

MICROPROPAGACIÓN DE EUCALIPTO (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL¹

***Eucalyptus* (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) micropropagation in a temporary immersion system**

Dagoberto Castro R.² y Justo González O.³

A B S T R A C T

A new procedure is described for *in vitro* multiplication using the temporary immersion system for plants (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) coming from elite trees. The optimum multiplication frequency was established at every 12 h with a duration of 3 min. The additional application of a stream of fresh air every 6 h for 3 min diminished the hyper-hydration of the plants during the process. The procedure involved two steps: shooting and elongation of buds. The best treatment for induction of axillary buds was obtained in the culture medium MS (Murashige and Skoog) with the nitrates reduced to half strength plus 0.5 benciladenin (BA) mg L⁻¹, with volumes of 55.5 mL per group of buds for three weeks. The elongation took place in the MS culture medium plus indol butiric acid (IBA) 1.0 g L⁻¹ for three weeks. The use of this protocol allows producing an average of 260 competent plants of *E. grandis*. Shoots taller than 2 cm were positively related with higher survival during the acclimatization phase.

Key words: *Eucalyptus grandis*, temporary immersion, micropropagation.

R E S U M E N

Se describe un nuevo procedimiento para la multiplicación *in vitro* mediante el sistema de inmersión temporal de plantas de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) procedentes de árboles elite. La mayor eficiencia de multiplicación se estableció a una frecuencia óptima de inmersión cada 12 h con una duración de 3 min. La aplicación adicional de un flujo de aire fresco cada 6 h durante 3 min disminuyó la hiperhidratación de las plantas durante el proceso. Este procedimiento comprendió dos pasos: la brotación o multiplicación múltiple y la elongación de brotes. El mejor tratamiento para la inducción de brotes axilares o multiplicación se obtuvo en un medio de cultivo MS (Murashige and Skoog) con los nitratos reducidos a la mitad + 0,5 mg L⁻¹ de benciladenina (BA), con volúmenes de 55,5 mL por grupo de brotes durante tres semanas. La elongación tuvo lugar en el medio de cultivo MS más ácido indolbutírico (AIB) 1,0 g L⁻¹, durante tres semanas. La utilización de este protocolo permitió obtener un promedio de 260 plantas competentes de *E. grandis*. Las plantas con tamaño mayor a 2 cm se relacionaron positivamente con una mayor supervivencia durante la fase de aclimatización.

Palabras clave: *Eucalyptus grandis*, inmersión temporal, micropropagación.

¹Recepción de originales: 11 de diciembre de 2000.

²Universidad Católica de Oriente, Unidad de Biotecnología, Apartado Aéreo 008, Rionegro, Antioquia, Colombia. E-mail: dcastro@uco.edu.co

³Universidad Ciego de Avila, Laboratorio Propagación Masiva de Plantas, Centro de Bioplantas. Carretera a Morón km 9, CP. 69450. Ciego de Avila. Cuba. E-mail: Justo@bioca.unica.cu

INTRODUCCIÓN

La propagación vegetativa de los eucaliptos tiene gran importancia en su mejoramiento para asegurar ganancias genéticas inmediatas. Los clones superiores de eucaliptos seleccionados cuidadosamente a partir de poblaciones naturales o mejoradas, pueden ser propagados masivamente a bajo costo. Posteriormente, los rametos de esos clones seleccionados podrán ser utilizados directamente en plantaciones para asegurar que las características superiores de crecimiento sean retenidas (Vichnevetskaia, 1997). Esta tecnología está muy bien establecida en algunos países como Brasil, donde de la producción anual en viveros, es decir 175 millones de plantas, aproximadamente 30% proviene de estacas enraizadas.

La micropropagación de eucalipto se ha desarrollado en más de 55 especies, y en un gran número de híbridos, utilizando técnicas convencionales de organogénesis a partir de tejidos juveniles como cotiledones y embriones, y de árboles adultos empleando brotes epicórmicos, nudos y rebrotes como fuente de explantes (Jones y van Staden, 1997). La aplicación a escala comercial de estas técnicas se ha visto limitada por factores tales como las bajas tasas de multiplicación, calidad de los explantes, y altos costos ocasionados por el uso intensivo de mano de obra en las etapas de multiplicación y enraizamiento (McComb y Bennett, 1986).

La automatización de una o más etapas en los procesos de micropropagación es una opción para la reducción de costos de manipulación, reducción del espacio, e incrementar volúmenes de producción. La utilización de medios de cultivo líquidos es una condición para lograr desarrollar esta alternativa (Aitken-Christie *et al.*, 1995; Kurata, 1995). Teisson *et al.* (1996) desarrollaron un equipo sencillo de inmersión temporal, cuyo nombre comercial es RITA® (récipient à immersion temporaire automatisé), el cual ha sido empleado para el cultivo de microesquejes y embriogénesis somática en varias especies de

interés hortícola, con altas tasas de multiplicación, lo cual ha permitido disminuir los costos de producción y reducir riesgos de contaminaciones.

En Cuba, a partir del desarrollo del primer sistema semiautomatizado de inmersión temporal en 1997, se han realizado investigaciones sobre la aplicación de esta técnica en la proliferación de meristemas de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) (Lorenzo *et al.*, 1998), y micropropagación de piña (*Ananas comosus*) (Escalona *et al.*, 1999).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar algunos factores críticos del proceso como son la duración y frecuencias de inmersión, volumen óptimo de medio de cultivo por explante, y duración de las fases de proliferación y elongación que tiendan a optimizar la producción y calidad de los brotes de *Eucalyptus grandis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del sistema de inmersión temporal

Se utilizaron explantes procedentes de micropropagación convencional de un clon de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden procedente originalmente de árboles elite.

El sistema de inmersión temporal empleado fue el propuesto por Alvard *et al.* (1993), con algunas modificaciones. Como recipientes se utilizaron frascos de 1 L de capacidad, los cuales se interconectaron por parejas mediante mangueras de silicona. En un frasco se colocó el medio de cultivo líquido y en el otro los brotes. Se debe aclarar, que en todos los casos, el volumen de medio de cultivo es constante durante cada fase y las pérdidas por evaporación son mínimas debido a que es un sistema cerrado. Cada frasco se conectó a un sistema de entrada de aire proveniente de un compresor, el cual se accionó por un programador automático para el control de la frecuencia, la duración de las inmersiones, la luminosidad y el flujo de gases. El aire entrante o saliente se esterilizó a través de filtros hidró-

fobos de 0,2 mm, de tal manera que cada recipiente se manipuló independientemente sin riesgos de contaminación.

Determinación del tiempo y la frecuencia de la inmersión

Se utilizó un experimento bifactorial en diseño completamente al azar con tres repeticiones, los factores correspondieron a duración de la inmersión (1 y 3 min) y frecuencias (3, 6, 12, y 24 h) durante tres semanas, lo que totalizó ocho tratamientos. El volumen total del medio de cultivo fue 500 mL y se inocularon seis grupos de explantes. Cada grupo estuvo compuesto por cinco brotes axilares. Posterior a la evaluación del primer ensayo se utilizaron inmersiones cada 12 h con una duración de 3 y 6 min. También se evaluó el efecto de la inyección adicional de aire durante 3 y 6 min cada 6 h y un testigo sin inyección de aire. Las variables que se evaluaron correspondieron a número total de brotes y porcentaje de brotes hiperhidratados.

El medio de cultivo utilizado consistió en las sales minerales de MS (Murashige y Skoog, 1962) con el nitrato de amonio y nitrato de potasio diluidos a la mitad. Los constituyentes orgánicos incluyeron las vitaminas MS, L-glutamina (500 mg L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹) y benciladenina (BA, 0,5 mg L⁻¹); como agente preventivo de la oxidación se utilizó polivinil polipirrolidona (PVPP) en concentración de 250 mg L⁻¹. En todos los casos el medio de cultivo se esterilizó por autoclave (25 min, 121 °C); el pH se ajustó previamente a $5,8 \pm 1$ con NaOH. Los cultivos se incubaron a 24 ± 1 °C con un fotoperíodo de 12 h luz: 12 h oscuridad. Como fuente de luz se emplearon bombillos de luz fluorescente (75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Influencia del número de explantes y volumen del medio sobre la tasa de multiplicación y calidad de los brotes

Se utilizó un experimento bifactorial en diseño completamente al azar con tres repeticiones,

donde se evaluaron los factores correspondientes a número de brotes: 3, 6, 9 y 12 grupos de explantes cada uno compuesto por 5 brotes axilares; y el volumen del medio de cultivo: 250, 500 y 750 mL, lo que dio un total de 12 tratamientos. La frecuencia de inmersión fue cada 12 h con una duración de 3 min cada una. El medio de cultivo tuvo la misma composición señalada anteriormente. Los indicadores evaluados fueron: coeficiente de multiplicación y relación entre las masas seca y fresca.

Evaluación del efecto de volumen del medio de cultivo y duración de la fase de elongación sobre el crecimiento de brotes de eucalipto

Para la etapa inicial de la multiplicación se empleó la misma composición del medio de cultivo anterior, y se sembraron nueve grupos de explantes. Cada grupo estuvo compuesto por cinco brotes axilares por recipiente durante un período de tres semanas; transcurrido este lapso de tiempo se inició una segunda etapa cuyo objetivo fue lograr la elongación de los brotes.

El medio de cultivo utilizado en la etapa de elongación correspondió a las sales minerales MS con el nitrato de amonio y nitrato de potasio diluidos a la mitad, vitaminas MS, más L-glutamina (500 mg L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹) y ácido indolbutírico (AIB) (1,0 g L⁻¹).

Se utilizó un experimento bifactorial en un diseño completamente al azar con tres repeticiones, donde los factores fueron: volumen del medio de cultivo: 250, 500 y 750 mL; y número de semanas después de la siembra (duración de la fase): 1, 2 y 3 semanas con un total de 9 tratamientos. Los indicadores evaluados correspondieron a coeficiente de multiplicación, relación entre masas seca y fresca, y altura de los brotes. También se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plántulas en invernadero 30 días después de transferidas a las casas de aclimatización.

Las variables analizadas se sometieron a la prueba de normalidad y análisis de varianza

mediante las pruebas de Cochran y Bartlett (Montgomery, 1991). La información obtenida se procesó por análisis de varianza de un diseño completamente al azar con arreglo multifactorial y prueba de rangos múltiples de Duncan para la comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del tiempo y la frecuencia de la inmersión

En el proceso para establecer una metodología de propagación de plantas en el sistema de inmersión temporal, la determinación del tiempo y la frecuencia de inmersión son dos factores fundamentales para lograr el mayor coeficiente de multiplicación y mejor calidad de las plántulas. De acuerdo con los resultados obtenidos (Figura 1A) se presentaron interacciones entre la duración y la frecuencia de inmersión sobre el número de brotes por explante. La inmersión de 3 min presentó mayor número de brotes en relación con 1 min. Las frecuencias de 12 y 24 h mostraron el mayor número de brotes, significativamente superior a los tratamientos donde se emplearon 3 y 6 h. Con relación a la calidad de los brotes se evaluó el porcentaje de brotes con síntomas de hiperhidratación (Figura 1B), no se encontraron interacciones entre los factores evaluados; de igual manera la duración de la inmersión de 1 y 3 min no presentó diferencias significativas. Las frecuencias de 12 y 24 h mostraron la menor hiperhidricidad en comparación a la frecuencia de 3 y 6 h. En *E. grandis* la hiperhidricidad es una anomalía fisiológica que se caracterizó porque las hojas mostraron una apariencia traslúcida, húmeda, gruesa, un color verde claro, y una apariencia muy túrgida de las plantas. De acuerdo con los resultados obtenidos se seleccionaron como mejor tratamiento las inmersiones con una frecuencia de 12 h con una duración de 3 min.

Las condiciones óptimas de inmersión dependen de la especie, pues en el caso de café (*Coffea canefora*) cuando se emplearon cuatro inmer-

siones al día de 15 min cada una, las cuales se aplicaron con éxito a *C. arabica*, hubo un alto porcentaje de hiperhidricidad, el cual se redujo cuando se cambió a dos inmersiones de 1 min por día (Teisson *et al.*, 1996). La frecuencia y duración de la inmersión tuvo un efecto directo en el desarrollo de embriones de *Coffea* sp. (Teisson y Alvard, 1995).

Teniendo en cuenta los altos porcentajes de hiperhidratación, se evaluó el efecto de la incorporación de flujos de aire adicionales, cada 6 h con una duración de 3 min cada una, lográndose disminuir notoriamente la hiperhidratación (Figura 2), lo cual permitió mejorar esta condición de estrés debido a una renovación de la atmósfera de los recipientes y disminución de la humedad relativa, sin que se presentaran diferencias significativas con relación a la multiplicación.

Influencia del número de brotes y el volumen del medio de cultivo sobre la multiplicación y calidad de los brotes

El número de brotes y volumen del medio de cultivo presentaron interacciones significativas con el coeficiente de multiplicación y la relación entre masas fresca y seca. De acuerdo con los resultados que se presentan en la Figura 3A, en los tratamientos donde se utilizaron 3, 6 y 9 grupos de explantes, el coeficiente de multiplicación se incrementó en la medida que el volumen de medio de cultivo se aumentó; sin embargo, en el tratamiento donde se emplearon 12 grupos de explantes se observó una disminución en el coeficiente de multiplicación en los tres volúmenes de medio, debido a un efecto de competencia de los explantes por nutrientes. Resultados similares informaron Kozai *et al.* (1995) en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), quienes señalaron que el volumen inicial del medio de cultivo y la concentración del medio nutritivo afectaron los contenidos iniciales de iones, el desarrollo, la fotosíntesis y la absorción de iones por los brotes.

La relación entre masas seca y fresca presentó los mayores valores, con un volumen de 500 mL

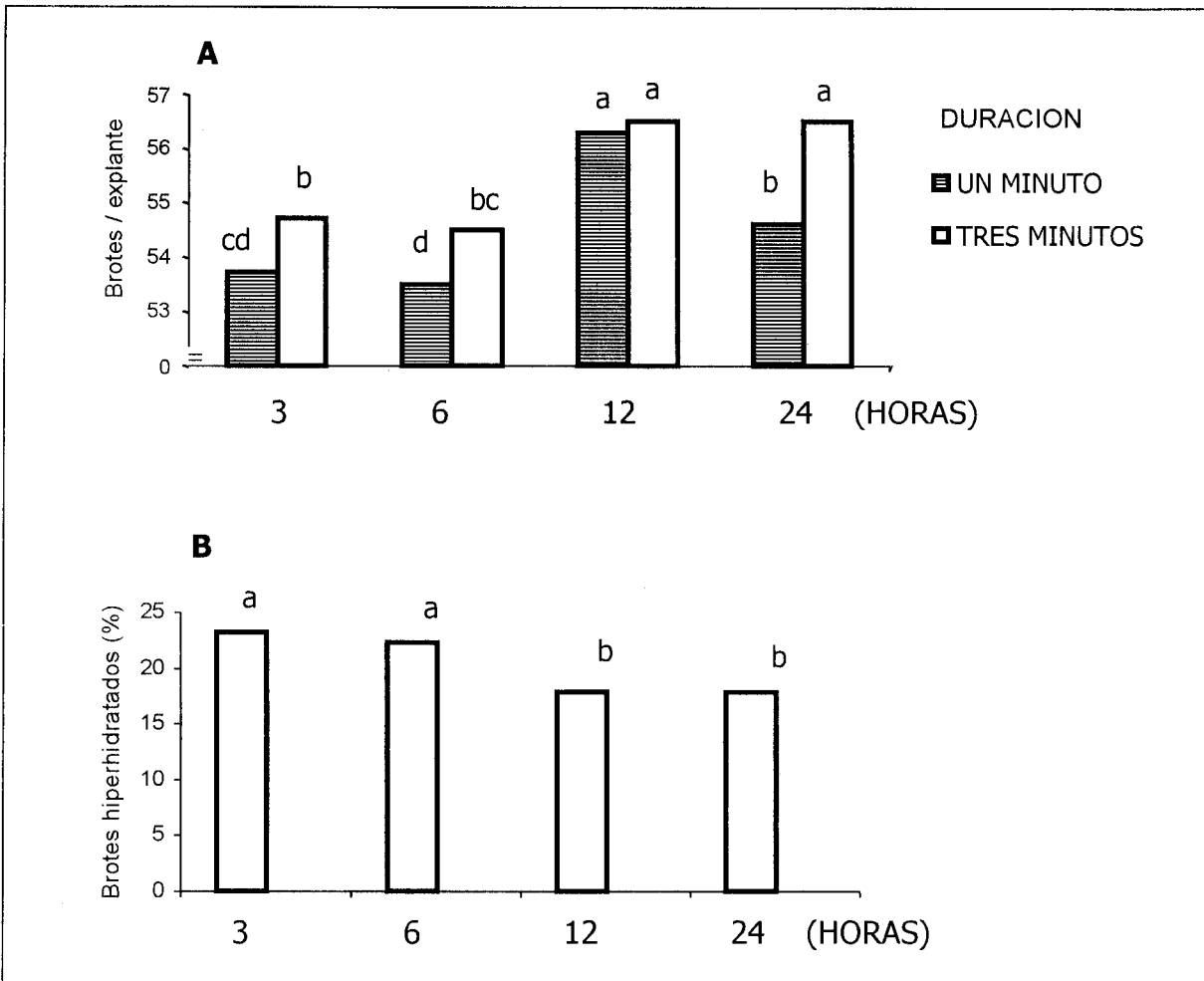


Figura 1. Efecto de los tiempos de duración y frecuencias de la inmersión sobre la multiplicación (A) y porcentaje de brotes hiperhidratados (B) en explantes de *Eucalyptus grandis*. Los datos representan las media de tres repeticiones, cada una con 30 brotes.

Figure 1. Effect of the time of duration and frequencies of the immersion on the multiplication (A) and percentage of hyperhydrated shoots (B) in explants of *Eucalyptus grandis*. The data represent the average of three repetitions, each one with 30 buds.

*Letras desiguales son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según test de Duncan.

de medio de cultivo con tres, seis y nueve grupos de brotes (Figura 3B). Se debe señalar la importancia de los valores de masa seca como un indicador de calidad de los brotes, pues ésta se compone principalmente de lignina y polisacáridos en la pared celular, además de componentes del protoplasma como proteínas, lípidos, aminoácidos, ácidos orgánicos y algunos elementos inorgánicos como el potasio (Salisbury y Ross, 1994).

Las técnicas convencionales de micropropagación se caracterizan por un volumen de medio de cultivo relativamente pequeño (4-10 mL por plántula), comparado con cultivos hidropónicos y otros sistemas de producción (Kozai *et al.*, 1995), y por largos períodos de tiempo entre los subcultivos. Sin embargo, para lograr un máximo desarrollo en las técnicas de cultivo de tejidos es necesario proveer a las plántulas con suficientes cantidades de nutrientes esenciales (incluyendo

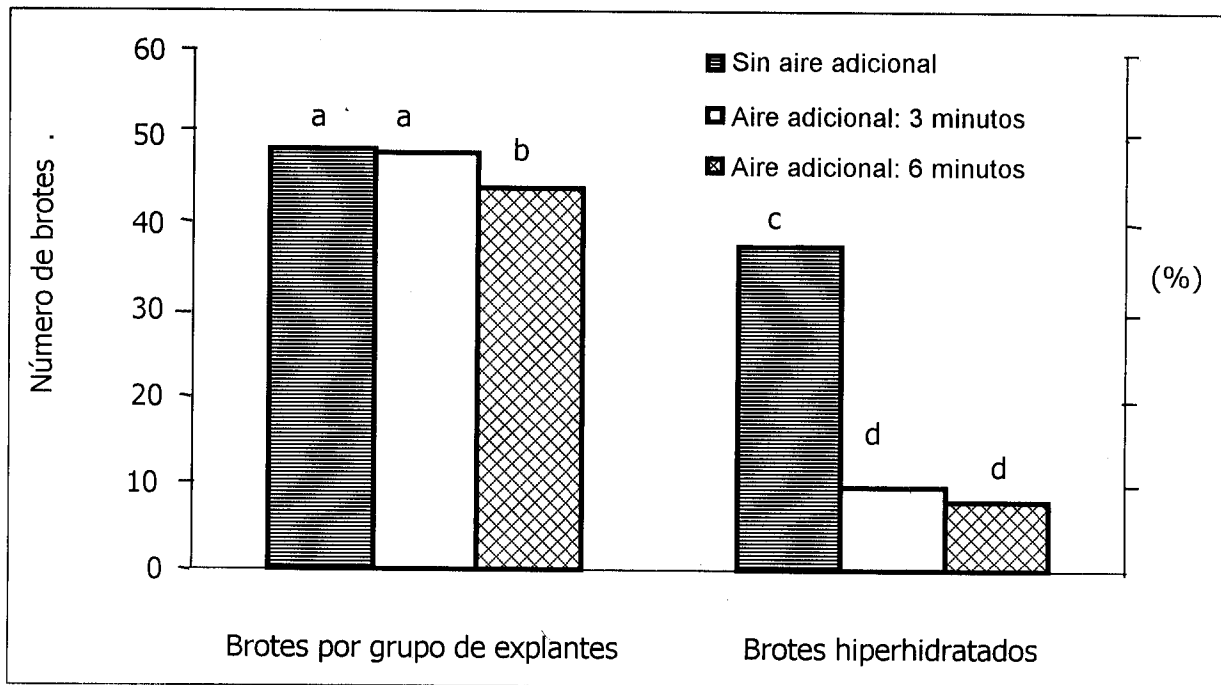


Figura 2. Comparación del efecto de la incorporación de aire adicional sobre el número de brotes por explante y el porcentaje de brotes hiperhidratados de *Eucalyptus grandis* en el sistema de inmersión temporal. Los datos representan la media de tres repeticiones, cada grupo de explantes tuvo cinco brotes.

Figure 2. Comparison of the effect of the incorporation of additional air on the shooting and percentage of hyperhydrated shoots of *Eucalyptus grandis* in the temporary system of immersion. The data represent the media of three repetitions, each group of explants had five shoots.

*Letras desiguales difieren significativamente ($P < 0,05$) según test de Duncan.

la sacarosa y carbono como fuentes de energía bajo condiciones heterotróficas y mixotróficas), de tal manera que los nutrientes no sean un factor limitante para la multiplicación y el desarrollo de las plantas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se encontró que un volumen de 500 mL de medio con nueve explantes, correspondió a un óptimo desarrollo de las plantas, lográndose un coeficiente de multiplicación de 10,5 brotes, y la mejor calidad de los brotes en términos de una mayor producción de masa seca. Es importante notar que en la medida que se incrementó el volumen de medio de cultivo se obtuvo un mayor coeficiente de multiplicación, sin embargo, la calidad de los brotes fue un factor importante, el cual permitió definir un volumen adecuado de medio de cultivo, que minimiza el estrés hídrico y químico

en los brotes, particularmente en las primeras etapas del cultivo. Además disminuyen los costos de nutrientes y de contaminantes ambientales por residuos del medio de cultivo.

Efecto del volumen del medio de cultivo y duración de la fase de elongación sobre el crecimiento de brotes de eucalipto

De acuerdo con los resultados de la Figura 4 se determinó una interacción entre el volumen de medio de cultivo y el número de semanas después de la siembra, con relación a las variables de coeficiente de multiplicación, relación entre las masas seca y fresca, y altura de los brotes. En la medida que se incrementó el tiempo y el volumen del medio de cultivo se lograron los mayores coeficientes de multiplicación a las tres semanas de cultivo y con 750 mL de medio de cultivo por

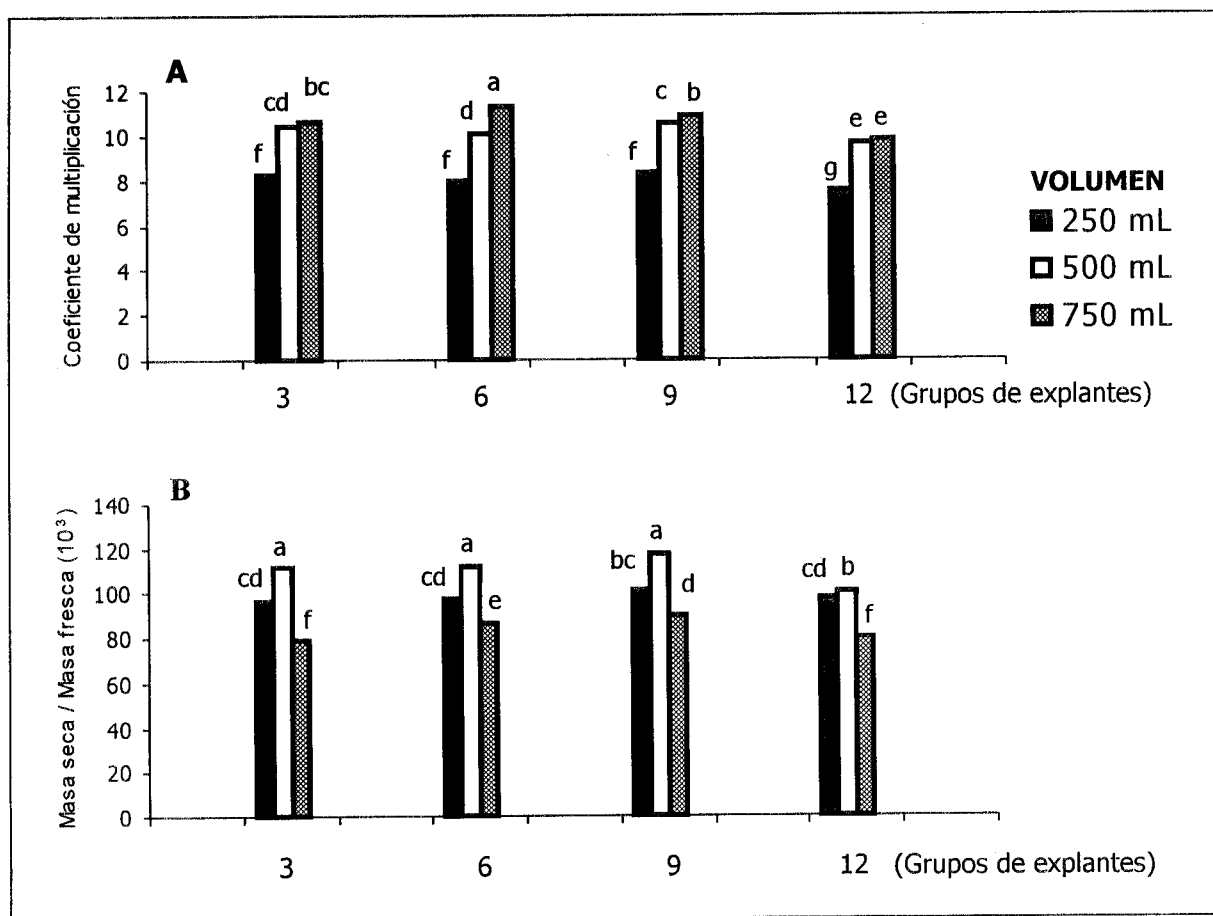


Figura 3. Efecto del número de explantes y volumen de medio de cultivo sobre el coeficiente de multiplicación (A) y la relación entre masas seca y fresca (B) en *Eucalyptus grandis*. Los datos representan la media de tres repeticiones. Cada grupo de explantes estuvo compuesto por cinco brotes.

Figure 3. Effect of the number of explants and volume of culture medium on the multiplication coefficient (A) and the relation between dry and fresh masses (B) in *Eucalyptus grandis*. The data represent the media of three repetitions, each group of explants had five shoots.

*Letras desiguales son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según test de Duncan.

recipiente (Figura 4A). La relación entre las masas seca y fresca alcanzó los mayores valores con un volumen de 500 mL en los períodos de tiempo de dos y tres semanas (Figura 4B), mientras que con un volumen de 750 mL se presentaron los valores más bajos y con una mayor tendencia a la hiperhidricidad. La altura media de los brotes mostró los mayores valores con volúmenes de medio de cultivo entre 500 y 750 mL y duración de la fase de elongación entre dos y tres semanas (Figura 4C).

Estos resultados implican la necesidad de establecer un óptimo entre los factores evaluados, que bajo las condiciones ensayadas correspondieron a tres semanas en el medio de elongación con un volumen de medio de cultivo de 500 mL, es decir 55,5 mL por grupo de brotes. Para esta selección se consideró el mayor coeficiente de multiplicación que fue de 11,5.

Respecto al tamaño de las plántulas, los mayores volúmenes de medio de cultivo, 500 y 750 mL, y los períodos de duración de la fase de elongación de dos y tres semanas, favorecieron plantas con

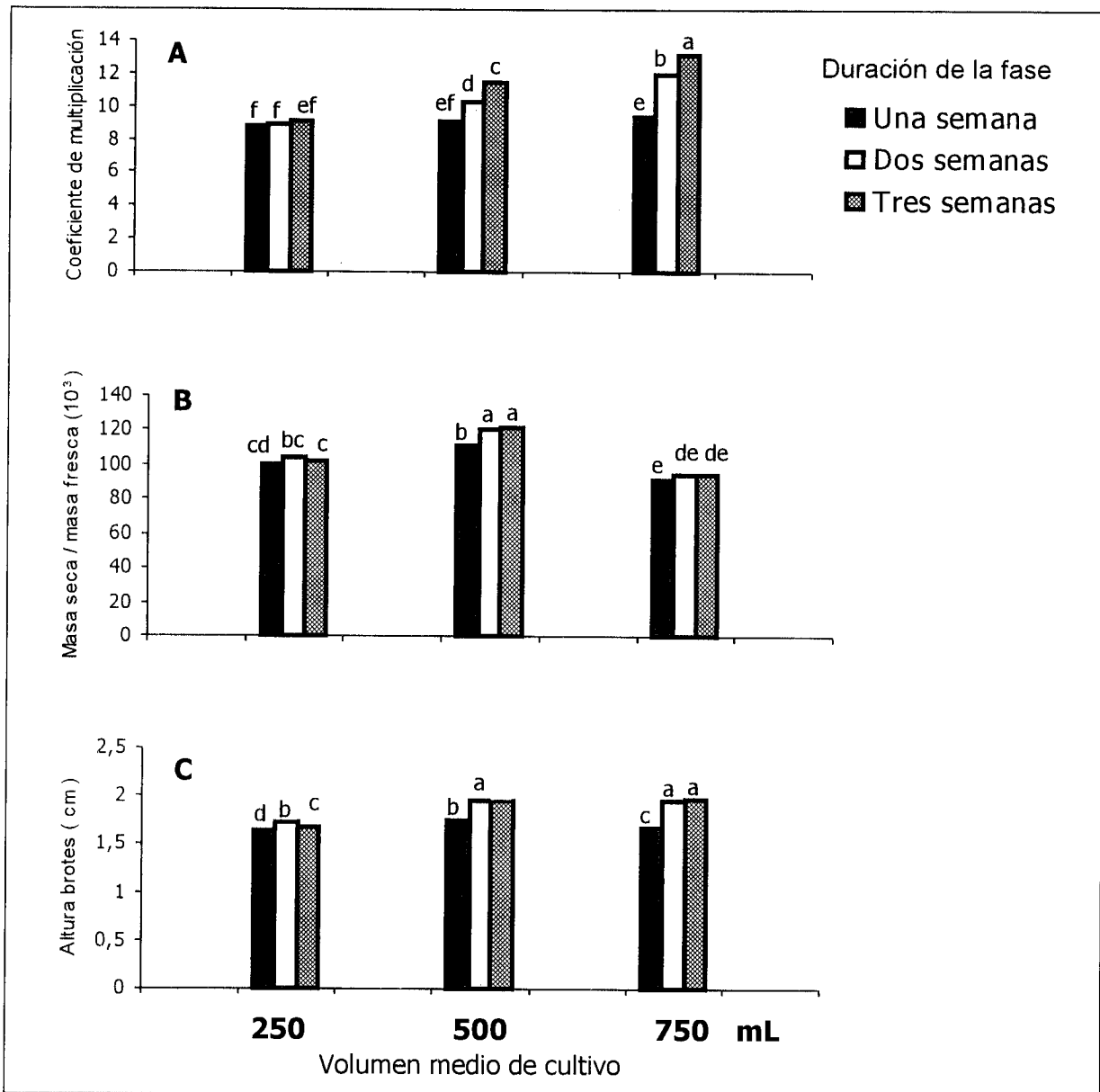


Figura 4. Efecto del volumen del medio de cultivo y duración de la fase (semanas) sobre el coeficiente de multiplicación (A), la relación entre masas seca y fresca (B) y altura de los brotes (C) durante la etapa de elongación en *Eucalyptus grandis*. Los datos representan la media de tres repeticiones, cada una con 50 brotes.

Figure 4. Effect of the volume of the medium culture and duration of the phase (weeks) on the coefficient of multiplication (A), the relation between dry and fresh masses (B) and shoot height (C) during the stage of elongation in *Eucalyptus grandis*. The data represent the media of three repetitions each one with 50 buds.

*Letras desiguales difieren significativamente ($P < 0,05$) según test de Duncan.

el mayor número de brotes y con un tamaño superior a los dos centímetros, que alcanzó porcentajes del 57,2%, es decir, 260 brotes competentes

en el tratamiento donde se utilizó un volumen de medio de cultivo de 500 mL durante tres semanas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto del volumen del medio de cultivo y duración de la fase (semanas) sobre el tamaño de los brotes durante la etapa de elongación en *Eucalyptus grandis*

Table 1. Effect of the volume of the culture medium and duration of the phase (weeks) on the size of the shoots during the elongation stage in *Eucalyptus grandis*

Volumen (mL)	Duración fase (semanas)	Tamaño de los brotes Clases (cm)				
		0,6 - 1,0	1,1 - 1,5	1,6 - 2,0	2,1 - 2,5	> 2,5 - 4,0
250	1	96,3	46,0	42,3	170,6 b	31,6
	2	88,0	44,0	39,3	184,6 b	40,1
	3	96,0	43,1	41,0	176,0 b	48,6
500	1	101,0	43,3	39,3	179,0 b	36,6
	2	104,0	45,3	42,6	218,3 ab	47,0
	3	108,6	44,2	41,0	212,0 ab	48,6
750	1	118,3	42,1	41,4	179,6 b	41,6
	2	132,0	43,3	42,6	225,3 a	51,6
	3	137,0	46,3	42,0	247,6 a	52,2
MG ± EE		109 ± 7,18	44,1 ± 1,44	41,2 ± 2,6	199 ± 2,2	44 ± 2,6
Análisis de varianza						
• Volumen (V)		*	NS	NS	*	*
• Semanas (S)		NS	NS	NS	*	*
Interacción V x S		NS	NS	NS	*	NS

*Diferencia al nivel 0,05.

NS: No significativo.

Los datos representan la media ± error estándar (EE) de tres repeticiones. Los tratamientos con letras diferentes presentan significación para $p < 0,05$ por el test de Duncan.

Las tasas de multiplicación en eucaliptos dependen de la especie e incluso del clon, y si los brotes son juveniles o maduros. En *E. marginata* se registró una tasa de multiplicación entre 3 y 7 en cuatro semanas en materiales procedentes de semillas, mientras que de árboles adultos se lograron tasas más bajas, entre 2 y 5 en el mismo lapso de tiempo, cuando se emplearon las técnicas convencionales de micropropagación (McComb y Bennett, 1986). En *E. grandis* se lograron coeficientes de multiplicación de 3,5 en sistemas convencionales (Castro, 1998). Al comparar estos resultados con los que se lograron con los sistemas de inmersión temporal, que en promedio fueron de 11,5, justifican el empleo de esta tecnología. El proceso de inmersión temporal para la proliferación de *E. grandis* permite el inter-

cambio gaseoso con una periodicidad de cada 6 h y cada 12 h se realiza un baño con el medio de cultivo, esto proporciona una mejor asimilación de los nutrientes; adicionalmente se presenta un mayor contacto entre los nutrientes y las plantas, y una mayor difusión de sustancias tóxicas, por lo tanto, se mejoran las tasas de multiplicación y la calidad de los brotes.

La supervivencia de las plántulas se relacionó con su mayor tamaño durante el proceso de inmersión y durante la etapa de aclimatización (Figura 5), razón por la cual los brotes mayores de 2 cm se consideran como plantas competentes para la etapa de aclimatización, al presentar porcentajes de supervivencia superiores a 90%.

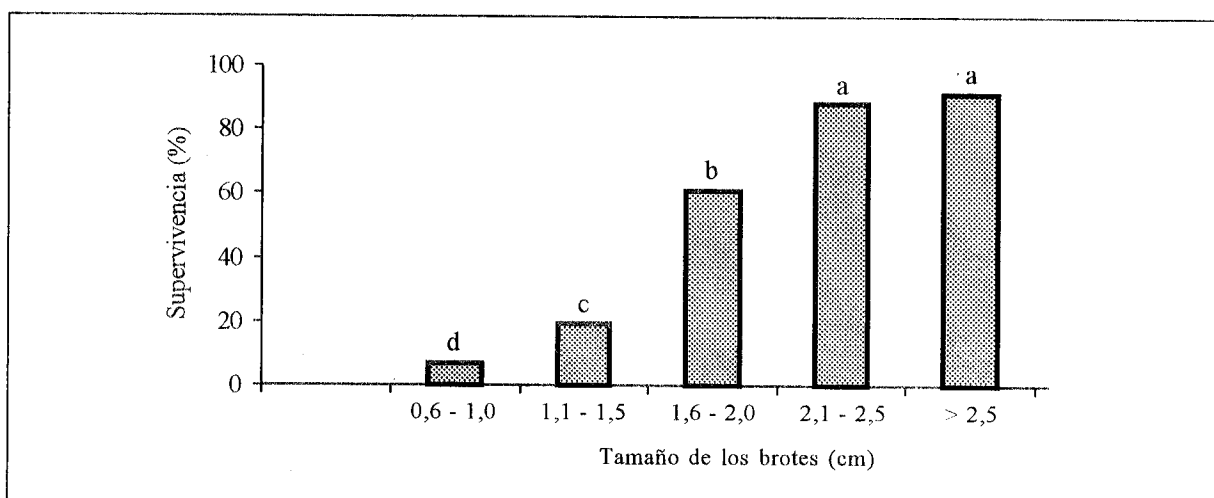


Figura 5. Relación entre la supervivencia durante la fase de aclimatización y el tamaño de las plántulas de *Eucalyptus grandis* propagadas en el sistema de inmersión temporal. Los datos representan la media de tres repeticiones, cada una con 15 brotes.

Figure 5. Relation between the survival during the phase of acclimatization and the size of plántulas of *Eucalyptus grandis* propagated in the temporary immersion system. The data represent the media of three repetitions each one with 15 buds.

*Letras desiguales son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según test de Duncan.

CONCLUSIONES

1. El mayor coeficiente de multiplicación y mejor calidad de las plántulas se logró con una frecuencia de inmersión cada 12 h con una duración de 3 min, con un intercambio adicional de aire cada 6 h durante 3 min.
2. De acuerdo con los resultados obtenidos se determinó que un volumen de 500 mL de medio con nueve explantes correspondió a un

óptimo, que permitió lograr un coeficiente de multiplicación de 11,5 brotes y la mejor calidad de los brotes en términos de una mayor masa seca.

3. El proceso de micropropagación estudiado permitió obtener a partir de nueve explantes, cada uno con cinco brotes, un promedio de 260 plantas competentes de *E. grandis* por litro de medio de cultivo en un período total de seis semanas.

LITERATURA CITADA

- Aitken-Christie, J., T. Kosai, and S. Takayama. 1995. Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. p. 1-18. In Aitken-Christie, J., T. Kozai, and M.A.L. Smith (eds.) I Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Alvard, D., F. Cote, and Y.C. Teisson. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Plant Cell Tissue Organ Cult. 32:55-60.
- Castro, D. 1998. Propagación *in vitro* de árboles elite adultos de *Eucalyptus grandis* L. y *Eucalyptus urograndis*. p. 83 (Resumen). In III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. 1-5 de junio. La Habana, Cuba.

- Escalona, M., J.C. Lorenzo, B. González, M. Daquinta, J.L. Gonzalez, Y. Desjardins, and C.G. Borroto. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* 18:743-748.
- Jones, N.B., and J. Van Staden. 1997. Micropropagation of Eucalyptus. p. 286-330. *In* Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 39. High-tech and micropropagation V. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Kozai, T., B.R. Jeong, Ch. Kubota, and Y. Murai. 1995. Effects of volume and initial strength of medium on the growth, photosynthesis and ion uptake of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets *in vitro*. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 64:63-71.
- Kurata, K. 1995. Automated systems for organogenesis. p. 257-272. *In* Aitken-Christie, J., T. Kozai, and M.A.L. Smith (eds.) *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Lorenzo, J.C., B.L. Gonzalez, M. Escalona, C. Teisson, P. Espinosa, and C. Borroto. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 54:197-200.
- McComb, J.A., and I.J. Bennett. 1986. Eucalyptus (*Eucalyptus* spp.). p. 340-362. *In* Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 1. Trees 1. Berlin, Germany.
- Montgomery, D. 1991. Diseño y análisis de experimentos. p. 589. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A., México, D.F., México.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Salisbury, F.B., y C.W. Ross. 1994. Fisiología vegetal. p. 338. 4ª ed. Editorial Iberoamérica S.A., México D.F., México.
- Teisson, C.Y., and D. Alvard. 1995. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. p. 105-110. *In* Terri, M., R. Cella, A. Falavigna (eds.). *Currents issues in plant molecular and cellular biology. Proceedings of the VIIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*. Florence, Italy, 12-17 June, 1994. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Teisson, C., D. Alvard, B. Berthouly, F. Cote, J.V. Escalant, H. Etienne, and M. Lartaud. 1996. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. *Acta Hortic.* 440:521-526.
- Vichnevetskaia, K. 1997. Factors affecting productivity of tropical forest plantations: Acacia, Eucalypti, Teak, and Pine. p. 45. *Forest Products Division, Forestry Department*. FAO, Rome, Italy.