

La desinfección de explantos de *Hippeastrum vittatum* como elemento determinante en su propagación a gran escala con fines comerciales en Cuba.

Marta Arteaga Amador, Esperanza Peña García, Dalia Pérez Montesino, Zoraida Torriente Campos y Chol Gyu Kang.

Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana.

RESUMEN

Se estudiaron distintos aspectos relacionados con la desinfección, establecimiento y diferenciación de fragmentos de escamas del bulbo en *Hippeastrum vittatum* var. *Equestre Red*, ornamental con potencial comercializable en Cuba. Se evaluó la efectividad de nueve esquemas de desinfección y siete medios de cultivo en escamas internas y externas. Se demuestra la importancia de la termoterapia en la desinfección, la utilización de escamas internas del bulbo como fuente de explanto y la combinación hormonal de ANA (1,0 mg/L) y BAP (10,0 mg/L) como suplemento al medio mineral (Peña, 1992), para la iniciación *in vitro* de *Hippeastrum* en oscuridad total y temperatura de 24 ± 2 °C. Se presentan y discuten los resultados.

Palabras clave: *Hippeastrum vittatum*, esquemas de desinfección, propagación *in vitro*

ABSTRACT

Different aspects related to disinfection, establishment and differentiation of scale fragments of *Hippeastrum vittatum* var. *Equestre Red*, with ornamental potential for commercialization in Cuba, were studied. Effectiveness of nine disinfection schemes and seven culture media were evaluated for culture initiation from internal and external bulb scales. The importance of thermal treatment as part of disinfection scheme, use of internal scales as explant source and the combination ANA (1,0 mg/L) and BAP (10,0 mg/L) as supplement to the mineral medium (Peña, 1992), for *in vitro* initiation of *Hippeastrum* in total darkness 24 ± 2 °C, is demonstrated.

Key words: *Hippeastrum vittatum*, disinfection schemes, *in vitro* propagation

INTRODUCCION

En el comercio de plantas ornamentales, la propagación acelerada *in vitro*, constituye una vía importante para satisfacer la demanda de especies y variedades cuya multiplicación en condiciones naturales es insuficiente, como es el caso de las bulbosas (Seabrook y col., 1976; Seabrook y Cumming, 1977; De Bruyn y col., 1992; Seabrook, 1987). Varios géneros dentro de *Amaryllidaceae* son explotados comercialmente por esta vía, en países como Inglaterra, Holanda, Canadá, Israel, Estados Unidos y Japón (Seabrook, 1987) y son innumerables los trabajos publicados a partir de la década del 70, en que se reporta la aplicación de biotecnologías a *Narcissus* L.; *Hippeastrum* Herb.; *Nerine* Herb.; *Harmanthus* L.; *Amaryllis* L. e *Hymenocallis* Salisb, entre otras (Hay y Syngé, 1973; Heywood, 1985). En Canadá por ejemplo, ya en 1976, se reportaba la producción de alrededor de 25 000 vitroplantas de *Narcissus* a partir de un bulbo en sólo seis meses (Seabrook y col., 1976).

Para la iniciación del cultivo aséptico se han utilizado diferentes fuentes de explantos (ovarios, escapos florales, tallos, base de hojas, platillos basales, escamas del bulbo, etc.) las que, en dependencia del cultivar seleccionado, responden con un determinado potencial regenerativo *in vitro* (Van Aarttrijk y Van der Line, 1986; Seabrook, 1987; De Bruyn y col., 1992; Peña, 1992; García y col., 1992).

El utilizar las escamas del bulbo como fuente proveedora de explantos, ofrece la ventaja de contar con la disponibilidad del bulbo durante todo el año, además de obtener una gran cantidad de fragmentos para llevar a cabo la iniciación del cultivo (entre 800-1000 explantos / bulbo). Sin embargo, la localización de esta estructura en una planta en crecimiento hace que, por lo general, el proceso de desinfección del tejido sea sumamente engorroso y con resultados poco alentadores (Margara, 1988); de hecho, esto se convierte en una limitante para la utilización del bulbo como fuente de explantos en la producción masiva *in vitro* de algunas bulbosas de valor comercial, fundamentalmente en países de clima tropical.

Si bien es cierto que la FASE 0 proporciona condiciones que garantizan, al menos, cierta esterilidad en los especímenes durante su desarrollo y soluciona en gran medida esta problemática, también es cierto que no siempre se cuenta con todas las condiciones para lograr los resultados esperados. Por ello, lograr un esquema de desinfección que garantice el máximo aprovechamiento del material vegetal, sin requerimientos especiales en el mantenimiento del banco de plantas, conlleva indiscutiblemente a una mayor factibilidad económica en países tropicales.

Varios trabajos realizados en la micropropagación de *Hippeastrum*, avalan a especies y variedades de este

género como ornamentales de gran demanda comercial, fundamentalmente por el particular atractivo de sus flores (Seabrook y Cumming, 1977; Mii et al., 1974; Pajersk y Ascher, 1977; Yanagawa y Sakanini, 1977; Graves et al., 1978). Sin embargo, en Cuba no existen estudios al respecto, a pesar de que el país cuenta con variedades adaptadas que sugieren un buen potencial para el comercio como en el caso del híbrido *Hippeastrum vittatum* var. *Equestre Red*.

Basados en los resultados alcanzados en *Hymenocallis ovata* Roem (Peña, 1992), el presente trabajo se planteó como objetivos el establecer el esquema de desinfección de las escamas del bulbo y obtener la iniciación *in vitro* en *Hippeastrum vittatum* var. *Equestre Red*, como requisito previo a la micropropagación con fines comerciales en condiciones diferentes a las reportadas (Mii et al, 1974; Graves et al, 1978).

MATERIALES Y METODOS.

Se seleccionaron plantas de *Hippeastrum vittatum* var. *Equestre Red*, sin síntomas de infección que crecen como ornamentales en áreas del Jardín Botánico Nacional. Estas se transplantaron y se mantuvieron durante un año en condiciones semicontroladas, a temperatura ambiental, riego diario por aspersión y luz natural filtrada al 70%.

Las plantas utilizadas como donadoras de explantos (nueve en total), se caracterizaron según: el número de

hojas y de raíces, el peso y el diámetro ecuatorial de los bulbos y el número de escamas. Sólo las escamas de la mitad inferior del bulbo conformaron los dos tipos de explantos probados: escamas inferiores externas (IE) y escamas inferiores internas (II)

Esquemas para la desinfección del tejido.

La elevada contaminación registrada con la aplicación de esquemas de desinfección útiles para la iniciación de otras variedades en pruebas preliminares, hizo necesaria la evaluación de nuevos procedimientos (Tabla I). En todos los casos los bulbos fueron previamente lavados, primero con abundante agua corriente, después con solución detergente y desinfectante (Clorhexidina + Metil ethil benzalconio) al 20% durante cinco min. y finalmente enjuagados con agua destilada dos o tres veces. (Fig. 1, A y B).

Las escamas externas e internas desinfectadas se cortaron en fragmentos rectangulares de 1,0 por 0,5 cms. y se inocularon separadamente y en posición horizontal, a razón de un explanto por tubo, sobre medio de cultivo sólido, conteniendo sólo agar (8,0 gr/L) y azúcar (30,0 gr/L). Se utilizó un sólo bulbo por variante y se inocularon 200 explantos para cada una de las variantes utilizadas. Transcurridos siete días, se evaluó la efectividad de los esquemas de desinfección aplicados mediante la determinación de la contaminación por hongos (CH) y bacterias (CB) así como la ocurrencia de muerte en el tejido, todas por observación visual.

TABLA I

Esquemas de desinfección aplicados a la iniciación *in vitro* de *Hippeastrum vittatum* a partir de las escamas internas (II) y externas (IE) del bulbo.

Variante	Esquemas de desinfección
1	- Separación de escamas en grupos: II e IE - Traslado al flujo laminar - Inmersión en Cloralex (6% cloro activo) al 10%, 10 min. - Lavado 3 veces con agua destilada estéril
2	- Separación de escamas en grupos: II e IE - Traslado al flujo laminar - Inmersión en alcohol al 70%, 2 seg. - Lavado simple con agua destilada estéril - Inmersión en Cloralex (6% cloro activo) al 10%, 10 min. - Lavado 3 veces con agua destilada estéril
3	- Separación de escamas en grupos: II e IE - Traslado al flujo laminar - Inmersión en alcohol al 70%, 2 seg. - Lavado simple con agua destilada estéril - Inmersión en Cloralex (6% cloro activo) al 10%, 10 min. - Lavado 3 veces con agua destilada estéril - En Cloralex (6% cloro activo) al 40%, 10 min. - Lavar 3 veces con agua destilada estéril, 10 min. cada vez

TABLA I

Esquemas de desinfección aplicados a la iniciación in vitro de *Hippeastrum vittatum* a partir de las escamas internas (II) y externas (IE) del bulbo. (Continuación)

Variante	Esquemas de desinfección
4	<ul style="list-style-type: none"> - Traslado al flujo laminar - Inmersión del bulbo en alcohol al 70%, 2 seg. - Lavado simple con agua destilada estéril - Separación de escamas en grupos: II e IE - Inmersión en Cloralex (6% cloro activo) al 10%, 10 min.
5	<ul style="list-style-type: none"> - Lavado 3 veces con agua destilada estéril, 10 min. cada vez - Separación de escamas en grupos: II e IE - Inmersión en solución detergente al 20%, 1 min. - Lavado 3 veces con agua destilada estéril - Inmersión en Cloralex (6% cloro activo) al 10%, 1 min. - Lavado simple vez con agua destilada estéril - Traslado al flujo laminar - Inmersión en alcohol al 70%, 1 seg. - Lavado 3 veces con agua destilada estéril - Inmersión en Cloralex (6% cloro activo) al 10%, 10 min.
6	<ul style="list-style-type: none"> - Lavado 3 veces con agua destilada estéril - Inmersión del bulbo entero en Cloralex (6% cloro activo) al 10%, 10 min. - Lavado 3 veces con agua destilada estéril - Inmersión del bulbo entero en Cloralex (6% cloro activo) al 10%, 10 min. - Traslado al flujo laminar - Lavado 3 veces con agua destilada estéril - Separación de escamas en grupos: II e IE - Inmersión en Cloralex (6% cloro activo) al 10%, 10 min. - Lavado 3 veces con agua destilada estéril
7	<ul style="list-style-type: none"> - Inmersión del bulbo en agua hirviendo, 10 min. - Inmersión del bulbo en Cloralex (6% cloro activo) al 10%, 10 min. - Lavado 3 veces con agua destilada estéril - Reinmersión del bulbo en Cloralex (6% cloro activo) al 40%, 10 min. - Traslado al flujo laminar - Lavado 3 veces con agua destilada estéril - Separación de escamas en grupos: II e IE - Inmersión en Cloralex (6% cloro activo) al 10%, 10 min. - Reinmersión en Cloralex (6% cloro activo) al 10%, 10 min. - Lavado 3 veces con agua destilada estéril
8	<ul style="list-style-type: none"> - Inmersión del bulbo en agua hirviendo durante 3 min. y continuar con los pasos del esquema de desinfección 7 a partir del segundo paso
9	<ul style="list-style-type: none"> - Inmersión del bulbo en agua hirviendo durante 2 min. y continuar con los pasos del esquema de desinfección 7 a partir del segundo paso (Fig.1, C-G).

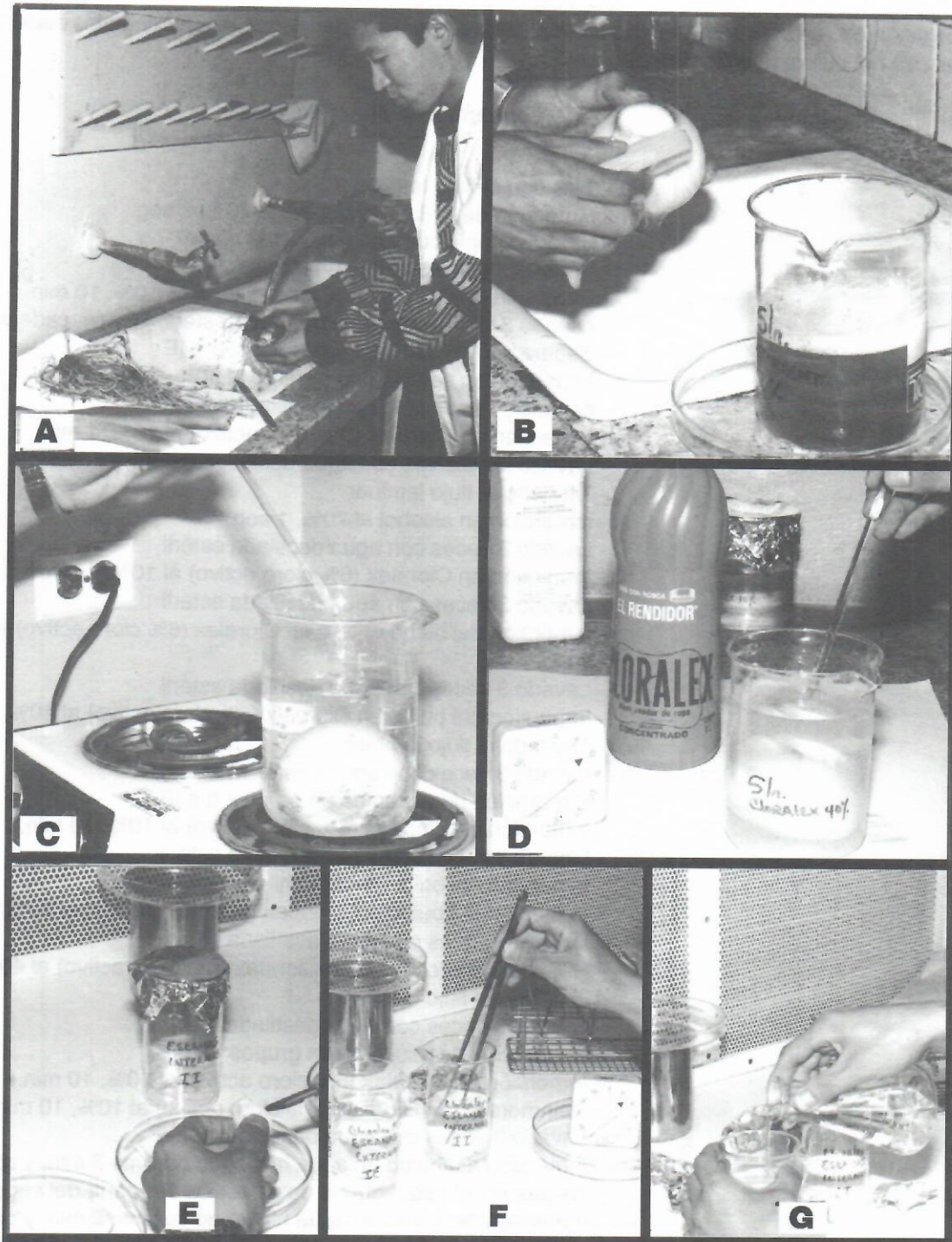


Fig. 1- Propuesta de tratamiento a *Hippeastrum vittatum* "Equestre Red" para su iniciación *in vitro* a partir de escamas del bulbo. A, obtención del bulbo por separación de hojas y raíces, seguida de lavado con agua corriente abundante; B, lavado del bulbo con solución detergente y desinfectante (Clorhexidina+ Metil- Etilbenzalconio) al 20% durante 5 min., después de eliminar las escamas externas secas y dañadas; C, tratamiento térmico del bulbo en agua hirviendo durante 2 seg. ; D, inmersión en Cloralex (6% de cloro activo) al 10% durante 10 min. seguido de 3 lavados en agua destilada estéril e inmersión en Cloralex al 40%, 10 min.; E, lavado 3 veces seguidas (5 min.) en el flujo laminar y posterior separación de las escamas internas (II) y externas (IE); F, desinfección de los grupos de escamas en Cloralex al 10% (10 min.), manteniendo las escamas totalmente sumergidas; G, lavado final 3 veces (5 min.) con agua destilada estéril.

Procedimiento empleado para la iniciación.

Los explantos axénicos obtenidos de la aplicación de los esquemas de desinfección 8 y 9 se inocularon a razón de un explanto/tubo y 30 explantos/tratamiento sobre medios MS modificados (Peña y Grillo, 1982; Peña, 1992), suplementados con diferentes niveles hormonales (Tabla II).

TABLA II

Combinaciones hormonales aplicadas para la iniciación in vitro de *Hippeastrum vittatum*. BAP: 6-bencilaminopurina, ANA: ácido naftalenacético, 2,4-D: ácido 2,4- diclorofenoxiacético, V: variantes del medio.

V	Medio basal	BAP (mg/l)	ANA (mg/l)	2,4-D (mg/l)	Agua de coco (%)
1	Peña (1992)	-	-	-	-
2		10	-	-	-
3		-	1	-	-
4		10	1	-	-
5		1	1	-	-
6		10	-	1	-
7	Peña y Grillo (1982)	-	10	-	15

La influencia del tipo de explanto en la iniciación se evaluó en los tratamientos del I al X (Tabla III). Para ello se realizaron evaluaciones cuantitativas cada siete días (hasta los 42 días) mediante observación visual y estereoscópica de los siguientes parámetros: fenolización del explanto, oxidación del medio, hinchamiento del explanto, doblamiento del explanto e inicio de diferenciación.

Con el objetivo de determinar las mejores combinaciones hormonales en la iniciación, se evaluaron semanalmente hasta los 70 días, la producción de raíces, brotes y callos en los tratamientos : II, IV, VI, VIII, X, XI y XII (Tabla III) en que fueron utilizadas sólo las escamas internas.

Condiciones de cultivo

Todos los medios de cultivos, incluso el utilizado para las variantes de desinfección, fueron ajustados a un pH entre 5,6-5,8 y esterilizados durante 20 minutos en autoclave a presión de 1 atm y 115°C. Los tubos se incubaron en el cuarto de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura (24 ± 20°C), HR (50%) y oscuridad total, según lo reportado para la iniciación de *Himenocallys ovata* Roem (Peña, 1992).

TABLA III

Tratamientos aplicados para evaluar la iniciación in vitro de *Hippeastrum vittatum*. IE, escamas externas; II, escamas internas.

Tratamientos aplicados	Tipo de explanto	Variantes del medio basal
I	IE	1
II	II	
III	IE	2
IV	II	
V	IE	3
VI	II	
VII	IE	4
VIII	II	
IX	IE	5
X	II	
XI	II	6
XII	II	7

RESULTADOS Y DISCUSION

Las condiciones en que se mantuvieron las plantas donadoras de explantos favorecieron su desarrollo vigoroso y buen estado fitosanitario. Las diferencias que se manifiestan como resultado de su caracterización expresan la existencia de diferentes fases de desarrollo, relacionadas con la época del año en que se obtuvieron los bulbos (Tabla IV).

Efectividad de las variantes aplicadas para la desinfección del tejido.

Los resultados de la efectividad de los distintos esquemas de desinfección aplicados a los explantos de *Hippeastrum vittatum* se reportan en la tabla V. Los porcentajes de contaminación en las variantes del 1-6 fueron muy variables y elevados (superiores al 50%). Los porcentajes de contaminación obtenidos en las variantes 1-4 demostraron que un solo tratamiento con Cloralex al 10% durante diez minutos no es suficiente para la eliminación de la contaminación bacteriana; sin embargo la aplicación del alcohol al 70% y el Cloralex al 10% después de independizar las escamas del bulbo (variantes 2-3) redujo la contaminación por bacterias posiblemente por favorecer la acción de los desinfectantes sobre la contaminación presente en el interior del bulbo. Las variantes 3, 5 y 6 produjeron los más bajos porcentajes de contaminación, posiblemente por la repetición de la aplicación con Cloralex aumentando su intensidad y

tiempo de acción sobre el tejido. La contaminación por hongos no puede discutirse en las variantes 1-6 debido a la agresividad de la contaminación bacteriana que hizo necesario desechar la mayoría de los tubos de cultivo después de las 72 horas. La variante 6 logró reducir la

contaminación al 50,5% con 2,8% de muerte, por lo que las variantes 7, 8 y 9 difieren de ésta sólo en la aplicación previa de termoterapia durante diez, tres y dos minutos respectivamente.

TABLA IV
Caracterización de las plantas de *Hippeastrum vittatum* utilizadas como donadoras de explantos.

Variante	No. hojas	No. raíces	Bulbos		No. escamas	
			Diámetro (cm)	Peso (g)	Externas	Internas
1	4	24	7.0	198.87	7	6
2	6	16	7.1	174.77	7	8
3	6	29	5.6	185.30	6	6
4	6	19	5.2	160.14	5	6
5	3	35	7.0	144.90	6	5
6	5	abundantes	5.5	119.65	6	9
7	3	26	6.2	130.47	7	6
8	2	abundantes	6.5	227.40	7	7
9	2	abundantes	6.0	168.71	6	8

TABLA V
Evaluaciones sobre contaminación por bacterias (CB), por hongos (CH), contaminación total (CT) y muerte del explanto en los nueve esquemas de desinfección aplicados, al cabo de 14 días de la inoculación.

Esquema de desinfección	Contaminación (%)			Muerte (%)	Supervivencia (%)
	CB	CH	CT		
1	99.0	1.0	100.0	0.0	0.0
2	21.0	75.0	96.0	1.5	2.5
3	11.0	72.0	83.0	3.0	14.0
4	95.0	5.0	100.0	0.0	0.0
5	17.0	62.0	79.5	7.5	13.5
6	20.5	30.0	50.5	3.0	46.5
7	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0
8	0.0	3.5	3.5	15.0	81.5
9	0.0	1.0	1.0	7.5	91.5

Resulta evidente que la termoterapia produjo un efecto importante en la reducción de la contaminación por hongos y en la eliminación de la contaminación bacteriana. Se evidenció que, de todas las variantes probadas, sólo la variante 9 cumple los requisitos para aplicar a *Hippeastrum vittatum* con objetivos de propagación masiva *in vitro*, pues con su aplicación logró más de un 90% de supervivencia. No obstante debe tenerse en cuenta que es posible que puedan reducirse las pérdidas de explantos muertos por calor sin que aumente la contaminación.

Fase de Iniciación

Influencia del tipo de explanto.

Las escamas de la región inferior externa del bulbo (IE) produjeron mayor fenolización en el explanto y oxidación del medio, posiblemente debido a su mayor exposición

al daño por calor y acción del desinfectante. Por otra parte, se evidenció que un mayor porcentaje de explantos provenientes de escamas inferiores internas (II) responden favorablemente a los tratamientos para lograr respuestas de iniciación (Tabla VI). Se observó también una mayor rapidez en la producción de las respuestas en el transcurso del tiempo de evaluación. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Peña (1992) en la iniciación *in vitro* de *Hymenocallis ovata* Roem. para su propagación masiva. Por tanto las escamas internas como fuente de explantos son de mayor utilidad para la micropropagación de la planta estudiada.

Influencia del medio de cultivo.

La posible influencia del medio de cultivo pudo evaluarse en las primeras fases de iniciación *in vitro* (hinchamiento, doblamiento e inicio de diferenciación), tanto en escamas internas como en escamas externas, utilizando los

medios del 1-5 (Tabla VI; Fig. 2, A y B). En todos los casos, las escamas internas superaron a las externas en cuanto al porcentaje de respuesta morfogénica obtenida. Hasta los 70 días de evaluación, las escamas externas no produjeron brotes, raíces o callos en ninguno de los medios probados. Los medios 4 y 5 fueron los que mejor respuesta produjeron en los dos tipos de explantos utilizados, considerando los porcentajes de hinchamiento, doblamiento, y sobre todo, el inicio de la diferenciación.

Los resultados de las evaluaciones realizadas al cabo de los 70 días para la producción de raíces, brotes y callos en escamas internas se reportan en la (Tabla VII; Fig. 2C). Los resultados obtenidos coinciden con los de otros autores (Seabrook y Cumming, 1977) para la iniciación *in vitro* de *Hippeastrum* en la que no se reporta producción de raíces, brotes y callos con medio libre de hormonas y/o suplementado sólo con BAP. En el medio 4, al que se le adicionó BAP (10,0 mg/L) y ANA (1,0 mg/L) se observó mayor producción de brotes, raíces y callos con respecto a los otros medios, lo cual se corresponde con resultados publicados antes (Seabrook y Cumming, 1976; Peña, 1992) para la inducción de brotes adventicios de *Narcissus* e *Hymenocallis* respectivamente. La producción de brotes sólo se

observó en los medios nutritivos donde hay combinaciones de BAP y ANA (medios 4 y 5) y en el que esta auxina se combina con el agua de coco (medio 7).

Teniendo en cuenta que el objetivo de esta fase es la producción de brotes, el medio 4 resulta el más efectivo para obtener esta respuesta a partir de escamas internas. Los resultados obtenidos en el medio 7 pueden ser de interés en la fase de enraizamiento si se piensa en seleccionar una tecnología completa para la propagación masiva de *Hippeastrum*. Es posible que los medios 5 y 7, donde se induce también la producción de brotes, sean de interés en el desarrollo de la fase de multiplicación. La inducción de callos en los medios 4, 5 y 7 puede ser favorable, si se considera que los callos constituyen otra vía para la obtención de vitroplantas.

Los bulbos de *Hippeastrum* pueden producir entre 800-1000 explantos, y de éstos aproximadamente 200 corresponden a escamas internas de su mitad inferior. Si durante la iniciación fue posible obtener 12 brotes a partir de 30 fragmentos de escamas, es evidente que la obtención de brotes por esta vía puede superar grandemente a la propagación convencional si se considera la fase de multiplicación como parte de cualquier tecnología de micropropagación.

TABLA VI

Influencia del tipo de explanto y del medio de cultivo aplicado en las primeras etapas de la iniciación, después de los 42 días de cultivo. (n=30)

Variante del medio	Hinchamiento (%)		Doblamiento (%)		Inicio de Diferenciación (%)	
	IE	II	IE	II	IE	II
1	13.6	24.1	41.0	48.3	0.0	6.9
2	35.0	42.9	60.0	82.1	0.0	7.1
3	95.0	100.0	57.9	100.0	15.8	76.0
4	55.6	100.0	100.0	100.0	44.4	00.0
5	75.0	100.0	100.0	100.0	33.3	93.3

TABLA VII

Influencia del medio de cultivo en la morfogénesis de *Hippeastrum* a partir de escamas internas del bulbo a los 70 días de cultivo. (n=30)

Variante del medio	Cantidad de explantos con respuesta		
	Brotes	Raíces	Callos
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	2	-
4	12	17	7
5	4	-	10
6	-	-	-
7	3	8	4

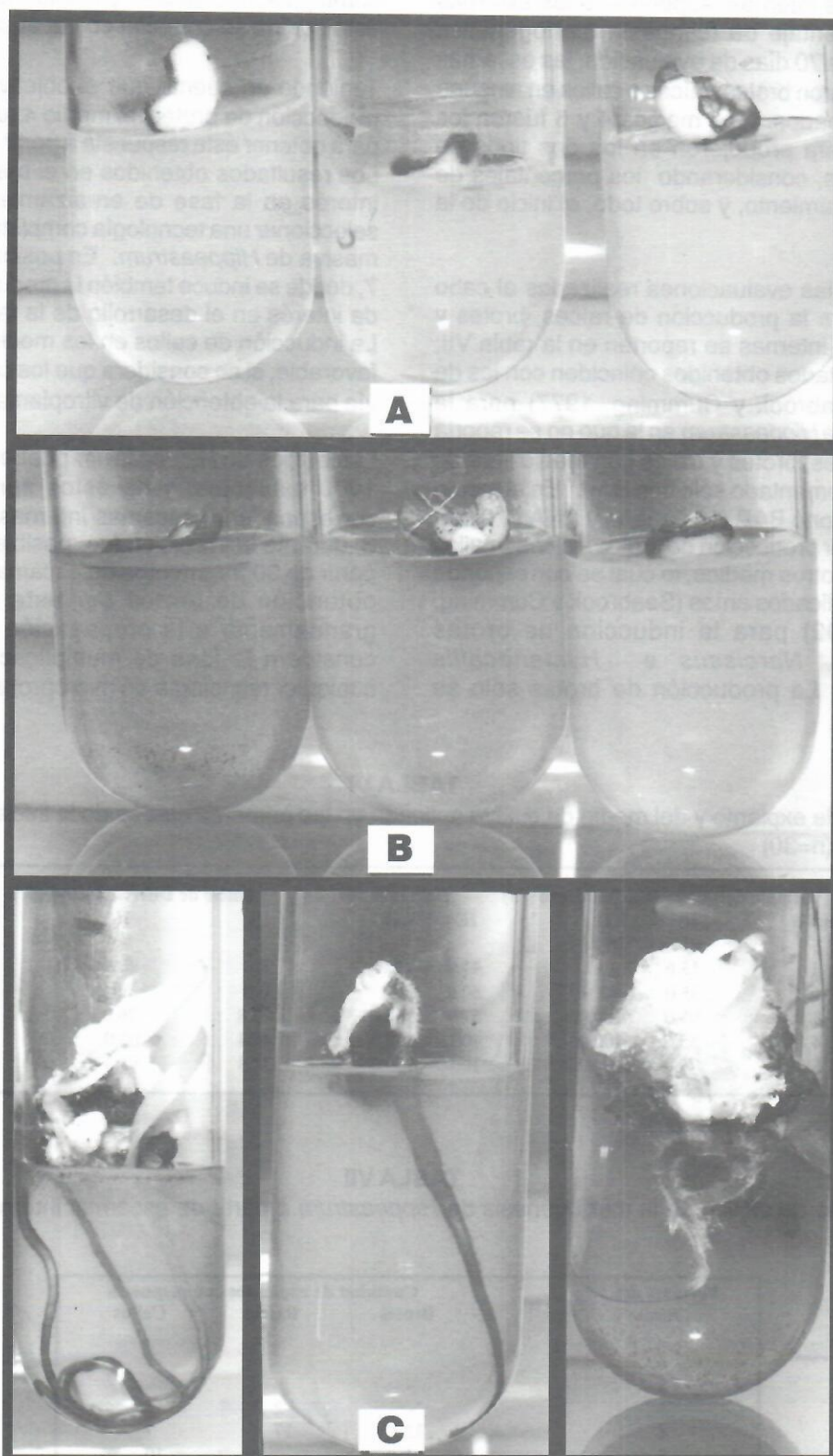


Fig. 2- Iniciación *in vitro* de *Hippeastrum vittatum* "Equestre Red". A, hinchamiento y doblamiento de escamas internas; B, fenolización de explantos y medio nutritivo e inicio de la producción de brotes; C, respuestas morfogénicas: brotes, raíces y callos.

BIBLIOGRAFIA

- De Bruyn MH, Ferreira DI, Slabbert MM and Pretorius J. 1992. *In vitro* propagation of *Amaryllis belladonna*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 31: 179-184.
- García MAP, Contreras EH y Clemente M. 1992. Propagación de *Narcissus sp.* En: Etnobotánica '92 (Libro de resúmenes). Jardín Botánico de Córdoba, Córdoba, pp. 393.
- Graves RH, Reid RH and Mathes MC. 1978. Tissue culture of the monocots *Lilium Hymenocallis* and *Hippeastrum*. In: Propagation of Higher Plant Through Tissue Culture. A Bridge Between Research and Application. pp. 248-254, National Technical Inform. Service, US.
- Hay R y Syngé PM. 1973. Diccionario ilustrado en color de plantas de jardín con plantas de interior y de invernadero. Editorial Gustavo Gili, S. A. Barcelona.
- Heywood H. 1985. Las plantas con flores. Editorial Reverté, S. A., Barcelona. pp. 310-312.
- Margara J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*: Los meristemas y organogénesis. Ediciones Mundi . Prensa, Madrid, pp.162-180.
- Mii M, Mori T and Iwasel N. 1974 Organ formation from the excised bulb scales of *Hippeastrum hybridium in vitro*. J. Hort. Sci., 49: 241-244.
- Pajerski L and Ascher PD. 1977. Propagation of *Amaryllis (Hippeastrum)* from cultured scape tissue. Hort Science 12: 293-296.
- Peña E y Grillo E. 1982. Proliferación de *Microcycas calocoma* (Miq.) A. DC. *in vitro*. Revista del Jardín Botánico Nacional, 3 (2): 177-196.
- Peña E. 1992. Propagación *in vitro* de *Hymenocallis ovata* Roem. (*Amaryllidaceae*), en: Etnobotánica' 92. (Libro de resúmenes). Jardín Botánico de Córdoba, pp. 387.
- Pierik RLM. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Seabrook JEA and Cumming BG. 1977. The *in vitro* propagation of *Amaryllis (Hippeastrum ssp. híbridos)*. *In vitro*, 13 (12): 831-836.
- Seabrook JEA and Cumming BG. 1976. Vegetative propagation of *Narcissus* using tissue culture . In: Daffodils, pp. 16-21, Roy. Hort. Soc., London.
- Seabrook JEA. 1987. *Narcissus* (Daffodils). In: Amirato, P., V. et al. (eds.), Handbook of Plant Cell Culture, 5: 577-597, Mc Graw- Hill Publis. CO., New York.
- Van Aartrijk J and Van der Linde PCG. 1986. *In vitro* propagation of flower- bulb crops. In: Zimmernan, R., H. et al. (eds.). Tissue Culture as a Plant Producción System for Horticultural Crops, pp 317- 331, Mart. Nijh. Publ., Dordrent.
- Yanagawa T and Sakanisni Y. 1977. Regeneration of bulblets on *Hippeastrum* bulb segments excised from various parts of a parent bulb. J. Jap. Soc. Hort. Sci., 46: 250-260.

Recibido: 13 de marzo de 1998.

Direcc. de los autores: Jardín Botánico Nacional, Carretera del Rocío km 3 1/2, Calabazar, Boyeros, Ciudad de La Habana. CP 19230