

Utilización de brotes epicórmicos para la propagación clonal *in vitro* de *Eucalyptus saligna*

Maurilio R. García López*, Rogelio Sotolongo Sospedra*, Sergio González Suarez**y Ana L. Noda Jimenez*

*Laboratorio de Biotecnología de las Plantas, Universidad de Pinar del Río

**Facultad de Biología, Universidad de La Habana

RESUMEN

Brotes epicórmicos de *Eucalyptus saligna* se asperjaron cada 48 horas con una solución de oxiclورو de cobre y ridomil 1 g/L, a razón de 5 mL por brote y se redujeron a segmentos nodales de aproximadamente 15 mm de longitud, que fueron desinfectados con soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) 3,53 % de cloro activo, en concentraciones de 5, 10 y 20 % v/v durante 10 minutos constituyendo los diferentes tratamientos. A continuación los segmentos nodales se inocularon en medios de cultivo MS, líquido que contenía kanamicina 100 mg/L, donde permanecieron siete días. Después, los explantes sanos se transfirieron para un medio de multiplicación MS sólido con diferentes tratamientos hormonales, en los que se combinó kinetina (Kin) o 6-bencilaminopurina (BAP) con ácido naftalenacético (ANA). A los 35 días se evaluó el número de brotes/explante y la longitud promedio de los mismos. La Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (KW) aplicada arrojó que existían diferencias significativas entre los tratamientos y la Prueba de Student-Newman Keuls (SNK) demostró que el tratamiento que contenía Kin 0,5 mg/L indujo el mayor número de brotes/explante y el que contenía Kin 0,75 mg/L + ANA 0,25 mg/L produjo los brotes más largos. Los brotes que medían de 15 a 20 mm se transfirieron para un medio MS líquido para su enraizamiento, con las sales reducidas a la mitad de su concentración y las auxinas: ANA, AIB (ácido indolbutírico) o AIA (ácido indolacético) en la concentración de 1 mg/L. Los mejores resultados se obtuvieron al cultivar los brotes en el medio suplementado con AIB.

Palabras clave: *Eucalyptus saligna*, propagación clonal, micropropagación, brotes epicórmicos, cultivo de tejidos

ABSTRACT

Epicormic shoots of *Eucalyptus saligna* were sprayed every 48 hour with a solution of cupric oxychloride and ridomil, 1 g/L, applying 5 mL for each shoot. They were reduced to a nodal segment of approximately 15 mm of length, and they were disinfected with a solution of sodium hypochlorite with 3,53 % of active chlorine, in concentrations of 5, 10 and 20 % v/v during 10 minutes according with the different treatment. Afterward, the nodal segments were inoculated in a liquid culture medium MS, with kanamicin 100 mg/L, where they were for seven days then the health explants were transferred to a solid multiplication medium MS with different treatments of hormones, where were combined with kinetin (Kin) or 6-benzilaminopurine (BAP) with naftalenacetic acid (NAA). After 35 days were analyzed the quantity of shoots/explant and its rate length. The Kruskal-Wallis (KW) non parametric Test applied showed the existence of significant differences between the treatments, and also the Student-Newman Keuls (SNK) Test showed that the treatment that contains Kin 0,5 mg/L were arised the major quantity of shoots/explant and in the one that contain Kin 0,75 mg/L + NAA 0,25 mg/L were arised the larger shoots. The shoots of length between 15 and 20 mm were transferred to a ½ MS liquid medium supplemented with the auxins: NAA, indolbutiric acid (IBA) or indolacetic acid (IAA) 1 mg/L. The best results were obtained when the shoots were cultivated in those medium with IBA.

Key words: *Eucalyptus saligna*, clonal propagation, micropropagation, epicormic shoots, tissue culture

INTRODUCCIÓN

El género *Eucalyptus* ha cobrado, en los últimos años, una singular trascendencia en la implantación de montes forestales, ocupando un lugar preferencial en la silvicultura de los países templado-cálidos y tropicales del mundo. Es el género que en Sudamérica, ha adquirido mayor importancia entre las plantas cultivadas, por el gran número de especies, que alcanzan a más de 60, con numerosas variedades, que comprenden toda una gama de valiosos árboles ornamentales, forestales medicinales, etc., cuyo cultivo relativamente reciente, ha superado en importancia al de otros grupos forestales como coníferas, salicáceas y fagáceas (Mangieri & Dimitri, 1961).

Las especies de *Eucalyptus* pueden ser propagadas sexualmente por semillas o asexualmente por clonación. La propagación vegetativa se ha aplicado a varias especies para incrementar la productividad y resolver problemas con

la semilla o de la producción (Zobel, 1993). La propagación vegetativa puede realizarse a través de varias técnicas entre las que se encuentra el cultivo de tejidos (Kijkar, 1995). Dentro de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, la micropropagación ha sido la más difundida y con aplicaciones prácticas comprobadas. A pesar de ser una técnica recientemente aplicada a la rama forestal, esta se ha insertado en los programas de mejoramiento que la mayoría de las veces, pretende una elevación del mantenimiento del valor genético de clones a ser propagados, permitiendo así adelantarse a los métodos convencionales de propagación vegetativa, entre otras finalidades (Aloísio & Comerio, 1997).

Para establecer con éxito un sistema de micropropagación que utilice árboles adultos selectos como fuente de explantes, es necesario garantizar un buen control fitosanitario de los mismos (Leifert & al., 1997). El empleo

de brotes epicórmicos facilita ese control y además proporciona material vegetal rejuvenecido, útil para establecer el cultivo aséptico (Major & al., 1995).

Este trabajo tiene como objetivo establecer una secuencia eficiente que permita utilizar los brotes epicórmicos como fuente de explantes para propagar clones seleccionados de *Eucalyptus saligna* y su posterior multiplicación y enraizamiento *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento del cultivo aséptico.

Se tomaron ramas de 3 – 5 cm de diámetro de árboles jóvenes de un clon seleccionado de *Eucalyptus saligna*, las que se cortaron en segmentos de aproximadamente 40 cm de longitud y se colocaron en recipientes con agua con el fin de estimular el desarrollo de las yemas. Estas estacas se asperjaron con una solución de oxiclورو de cobre y ridomil 1 g/L, cada 48 horas, a razón de 10 mL por estaca, con el fin de contrarrestar la infección superficial fúngica. La aspersión se realizó hasta que aparecieron los primeros brotes, momento en que se interrumpió la misma y se reinició cuando los brotes alcanzaron 2 cm de longitud aproximadamente, aplicando entonces la solución de fungicida a razón de 5 mL por brote en igual intervalo de tiempo que para las estacas.

Los brotes emitidos de hasta 5 cm de largo se seccionaron en segmentos nodales de aproximadamente 15 mm de longitud, con una o dos yemas axilares y las hojas se cortaron dejando solamente 1/3 de su tamaño.

Los segmentos nodales así obtenidos se desinfectaron en soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3,53 % de cloro activo, en concentraciones de 5, 10 y 20 % v/v durante 10 minutos, según cada tratamiento. A continuación se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se inocularon en un medio de cultivo líquido, compuesto por las sales del MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con sacarosa 20 g/L, caseína hidrolizada 250 mg/L, vitaminas de Gamborg (Gamborg, 1984) 25 mg/L, kanamicina 100 mg/L, carbón activado 1 g/L y el pH ajustado a 5,7. Todo el proceso de desinfección e inoculación se efectuó bajo campana de flujo laminar.

Los tubos de cultivo que contenían el medio nutritivo y los segmentos nodales inoculados en ellos se colocaron en la cámara de crecimiento, a la oscuridad y a una temperatura que osciló entre 22 °C y 27 °C.

La evaluación del establecimiento se realizó a los siete días posteriores a la inoculación y se tuvieron en cuenta los porcentajes de microestacas sanas, quemadas por el desinfectante y contaminadas.

Multiplicación de segmentos nodales.

Los explantes sanos se transfirieron para un medio nutritivo MS que contenía además: sacarosa 30 g/L, caseína hidrolizada 250 mg/L, vitaminas de Gamborg (Gamborg, 1984) y distintas concentraciones de kinetina (Kin), 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA), reguladores del crecimiento que fueron utilizados con éxito por García (1999) para multiplicar segmentos nodales provenientes de plantas asépticas de la misma especie, (Tabla I). El pH se ajustó a 5,7 y se solidificó con agar tipo E. Se inocularon 15 explantes en cada tratamiento.

TABLA I

Combinaciones hormonales empleadas para la multiplicación de segmentos nodales, provenientes de brotes epicórmicos.

Tratamientos	Hormonas (mg/L)		
	Kin	ANA	BAP
M ₁	0	1,0	1,0
M ₂	0,50	0	0
M ₃	0,75	0,25	0
M ₄	0,75	0,50	0

A los 35 días se evaluó el número de brotes emitidos por segmento nodal y la longitud promedio de los mismos.

Enraizamiento de los brotes.

Los brotes que medían de 15 a 20 mm se separaron del segmento nodal y se transfirieron para un medio líquido que contenía las sales del medio MS reducidas a la mitad de su concentración, sacarosa 15 g/L, las vitaminas de Gamborg (Gamborg, 1984), las auxinas: ANA, AIA o AIB 1,0 mg/L, según el tratamiento por ser las más utilizadas para inducir el enraizamiento en numerosas especies (Orellana, 1998). Se inocularon 60 brotes por cada tratamiento.

A los 30 días se evaluó el porcentaje de brotes enraizados y de éstos se seleccionaron 15 al azar a los cuales se les evaluó el número de raíces/brote y la longitud de la raíz mayor.

Análisis biométricos:

Los datos obtenidos de la multiplicación de los segmentos nodales, el número de raíces/brote y la longitud de la raíz mayor se analizaron mediante la Prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis (KW) y en los casos de diferencias significativas entre los tratamientos se realizó la comparación múltiple no paramétrica por la Prueba de Student – Newman Keuls (SNK) (Sigarroa, 1985). Los porcentajes de enraizamiento se compararon según la Prueba t para comparación de porcentajes (Sokal & Rohlf, 1969).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento del cultivo aséptico.

En la Tabla II se muestran los resultados de la desinfección y el establecimiento aséptico de microestacas provenientes de brotes epicórmicos. Como se puede apreciar los mayores porcentajes de supervivencia (explantes vivos) se obtuvieron cuando las concentraciones de la solución desinfectante eran de 5 y 10 % y el menor porcentaje para la concentración del 20 %, siendo ésta la que provocó el mayor porcentaje de explantes necrosados producto de la acción del desinfectante.

En cuanto a la contaminación no se presentaron variaciones considerables entre los tres tratamientos, siendo en la concentración del 5 % de NaOCl donde se produjo el mayor porcentaje de explantes contaminados superficialmente por hongos.

Al respecto Le Roux & Van Staden (1991) y Lee & Jusaitis (2000) han planteado que la desinfección de explantes de campo ha presentado serias dificultades debido a la contaminación microbiana endógena. Por otro lado, tanto la edad del material como la estación del año son factores determinantes en el éxito del establecimiento de cultivos asépticos. Es virtualmente imposible desinfectar explantes de campo sin dañar severamente los tejidos. La mayoría de los procedimientos utilizados para la desinfección de explantes de campo consisten en un lavado ligero con agua corriente, seguido de la aplicación de soluciones de NaOCl en concentraciones del 1 al 10 % durante 10–30 minutos (Leifert & al., 1997).

El aumento en la concentración del desinfectante redujo la tasa de contaminación pero provocó la pérdida de la mayoría de los explantes por necrosis de los tejidos, lo que demuestra el efecto negativo del desinfectante sobre el material vegetal.

El tiempo de exposición de los explantes al desinfectante es otro factor que debe tenerse en cuenta pues cuando se aumenta la concentración del producto activo en la solución desinfectante el tiempo de exposición debe disminuirse y viceversa (Villalobos & Thorpe, 1991).

Para la desinfección de segmentos nodales de *Didymopanax morototoni*, Mantovani (1997) empleó NaOCl durante 15 y 20 minutos logrando las menores tasas de contaminación, pero se produjo la necrosis de los tejidos. Resultados similares obtuvieron Camargo & Pasqual (1995) cuando desinfectaron explantes de *Bertholetia excelsa*.

Jiménez (1998) plantea que las plantas donantes deben mantenerse libres de enfermedades y plagas con estrictos métodos de control químico y biológico. Recomienda que es conveniente realizar aplicaciones de fungicidas, antibióticos e insecticidas a estas plantas. El uso de antibióticos en el medio de cultivo durante la fase de establecimiento es frecuente, aunque no siempre surte el efecto deseado.

El uso de kanamicina en el medio de establecimiento evitó la aparición de contaminación por bacterias y no se observó ningún efecto negativo sobre el ulterior desarrollo de los brotes.

La utilización de brotes epicórmicos permitió realizar una buena desinfección del donante, así como poder contar con una fuente de material vegetal rejuvenecido que resulta muy eficiente para el establecimiento del cultivo *in vitro*, todo esto influyó positivamente en la baja tasa de contaminación alcanzada. Leifert & al. (1997) plantean que las condiciones fitosanitarias del donante determinan la eficacia del proceso de desinfección así como del cultivo *in vitro*.

Multiplicación de segmentos nodales.

Esta fase se evaluó teniendo en cuenta el número de brotes/explante y la longitud promedio de esos brotes. Ambos parámetros mostraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos, cuando se les aplicó la Prueba de KW a los resultados obtenidos, por lo que se realizó a continuación la Prueba SNK con el fin de detectar cuales eran los tratamientos que diferían entre sí.

Con respecto al número de brotes/explante la Prueba SNK arrojó que en el tratamiento M₂ (Kin 0,5 mg/L) se produjo el mayor número de brotes y que existían diferencias

TABLA II

Establecimiento aséptico de los explantes. Datos expresados en %.

Tratamientos	Tiempo de exposición	Explantes (%) n = 25		
		vivos	necrosados	contaminados
NaOCl al 5 %	10 minutos	92	0	8
NaOCl al 10 %		88	8	4
NaOCl al 20 %		44	52	4

significativas con el resto, siendo el tratamiento M₁ (BAP 1 mg/L + ANA 1 mg/L) el que produjo el menor número de brotes/explante (Fig. 1).

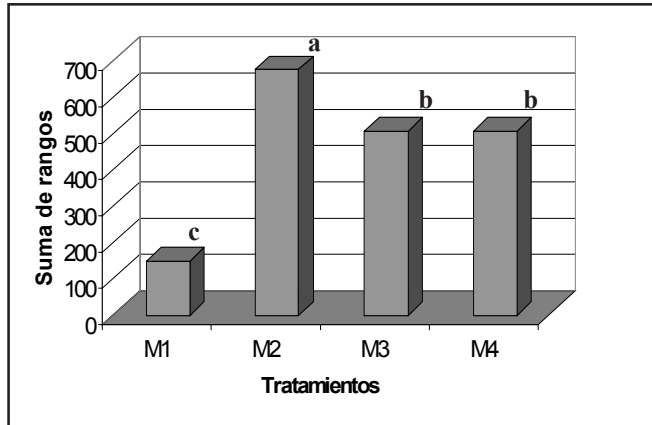


Fig. 1. Número de brotes/explante en los diferentes tratamientos (H = 32,325; ***, n = 15). Letras iguales no difieren entre sí.

Para la longitud promedio de los brotes, el tratamiento que produjo los brotes más largos fue el M₃ (Kin 0,75 mg/L + ANA 0,25 mg/L) y los más cortos el tratamiento M₂ (Kin 0,50 mg/L) (Fig. 2.).

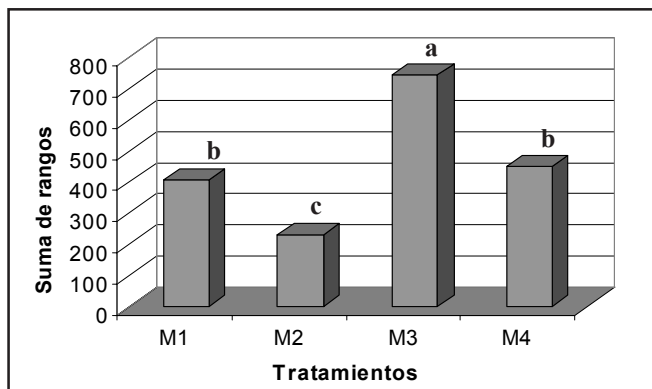


Fig. 2. Longitud promedio de los brotes en los diferentes tratamientos (H = 30,213, ***, n = 15) Letras iguales no difieren entre sí.

El tratamiento M₃ indujo un número de brotes considerable y, además, los brotes más largos que poseían varias yemas axilares, útiles para continuar el proceso de multiplicación en un segundo subcultivo o para transferirlos directamente a un medio de enraizamiento sin necesidad de emplear una fase intermedia de alargamiento dada como imprescindible por algunos autores (Lakshmi & Shobha, 1985; Lainé & David, 1994 y Jenq – Chuan & al., 1995) en otras especies de *Eucalyptus*.

Enraizamiento de los brotes.

En todos los tratamientos se logró la inducción de raíces, aunque los resultados varían de acuerdo con la auxina empleada como se observa en la figura 3. La Prueba t para comparación de porcentajes demostró que existían

diferencias significativas entre los tratamientos, obteniéndose el valor más alto en el tratamiento que contenía AIB 1,0 mg/L y el valor más bajo para el que contenía AIA 1,0 mg/L.

Para el número de raíces/brote no se detectaron

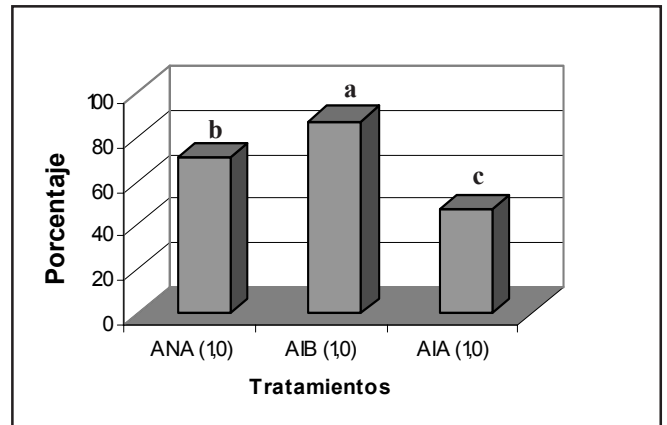


Fig. 3. Porcentaje de brotes enraizados en los diferentes tratamientos (EBE). Prueba t. Letras iguales no difieren entre sí.

diferencias significativas entre los tratamientos según la Prueba de KW aplicada (Fig. 4). Sin embargo, si se detectaron al analizar los resultados de la longitud de la raíz mayor, produciéndose las raíces más largas en el medio que poseía AIB 1,0 mg/L como auxina y las más cortas en el que contenía ANA 1,0 mg/L (Fig 5).

El AIB es la auxina que más se emplea para estimular la producción de raíces en varias especies de *Eucalyptus*. En estos experimentos también el AIB mostró los mayores porcentajes de inducción, coincidiendo con Salisbury (1994), quien planteó que el hecho de que el AIB se prefiera para el enraizamiento sobre otras auxinas sintéticas se debe a que es un fuerte diferenciador.

Jenq – Chuan & al. (1995) lograron enraizar brotes del híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* en medios de cultivo que contenían ANA o AIB 0,1 a 10 mg/L. La formación de raíces fue óptima en el medio que contenía AIB 0,3 mg/L. Kapoor & Chauhan (1992) usaron para el enraizamiento de brotes del híbrido F₁ (*Eucalyptus torelliana* x *Eucalyptus citriodora*), dos medios que contenían 1/5 de la concentración de las sales del MS más AIB 0,1 mg/L y 1/2 de la concentración de las sales del MS más AIB 0,1 mg/L. En el primer caso obtuvieron un 95,83 % de enraizamiento y un 50 % en el segundo. Cuando utilizaron un medio con la mitad de la concentración de las sales del MS suplementado con AIB 1,0 mg/L se observaron callos basales en algunos brotes los cuales inhibían el desarrollo de las raíces.

Major & al. (1995) lograron la formación de los primordios radicales en un medio que contenía AIB 1,0 g/L durante 7

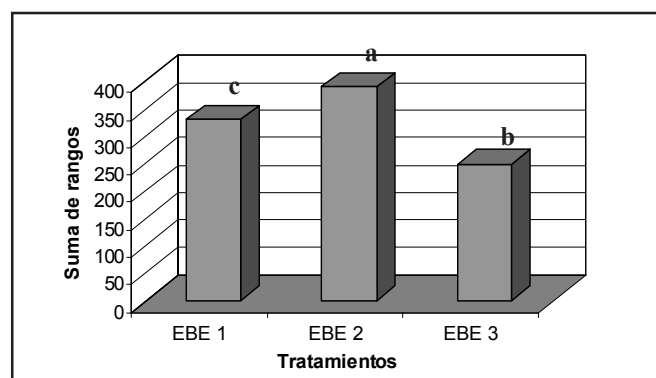


Fig. 4. Comportamiento del número de raíces/brote en los diferentes tratamientos, donde se emplearon las auxinas: ANA 1,0 mg/L; AIB 1,0 mg/L y AIA 1,0 mg/L. (H = 4,016; n. s.; n = 15). Letras iguales no difieren significativamente entre sí.

días al cabo de los cuales los transfirieron para un medio sin auxinas para favorecer la emisión de raíces adventicias.

Los porcentajes de enraizamiento obtenidos en este trabajo coinciden con lo logrado por otros autores, que en otras especies de *Eucalyptus* han obtenido hasta un 80 % de enraizamiento (Hartney, 1982; Kapoor & Chauhan, 1992; Rojas & al., 1993; Trindade & Pais, 1997; Lê & al., 2000). Los citados autores también han empleado las sales del medio MS reducidas a 1/2 o 1/5 de su concentración para enraizar brotes *in vitro*, lo que coincide con nuestros resultados, pues empleamos la mitad de la concentración de las sales del MS como medio de enraizamiento logrando altos porcentajes de inducción. Al respecto Hu & Wang (1983) recomiendan disminuir la concentración de las sales de los medios de cultivo para inducir un abundante enraizamiento, el procedimiento más empleado es la reducción de las sales a la mitad, ya que una mayor reducción provocaría el agotamiento temprano de las mismas, lo que frenaría el desarrollo de las plantas.

En los tratamientos aplicados no se produjo formación de callos basales en ningún caso.

En este trabajo se emplearon medios de cultivo líquidos con soporte de papel de filtro, lo que disminuye el costo del medio nutritivo y la raíz se daña menos al ser extraída del tubo y llevada a la bolsa para su aclimatación.

CONCLUSIONES

-Los brotes epicórmicos constituyen una fuente de explantes que proporciona material vegetal rejuvenecido y facilita su desinfección superficial previa al establecimiento del cultivo aséptico, para la propagación clonal *in vitro* de árboles seleccionados de *Eucalyptus saligna* Sm.

-Los segmentos nodales provenientes de brotes epicórmicos pueden ser multiplicados *in vitro* empleando para ello un medio MS sólido suplementado con la combinación hormonal: Kin 0,75 mg/L + ANA 0,25 mg/L.

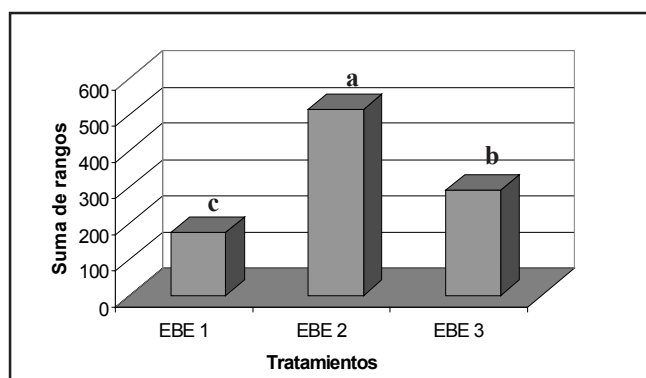


Fig. 5. Comportamiento de la longitud de la raíz mayor ante los tratamientos (EBE) con las auxinas: ANA 1,0 mg/L; AIB 1 mg/L y AIA 1,0 mg/L. (H = 25,293; ***, n = 15). Letras iguales no difieren significativamente entre sí.

-Para el enraizamiento de los brotes obtenidos de la multiplicación de segmentos nodales provenientes de brotes epicórmicos debe emplearse un medio MS líquido, con las sales reducidas a la mitad de su concentración y AIB 1,0 mg/L.

BIBLIOGRAFÍA

- Aloísio X & Comerio J. 1997. Enraizamiento *ex vitro* de gemas de *Eucalyptus* spp multiplicadas e alargadas *in vitro*. Scientia Forestalis, No. 59: 29 – 36.
- Camargo IP & Pasqual M. 1995. Micropropagación da castanheira-do-Brasil (*Bertholetia excelsa* Humb. & Bompl.) a partir de segmentos nodais. En: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal.
- Gamborg OL. 1984. Plant Cell Culture: Nutrition and media. In: Cell culture and somatic cell genetics of plant (Ed.) San Francisco. California, USA.
- García MR. 1999. Metodología para la propagación masiva *in vitro* de *Eucalyptus saligna* Sm. Tesis presentada en opción al título de Master en Ciencias. Biología Vegetal. La Habana, Cuba. 58 pp.
- Hartney VJ. 1982. Vegetative propagation of *Eucalyptus in vitro*. Colloque International sur la Culture *in vitro* des Essences Forestiers. IUFRO. Nangis. France. AFOCEL, p 175 – 179.
- Hu CV & Wang J. 1983. Meristem shoot tip and bud culture. In Handbook of Plant Cell. Evans, D. A.; P. V. Ammirato and Y. Yamada (Eds) p 256 – 290.
- Jenq – Chuan Y, Jeng – Der Ch & Zenn – Zong Ch. 1995. Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis x urophylla* and comparison of growth between micropropagated plantlets and rooted cuttings. Plant Cell Reports, 15: 170 – 173.
- Jimenez EE. 1998. Cultivo de ápices y meristemas. En: Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología. Pérez Ponce, J. N. (Ed.) Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba. 400 pp.
- Kapoor ML & Chauhan JMS. 1992. *In vitro* clonal Propagation of Mature *Eucalyptus* F₁ Hybrid (*E. torelliana* F. Muell x *E. citriodora* Hook). Silvae Genetica, 41, 6: 305 – 307.

- Kijkar S. 1995. *Eucalyptus* cloning in ASEAN. Review Paper No. 4, ASEAN Forest Tree Seed Centre Project. Muak-Lek, Saraburi, Thailand.
- ê CL, Thomas D, Tschuy F, Derron M, Gmür P, Moret JL & Baumann R. 2000. *In vitro* culture of *Anagallis tenella* (L.) Murray. Botanic Gardens Micropropagation News. Volume 2 (4): 54 – 57.
- Lee TCh & Jusaitis M. 2000. Micropropagation of *Haloragis eyreana* Orch. (*Haloragaceae*) using field material. Botanic Gardens Micropropagation News, Volume 2 (4): 50 – 51.
- Lainé, E. & David, A. 1994. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. Plant Cell Reports. 13: 473 – 476.
- Lakshmi Sita G & Shobha Rani B. 1985. *In vitro* propagation of *Eucalyptus grandis* L. by tissue culture. Plant Cell Reports, 4: 63 – 65.
- Leifert C, Ritchie JY & Waites WM. 1997. Contaminants of plant tissue and cell culture. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 7: 452 – 459.
- Le Roux JJ & Van Staden J. 1991. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* – a review. Tree Physiology 9: 435 – 477.
- Major G, Ross S, Krause M & Trujillo I. 1995. Micropropagación de árboles adultos de *Eucalyptus grandis* Maiden (Hill). Uruguay Forestal. No. 8: 16 – 17.
- Mangieri HR & Dimitri MJ. 1961. Los eucaliptos en la silvicultura. Ed. ACME. Buenos Aires. 226 pp.
- Mantovani NC. 1997. Estudo de regeneração *in vitro* de caixeta (*Didymopanax morototoni*). Dissertação de Mestrado.
- Murashige T & Skoog F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473 – 497.
- Orellana P. 1998. Propagación vía organogénesis. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez Ponce, J. N. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba.. 400 pp.
- Rojas A, Gil V, Pérez C & Darias ML. 1993. Resultados de la micropropagación *in vitro* del *Eucalyptus citriodora* Hook. Centro Agrícola. Año 20, 1: 73 – 75.
- Salisbury FB. 1994. Fisiología Vegetal. Wadsworth Inc.(Ed.) 4ta. edición 305 pp.
- Sigarroa A. 1985. Biometría y diseño experimental. Ed. Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. 793 pp.
- Sokal RR & Rohlf FJ. 1969. The Principles and Practices of Statistics in Biological Research. W. H. Freeman and Co. San Francisco. U.S.A. 776 pp.
- Trindade H & Pais MS. 1997. *In vitro* studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability. In vitro Cellular and Developmental Biology Plant. 33: 1, 1 – 5.
- Villalobos VMY & Thorpe TA. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca, W. M. Y L. A. Mroginski (Eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia. P 127 – 141.
- Zobel BJ. 1993. Clonal forestry in the *Eucalyptus*. In Clonal Forestry II, Conservation and Application. Ahuja, M. R., Libby, W. J. (Eds.) Springer – Verlag, Berlin.

Recibido: 12 de octubre del 2000.

Direcc. de los autores: *Laboratorio de Biotecnología de las Plantas. Universidad de Pinar del Río. MES. Carretera a San Juan y Martínez Km 5 “El Vizcaino” Pinar del Río 20300. Cuba. **Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de la Habana. Calle 25 # 455 e/ J e l Vedado. Plaza 10400. Ciudad de la Habana, Cuba.