

## EL CULTIVO *IN VITRO* EN EL MEJORAMIENTO DE PASTOS Y FORRAJES. II. MICROPROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA

**A.R. Mesa, G. Lajonchere y Odalys Toral**

**Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"  
Matanzas, Cuba**

En la primera parte de esta reseña se abordó, dentro de las técnicas de cultivo *in vitro* para el mejoramiento de pastos y forrajes, la variación somaclonal, pero existen otras biotécnicas que tienen amplias perspectivas de aplicación inmediata en la agricultura y el mejoramiento genético, como son la propagación masiva, el saneamiento para diversas enfermedades y la conservación e intercambio de germoplasma *in vitro*. En la actualidad, debido al rápido avance que ha tenido la biología hacia el estudio de los niveles moleculares y subcelular de los organismos, ha traído consigo metodologías nuevas para el mejoramiento de plantas.

La micropropagación ha sido exitosamente aplicada en muchos cultivos con propagación lenta, así como los que presentan características reproductivas no deseables, como la producción de semillas con un alto grado de heterocigosis, que atentan contra la homogeneidad de las plantaciones en la agricultura de alta producción.

Por otro lado, la conservación *in vitro* permite la posibilidad de almacenar, por un tiempo considerable, un banco de genes útiles a los fitomejoradores, con incalculables beneficios tanto prácticos como biológicos.

Tanto para la micropropagación acelerada como para la conservación *in vitro* de variedades y especies, el fenómeno de la regeneración de órganos o plantas completas es determinante.

Muchos cultivos agrícolas han sido difíciles de manipular *in vitro* y la regeneración ha resultado problemática. En los últimos años los progresos en estas técnicas biológicas han

sido tan significativos que la mayoría de las especies pueden ahora ser regeneradas.

El objetivo de esta reseña es reafirmar la aplicación de la micropropagación acelerada y la conservación *in vitro* de germoplasma como técnicas necesarias para un programa de mejoramiento de pastos y forrajes.

### **MICROPROPAGACIÓN ACELERADA**

La "micropropagación" es una técnica que consiste en reproducir plantas semejantes a la planta madre a través de la estimulación de las capacidades naturales de multiplicación vegetativa de la especie, o por la inducción de una nueva organogénesis de yemas y raíces (Auge y Boccon-Gibod, 1984). Incluso se pueden reproducir plantas completas a partir de una célula viva y todo individuo del reino vegetal puede ser cultivado por esta técnica.

Es conveniente aclarar que el término "micropropagación" puede aparecer en la literatura con otros nombres como: "propagación clonal" (Jiménez, 1992), "multiplicación vegetativa *in vitro*" (Griza, Tejklová y Novák, 1984), entre otros menos usados.

En sentido general, la característica distintiva de dicha multiplicación es mantener intacto el patrimonio genético del material vegetativo, por lo que las nuevas plantas deberán ser idénticas a la donante, sin considerar el cultivo de anteras o de óvulos que tiende a obtener plantas haploides.

Esta técnica está modificando en la actualidad las más comúnmente empleadas en la reproducción y propagación de plantas,

aportando múltiples ventajas en su uso (Jiménez, 1992). Aunque no es cuantificable con exactitud el número de especies que ahora se propagan, se considera que son cerca de 1 000 (Murashige y Huang, 1987), pero no todas han sido evaluadas para su propagación comercial. Los mayores volúmenes se concentran en Estados Unidos y países de Europa del Oeste; también en Asia se ha empleado la micropropagación en la floricultura y horticultura, fundamentalmente.

En los momentos actuales, la micropropagación como biotécnica va logrando cada vez más importancia y se está utilizando con los más diferentes fines en las investigaciones científicas, así como en las grandes producciones agrícolas, que demandan una alta densidad de población como la papa, el plátano y la caña de azúcar, lo cual justifica la producción inicial de material de propagación, de una alta pureza genética y fitosanitaria.

### **Métodos más usados en la micropropagación acelerada**

De la propagación *in vitro* se han desarrollado muchos métodos, entre los cuales dos, el de la formación acelerada de yemas axilares y el de la producción de yemas adventicias, tienen amplio uso. Un tercer método, el de embriogénesis somática, está presentando un potencial excepcional para la propagación *in vitro* (Schilde-Rentschier y Schmiediche, 1984).

La formación de yemas axilares es poco usada en gramíneas a causa de su morfología, por lo que es más aplicada en leguminosas y otras plantas pratenses y forrajeras.

*Prosopis cineraria*, una especie arbórea desértica para diversos fines, entre ellos el de forrajera, es factible de micropropagar a través de este método, con el que se logran de 3 a 5 plantas de una simple yema en medio MS + 3 mg/l de IAA + 0,05 mg/l de kinetina y

multiplicada en medio MS sin hormonas (Qoyal y Arya, 1984).

La diferenciación de brotes adventicios permite la regeneración de una mayor cantidad de brotes que el sistema de yemas axilares, aunque la estabilidad genética no es alta fundamentalmente en la formación de ápices a partir de callos originados del explante (Santana, 1994).

No obstante, Lo, Chen y Ross (1980) lograron atenuar esta dificultad y propagar 5 especies forrajeras temporales con el uso adecuado de hormonas.

Vasil (1986), después de realizar numerosas observaciones en gramíneas, concluyó que la embriogénesis somática mantiene una alta estabilidad genética relativa y uniformidad en la regeneración de plantas, debido a que los embriones son formados mayoritariamente por células que no sufrieron mutaciones. Las células haploides y poliploides son propensas para formar organogénesis, provocando variación somaclonal, por lo que Kohienbach (1985) recomienda la embriogénesis como propagación a gran escala de genotipos de plantas.

Lu y Vasil (1981) implantaron embriones inmaduros e inflorescencias jóvenes de *Panicum maximum* en un medio MS + 1 mg/l de 2,4-D + 2,5% de agua de coco (CM) para iniciar los cultivos en suspensión celular. Ellos obtuvieron una marcada embriogénesis y los embrioides germinaron en un medio libre de hormonas con suplemento de 0,2 mg/l de 2,4-D. Las plantas obtenidas mostraron un número normal de cromosomas somáticos  $2n = 4x = 32$ .

También en *Panicum mileaceum* se obtuvo embriogénesis y las plantas regeneradas fueron idénticas a la donante, con un número normal de cromosomas  $n = 7$  (Heyser y Nabors, 1982).

Por otra parte, Chandier y Vasil (1984) plantean que se pueden obtener 25 000 plantas de un simple segmento de hojas en *Pennisetum purpureum*.

### **Objetivos que se persiguen con la micropropagación de plantas**

Estos tres métodos explicados anteriormente se pueden usar de forma individual o combinada para lograr un conjunto de objetivos (Orellana, 1992), entre los que se encuentran:

- a) Aumentar la velocidad de propagación en especies de multiplicación vegetativa natural lenta y plantas heterocigóticas.
- b) Propagar variedades útiles y nuevas variedades surgidas del programa de mejoramiento.
- c) Micropropagar individuos libres de enfermedades.
- d) Reproducción de plantas genéticamente idénticas para ser utilizadas en programas de mejoramiento o producción de semillas híbridas.
- e) Exportación o importación de plantas o semillas.
- f) Reducir los costos de producción, así como los de transportación de semillas.
- g) Producción de plantas y otros órganos de forma estable durante todo el año.

Independientemente de la importancia de cada uno de estos objetivos, se hará referencia a los tres primeros por su gran utilidad en el mejoramiento genético de pastos y forrajes y otras especies de interés agrícola.

#### **a) Aumentar la velocidad de propagación en especies de multiplicación vegetativa natural lenta y plantas heterocigóticas.**

Las plantas de reproducción por vía agámica encuentran en la micropropagación una importante forma de propagación acelerada, que las hace tan ventajosas como las de reproducción por vía gámica.

Por ejemplo, el modo de propagación de *Cynodon dactylon* es vegetativo, por lo que la biotecnología puede jugar un importante papel. Esta especie puede micropropagarse a través de la embriogénesis somática, según lo

apuntado por Artunduaga, Taliaferro y Johnson (1988). Igualmente sucede con *Digitaria decumbens* (Cheng, 1985).

Cuando se cuenta con un alto grado de heterocigosis en plantas alógamas, se pueden obtener con la micropropagación plantas idénticas a la donante, con lo que se logran plantaciones muy homogéneas. Esto puede justificarse en cultivos de alto valor botánico y/o agrícola.

Con fines forestales y de alimentación del ganado, se han llevado a cabo importantes investigaciones, fundamentalmente en leucaena. La autocompatibilidad entre las diferentes especies de este género, ha permitido obtener semillas híbridas heterocigóticas, lo que no hace posible una rápida propagación. Goyal, Bingham y Felker (1985) y Franclet (1989), a través de la micropropagación *in vitro*, solucionaron este problema al obtener miles de individuos idénticos al donante a partir de yemas axilares.

#### **b) Propagar variedades útiles y nuevas variedades surgidas del programa de mejoramiento.**

El cultivo *in vitro* es una poderosa herramienta para el mejoramiento genético de las plantas, ya que a través de este pueden multiplicarse rápidamente las nuevas variedades surgidas. De esta manera resulta más breve la preparación del suficiente material para las posteriores evaluaciones de campo (Churová, 1984; Benbadis, 1989) y su introducción en la producción comercial.

La eficiencia de este método justifica su uso hasta en especies de fácil propagación gámica, como es el caso de *Leucaena leucocephala* (Glovak y Greatbatch, 1981; Bray, 1984), que tiene posibilidades de producir por encima de 40 000 plantas en 6 meses.

Dhawan y Bhojwani (1985) obtuvieron una tasa de multiplicación entre 9 y 10 para un método de activación de yemas axilares de

segmentos nodales con nivel hormonal de 0,5 mg/l de 6 BAP. Más tarde, perfeccionando aún más la técnica y usando además 0,025  $\mu$ m de IBA, Hisajima, Chongpraditnum, Osaka y Arai (1987) lograron obtener de un simple brote, 1 600 000 individuos genéticamente iguales en un plazo de un año.

En Cuba se ha trabajado en este sentido con el Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.). Mesa, La-jonchere y Prieto (1995) seleccionaron un método con una buena eficiencia y coeficiente de multiplicación, que garantiza un potencial de 3 000 000 de vitroplantas en menos de un año a partir de una yema axilar tomada como explante.

En estudios preliminares de *Digitaria eriantha* realizados en la región de Sudáfrica, Watt, Mycock y Cresswell (1989) encontraron un sistema para micropropagar esta especie por embriogénesis somática, que consta de sales nutritivas MS + 1 mg 1 de 2,4-D, altas concentraciones de sacarosa (80 g/l) y agua de coco en la fase de implantación. Para la regeneración, el uso del agua de coco y 3 g/l de prolina tuvo muy buenos resultados.

En ocasiones, tratando de cumplir otros objetivos, se han encontrado resultados para micropropagar especies de pastos, como es el caso de *Sorghum bicolor* y *Cenchrus ciliaris*. Murty (1992) comprobó que la embriogénesis de ambas especies es de alta estabilidad genética, con una fácil respuesta a la regeneración, y se obtiene un número considerable de individuos de un explante inicial.

*Lolium multiflorum* se puede propagar con fines de producción de semillas y experimentación, ya que se obtuvieron 8 000 plantines de un simple hijo en un período de 3 meses (Dale, 1984).

A través de la embriogénesis somática en alfalfa en suspensión celular, Brown, Bowley. McKersie, Senaratna y Bewley (1989) han obtenido 300 000 embriones por un gramo de explante en 54 días utilizando un protocolo de ocho pasos.

Existen otros cultivos que, aunque se perpetúen a través de semillas, presentan serias dificultades para obtener en breve tiempo una suficiente cantidad de las mismas. En el café es justificable este método (Villalobos, 1989), teniendo en cuenta que es necesario esperar algunos años para lograr las primeras producciones de sus frutos, lo que frena en parte los grandes programas de plantación.

En la caña de azúcar se han obtenido importantes avances por diferentes instituciones científicas cubanas, las cuales han logrado un alto coeficiente de multiplicación, por lo que se pueden regenerar millones de vitroplantas a partir de un meristemo en cuestión de varios meses (Kosky, 1992).

Esta técnica trae consigo un aumento del rendimiento entre el 15 y 30% en dependencia del genotipo durante la primera multiplicación en campo, dado fundamentalmente por el incremento del número de tallos (Santana, 1994).

### **c) Micropropagar individuos libres de enfermedades.**

La micropropagación tiene implícitos otros objetivos, como el saneamiento a través del cultivo de meristemas, mediante el cual pueden eliminarse numerosas enfermedades virales de cultivares infestados. Este principio se sostiene a causa de la mayor velocidad de división celular del meristemo vegetal con relación a las posibilidades de multiplicación del virus (Quak, 1977).

Una vez saneados los meristemas sobrevivientes, es necesario propagarlos. Es ahí donde la micropropagación garantiza en breve tiempo una adecuada población de individuos genéticamente homogéneos y sanos.

Esta técnica ha sido utilizada exitosamente en cultivos de importancia agrícola como la yuca (Kantha y Gamborg, 1975), la papa

(Mellor y Stace-Smith, 1977), *Trifolium repens* (Bamett, Gibson y Seo, 1975), *Trifolium pratense* (Phillips y Collins, 1979). También en Cuba se ha usado con gran éxito en la caña de azúcar, la papa y otras especies de interés (Anón, 1992), pero en sentido general no ha sido muy empleada en otras gramíneas. Aunque en los pastos y forrajes se conocen algunas enfermedades virales que los atacan, no se ha estudiado el saneamiento por técnicas biotecnológicas.

### **CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA**

Los programas de mejoramiento genético de plantas se basan en la disponibilidad de una amplia diversidad genética. Las especies silvestres, incluyendo las ancestrales, constituyen la principal reserva de genes para los fitomejoradores; sin embargo, en las últimas décadas ha habido una pérdida sensible de la diversidad genética, debida fundamentalmente al crecimiento de las zonas urbanas y a la expansión de la agricultura de alta producción, basada en la utilización de un número limitado de variedades comerciales.

De esta forma, los agricultores descartan variedades antiguas por otras de mayor producción con resistencia a ambientes diversos. Por otro lado, los fitomejoradores desechan líneas o variedades que no llenan sus requisitos inmediatos. Todo esto conduce a la erosión paulatina e irreparable de la diversidad genética.

Es por ello que el mantenimiento de bancos de germoplasma es una gran necesidad en los programas de mejoramiento genético vegetal, tanto para los métodos tradicionales de mejora, como por la mejora mutacional y el cultivo *in vitro*, los cuales aseguran la disponibilidad de material genético cuando sea necesario.

La estrategia de la conservación depende de la naturaleza del material con que se está trabajando, así como de los objetivos que se persiguen.

El método más sencillo y ventajoso es la conservación de semillas, pero existen especies que no las producen o estas son de corta viabilidad; otras semillas son altamente heterocigóticas y, por tanto, no mantienen el genotipo original. Además, aquellas especies que se propagan vegetativamente solo pueden ser conservadas por tiempos cortos mediante propágulos vegetativos o en el campo en parcelas de germoplasma. Es conocido que los bancos de genes en el campo son muy costosos de mantener y resultan vulnerables a los desastres naturales frecuentes en las áreas tropicales, las inundaciones, el frío y las plagas y enfermedades, las cuales ponen constantemente en peligro la seguridad del germoplasma: además, frecuentemente es necesario mantener las plantas libres de virus en invernaderos, lo que hace aún más engorrosa la conservación del material genético.

Es precisamente en estos casos donde la posibilidad de regenerar plantas a partir de células, tejidos, embriones y órganos cultivados *in vitro*, ha conducido a la utilización de las diferentes modalidades de cultivo de tejido para la preservación del germoplasma.

Entre las múltiples ventajas se pueden mencionar las siguientes:

1. Se requiere relativamente de poco espacio para la preservación de una gran cantidad de material vegetativo.
2. El germoplasma se encuentra libre de patógenos, virus e insectos, lo cual permite el intercambio entre diferentes países sin pasar por períodos de cuarentena, además de que se hace posible multiplicarlo rápidamente cuando es necesario con solo colocarlo en las condiciones y medios de cultivo apropiados, lo que permite disponer de las plantas en el momento oportuno (Ochoa, 1990; Jiménez, 1992a).

Es por eso que el cultivo *in vitro* es un poderoso instrumento de apoyo al mejoramiento genético, en la esfera de la conservación *in vitro*.

Las técnicas para la preservación de germoplasma están basadas en la disminución de la actividad metabólica de las células, tejidos u órganos vegetales, de tal manera que se evite el crecimiento y se mantenga la posibilidad regenerativa de las mismas.

En general, la conservación de germoplasma *in vitro* se puede alcanzar utilizando dos estrategias; 1) Por el método del mínimo crecimiento de la actividad celular mediante la combinación de una serie de factores como la temperatura, la composición del medio de cultivo y la adición de inhibidores de crecimiento (hormonales u osmóticos); y 2) Por medio de criopreservación, que consiste en el almacenamiento de los tejidos y células en nitrógeno líquido (-196°C). A esta temperatura cesa el metabolismo y toda la actividad celular, y el material almacenado en estas condiciones puede ser conservado por tiempo indefinido (Ochoa, 1990).

La técnica del crecimiento mínimo se lleva a cabo generalmente bajo condiciones de temperatura reducida, desde 1 hasta 15°C (Stushnoff y Fear, 1985; Whitters, 1985), aunque existen diferencias en dependencia de la especie y el tejido con que se esté trabajando.

Whitters (1985) plantea que la temperatura de almacenamiento debe estar entre 4 y 10°C para aquellos cultivos que crecen normalmente a 20-25°C y entre 15 y 20°C para los que crecen a 30°C. Conjuntamente con la disminución de la temperatura, se modifica la composición de los medios de cultivo, por lo que se emplean normalmente medios menos enriquecidos que los utilizados en la propagación, a los que se adicionan inhibidores de crecimiento que pueden ser osmóticos (sorbitol, manitol, altas concentraciones de sacarosa) u hormonales, como el ácido absérico, el cicocel y el 2-cloroetil cloruro de trimetil (ccc).

El material mantenido en estas condiciones se subcultivaré en medio fresco cada cierto

tiempo, en dependencia de los requerimientos de la especie y las condiciones de almacenamiento. Por ejemplo, en la caña de azúcar esto debe realizarse cada 6 meses (Srenivasan y Srenivasan, 1985).

Para la conservación de germoplasma pueden, emplearse ápices caulinares, yemas, meristemos, callos, suspensiones celulares, anteras, óvulos y embriones. Los ápices caulinares presentan una gran ventaja, que es la estabilidad genética, lo cual es difícil de mantener al emplear otros materiales. Con el empleo de ápices, la técnica resulta sencilla y puede ser establecida con facilidad, previo conocimiento de los métodos de propagación *in vitro* (Pérez-Ponce y Jiménez, 1992), y da la posibilidad de mantener las plantas libres de patógenos.

Los pastos y forrajes han sido poco estudiados desde este punto de vista. En Etiopía. Ruredzo y Hanson (1989) han realizado trabajos en *Cynodon dactylon*, *C. aethiopicus*, *D. decumbens* y *D. smutsii*; ellos plantean que estas especies pueden ser establecidas y multiplicadas *in vitro* a partir de yemas axilares, meristemos o internodios y conservadas bajo condiciones de crecimiento lento a bajas temperaturas.

La conservación de germoplasma tiene cada vez más importancia, pues con las modernas técnicas de la biología molecular, son los genes aislados los que integran el genoma en su conjunto y desde ese punto de vista prácticamente todos los genotipos tienen interés.

## CONCLUSIONES

La micropropagación acelerada ha sido muy aplicada a muchos cultivos que presentan dificultades en cuanto a la propagación natural lenta, el alto grado de heterocigosis, la reproducción obligatoriamente agámica y otras; además, se usa para sanear variedades infestadas con virus, lo que permite mantener

plantaciones sanas por períodos más o menos extensos. Esta se desarrolla, fundamentalmente, por 3 métodos que son: la formación acelerada de yemas axilares, la producción de yemas adventicias y la embriogénesis somática.

La técnica de conservación de germoplasma *in vitro* ha abierto una nueva posibilidad a los cultivos que no producen semillas y que tienen que mantenerse vegetativamente, con lo que se corre el riesgo de que se erosione el banco genético y ocurran pérdidas de variedades. Se logra asimismo una vía económica, segura y libre de patógenos en las variedades a conservar. Esta técnica permite, según sus métodos, conservar a corto, mediano o largo plazo el material vegetal y se puede usar una amplia gama de explantes que puede ir desde una simple célula hasta un conjunto de tejidos.

Tanto para la micropropagación acelerada como para la conservación *in vitro* de variedades y especies, el fenómeno de la regeneración de órganos o plantas completas es determinante.

Ambas técnicas biotecnológicas han sido y podrán ser aplicadas a los pastos y forrajes, lo cual los ubica al mismo nivel que el resto de los cultivos y permite acelerar el programa de mejoramiento y el uso inmediato de las mejores variedades que respondan a las exigencias de la ganadería moderna.

### CONCLUSIONS

The accelerate micropropagation have been aplicated in many cultures that present difficulties with regard to the slow natural propagation, high level of heterozigosis, the obligatorily agamic reproduction and others; ifs also use to give security to infested varieties with virus that permit to keep security populations by less or more extensive periods. It is fundamentealy develop by 3 methods, they are: the rapid formation of axillaries bud, the production of adventitious bud and the somatic embryogenesis.

The technique of germoplasm conservation *in vitro* has open a new possibility to the cultures that not produce seeds and they have to keep vegetatively; with these we run the risk of the erosion of the genetic bank and also may be happen the lost of varieties. In like manner it is obtain an economic, sure and free Way of pathogens in the varieties to conserve. According to these methods, this technique permit to preserve the vegetable material at short, middling or long time and it can use a plantiful gamut of explants that can go from a simple cell to a tissue conjunct.

The regeneration phenomenon of organs and complete plants is determining for both accelerate micropropagation and *in vitro* conservation of varieties and species.

Both biotechnological techniques have been and must be used to the pasture and forage, that situated it at the same level that the rest of cultures and pennit to accelerate the improvement program and the immediate use of the best varieties that respond to exigencies of the modern livestock.

### REFERENCIAS

- ANON. 1992. Obtención de plantas libres de virus. En: Conferencias Primer Curso FAO-Francia-Cuba sobre técnicas modernas de mejoramiento y multiplicación de especies agámicas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas, Cuba
- ARTUNDUAGA, I.R.; TALIAFERRO, C.M. & JOHNSON, B.L. 1988. Effects of auxin concentration on induction and growth of embryogenic callus from young inflorescence explants of Old World bluestem (*Bothriochloa* spp.) and bermuda (*Cynodon* spp.) grasses. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***. 12:13
- AUGE, R. & BOCCON-GIBOD, J. 1984. Aplicaciones en la horticultura. En: Cultivo *in vitro*. (Ed. H. Vidalie). Editorial Científica, S.A. de C.V. México, p. 91

- BARNETT, O.W.; GIBSON, P.B. & SEO, A. 1975. A comparison of hot treatment and meristem-tip culture for obtaining virus-free plant of *Trifolium repens*. **Plant Dis. Rep.** 59:834
- BENBADIS, A. 1989. Date-Palm: Application of *in vitro* culture for micropropagation and the fight against *Fusarium oxysporum*. In: Plant biotechnologies for developing countries. (Eds. A. Sasson and V. Costarini). Proceedings of an international symposium organized by CTA and FAO, Luxembourg. p. 239
- BRAY, R.A. 1984. Evaluating hybrids between *Leucaena leucocephala* and *L. pulverulenta* as potential forage plants. **Aust. J. Exp. Anim. Husb.** 24:379
- BROWN, D.C.W.; BOWLEY, S.R.; McKERSIE, B.D.; SENARATNA, T. & BCWLEY, J.D. 1989. Synthetic alfalfa seed: an alternate approach to enhance alfalfa production efficiency. **Forage Notes.** 34:4
- CHANDLER, S.F. & VASIL, I.K. 1984. Optimization of plant regeneration from long term embryogenic callus cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. (Napier grass). **J. Plant Physiol.** 117:147
- CHENG, Y.K. 1985. Callus induction and plant regeneration from inflorescence segments of Pangola grass. Proc. XV Int. Grassl. Cong., Kyoto. p. 313
- CHUROVA, K. 1984. Regeneration of plants in culture of red clover apical meristem. In: Plant tissue and cell culture application to crop improvement. (Eds. F.J. Novák, L. Havel & J. Dolezel). Czechoslovak Academy of Sciences, Prague. p. 501
- DALE, P.J. 1984. Tissue culture and forage crop improvement. **Span.** 27:2
- DHAWAN, VIBHA & BHOJWANI, S.S. 1985. *In vitro* vegetative propagation of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. **Plant Cell Report.** 4:315
- FRANCLET, A. 1989. Biotechnology and the genetic improvement of trees. In: Plant biotechnologies for developing countries. (Eds. A. Sasson and V. Costarini). Proceedings of an international symposium organized by CTA and FAO, Luxembourg. p.263
- GLOVAK, L. & GREATBATCH, W. 1981. Successful tissue culture of *Leucaena*. **Leucaena Res., Rep.** 3:81
- GOYAL, Y. & ARYA, H.C. 1984. Tissue culture of desert trees. I. Clonal multiplication of *Prosopis cineraria* by bud culture. **J. Plant. Physiol.** 115:183
- GOYAL, Y.; BINGHAM, R.L. & FELKER, P. 1985. Propagation of the tropical tree, *Leucaena leucocephala* K-67, by *in vitro* bud culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 4:3
- GRIZA, M.; TEJKLOVA, E. & NOVAK, F.J. 1984. *In vitro* propagation of pea by axillary and adventitious bud technique. In: Plant tissue and cell culture application to crop improvement. (Eds. F.J. Novák, L. Havel & J. Dolezel). Czechoslovak Academy of Sciences, Prague. p. 507
- HEYSER, J.W. & NABORS, M.W. 1982. Regeneration of Proso Millet from embryogenic calli derived from various plant parts. **Crop Sci.** 22:1070
- HISAJIMA, S.; CHONGPRADITNUM, P.; OSAKA, J. & ARAI, Y. 1987. Mass propagation of giant Ipil Ipil through seed culture in vitro. **Japan Trop. Agr.** 34 .249
- JIMÉNEZ, E. 1992. Micropropagación. En: Conferencias Primer Curso FAO-Francia-Cuba sobre técnicas modernas de mejoramiento y multiplicación de especies agámicas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas, Cuba
- JIMÉNEZ, E. 1992a. Conservación de germoplasma. En: Conferencias Primer Curso



- FAO-Francia-Cuba sobre técnicas modernas de mejoramiento y multiplicación de especies agámicas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas, Cuba
- KARTHA, K.K. & GAMBORG, O.L. 1975. Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture. **Phytopathology**. 65:826
- KOHLLENBACH, H.W. 1985. Fundamental and applied aspects of *in vitro* plant regeneration by somatic embryogenesis. In: *In vitro* techniques propagation and long term storage. (Ed. A. Schafer-Menuhr). Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Dordrecht. p. 101
- KOSKY, R. 1992. Cultivo de tejidos en la caña de azúcar. En: Conferencias Primer Curso FAO-Francia-Cuba sobre técnicas modernas de mejoramiento y multiplicación de especies agámicas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas, Cuba
- LO, P.F.; CHEN, H. & ROSS, J.G. 1980. Vegetative propagation of temperate forage grasses through callus culture. **Crop Sci.** 20:363
- LU, C. & VASIL, I.K. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from freely-suspended cells and cell groups of *Panicum maximum* Jacq. **Ann. Bot.** 48:543
- MELLOR, F.C. & STACE-SMITH, R. 1977. Virus-free potatoes by tissue culture. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (Eds. J. Reinen and Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag, Berlin. p. 616
- MESA, A.R.; LAJONCHERE, G. & PRIETO, MARLENIS. 1995. Nota técnica: Micro-propagación acelerada de *Helianthus tuberosus*. **Pastos y Forrajes**. 18:103
- MURASHIGE, T. & HUANG, L.C. 1987. **Acta Hort.** 212:35
- MURTY, V.R. 1992. Achieving apomictic reproduction in sorghum in India and USA. **Apomixis Newsletter**. 5:50
- OCHOA, N. 1990. Conservación de germoplasma. En: Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. (Eds. C.H. Rosell y V.M. Villalobos). FAO, Roma. p. 55
- ORELLANA, P.A. 1992. Aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura. En: Conferencias Primer Curso FAO-Francia-Cuba sobre técnicas modernas de mejoramiento y multiplicación de especies agámicas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas, Cuba
- PEREZ-PONCE, J. & JIMÉNEZ, E. 1992. Introducción al cultivo *in vitro*. En: Conferencias Primer Curso FAO-Francia-Cuba sobre técnicas modernas de mejoramiento y multiplicación de especies agámicas. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas, Cuba
- PHILLIPS, G.C. & COLLINS, G.B. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus culture of red clover. **Crop Sci.** 19:59
- QUAK, F. 1977. Meristem culture and virus-free plants. In: Plant Cell, Tissue and Organ Culture. (Eds. J. Reinert and Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag, Berlín, p. 598
- RUREDZO, T.J. & HANSON, J. 1989. Tissue culture techniques for maintenance and distribution of germplasm of tropical grasses. Proc. XVI Int. Grassl. Cong., Nice. p.429
- SANTANA, I. 1994. Estudio de la variabilidad en poblaciones de caña de azúcar obtenidas por cultivo de tejidos. Tesis presentada en opción al grado de Dr. en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Investigaciones en Caña de Azúcar, La Habana. 85 p.
- SCHILDE-RENTSCHLER, L. & SCHMIEDICHE, P.E. 1984. El cultivo de tejidos: su pasado, presente y futuro. **Centro Internacional de la Papa, Circular**. 12:1
- SRENIVASAN, S.P. & SRENIVASAN, S.J. 1985. *In vitro* sugar cane germplasm storage. **Sugar Cane**. 1:2

- STUSHNOFF, C. & FEAR, C. 1985. The potential use of *in vitro* storage for temperate fruit germplasm: A Status Report. IBPGR, Rome
- VASIL, I.K. 1986. Relative genetic stability of embryogenic cultures of the gramineae and uniformity of regenerated plants. In: Somaclonal variations and crop improvement (Ed. Jean Semal). Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht. p. 108
- VILLALOBOS, V.M. 1989. Advances in tissue culture methods applied to coffee and cocoa. In: Plant biotechnologies for developing countries. (Eds. A. Sasson and V. Costarini). Proceeding of an international symposium organized by CTA and FAO. Luxembourg. p. 247
- WATT, PAULA; MYCOCK, D.J. & CRESS-WELL, C.F. 1989. Plant regeneration by somatic embryogenesis from leaf explants of *Digitaria eriantha* (Steud) Subsp. *Eriantha*. Proc. XVI Int. Grassl. Cong., Nice. p. 421
- WHITERS, L.A. 1985. Cryopreservation and storage of germplasm. In: Plant cell culture: a practical approach. (Ed. R.A. Dixon). IRL Press. Oxford-Washington D.C. p. 169

**Recibido el 18 de octubre de 1993**