

# EFECTO DE UN ANÁLOGO DE BRASINOESTEROIDES (MH5) EN LA PROPAGACIÓN DE *Eucalyptus urograndis* EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL

G. A. Palhares, R. Rodríguez, Marieta Cid, D. Pina y J. L. González-Olmedo✉

**ABSTRACT.** Temporary Immersion Bioreactors (TIB) are among the current techniques to reach the quick introduction of new varieties in production. *Eucalyptus urograndis* (*E. grandis* Hill ex Maiden x *E. urophylla*) plantlets were used to increase explant quality in TIB and study the effect of plantlet sizes on survival rates during acclimatization. The application of low concentrations (0.01 and 0.1 mg.L<sup>-1</sup>) of the brassinosteroid analogue MH5 in culture media during the elongation stage increased plant height, leaf number, fresh and dry weights in TIB. During acclimatization stage, the lowest sized seedlings (1.1-2.0 cm high) reached the highest survival rates (63 %) without statistical differences with 2.1-3.0 cm classification. Growth variables (plant height, leaf number and root number) got the highest values in the smallest plantlets (1.1-2.0 cm), with significant differences just with leaf number. Seemingly, it appeared that size factor had very little effect on the survival of *E. urograndis* seedlings during the acclimatization process, rather than the quality of different organs confirming it.

**RESUMEN.** Entre las técnicas actuales para alcanzar la pronta introducción de nuevas variedades a escala productiva, se encuentra la multiplicación mediante biorreactores de inmersión temporal (BIT). Plántulas de *Eucalyptus urograndis* (*E. grandis* Hill ex Maiden x *E. urophylla*) sirvieron como material vegetal, con el objetivo de incrementar la calidad de los explantes en los biorreactores de inmersión temporal y estudiar el efecto que ejercen las tallas de las plántulas en la supervivencia durante su tránsito por la fase de aclimatización. La aplicación del análogo de brasinoesteroides (MH5) a bajas concentraciones (0.01 y 0.1 mg.L<sup>-1</sup>) en los medios de cultivo durante la etapa de elongación incrementó la altura, el número de hojas, las masas fresca y seca de las vitroplantas en los biorreactores de inmersión temporal. Durante la fase de aclimatización, los mayores niveles de supervivencia (63 %) fueron alcanzados por las plántulas clasificadas con la talla de 1.1-2.0 cm, aunque no mostraron diferencias estadísticas con la clasificación de 2.1-3.0 cm. Las variables de crecimiento (longitud, número de hojas y raíces emitidas) lograron los valores más altos en las plántulas clasificadas con las menores tallas (1.1-2.0 cm), donde se observaron diferencias significativas únicamente en el número de hojas. Al parecer no es la talla la variable que tiene mayor efecto en la supervivencia de las plántulas de *E. urograndis* durante la aclimatización, sino la calidad de los diferentes órganos que la conforman.

**Key words:** adaptation, bioreactors, brassinosteroids, vegetative propagation, *Eucalyptus urograndis*

**Palabras clave:** adaptación, biorreactores, brasinoesteroides, propagación vegetativa, *Eucalyptus urograndis*

## INTRODUCCIÓN

El género Eucalipto contiene más de 500 especies, de las cuales la más ampliamente plantada en el mundo es *Eucalyptus grandis*, con un área estimada en dos millones de hectáreas (1).

En Cuba, en los últimos años, se han introducido y probado más de 50 especies de eucaliptos, algunas de las cuales se han adaptado muy bien a determinadas localidades y constituyen, conjuntamente con introduc-

ciones anteriores, un potencial productivo de gran significación, por sus múltiples usos como madera para las construcciones, mobiliarios, chapas, aglomerados, energía, laminados, cujes para el secado del tabaco, etc, siendo la demanda de los productos mayor que la oferta (2).

El empleo de las técnicas biotecnológicas en la propagación de eucaliptos ha permitido acelerar la introducción de nuevos clones con características favorables, pero los costos de producción siguen siendo la mayor dificultad para su uso masivo. La automatización de algunas de las fases de la organogénesis y la embriogénesis somática puede solucionar estas restricciones, ya que permiten reducir la mano de obra y los costos de producción (3).

La utilización de cultivo de especies vegetales en medios líquidos es una importante alternativa para incrementar volúmenes de producción, con bajos costos y en

G. A. Palhares, Especialista; Ms.C. R. Rodríguez, Investigador Agregado del Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos; Marieta Cid y D. Pina, Especialistas en Propagación de Plantas y Dr.C. J. L. González-Olmedo, Investigador Titular, Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila (UNICA), Carretera a Morón km 9, CP 64950, Ciego de Ávila.

✉ justo@bioplantas.cu

reducidos espacios (4). Así se ha logrado con éxito el empleo de biorreactores de inmersión temporal (5) en especies como caña de azúcar (6), café (7, 8), piña (9) bananos y plátanos (10), y también en eucaliptos, específicamente en el cultivar *grandis* (11). En relación con este último trabajo, varias de las condiciones de cultivo: número de explantes, volumen de medio por explante, frecuencia y tiempo de la inmersión, generalidades de las fases de multiplicación y elongación, también funcionaron adecuadamente en *E. urograndis*.

Teniendo en cuenta las posibilidades que brindan el empleo de los sistemas semiautomatizados y la existencia de un protocolo de propagación para los *Eucalyptus grandis* (11) y sus favorables resultados cuando esta metodología ha sido transferida al clon *E. urograndis*, presentan solamente problemas en la elongación de las plantas en la última fase *in vitro*. Conociendo los efectos que ejercen los análogos de brasinoesteroides sobre la elongación, la división celular, el desarrollo vascular y el reproductivo, y su amplio uso en los trabajos de biotecnología vegetal, es que se decide evaluar el análogo MH5 en este trabajo.

Por todo lo anteriormente planteado, es que el objetivo de este trabajo fue determinar las concentraciones de un análogo de brasinoesteroide (MH5) que favorezcan una mejor calidad de plantas de *E. urograndis* propagadas mediante biorreactores de inmersión temporal (BIT) y evaluar el efecto de diferentes clases según sus tallas sobre la supervivencia en condiciones de aclimatización.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Multiplicación in vitro de E. urograndis.* Se empleó el protocolo descrito para la multiplicación de esta especie (11), al cual se le realizaron algunas modificaciones, especialmente en los reguladores del crecimiento en la fase de elongación, para estimular un mejor desarrollo de los brotes y evaluar su efecto en el porcentaje de supervivencia en la fase de aclimatización. Los experimentos desarrollados se describen a continuación:

### • Efecto del empleo del análogo de brasinoesteroides MH5 en la elongación de los brotes de *E. urograndis* en biorreactores de inmersión temporal

En la fase de elongación de los brotes en los biorreactores de inmersión temporal, se empleó el ácido indolbutírico (AIB) a  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ , concentración establecida en la metodología (11) y el análogo de brasinoesteroides MH5 que es una formulación, producida por el Centro de Estudios de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad de La Habana, la cual tiene como ingrediente activo un análogo espirostánico trihidroxilado de brasinoesteroides en una concentración de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ; de sus aplicaciones independientes y combinadas resultaron los siguientes tratamientos:

Tratamientos	AIB ( $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ )	MH5 ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
1	-	0.00
2	-	0.01
3	-	0.10
4	-	1.00
5	0.5	0.00
6	0.5	0.01
7	0.5	0.10
8	0.5	1.00

El diseño experimental empleado fue un bifactorial (AIB x MH5) completamente aleatorizado con tres repeticiones. En el momento final del experimento (a los 21 días), en 30 plantas (10 por cada repetición) se evaluaron las siguientes variables: longitud de los explantes (cm), número de hojas/explante, masa fresca/explante (g) y masa seca/explante (g).

### • Aclimatización *ex vitro* de *E. urograndis* provenientes de biorreactores de inmersión temporal

Plántulas de *Eucalyptus urograndis* multiplicadas (11) y elongadas con  $0.01 \text{ mg.L}^{-1}$  de MH5 se emplearon en este experimento.

En el momento de salida de la última fase *in vitro*, las plántulas se clasificaron en tres categorías, basándose en su talla: 1.1–2.0 cm, 2.1–3.0 cm, 3.1–4.0 cm.

De cada categoría se emplearon grupos de 30 plántulas, las que se plantaron en una combinación de zeolita + cachaza (1/1, v/v) como sustrato. Las bandejas se colocaron en casas de aclimatización en condiciones controladas de luminosidad ( $600 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y donde se utilizó un sistema de riego automatizado que garantizaba humedad relativa superior al 90 %. Se evaluó la dinámica del comportamiento de la supervivencia de las plántulas cada 10 y hasta los 40 días de permanencia en estas condiciones ambientales, así como los incrementos en longitud, número de hojas y raíces.

Para el procesamiento estadístico de los resultados, se utilizó el utilitario STAGRAFIC PLUS. Se realizaron análisis paramétricos (ANOVA, prueba de LSD  $P < 0,05$ ) después de chequeada la distribución normal (Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (Bartlett).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del cultivo en biorreactores de inmersión temporal de *E. urograndis* durante las tres semanas que permanecieron en medios enriquecidos con auxinas y un análogo de brasinoesteroides, se exponen en la Tabla I.

La tabla muestra los efectos de los reguladores del crecimiento empleados para estimular la elongación de los brotes. En particular, permite definir la actividad del brasinoesteroide con respecto a la auxina empleada, ya que como puede comprobarse en el orden cuantitativo, la mayoría de las variables estudiadas fueron superiores en los brotes tratados con el brasinoesteroide solo con respecto a su combinación con el ácido indol butírico.

**Tabla I. Efecto de los reguladores sobre variables del crecimiento evaluadas en los brotes de *E. urograndis* durante la etapa final de la fase de elongación en BIT**

Tratamientos	AIB (0.5 mg.L <sup>-1</sup> )	MH5 (mg.L <sup>-1</sup> )	Altura (cm)	No. hojas	Masa fresca (g)	Masa seca (g)
1	-	0.00	1.07 d	9.20 b	0.192 c	0.032 c
2	-	0.01	1.45 a	11.00 a	0.271 ab	0.050 a
3	-	0.10	1.48 a	10.04 ab	0.241 b	0.047 a
4	-	1.00	1.24 bc	8.08 c	0.177 d	0.030 c
5	0.5	0.00	1.08 d	9.52 b	0.206 c	0.045 ab
6	0.5	0.01	1.14 cd	9.76 b	0.221 bc	0.040 b
7	0.5	0.10	1.29 b	9.60 b	0.300 a	0.050 a
8	0.5	1.00	1.14 cd	10.28 ab	0.199 c	0.030 c

Los datos de no. de hojas se transformaron para el análisis según  $X'=(x)'0.5$ . Los tratamientos con letras diferentes indican significación (ANOVA, LSD Test  $p<0.05$ ) ( $n=30$ )

Los tratamientos con solo el brasinoesteroide en las menores dosis lograron los mejores efectos sobre las variables medidas en los brotes, en especial sobre la longitud de estos como principal propósito de este experimento. Estos resultados demuestran que el análogo superó significativamente al tratamiento control y al de AIB.

Por otro lado, es interesante destacar que fueron precisamente en las más bajas concentraciones de MH5 en las que se obtuvieron los mejores resultados, las cuales no mostraron diferencias significativas entre ellas pero sí con la dosis de mayor concentración.

Es válido resumir los efectos de los tratamientos estudiados, con el objetivo de incrementar la talla de los brotes, mediante la comparación de los incrementos logrados en cada uno de ellos. El promedio de altura que alcanzaron los brotes en los biorreactores de inmersión temporal durante la fase precedente de multiplicación, considérese momento cero de la elongación, fue de 0.92 cm. En tal sentido, durante las tres semanas en esta fase las plantas tratadas con el medio MS solo incrementaron su talla en 0.15 cm, mientras que en 0.16 cm lo hicieron las suplementadas con el ácido indol butírico. La mejor combinación (0.5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB+0.1 mg.L<sup>-1</sup> de MH5) aumentó la altura promedio de

los brotes en 0.37 cm, cuando la aplicación de solo MH5 a la dosis más baja de 0.01 mg.L<sup>-1</sup> logró un incremento de 0.53 cm.

Además del valor práctico de las adiciones del análogo de brasinoesteroides al medio de cultivo, para mejorar la calidad de los brotes de *E. urograndis* cultivados en los biorreactores de inmersión temporal, los resultados confirman la aplicación adecuada de manejos oportunos del cultivo de eucaliptos en medios líquidos mediante la inmersión temporal.

Las imágenes de la Figura 1 junto con los resultados cuantitativos alcanzados por las plantas y mostrados en la Tabla I permiten con claridad llegar a conclusiones al respecto.

En la Figura 1 se puede observar un acercamiento de los explantes de forma individual. En ella solo se aprecian los tratamientos con brasinoesteroides empleados en el experimento y el control en el momento de salida de la fase de elongación en BIT.

Es evidente que en los tratamientos a los cuales se les aplicaron las más bajas concentraciones de MH5, se alcanzaron los mayores niveles de elongación, además de apreciarse un mayor número de hojas con respecto a los demás tratamientos. Por otro lado, se puede concluir que es necesaria la aplicación de alguna hormona que estimule la elongación en esta fase, ya que los resultados alcanzados por las plantas en el medio MS así lo demuestran.

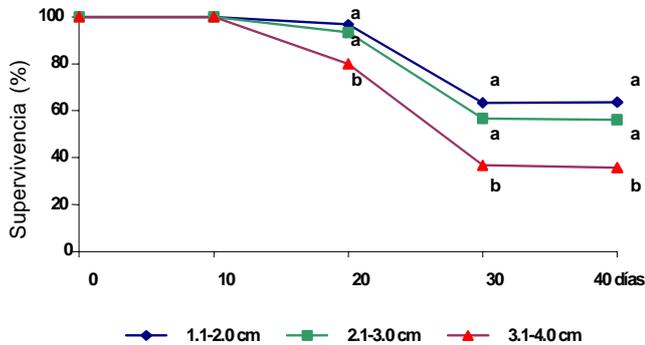
Si bien los resultados alcanzados en esta fase fueron positivos, básicamente en lo referido al crecimiento y desarrollo de los brotes, un objetivo importante de ella, el enraizamiento, solo se hizo evidente en uno de los grupos experimentales. Comoquiera que se prefiere solo inducir el sistema radical *in vitro*, y lograr su emisión y desarrollo *ex vitro*, acorde a patrones de enraizamiento directo (12), vale comprobar durante la aclimatización si también el MH5 fue eficiente en el cumplimiento de este propósito, factor relevante para la supervivencia y dinámica, tasa de crecimiento y desarrollo de las plántulas en los ambientes *ex vitro*.



**Figura 1. Efecto de los tratamientos con brasinoesteroides en la elongación de los explantes de *Eucalyptus urograndis* al finalizar la fase de elongación en BIT**

✱ **Aclimatación *ex vitro* de *E. urograndis* provenientes de biorreactores de inmersión temporal**

En la Figura 2 se aprecia el comportamiento de la supervivencia y la influencia de la calidad de los explantes de *E. urograndis* durante el tiempo de permanencia de las plántulas en las condiciones de aclimatación.



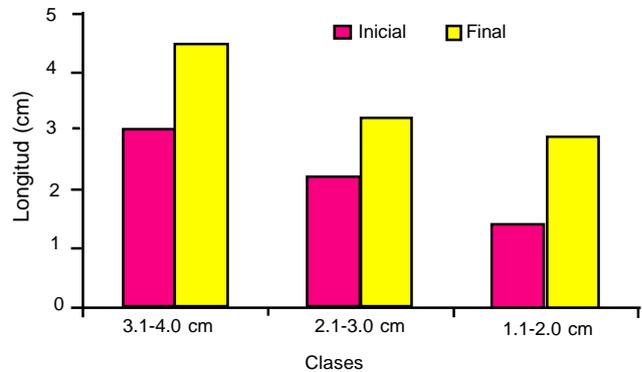
**Figura 2. Dinámica de la supervivencia alcanzada por las diferentes clasificaciones de plántulas de *E. urograndis* provenientes de BIT durante la aclimatación. Para el análisis los datos se transformaron según  $X' = 2 \arcsen((x/100)^{0.5})$ . Para cada momento de evaluación, medias con letras diferentes indican significación (ANOVA, LSD,  $p < 0.05$ ) ( $n = 30$ )**

Es evidente que en los primeros 10 días en condiciones de aclimatación, independientemente de la calidad, las plántulas no sufrieron pérdida alguna; luego de esta etapa se observan niveles de mortalidad, siendo más acentuada en las plantas que poseían mayores tallas, apreciándose diferencias estadísticas con respecto a las demás clasificaciones. Entre los 20 y 30 días se registró una marcada mortalidad en todos los tratamientos, sin variar el comportamiento estadístico. Los mayores niveles de supervivencia fueron obtenidos por las plántulas clasificadas con las tallas de 1.1-2.0 y 2.2-3.0 cm, ya que no mostró diferencias estadísticas entre ellas.

La calidad del material vegetal en el momento de salida de las condiciones *in vitro* a *ex vitro*, tiene gran responsabilidad en los porcentajes de supervivencia; aunque no es la talla la variable que tiene el mayor efecto en la supervivencia de las plántulas, sino la calidad de los diferentes órganos que la conforman. En las categorías de tallas mayores se observó un intenso color verde del follaje y un enrollamiento parcial de las últimas hojas emitidas, lo que al parecer pudiera ser un efecto menor de hiperhidratación, aunque no se evaluó histológicamente esta característica, pero sí es conocido que este síntoma es frecuente cuando se usan medios líquidos.

Por otra parte, las plantas de menores categorías fueron las que alcanzaron mayores incrementos en longitud, número de hojas y número de raíces, lo que colaboró a alcanzar los mayores niveles de supervivencia.

Entre las variables de crecimiento más evaluadas se encuentran la longitud, el número de hojas emitidas y el número de raíces. La Figura 3 muestra el incremento en longitud alcanzado por las diferentes categorías de plantas durante su permanencia en las condiciones de aclimatación.



Clases	3.1-4.0 cm	2.1-3.0 cm	1.1-2.0 cm	ES X
Incremento (cm)	1.4 a	1.04 b	1.48 a	0.25

**Figura 3. Longitud alcanzada por las plántulas de *E. urograndis* durante la permanencia en aclimatación. Los análisis estadísticos se realizaron a los incrementos de cada clase; para ello los datos se transformaron según  $X' = 2 \arcsen(x/100)$ . Los tratamientos con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba DLS,  $p < 0.05$ ) ( $n = 30$ )**

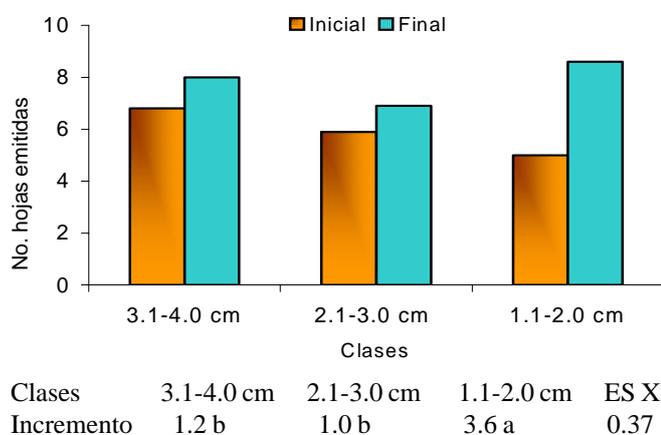
En la figura se aprecia cómo las plántulas clasificadas con las mayores tallas, aunque no difirieron estadísticamente de las menores clasificaciones, lograron los más altos valores de longitud al finalizar la etapa de aclimatación, observándose diferencias significativas con las plantas de talla mediana.

Aunque no es muy común observar que las plántulas de menor talla sean las que mayores porcentajes de supervivencia y longitud alcancen en la fase de aclimatación, sí es muy conocido que la calidad fisiológica y anatomorfológica alcanzada por las plantas en condiciones *in vitro* juega un papel determinante durante la permanencia de ellas en la fase de aclimatación (13).

Como resultado del ambiente *in vitro*, las plantas desarrollan una anatomía y fisiología diferentes a las plantas cultivadas en condiciones de campo o casas de cultivo (14). Entre ellos, se afectan todos los órganos de la planta, aunque no todos tienen la misma significación sobre el comportamiento *ex vitro*.

Las plántulas de *E. urograndis* de la menor clasificación, presentaban una mayor conformación y calidad del follaje comparadas con las demás categorías evaluadas, siendo esta diferencia más marcada con las plántulas de mayor talla, en las que se observaban síntomas de hiperhidratación en las hojas más jóvenes, lo que pudo incidir en un favorable metabolismo de ellas y por ello una mayor elongación durante la aclimatación. Cuando se

analizan los niveles de emisión foliar por los distintos grupos de plantas evaluados durante la etapa de aclimatización, se observa cómo las plántulas que se clasificaron con menor talla también son las que alcanzan los mayores valores en la emisión de hojas (Figura 4).



**Figura 4. Número de hojas de las plántulas de *E. urograndis* durante su permanencia en fase de aclimatización. Los análisis estadísticos se realizaron a los incrementos de cada clase; para ello los datos se transformaron según  $X'=(x)^{0.5}$ . Los tratamientos con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba LSD,  $p < 0,05$ ) ( $n=30$ )**

En la figura se aprecia cómo las plántulas de la menor categoría nuevamente son las que mayores niveles de emisión foliar alcanzan, manteniendo diferencias significativas con las plantas de las tallas superiores, no encontrándose diferencias estadísticas entre estas últimas.

En la mayoría de las especies que se han estudiado, el mesófilo de las hojas en condiciones *in vitro* posee un tejido en empalizada pobremente desarrollado, generalmente formado por una sola capa de células, y fundamentalmente compuesto por tejido esponjoso con grandes espacios intercelulares (15). Ello limita que tengan una óptima funcionalidad, por lo que la emisión de nuevas hojas en condiciones *ex vitro* provoca directamente un mayor crecimiento y desarrollo de las plántulas, ya que alcanza una mayor actividad fotoautotrófica en estas condiciones.

Las hojas son los órganos de reserva de la mayoría de las especies vegetales, por lo que la calidad de ellas, así como su número total, tienen efectos directos para alcanzar resultados satisfactorios durante la fase de aclimatización.

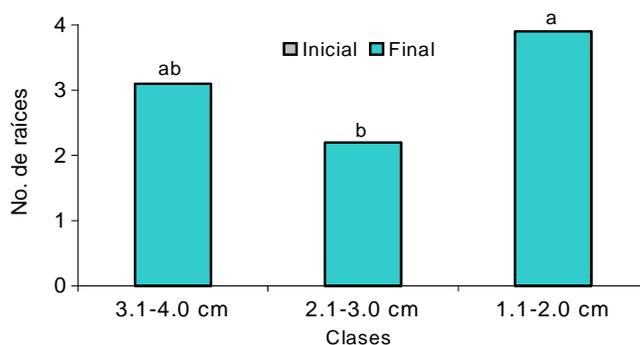
Las hojas como protagonistas de la formación de fotosintatos para el normal desarrollo de las plántulas, en las condiciones *in vitro*, son empleadas solo como almacén de sustancias carbonadas que son útiles en el crecimiento y desarrollo de ellas, luego de ser transferidas a condiciones *ex vitro*, donde mantienen esta función hasta tanto no exista una nueva emisión foliar con mejores características anatómicas que les garanticen acciones metabólicas especializadas (16).

Estos resultados a la vez están acorde con los mayores niveles de supervivencia y con los incrementos en longitud alcanzados en las figuras descritas anteriormente; es obvio que los niveles de acumulación de sustancias fotosintéticas deben ser superiores en las plantas de esta clasificación, por poseer un mayor número de hojas fotosintéticamente activas, lo que indica un mayor crecimiento y desarrollo de las plántulas.

Por otro lado, el número de raíces emitidas durante la permanencia de las plántulas en la aclimatización fue también superior en las plantas clasificadas con la menor categoría, aunque no se apreciaron diferencias significativas con las de mayor talla, sí se observaron entre estas con las plantas de las clases intermedias (datos no mostrados).

Estos resultados demuestran la necesidad de que en futuros trabajos se deba valorar la posibilidad de emplear tratamientos adicionales en condiciones *in vitro*, que permitan un mayor grado de fotoautotrofismo de las plantas en condiciones *in vitro*, para con ello garantizar una mejor funcionalidad de estos órganos, y así alcanzar mayores niveles de supervivencia y constantes tasas de crecimiento y desarrollo durante la aclimatización (17).

Por otro lado, el número de raíces emitidas durante la permanencia de las plántulas en la aclimatización fue también superior en las plantas clasificadas con la menor categoría; aunque no se aprecian diferencias significativas con la de mayor talla, sí se puede observar esta con las plantas de las clases intermedias (Figura 5).



**Figura 5. Número de raíces emitidas por las plántulas durante su permanencia en la fase de aclimatización. Para el análisis estadístico los datos se transformaron según  $X'=(x)^{0.5}$ . Los tratamientos con letras diferentes indican significación (ANOVA, prueba LSD,  $p < 0,05$ ). Cada dato representa la media para  $n=30$ . ES X= 0.37**

Aunque en el momento inicial las plántulas no poseían un sistema radical establecido, este estaba ya previamente inducido en las condiciones *in vitro*; esta inducción colabora a la pronta emisión de las raíces cuando son transferidas a condiciones *ex vitro*. Teniendo en cuenta que también fueron las clases pequeñas las que mayor número de hojas emitió y que las hojas son fuente de producción natural de auxina, no resultan alarmantes los niveles de emisión de raíces alcanzados por esta categoría.

## REFERENCIAS

1. Eldridge, K.; Davidson, J.; Harwood, C. y Van Wyk, G. *Eucalyptus* domestication and breeding. New York : Oxford University Press, 1994, 281 p.
2. Betancourt, A. Silvicultura especial de árboles maderables tropicales. La Habana : Editorial Científico-Técnica, 1987, p. 427.
3. Kitto, S. Commercial micropropagation. *HortScience*, 1997, vol. 32, no. 6, p. 1012-1014.
4. Aitken-Christie, J.; Kozai, T. y Takayama, S. Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. En: Automation and environmental control in plant tissue culture. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1995, p. 1-18.
5. Teisson, C.; Alvard, D.; Berthouly, B.; Cote, F.; Escalant, J. V.; Etienne, H. y Lartaud, M. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. *Acta Hort.*, 1996, vol. 440, p. 521-526.
6. Lorenzo, J. C.; González, B. L.; Escalona, M.; Teisson, C.; Espinosa, P.; Borroto, C. G. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, vol. 54, p. 197-200.
7. Etienne, E.; Teison, C.; Alward, D.; Lartaud, M.; Berthouly, M.; Georget, F.; Escalona, M. y Lorenzo, J. C. Temporary immersion for plant tissue culture. En: Plant Biotechnology and *in vitro* Biology (21:1999:Holanda). p. 629-632.
8. Etienen, H. y Berthouly, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, vol. 69, p. 215-231.
9. Escalona, M. Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L) Merr) en sistemas de inmersión temporal. [Tesis de grado]; Universidad de Ciego de Ávila, 1999.
10. Daquinta, M.; Barrera L.; Lezcano, Y.; Mosqueda, O.; Escalona, M. y Borroto, C. G. Efecto de la oscuridad en la multiplicación *in vitro* del banano FHIA-18 en los sistemas de inmersión temporal. Libro de Reportes Cortos. En: Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. (5:1999:La Habana). p. 187.
11. Castro, D.; Rodríguez, R. y González J. L. Propagación mixotrófica de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden en biorreactores de inmersión temporal. Bioveg 2001. Libro Reportes Cortos. En: Taller Internacional de Biotecnología Vegetal. (2001:Ciego de Avila). p. 216.
12. Geneve, R. L. Adventitious root initiation in reciprocally grafted leaf cutting from the juvenile and nature phase of *Hedera helix*. L. *Journal of Experimental Botany*, 1996, vol. 42, p. 65-69.
13. Rodriguez, R.; Escalona M.; Rodriguez Y.; Cid, M. y González, J. L. Acclimatización de vitroplantas de caña de azúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) provenientes de sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 3, p. 51-56.
14. Pospisilova, J.; Catsky, J. y Sestak, Z. Photosynthesis in plants cultivated *in vitro*. En: Handbook of photosynthesis, 1997, p. 525-540.
15. Majada, J. P.; Tadeo, F.; Fal, M. A. y Sanchez-Tames, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, vol. 63, p. 207-214.
16. Van Huylbroeck, J. M.; Piqueras, A. y Debergh, P. C. The evolution of photosynthesis capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. *Plant Science*, 2000, vol. 155, p. 59-66.
17. Preece, J. E. y Sutter, E. G. Acclimatization in micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Micropropagation. Kluwer Academic publishers, 1991, p. 71-93.

Recibido: 11 de febrero de 2003

Aceptado: 17 de junio de 2003

# DIPLOMADOS

Precio: 2000 USD

## *Métodos para contrarrestar el efecto nocivo de la salinización de los suelos*

Coordinador: Dra. C. María C. González Cepero

Duración: 1 año

### SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr. C. Walfredo Torres de la Noval  
Dirección de Educación, Servicios Informativos  
y Relaciones Públicas  
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)  
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,  
La Habana, Cuba. CP 32700  
Telef: (53) (64) 6-3773  
Fax: (53) (64) 6-3867  
E. mail: posgrado@inca.edu.cu