados novedosos en la propagación mediante organogénesis y embriogénesis somática y una respuesta diferencial a la adición de reguladores del crecimiento y medios de cultivo en estados líquido y semisólidos así como el empleo de sistemas de inmersión temporal (Daquinta *et al.*, 2004; Barbón, 2011; Quiala *et al.*, 2012).

Entre las especies forestales que han sido propagadas con éxito a través del cultivo *in vitro* se encuentran: pino macho (*Pinus caribaea*), cedro, caoba africana (*Khaya nyasica*), caoba cubana (*Swietenia mahagoni*), caoba hondureña (*Swietenia macrophylla* King), caoba híbrida (*S. macrophylla* x *S. mahagoni*), majagua (*Hibiscus elatus* Sw.) eucalipto (*Eucalyptus* spp.) y teca (*Tectona grandis*), entre otras.

### Pino

La micropropagación de plantas del género *Pinus* se ha realizado en varias especies, por ejemplo: *Pinus caribaea* Morelet. (David *et al.*, 1995), *Pinus strobus* L. (Klimaszewska *et al.*, 2007), *Pinus taeda* L. (Gupta *et al.*, 1999), *Pinus cubensis* Griseb (Cantillo *et al.*, 2011), *Pinus caribaea* (de Feria *et al.*, 2008; Chávez *et al.*, 2012). Asimismo, Klimaszewska *et al.* (2007) se refirieron a los avances de investigaciones sobre embriogénesis en pino.

Diferentes investigaciones refieren el uso de citocininas solas o combinadas con ácido naftalenacético (ANA) en la fase de multiplicación y la influencia de otros factores. Por ejemplo, de Feria *et al.* (2008) demostraron que fue posible multiplicar plantas *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *caribaea* a partir de brotes apicales cortados de plantas donantes obtenidas de semillas, lo que permitirá

mantener la diversidad biológica de esta variedad y multiplicar nuevos clones. Estos autores determinaron que en la fase de multiplicación el uso de 6-bencilaminopurina (6-BAP) influyó en el desarrollo de las plantas *in vitro* y que con la concentración de 6.66  $\mu\text{M}$  se obtuvo el mayor número (6.75) y longitud de los brotes por planta (2.70 cm) y un coeficiente de multiplicación de 2.38. Además, de Feria *et al.* (2009) lograron la regeneración de plantas de *Pinus caribaea* vía organogénesis a partir de brotes apicales obtenidos de plantas donantes cultivadas en casas de cultivo. Al comparar el efecto de la luz solar y artificial en el desarrollo de las plantas *in vitro* se observó que con luz solar las plantas presentaron una mejor respuesta *in vitro* y un mayor coeficiente de multiplicación. Igualmente se demostró que el agente gelificante y su concentración, fueron factores que influyeron en el desarrollo *in vitro* de las plantas en la fase de multiplicación.

Por otra parte, Chávez *et al.* (2010) evaluaron la influencia del empleo de sacarosa en la multiplicación *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *caribaea* sobre las características morfológicas de las plantas. Se determinó también, la respuesta de estas plantas en la fase de enraizamiento con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) y diferentes concentraciones de nutrientes inorgánicos (50 y 100% de las sales MS) (Murashige y Skoog, 1962). Con 50 y 60 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, se obtuvo una menor formación de nuevos brotes y mayores porcentajes de materia seca. Con 60 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, se observaron acículas más diferenciadas, muy similares a las desarrolladas en condiciones naturales, las plantas presentaron un color verde más intenso y el olor característico de los aceites esenciales que puede percibir al macerar tejidos de árboles adultos.

Igualmente, Cantillo *et al.* (2011) observaron que con el uso de 22.5  $\mu\text{M}$  de 6-BAP y 5.4  $\mu\text{M}$  de ANA se incrementó el número y la longitud de los brotes axilares en la fase de multiplicación. Estos autores propagaron *in vitro* por primera vez *Pinus cubensis* Griseb. a partir embriones cigóticos y establecieron un protocolo de trabajo donde las plantas obtenidas alcanzaron un 50% de supervivencia en la fase de aclimatización.

Posteriormente, Chávez y de Feria (2012), señalaron aspectos básicos de la propagación

*in vitro* por organogénesis en el género *Pinus*, incluyendo un análisis de los principales factores que de alguna forma podrían afectar el éxito de la regeneración de plantas por este método, con énfasis en la formación de raíces tanto *in vitro* como *ex vitro*.

### Cedro

Badilla *et al.* (2000) propusieron un método para la multiplicación *in vitro* de cedro (*Cedrela odorata* L.) mediante organogénesis y embriogénesis somática (ES), evadiendo las principales manifestaciones de recalcitrancia que muestra la especie al cultivo de tejidos. Estos autores utilizaron el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), al que se adicionaron varias concentraciones de 6-BAP lo cual posibilitó el desarrollo de brotes axilares a partir de segmentos nodales. Para la elongación y enraizamiento de los brotes fueron probadas diferentes concentraciones de ANA y ácido indolacético (AIA). La mejor variante fue el medio de cultivo constituido por el 50% de sales (MS), sin reguladores del crecimiento y a pH=5. Para la formación de callos con estructuras embriogénicas a partir de cotiledones e hipocotilos de plántulas germinadas *in vitro* se utilizó el medio de cultivo MS al que incluyeron varias concentraciones de ANA y ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). Como resultado se logró la formación de callos en todas las variantes. Además, estos autores lograron la maduración y germinación de los embriones con bajas concentraciones de 6-BAP.

Por otra parte, Jiménez-Terry *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la revigorización en el establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de *Cedrela odorata* L. y demostraron la necesidad de realizar la revigorización del material vegetal para lograrlo.

### Caoba

Collado *et al.* (2004) partieron de brotes jóvenes tomados de plantas sembradas en condiciones de campo para lograr el establecimiento *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King). A partir del empleo de segmentos nodales como explante se logró una propagación directa de vástagos vigorosos con una concentración de 0.2 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP.

Por otra parte, Daquinta *et al.* (2004) describieron que las técnicas biotecnológicas les permitieron encontrar nuevas vías para la propagación de caoba híbrida. En su trabajo de investigación lograron la formación de callos en *Swietenia mahogani* x *Swietenia macrophylla* con vistas a inducir la regeneración de plantas. Para ello, yemas axilares de brotes jóvenes fueron establecidas en el medio de cultivo MS al que se le adicionaron diferentes concentraciones de Tiazuron (TDZ) (0.1-1.0 mg l<sup>-1</sup>). Se obtuvieron callos nodulares con buenas características morfológicas y estructuras embriogénicas.

Asimismo, Collado *et al.* (2006) señalaron la obtención de embriones somáticos cuando emplearon embriones cigóticos como material vegetal inicial. Estudiaron tres concentraciones de 2,4-D, para lograr la formación de embriones somáticos. Se evaluó a las seis semanas de cultivo, el número de explantes con embriogénesis somática de alta frecuencia y baja frecuencia. Para que los embriones somáticos en etapa globular alcanzaran las etapas finales de torpedo y cotiledonal, estos se colocaron en tres tratamientos con 6-BAP.

Basado en experiencias anteriores, Barbón (2011) utilizó secciones cotiledonales como material vegetal inicial en medio de cultivo semisólido y logró la embriogénesis somática de *Swietenia mahogani* (L.) Jacq. Los resultados demostraron que el mayor porcentaje de formación de callo (95.30%) a partir de secciones cotiledonales se obtuvo con 6.0 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D combinado con 1.0 mg l<sup>-1</sup> de kinetina en el medio de cultivo.

### Majagua

Los trabajos relacionados con la micropropagación de la majagua en Cuba se iniciaron en la década de los años 90 del siglo XX, cuando Gil *et al.* (1992) obtuvieron plantas *in vitro* de esta especie a partir de yemas apicales.

Posteriormente, las investigaciones realizadas en el laboratorio de Propagación Masiva del Instituto de Biotecnología de las Plantas permitieron arribar a la metodología para obtener plantas *in vitro* de esta especie forestal y utilizarlas en los planes de reforestación a partir de su producción en Biofábricas. Con estos resultados se propuso una metodología

para la micropropagación de majagua por organogénesis vía yemas axilares mediante la cual no se lograron altos coeficientes de multiplicación y por tanto la eficiencia del proceso *in vitro* fue baja (Trocones *et al.*, 2005).

Por otra parte, especialistas en el tema profundizaron en los estudios sobre el manejo de los explantes en el proceso de organogénesis de esta especie forestal, y mejoraron el coeficiente de multiplicación hasta valores entre 2.2 y 2.6 unidades (IBP, 2008).

La micropropagación de majagua a partir de árboles plus seleccionados por su rendimiento agroforestal en campo se ha desarrollado con éxito en el Instituto de Biotecnología de las Plantas. La metodología utilizada describe el proceso que transcurre desde la selección de los árboles élites en el campo hasta su aclimatación en casa de cultivo. Las plantas regeneradas por esta vía se utilizaron para la reforestación en algunos lugares de la región central de Cuba y alcanzaron como promedio 3.2 m de altura y 11.4 cm de diámetro de tallo (a 1m del nivel del suelo) en el primer año de cultivo (Jiménez-Terry *et al.*, 2007).

### Eucalipto

La producción de plantas *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* a partir de árboles adultos fue informada por Jenq *et al.* (1994). Estos investigadores lograron un 95% de segmentos nodales establecidos *in vitro* en un medio de cultivo MS que contenía 0.1 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.01 mg l<sup>-1</sup> ANA y como promedio 13.7 brotes por explante en 40 días de cultivo. La elongación se incrementó en el medio de cultivo anterior modificado que contenía la mitad del nitrato de potasio de las sales MS. La formación de raíces tuvo su respuesta óptima en un medio de cultivo que contenía sales MS al que se adicionaron 1mg l<sup>-1</sup> de vitaminas MS, sacarosa al 1% y 0.3 mg l<sup>-1</sup> de IBA. En el campo se observaron diferencias en el crecimiento, las cuales favorecieron a las plantas micropropagadas sobre las plantas propagadas por el método convencional de estaquillas. Sobre ello, señalaron que el efecto del rejuvenecimiento del cultivo *in vitro* favoreció un rápido crecimiento y desarrollo de las plantas.

La micropropagación de eucalipto se ha

desarrollado en más de 55 especies, y en un gran número de híbridos, mediante organogénesis a partir de tejidos juveniles como cotiledones y embriones, y de árboles adultos con el empleo de brotes epicórmicos, anillos de primordios y rebrotes como fuente de explantes (Jones y van Staden, 1997). La aplicación a escala comercial de estos métodos se ha visto limitada por factores tales como las bajas tasas de multiplicación, baja calidad de los explantes y altos costos ocasionados por el uso intensivo de mano de obra en las fases de multiplicación y enraizamiento (McComb y Bennett, 1986; Castro y González, 2002)

En el Instituto de Biotecnología de las Plantas, se desarrolló una metodología para la micropropagación de clones de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) mediante la cual se demostró una dinámica de crecimiento muy superior de las plantas *in vitro* con respecto a las producidas a partir de semillas (IBP, 2008).

### Teca

En relación con la teca, sin duda la experiencia clonal más extensa se ha desarrollado en los países asiáticos de donde proviene (Monteuuis *et al.*, 1995).

En Cuba, la teca ha sido propagada con éxito por varias instituciones. En tal sentido, el Centro de Bioplantas y el Instituto de Biotecnología de las Plantas, describen protocolos completos de propagación vía organogénesis en medios de cultivo estáticos y en sistemas de inmersión temporal (Daquinta *et al.*, 2000; Ramírez *et al.*, 2003; Quiala *et al.*, 2012).

Por ejemplo, Daquinta *et al.* (2000) informaron que establecer la metodología de propagación *in vitro* de teca se ha buscado como alternativa y respuesta a la problemática de la propagación convencional por semilla de los clones híbridos. Estos autores partieron de explantes recolectados de árboles jóvenes y adultos. Se evaluaron diferentes concentraciones de citoquininas con el objetivo de estimular la emisión de brotes y auxinas para la formación de raíces *ex vitro*. A partir de los resultados se logró establecer un protocolo para la propagación *in vitro*.

Estos mismos autores, más adelante

(Daquinta *et al.*, 2002), establecieron una metodología para la regeneración de plantas de teca con vistas a utilizarla en los programas de mejoramiento genético. Se utilizaron como explantes ápices y botones florales de árboles adultos y cotiledones de semillas. Para el establecimiento *in vitro* de los cotiledones, las semillas se desinfectaron con bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) al 0.2% durante 10 minutos. Además, evaluaron diferentes concentraciones de TDZ para el cultivo de los explantes antes señalados, con el objetivo de lograr la formación de callos y diferentes niveles de 6-BAP y kinetina para la emisión de brotes. Se logró la formación de callos en todos los explantes utilizados.

Por otra parte, Ramírez *et al.* (2003), lograron la regeneración de plantas *in vitro* de teca a partir de semillas para dar respuesta a la problemática de su baja germinación por poseer un grueso y duro pericarpio y porque una parte considerable de ellas permanece latente durante el primer año. Como resultado se logró establecer las condiciones y medios de cultivo para la multiplicación de las plantas obtenidas *in vitro* a partir de semillas así como su enraizamiento *ex vitro*. Se comprobó que el empleo de 2.0 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y kinetina a razón de 0.5 mg l<sup>-1</sup> permitieron la formación de un mayor número de brotes y superior coeficiente de multiplicación. Además, se determinó que los subcultivos se deben realizar cada 28 días en medio de cultivo en estado semisólido y la posibilidad de realizar el enraizamiento *ex vitro*.

Más recientemente, Quiala *et al.* (2012) incorporaron a la propagación *in vitro* por organogénesis que ha sido exitosa a partir de las metodologías desarrolladas en medios de cultivo estáticos, los sistemas de inmersión temporal. Se continúan los estudios para mejorar la supervivencia de las plantas en la fase de aclimatización y lograr mayor sostenibilidad de esta vía de propagación mediante la combinación con los métodos convencionales. Estos autores abordaron también aspectos básicos de la morfogénesis *in vitro* en la micropropagación y definieron indicadores de respuesta a los procesos de diferenciación en la fase de multiplicación relacionados con la hiperhidricidad de las plantas en sistemas de inmersión temporal.

#### **MACROPROPAGACION**

La reproducción de las plantas está supeditada al propósito final o interés del hombre para ejecutar la actividad. La propagación de las plantas debe poseer como principales atributos la calidad del producto final y que cumpla con los requisitos que le dieron origen, así como la rentabilidad o sustentabilidad de su producción (Bidwell, 1979; Luján *et al.*, 2003).

Los métodos de propagación no presentan una especificidad por cultivo, su aplicación varía con las características de las plantas y su objeto. Mediante micropropagación se pueden obtener elevados volúmenes de plantas en cultivos que regularmente no se pueden multiplicar por semillas botánicas, o en otros que necesitan de la rápida introducción de nuevas variedades, clones o cultivares. Por otra parte, la macropropagación se utiliza principalmente en cultivos que se reproducen por vía asexual con elevados coeficientes de multiplicación y mayor rentabilidad de este método a diferencia de utilizar la costosa infraestructura inicial y gastos en reactivos de la micropropagación (Pérez *et al.*, 2000).

Las diferencias entre micro y macropropagación radican principalmente en el medio y condiciones donde se desarrollan, y las dimensiones del material vegetal de partida. La macropropagación se realiza *ex vitro*, requiere menos recursos materiales y menor especialización y el material vegetal de partida es de mayor tamaño que en la micropropagación (Ajete- Hernández *et al.*, 2009).

La macropropagación, al igual que la micropropagación; utiliza diferentes alternativas de plantas madre para obtener un individuo o clon idéntico al que le dio origen. En la macropropagación el explante inicial es de mayores dimensiones que en la micropropagación y se cultiva sobre sustratos orgánicos, inorgánicos y fibras que se formulan atendiendo a las posibilidades de lograr altos índices de supervivencia y adaptación gradual al ambiente natural donde crecerán (Hartmann y Kester, 1975).

La macropropagación tiene muchas ventajas y se emplea exitosamente sin necesidad de gran inversión económica. La técnica más común, denominada estaquillado, es la inducción de la formación de raíces en una sección del tallo o de la rama, de manera que se origine una planta independiente. En los

casos en que se ha experimentado propagar árboles mediante el enraizamiento a partir de segmentos se ha tenido éxito en más de 80% (Mesén, 1992; Mercadet, 2007).

Según la parte de la planta de donde se obtienen los segmentos (cortes o fragmentos) se han dividido en cortes de: hojas, de brotes o renuevos, de raíz y de ramas. La selección de cualquiera de ellos depende básicamente de las características inherentes a cada especie, de las facilidades para obtener y manipular los cortes (en función del estado fenológico de la planta), del propósito de la propagación y de la disponibilidad de recursos económicos (Barner y Ditlevsen, 1988).

Duarte (1984) refiere que la macropropagación o propagación asexual de especies forestales se realiza fundamentalmente a través de: injertos, estaquillado y corte de esquejes.

#### *Injertos*

Macropropagación por injertos de segmentos de plantas sobre tallos de plantas receptoras más resistentes. El fin perseguido con el injerto es obtener la unión lo más íntimamente posible entre dos fragmentos de vegetales. El porta-injerto por medio de su sistema radical, y eventualmente por una parte del tallo, suministra los elementos necesarios para el crecimiento de la nueva planta. El injerto, aportará las características de la planta a multiplicar.

El injerto aplicado a especies forestales se practica para:

- reproducir fielmente árboles con determinadas características deseadas,
- multiplicar plantas imposibles o difíciles de reproducir por esqueje o acodo,
- trasladar material vegetal genético a lugares distantes,
- dar un sistema radicular adaptado al suelo y al clima de una región,
- sustituir en un árbol ya implantado una variedad por otra,
- adaptar la forma de un árbol a cierta necesidad,
- luchar contra ciertos parásitos y virus, injertando las variedades sobre porta-injertos resistentes,
- modificar o mejorar la estructura de ciertos árboles y
- multiplicar rápidamente una variedad, clon o

cultivar.

Existen varios tipos de injertos entre los cuales el injerto de yema y el de púa son los más utilizados en las especies leñosas y forestales. El injerto de yema en T, también llamado de escudete se realiza desde principios de primavera al otoño, es decir, cuando la corteza del patrón se pueda despegar con facilidad y el árbol esté turgente y fluya la savia. En invernaderos se pueden efectuar injertos durante todo el año, ya que se regulan artificialmente las condiciones ambientales.

Las ventajas fundamentales del injerto son:

- la multiplicación de las plantas alópatras, plantas aisladas en un lugar, híbridos y plantas rebeldes a otros métodos,
- la adaptación a diferentes tipos de suelos calcáreos, secos, salinos, formas de cultivo (especies más o menos vigorosas) y al clima,
- la lucha contra ciertos parásitos,
- el comportamiento agronómico (en vegetación y rendimientos),
- la influencia en la floración,
- la cirugía arbórea (permite cubrir ramas desnudas,
- los inconvenientes principales de los injertos,
- la longevidad de los árboles,
- la transmisión de enfermedades virales, y
- la incidencia económica (requiere de mayor especialización y se obtienen bajos volúmenes de plantas en periodos relativamente cortos).

#### *Estaquillado*

Según Mesén *et al.* (1992) el estaquillado es el método de macropropagación a partir de estacas que conserven la potencialidad de enraizar en un sustrato determinado, ya sea en casa de cultivo o directamente en el suelo. Este método, que describe la propagación vegetativa mediante estacas o ramas de tallos es uno de los métodos usados para propagar plantas leñosas en vivero o casa de cultivo. Se obtienen las estacas de plantas con alto grado de madurez fisiológica, generalmente árboles de maderas duras, semiduras y suaves. Aunque las diferentes fases de maduración se presentan de manera continua, generalmente se distinguen por la forma y el color de las hojas y por los cambios de coloración del tallo o ramas.

El estaquillado se ha utilizado para el

establecimiento de plantas donadoras en diferentes especies forestales (cedro, caoba, majagua y teca) en la casa de cultivo con destino a la micropropagación y la macropropagación. Sin embargo, Acosta-Suárez *et al.* (2009) señalaron que cuando se realizó establecimiento *in vitro* a partir de plantas donadoras cultivadas mediante el estaquillado en casa de cultivo se logró mejorar la supervivencia de los explantes con menores índices de contaminación microbiana que cuando se utilizó material vegetal procedente directamente de campo. En este sentido, Pérez *et al.* (2000) enfatizaron en la necesidad de combinar estos métodos para incrementar la eficiencia del proceso de reproducción a gran escala de las plantas. La combinación de estas vías de multiplicación y del corte de esquejes mediante podas sucesivas permitió alcanzar mayor eficiencia y mejor respuesta de las plantas tanto para el cultivo *in vitro* como la plantación en campo de las plantas regeneradas (Jiménez-Terry *et al.*, 2007).

La empresa Maderas Preciosas de Costa Rica logró a finales de los años 90, del siglo pasado, desarrollar su programa clonal con *Tectona grandis* L. en el Pacífico seco. Sin embargo, se inicia la reforestación comercial clonal en bloques monoclonales, tal y como se concibe internacionalmente. Gran cantidad de aportes sobre adaptación de técnicas de propagación vegetativa se suceden en las universidades costarricenses. La mayor parte de esta experiencia se condensa en los trabajos de Mesén *et al.* (1992), Núñez (1997) y Mesén y Trejos (1998), que culminaron con una propuesta de manual de 'Enraizamiento de estacas juveniles de especies forestales: uso de propagadores de sub-irrigación'.

#### *Corte de esquejes*

Los esquejes son segmentos de tallos o ramas de las plantas que potencialmente tienen la capacidad de enraizar y crecer para dar lugar a una planta. Este método permite la propagación vegetativa de las plantas mediante segmentos de brotes jóvenes de plantas madre que generalmente se mantienen en viveros durante un proceso denominado revigorización. Es muy usado para propagar plantas leñosas en casa de

cultivo a partir de estacas previamente revigorizadas a través de podas sucesivas (Jiménez-Terry *et al.*, 2007).

Según Badilla *et al.* (2000) de acuerdo con las características de madurez de las ramas de donde se obtienen los brotes o material vegetal para la macropropagación, los esquejes se han dividido en: leñosos o duros, semileñosos y suaves. Las técnicas de propagación de árboles por medio de esquejes o ramas se dividen en dos tipos básicos: de segmentos foliados y de segmentos defoliados. Cada uno de éstos utiliza esquejes con un grado de maduración diferente, y como proceden de árboles de contrastante ciclo fenológico, esta diferencia se relaciona con la acumulación de reservas en los tejidos del tallo.

Los pasos y criterios que se deben considerar para realizar el método corte de esquejes son:

1. seleccionar donantes vigorosos y sanos con alta cantidad de reservas alimenticias en campo, preferentemente de un banco de plantas donantes,
2. elegir los segmentos apicales y centrales de las ramas, que son los que tienen mayores contenidos endógenos de auxinas activable para el enraizamiento y crecimiento,
3. la longitud de los segmentos debe oscilar entre 3 y 5 cm de largo, el criterio adecuado para elegirlo depende de la especie, ya que se requiere que se incluya por lo menos una sección de la zona donde se encuentra la yema axilar de las ramas (nudo); aunque lo recomendable es dos o tres. Sobre todo cuando los entrenudos son muy cortos,
4. el diámetro de las ramas en que se realizan los cortes puede ser de 0.2 a 0.4 cm,
5. el corte basal se hace justo debajo del nudo (sitio donde preferentemente se forman raíces adventicias) y el corte superior se realiza de 1.0 a 1.5 cm arriba del otro nudo,
6. empaquetar los esquejes cuidando su orientación, para mantener su polaridad y permitir que el flujo de savia siga su dirección normal,
7. las sustancias más usadas para acelerar el enraizamiento de estos forestales son el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido indolbutírico (IBA), y
8. para la siembra se elige un sustrato compuesto por un material orgánico,

preferiblemente humus de lombriz 85% y otro inorgánico (zeolita 15%) con el objetivo de obtener las características químicas y físicas apropiadas para el desarrollo de estos materiales vegetales de propagación.

Los cortes de esquejes se seleccionan en la estación de crecimiento de las plantas donantes, antes de que se presente la lignificación, y son tomados de los renuevos tempranos o de ramas jóvenes. Esto significa que las ramas se encuentran en crecimiento activo, por lo que en su acopio y manipulación se deben tener cuidados especiales. La clave para el éxito es mantener los cortes turgentes, desde el periodo de colecta hasta que son puestos a enraizar en dispositivos diseñados especialmente para que las estacas mantengan esa turgencia.

Las plantas donantes deben ser vigorosas, sanas y estar sujetas a un buen manejo para asegurar la producción continua y prolongada de gran número de esquejes de fácil enraizamiento. Se pueden cosechar brotes o esquejes de una misma planta donante de manera frecuente, siempre que se realicen fertilizaciones completas de las plantas donantes para no afectar las reservas alimenticias de la planta y su sistema radicular (Dickman y Pregitzer, 1992).

De acuerdo con la especie que se propague será necesario renovar la planta donante cuando el coeficiente de multiplicación de esquejes por planta disminuya durante dos ciclos consecutivos o si la calidad de los esquejes es menor siempre que se efectúen las labores apropiadas de fertilización, riego y regulación de la iluminación. La disminución del coeficiente de multiplicación es un indicador de la disminución de la capacidad de regeneración de brotes nuevos por la planta (Schestibratov *et al.*, 2003).

La planta donante debe mantener por lo menos una rama con hojas que pueda continuar haciendo fotosíntesis. También debe mantenerse en la sombra, al menos por unas semanas, lo cual favorecerá el futuro enraizamiento de las esquejes, ya que en esta situación la planta no padece estrés hídrico (Martínez *et al.*, 1994; Rocha y Niella, 2001).

#### **COMBINACIÓN DEL CULTIVO *IN VITRO* Y**

#### **EL CORTE DE ESQUEJES**

El desarrollo sostenible es un movimiento concebido por la humanidad para enfrentar los retos del nuevo milenio (York, 1988; Pretty, 1996). En la agricultura cubana se lleva a cabo una constante búsqueda de mecanismos sustentables y económicamente viables que permitan una mayor eficiencia sin que se incurra en el deterioro del medio ambiente y se evalúan las condiciones para alcanzarla.

Las vías para lograr la sostenibilidad causan gran impacto en los cultivos que requieren de tecnologías de propagación modernas basadas en el cultivo *in vitro*. Los forestales eucalipto y majagua son dos de estas especies, las cuales se caracterizan por una extraordinaria capacidad de adaptación a condiciones muy diversas de suelos. Son reconocidas por su alta productividad y valor de uso, este último dado por su producción de masa fresca verde y por sus aplicaciones en la agricultura, particularmente valiosas debido a sus numerosas ramificaciones que son demandadas por el cultivo del tabaco y la producción de carbón vegetal. Estas especies han requerido del cultivo *in vitro* para la producción de posturas de alta calidad genética y fitosanitaria, pues sus semillas botánicas presentan alta grado de segregación y existen varios clones de rápido crecimiento con alta demanda de reproducción por la empresa forestal cubana (Delgado *et al.*, 2004; Álvarez A, *comunicación personal*).

El cultivo *in vitro* ha contribuido a la multiplicación intensiva de especies diversas con un significativo aporte al desarrollo agrario y forestal, sin embargo los gastos en la aplicación de esta tecnología son elevados y para minimizarlos se requiere la utilización de tecnologías apropiadas, por ejemplo de macropropagación, de bajo coste y sufragadas por la población (Rodríguez *et al.*, 2003). De esta forma, se puede contribuir a la disminución en la compra de insumos externos producidos por la industria (reactivos, gelificantes, equipos, material de laboratorio, etc.) y con ello se consigue un alto grado de sostenibilidad tecnológica.

En una población de plantas obtenidas por cultivo *in vitro* el empleo de métodos de macropropagación puede contribuir a

incrementar el número de individuos que se desea propagar y hacer sostenible la producción en cuanto a recursos necesarios corresponde. En este sentido, Jiménez-Terry *et al.* (2007) destacaron el uso del corte de esquejes en casa de cultivo como método de propagación vegetativa y lograron resultados satisfactorios en cuanto a los altos coeficientes de multiplicación de especies forestales. Además, describieron la utilización de los injertos y propagación mediante tocones o toconcillos en algunas especies cuando los volúmenes de plantas que se desean multiplicar son bajos.

### Eucalipto

La empresa brasileña Aracruz Forestal alcanzó resultados relevantes en la macropropagación de eucalipto. Estos estuvieron determinados por la utilización de híbridos interespecíficos en áreas con condiciones abióticas propias de la zona de transición entre las especies parentales. Los árboles propagados por estos métodos elevaron su rendimiento desde 33 m<sup>3</sup>/ha/año como promedio a poco más de 70 m<sup>3</sup>/ha/año. Estos logros influyeron definitivamente en la concepción de una nueva silvicultura comercial, que ha impulsado el desarrollo de numerosas técnicas de micropropagación (Eldridge *et al.*, 1994).

De otra parte, IBP (2008) señalan que lograron resultados satisfactorios en la respuesta al crecimiento de plantas de eucalipto propagadas mediante corte de esquejes en casa de cultivo. Estos autores, refirieron que con esta técnica disminuyeron cuantitativamente los costos de producción de posturas de eucalipto y las plantas alcanzaron mayor ritmo de crecimiento que las plantas de semillas en una plantación hasta los seis meses de cultivo. Además, consideraron que el corte de esquejes permitió la sostenibilidad de los métodos de cultivo *in vitro* durante cuatro años consecutivos de propagación de la especie para un programa territorial de reforestación (Tabla 1). Los valores del costo unitario de la combinación del cultivo *in vitro* y macropropagación por corte de esquejes en casa de cultivo constituyen elementos indicadores de la eficiencia de estos métodos como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales.

En la tabla anterior se muestra la altura

promedio de las plantas de eucalipto a los 6 meses de cultivo. La observación de esta variable solo constituye un elemento comparativo de la respuesta inicial del crecimiento de las plantas de esta especie propagadas por estos métodos y expresados en valores que no muestran diferencias significativas entre ellos pero sí con las semillas. Sobre ello, resulta importante resaltar que aunque el objetivo fundamental del tratamiento y manejo de las plantas en vivero o instalaciones funcionalmente similares es preparar a la planta para enfrentar exitosamente el estrés abiótico generado por su trasplante a condiciones de campo, incluye en primera instancia la supervivencia. Por ello, la ventaja comparativa del empleo de métodos diferentes de propagación y adaptación de las plantas es preciso evaluarla en condiciones de campo y durante el período de tiempo en que tales resultados se manifiestan, porque una vez transcurrido ese período, los efectos registrados pueden estar definidos por factores ajenos a los de la etapa de vivero. En tal sentido y siempre que la planta logre mantenerse con vida en condiciones de campo, el indicador más apropiado para evaluar los efectos del aviveramiento es el tiempo que requiere para reiniciar el crecimiento apical, el cual en la mayoría de las especies se detiene luego del trasplante, en aras de concentrar el máximo de los recursos disponibles en garantizar la supervivencia. Sin embargo, una vez que el crecimiento se reinicia, ello es una evidencia de que el estrés del trasplante ha sido superado y entonces, otros factores ajenos al vivero comienzan a interactuar con la planta (Mercadet, 2007; Álvarez, 2012).

Los resultados en la micropropagación del eucalipto han sido combinados con la macropropagación por corte de esquejes en casa de cultivo para incrementar el volumen total de plantas a entregar en los programas de reforestación con una disminución cuantitativa de los costos y gastos de reactivos. Sobre estas particularidades del uso del corte de esquejes en eucalipto durante varios ciclos de multiplicación hicieron referencia en el programa de reforestación cubano lo que indicó términos de sostenibilidad económica, además de la calidad de las plantas que se lograron por esta vía. Asimismo señalaron que los clones élites de eucalipto propagados se podrían utilizar en la industria para la producción de papeles finos y en la elaboración de carbón vegetal.

Por otra parte, Castillo *et al.* (2005) señalaron

el uso de macropropagación en la Empresa Forestal Integral Guanahacabibes desde hace años. En este sentido, especialistas forestales efectuaron la multiplicación de eucaliptos en un vivero especialmente dedicado a la propagación por estacas y utilizaron como envases tubetes plásticos.

### Majagua

En esta especie se han utilizado con éxito el corte de esquejes para la propagación de individuos seleccionados de forma masal en una población de Baracoa, Cuba, los cuales presentaron un ritmo de crecimiento y rendimiento en madera superior al resto. Inicialmente se clonaron estos individuos mediante estacas e injertos y se utilizaron las plantas como donantes en un programa nacional de reforestación de esta especie maderable. Posteriormente se han continuado estudiando en campo las poblaciones obtenidas tanto por cultivo *in vitro* como por corte de esquejes en casa de cultivo (Mesén *et al.*, 1992). Al igual que lo referido para la propagación del eucalipto, este método fue eficiente en la multiplicación de la majagua.

### Cedro, caoba y teca

Según refirió IBP (2008), el corte de esquejes constituyó una alternativa sostenible para la propagación masiva del cedro. En el mismo se mencionó que fue necesario realizar el corte de esquejes en la casa de cultivo a partir de plantas obtenidas por cultivo *in vitro* con el objetivo de incrementar los volúmenes de plantas. Para estimular la brotación de las yemas

axilares se realizó la poda de las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* y se colectaron esquejes con estado fisiológico semileñoso a los 45 días del ciclo vegetativo de las plantas en la casa de cultivo. Los esquejes con dimensiones de 2-4 mm de diámetro del tallo y 3.5 cm de longitud se plantaron en un sustrato compuesto por una mezcla de humus de lombriz 85% y zeolita 15%. Se aplicaron sustancias estimuladoras del enraizamiento, brotación y crecimiento. Los esquejes colectados permitieron obtener nuevos individuos con calidad y de rápido crecimiento en la casas de cultivo. Las podas sucesivas incrementaron el número de brotes axilares emitidos por las plantas donantes.

Asimismo, el uso del corte de esquejes en casa de cultivo para establecer plantas donadoras incrementó la eficiencia en la propagación *in vitro* de diferentes especies de caobas (caoba africana, caoba cubana, caoba hondureña y caoba híbrida). Como resultado de la aplicación de esta técnica de propagación vegetativa disminuyó la contaminación microbiana, se incrementó la supervivencia y el crecimiento de los explantes en la fase de de establecimiento *in vitro* (Barbón, 2011).

En el caso de teca, las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* se lograron multiplicar con éxito en la casa de cultivo a través del corte de esquejes de yemas apicales de dos nudos con dimensiones de 3 a 3.5 cm y dos pares de hojas. Después del corte de esquejes apical de las plantas, estas emitieron nuevos rebrotes que se utilizaron con éxito en esta vía de propagación (IBP, 2008).

### Efecto de corte de esquejes sobre la

Tabla 1. Resultados de la disminución de los costos con la aplicación de macropropagación por corte de esquejes en el programa de reforestación en la Empresa de Papeles Finos de Jatibonico en la Provincia de Sancti Spiritus (IBP, 2008).

Método de propagación de plantas de eucalipto	Costo unitario (\$) durante cuatro años consecutivos 1999-2002	Altura de las plantas (m) a los seis meses de cultivo de la plantación
Plantas <i>in vitro</i>	0.126 b	6.4 a
Corte de esquejes	0.026 c	5.9 a
Combinación cultivo <i>in vitro</i> y corte esquejes en casa de cultivo	0.021 c	6.1 a
Semillas	0.894 a	3.1 b

Medias con letras no comunes en una misma fila difieren significativamente para  $P < 0.05$  según la prueba de Fisher.

### revigorización de las plantas donantes en la casa de cultivo

IBP (2008) refiere que se logró la revigorización y el rejuvenecimiento de las plantas donantes en la casa de cultivo cuando se realizaron podas sucesivas mediante el corte de esquejes. Describe que este método combina los elementos convencionales del estaquillado con los conceptos básicos del seccionado de los explantes, que se aplica en la organogénesis vía yemas axilares. En este sentido, señaló que los cortes de esquejes sucesivos a las plantas donantes provocan el crecimiento de brotes vigorosos, asimismo abordan este efecto característico del proceso de revigorización de las plantas donantes en la casa de cultivo y que con ello se incrementa el número de brotes por plantas y por ende el coeficiente de multiplicación en esta vía de propagación vegetativa de especies forestales.

Duarte (1984) señaló que los cortes que recibieron las plantas donantes en el campo condujeron a obtener un elevado coeficiente de multiplicación y sobre esto, explicó que a través de las podas sucesivas se detiene el efecto de dominancia apical en las plantas. Igualmente, Dickman y Pregitzer (1992) y Jenq *et al.* (1994) describieron que mediante el corte de esquejes a las plantas donantes en la casa de cultivo se produce una concentración de auxinas mayor en las zonas de crecimiento basal de las yemas axilares, lo que condiciona la brotación y crecimiento de las mismas ocasionado por el balance hormonal favorable para que ocurra este proceso.

Esta respuesta ha sido abordada también para las podas de rejuvenecimiento en campo en diferentes cultivos como una técnica para incrementar el rendimiento de los cultivos (Del Pozo *et al.*, 2005). Estos autores observaron que las plantas leñosas obtenidas mediante podas sucesivas a plantas donantes tuvieron mayor estabilidad en el crecimiento, la emisión de brotes y otros índices relacionados con el crecimiento y producción de materia seca.

### CONCLUSIONES

La técnica de corte de esquejes no se practica regularmente en Cuba para la multiplicación de especies forestales, pero los resultados de investigaciones científicas la colocan como una

alternativa viable en la propagación de plantas maderables. Su empleo constituye una forma sostenible de replicar clones de interés con disminución en los gastos de reactivos a la vez que se mantiene la calidad morfológica de las plantas. Por ello, debe considerarse la macropropagación como una estrategia sostenible de reproducción de especies maderables para complementar los novedosos métodos de cultivo *in vitro* en estas plantas y lograr resultados similares en la calidad de la semilla que se utiliza tradicionalmente en la plantación.

### AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo fue necesaria la colaboración prestada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, por su cooperación y contribución en el proyecto Propagación masiva de especies leñosas. En especial al Dr.C. Arnaldo F. Álvarez Brito, por su contribución a la culminación de esta reseña científica.

### REFERENCIAS

- Acosta-Suárez, M, Alvarado-Capó Y, Cruz-Martín M, Leiva-Mora M, Sánchez-García C, Roque B, Quiala E, Chávez M, Jiménez-Terry F, La O M, Barbón R, Collado R, Rodríguez M, De Feria M, Borroto I, Pérez M (2009) Micobiota de plantas donadoras y hongos filamentosos contaminantes del establecimiento *in vitro* de cinco especies forestales. Biotecnología vegetal 9(2): 99 – 103
- Ajete-Hernández, A, Álvarez A, Mercadet A (2009) Evaluación de impacto y estrategia para la empresa forestal integral Baracoa, Provincia Guantánamo, CUBA. Ra Ximhai 5(3): 271-279
- Álvarez, A (2000) La Genética Forestal en Cuba: Avances del siglo XX y desafíos del siglo XXI. Recursos genéticos forestales 27: 18-28
- Álvarez, A (2012) La biotecnología vegetal: ¿Una alternativa para el enfrentamiento a los impactos del cambio climático en Cuba? Biotecnología vegetal 12(4): 195 – 201
- Badilla, Y, Rodríguez L, Murillo O, Obando G (2000) Avances en la clonación de cebo, botarrama, pilón y almendro. Programa de mejoramiento y conservación genética de especies forestales. Reporte de Investigación No. 1. ITCR/FUNDECOR. Cartago
- Barbón, R (2011) Embriogénesis somática de *Swietenia mahoganii* (L. Jacq.) en medios de cultivo semisólidos. Revista Forestal Baracoa 30: 124
- Barner, H, Ditlevsen B, Olesen K (1988) The

- strategies and procedures for an integrated national tree seed programme. Danida Forest Seed Centre, Denmark. Lecture Note: 435-454
- Betancourt, A (1987) Silvicultura especial de árboles maderables tropicales. Editorial Científico – Técnica. La Habana. pp. 342-356
- Bisse, J (1981) Árboles de Cuba. Editorial Científico – Técnica. La Habana
- Bidwell, R (1979) Fisiología vegetal. Editor, S.A. México DF
- Bidwell, OW (1986) Where do we stand on sustainable agriculture? INTA. FAO. Boletín 32: 18-27
- Cantillo Ardebol, R, Igarza Castro J, Ochoa AM (2011) Propagación *in vitro* de plantas de *Pinus cubensis* Griseb. Biotecnología vegetal 11(1): 3 – 13
- Callizaya, R (2003) Injertación en *Swietenia macrophylla* King y *Cedrela odorata* L. mediante la utilización de dos técnicas, realizado en el «Jardín Botánico Lancetilla». Tela, Honduras. Tesis 631.53097283127 - C162 - 2003. Escuela Nacional de Ciencias Forestales (ESNACIFOR). Siguatepeque, Honduras. pp.104
- Capote, R, Berazaín R (1984) Clasificación de las formaciones vegetales de Cuba. Revista del Jardín Botánico Nacional 2: 27-77
- Castillo Martínez, I, Medina R, Pérez Meléndez JM, Medina M (2005) Efecto de diferentes regímenes de riego en la calidad de la planta de *Eucalyptus grandis* cultivada en viveros sobre tubetes en la provincia de Pinar del Río. EFI Guanahacabibes, Pinar del Río. CIGET 7(1): 8-12
- Castro, D, González J (2002) Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. Agricultura Técnica 62(1): 87-95
- Chávez, M, de Feria M (2012) Aspectos básicos de la propagación *in vitro* por organogénesis del género *Pinus*. Biotecnología vegetal 12(3): 131 – 142
- Chávez, M, de Feria M, Barbón R, Jiménez-Terry FA, La O M, Pérez M, Quiala E, Agramonte D (2010) Características morfológicas de plantas *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *caribaea* influenciadas por el empleo de la sacarosa en la fase de multiplicación. Biotecnología vegetal 10(1): 31 – 40
- Collado, R, Barbón R, Agramonte D, Jiménez-Terry FA, Pérez M, Gutiérrez O (2006) Embriogénesis somática directa en *Swietenia macrophylla* King. Biotecnología vegetal 6(2): 67 – 71
- Collado, R, Barbón R, Agramonte D, Jiménez-Terry F, Pérez M, Gutiérrez O (2005) Germinación de embriones somáticos de *Swietenia macrophylla* en medios de cultivo semisólidos. Biotecnología vegetal 5(1): 17 – 21
- Collado, R, Barbón R, Agramonte D, Jiménez-Terry FA, Pérez M, Gutiérrez O, Ramírez D (2004) Establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de *Swietenia macrophylla* King. Biotecnología vegetal 4(3): 143-146
- Croitoru, L (2007) Valuing the non-timber forest products in the Mediterranean region. Review Ecological economics 63: 768-775
- Daquinta, M, Lezcano Y, Cid M, Rodríguez R, Pina D, Escalona M (2003) Callogénesis en meliáceas exóticas (*Khaya nyasica* Stapf y *Toona ciliata*). Biotecnología vegetal 3(2): 123 – 125
- Daquinta, M, Cid M, Lezcano Y, Danilo P, Rodríguez R (2004) Formación de callos a partir de inflorescencias inmaduras en cedro y caoba híbrida. Biotecnología vegetal 4(2): 121 – 124
- Daquinta, M, Ramos L, Capote I, Lezcano Y, Rodríguez R, Escalona M (2002) Inducción de callos y regeneración de plantas en *Tectona grandis* L. Biotecnología vegetal 2(1): 15-19
- Daquinta, M, Ramos L, Lezcano Y, Rodríguez R, Escalona M (2000) Algunos elementos en la micropropagación de la teca. Biotecnología vegetal 1(1): 39-44
- David, A, Laine E, David E (1995) Somatic embryogenesis in woody plants. Journal of Soil and Water Conservation 41(5): 317-320
- de Feria, M, Chávez M, Barbón R, La O M, Pérez M, Jiménez-Terry F, Quiala E, Agramonte D (2008) Establecimiento *in vitro* de brotes apicales de *Pinus caribaea* var. *caribaea*. Biotecnología vegetal 8(1): 15-20
- de Feria, M, Chávez M, Barbón R, La O M, Pérez M, Jiménez-Terry FA, Quiala E, Agramonte D (2009) Multiplicación *in vitro* de plantas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*. Biotecnología vegetal 9(4): 217 - 224
- Del Pozo, JC, López-Mata MA, Ramírez-Parra E, Gutiérrez C (2005) Hormonal control of the plant cell cycle. Physiologia Plantarum 123: 173-183
- Delgado, LA, Trocones AG, Agramonte D, Jiménez-Terry FA, Pérez M, Gutiérrez O, Ramírez D (2004) Aclimatización de plantas de *Eucalyptus grandis* (Hill ex. Maiden) obtenidas a través del cultivo *in vitro*. Revista Forestal Baracoa 23 (2): 41-49
- Dickman, D, Pregitzer K (1992) The structure and

- dynamics of woody plant root systems. En: CP Mithchell, J B Ford-Robertson, T Hinckley, L Sennerby-Forsse (Eds.) Ecophysiology of Short Forest Crops, pp. 95-123. Elsevier Applied Sciences, London
- Duarte, O (1984) Propagación Sexual de las Plantas. Biblioteca Agropecuaria del Perú. Editores NETS 5. Lima
- Duryea, ML, McClain KM (1984) Altering seedling physiology to improve reforestation success. En: Duryea, M.L, GN Brown (Eds.). Seedling Physiology and Reforestation Manual Success I. Proceedings of the Physiology Working Group Technical Session, pp. 77-114 Martinus Nijhoff/DR W Junk Publishers. Oregon
- Earle, JC (2007) Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos en México. Maderas y Bosques 317: 503 – 507
- Eldridge, K, Davidson J, Harwood C, van Wyk G (1994) *Eucalyptus* domestication and Breeding. Oxford University Press Inc. New York
- Farjon, A (2003) The remaining diversity of conifers. Acta Horticulturae (ISHS) 615: 75-89
- Gil, V, Perez JN, Agramonte D, Muñoz A, Hernández R, Jiménez E, Pérez C, Rojas A (1992) Resultados preliminares de la propagación *in vitro* de *Hibiscus elatus* Sw. Centro Agrícola 19: 105-108
- Gupta, PK, Timmis RT, Timmis K, Grob J, Karlson W, Welty E (1999) Advance in conifers technique improvement through somatic embryogenesis. En: Kazuo Watanabe R, Komamine A (Eds) Chapter 29. Proceedings of the 12th Toyota Conference Challenge of Plant and agriculture Science to the crisis of biosphere on the earth in the 21th Century, pp. 33-39. RG Landes Co. Texas
- Hartmann, HT, Kester DE (1975) Plant Propagation. Principles and Practices. Prentice - Hall Inc. Englewood Cliffs. New Jersey. pp. 662
- Herrero, JA (2007) Fajas Forestales Hidrorreguladoras. Situación e importancia. Rev. Agricultura Orgánica 13(1): 40-42
- IBP (2008) Informe técnico final del proyecto: Propagación masiva de diferentes especies leñosas. Proyecto PNCIT-300228. pp.148
- Jenq Chuan Y, JengDer C, ZennZong C, Yang JC, Chung JD, Cheng ZZ (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
- Jiménez-Terry FA, Barbón R, La O M, Pérez M, Collado R, Acosta-Suárez M, Alvarado-Capó Y, Agramonte D (2007) Efecto de la revigorización en el establecimiento *in vitro* de ápices y segmentos nodales de *Cedrela odorata* L. Biotecnología vegetal 7(1): 45 – 51
- Jones, NB, Van Staden J (1997) Micropropagation of *Eucalyptus*. Biotechnology in agriculture and forestry. En YPS. Bajaj (Ed.). High-tech and micropropagation. 39: 286-330. Springer Verlag, Berlin
- Klimaszewska, K, Trontin JF, Becwar MR, Devillard C, Park YS, Lelu MA (2007) Recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. Tree and Forestry Science and Biotechnology 1: 11-25
- Labaut, RM, Almaguer Y, Arcia T, Veliz R, García C (2001) Plantas autóctonas del Jardín Botánico Cupaynicú. Revista Electrónica Granma Ciencia 5(2): 1-31
- Luján, C (2003) Forestería comunitaria: Una acción de base para el desarrollo forestal sustentable en México. Revista Relaciones 24(94): 267 – 283
- Martínez C, Harry I, Thorpe T (1994) Effect of various bud induction treatments on elongation and rooting of Canary Island Pine (*Pinus canariensis*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 39: 225-230
- Mascarenhas, AF, Muralidharan, EM (1993) Clonal forestry with tropical hardwoods. Capítulo 10. En: Ahuja y Libby (Eds.) Clonal Forestry II. Conservation and Application, pp.169 - 176. Springer-Verlag, Berlín
- Maruyama, E, K Ishii (1997) Tissue culture studies on big-leaf mahogany *Swietenia macrophylla*. Proc. Int. Workshop BIO-REFOR, Australia
- Mercadet A, Marquetti JR, Álvarez A, Pérez M, Echevarría P, Hidalgo E, Ortiz O, Rodríguez E, Romeu P, Ávila B, Parada D, Yero L, Sotolongo P, Martínez E, Maresma H, González A, Hechavarría O, Hernández A, Paredes L (2001) Introducción de especies y procedencias en Cuba: Resultados de la investigación y proyecciones. Recursos Genéticos Forestales 29: 26 - 34. FAO, Roma, Italia
- Mercadet, A (2007) Cambio Climático: estudios de impacto y mitigación en el sector forestal cubano. Agricultura Orgánica, Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales (ACTAF) 13(1): 43-45
- Mesén F, Leakey RR, Newton A.C (1992) Hacia el desarrollo de técnicas de silvicultura clonal para el pequeño finquero. El Chasqui 28: 6 -18
- Metzger M, Rounsevell M, Acosta-Michlik L, Leemans R, Schrotter D (2006) The vulnerability of ecosystem services to land use change. Review

- Agriculture, Ecosystems and Environment 114(1): 69-85
- McComb JA, IJ Bennett (1986) *Eucalyptus* (*Eucalyptus* spp.). En: YPS Bajaj (Ed.). Biotechnology in agriculture and forestry 1(1): 340-362
- Monteuuis, O, Vallauri D, Poupard C, Hazard L, Yusof Y, Latip AW, García C, Chauvière M (1995) Propagation clonale de teck matures par bouturage horticole. Bois et Foret des Tropiques 243: 25-39
- Navarro, RM, Palacios G (2004) Efecto de la calidad de planta, el procedimiento de preparación y la fecha de plantación en la supervivencia de una repoblación de *Pinus pinea* L. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales 17: 199-204
- Negreros-Castillo, P, Snook L, Mize C (2003) Regenerating mahogany (*Swietenia mahoganii*) from seed in Quintana Roo, Mexico: the effects of sowing method and clearing treatment. Forest Ecology and Management 183: 351-362
- Pérez, JN, Suárez-Castellá M, Orellana P (2000) Posibilidades y potencial de la propagación masiva de plantas en Cuba. Biotecnología vegetal 1(1): 3-12
- Pretty, JN (1996) Sustainable Agriculture. Increasing Food Production and Food Security. Appropriate Technology 23(2): 9 – 11
- Quijala, E, Cañal MJ, Meijón M, Rodríguez R, Chávez M, Valledor L, de Fera M, Barbón R (2012) Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 109(2): 223 – 234
- Ramírez D, Agramonte D, Gutiérrez O, Barbón R, Pérez M, Collado R, Jiménez-Terry FA (2003) Propagación *in vitro* de explantes de teca obtenidos a partir de semillas. Biotecnología Vegetal 3(3): 161-167
- Rocha P, Niella F (2001) Research and development of vegetative propagation techniques for *Pinus* sp. in the Northeast region of Argentina. En: Jeffrey F D (Ed.) Proceedings of the 26th. Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference. June 26-29, 2001, pp. 32-38. Dean-Georgia University. Athens
- Rodríguez, R, Daquinta M, Capote I, Pina D, Lescano Y, González-Olmedo J (2003) Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahoganii* (Caoba híbrida) y *Cedrela odorata* (cedro). Cultivos Tropicales 24: 23-27
- Schestibratov, K, Mikhailov R, Dolgov S (2003) Plantlet regeneration from subculturable nodular callus of *Pinus radiata* Don. Plant Cell Tissue and Organ Culture 72(2): 139-146
- Trocones, AG, Delgado L, Agramonte D, Pérez M, Gutiérrez O, Jiménez-Terry F (2005) Establecimiento *in vitro* de brotes axialres de *Hibiscus elatus*. Revista Forestal Baracoa 23(2): 50 – 62
- York, ET (1988) Improving sustainability with agricultural research. Environment 30(9): 68 – 82

Recibido: 9-10-2012

Aceptado: 23-11-2012