



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala

“DIFERENCIACION DE BROTES ADVENTICIOS
EN COTILEDONES DE PINUS MAXIMARTINEZII
RZEDOWSKI CULTIVADOS IN VITRO”

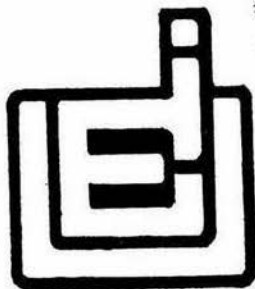
T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

PRESENTA

Alejandrina Robledo Paz



MEXICO, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Genética del Colegio de Postgraduados, bajo la dirección del Dr. Víctor M. Villalobos Arámbula.

DEDICATORIA

A mis padres

A mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios profesionales.

Al Centro de Genética del Colegio de Postgraduados, por darme las facilidades para llevar a cabo la presente investigación.

Al Dr. Víctor M. Villalobos Arámbula, por su apoyo y amistad sincera.

A los profesores Angel Durán, Enrique Bañuelos e Ignacio Peñalosa, por sus enseñanzas.

A Laura Valencia Enciso, por la transcripción mecanográfica del presente trabajo.

CONTENIDO

	PAG.
LISTA DE CUADROS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
III. MATERIALES Y METODOS	20
1. Germinación de la semilla	20
1.1 Germinación en medio de cultivo	20
1.2 Germinación en peróxido de hidrógeno al 3%	21
2. Selección del explante	22
3. Iniciación de brotes adventicios	22
4. Desarrollo de los brotes	23
5. Condiciones físicas	24
6. Enraizamiento	24
6.1 Enraizamiento en suelo	24
6.2 Enraizamiento <i>in vitro</i>	25
7. Análisis de datos	25
IV. RESULTADOS	27

	PAG.
1. Germinación	27
2. Selección del explante	30
3. Efecto de la benciladenina sobre la <u>for</u> mación de brotes	32
4. Desarrollo de los brotes	38
5. Enraizamiento	44
V. DISCUSION	47
VI. CONCLUSIONES	62
VII. BIBLIOGRAFIA	64
APENDICE No. I	72
APENDICE No. II	73

LISTA DE CUADROS

CUADRO		PAG.
1	Concentración de auxinas (ANA y AIB), empleadas para suplementar el medio de inducción del sistema radical en los brotes adventicios de <i>P. maximartinezii</i> .	26
2	Respuesta de los cotiledones provenientes de semillas germinadas mediante los dos métodos de germinación probados.	29
3	Respuesta en la formación de brotes en cotiledones de <i>P. maximartinezii</i> expuestos a diferentes concentraciones de bencladenina (BA).	37
4	Longitud de los cotiledones después de 34 días de haberse mantenido en ausencia (SBA) o presencia de BA.	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PAG.
1	Efecto de diferentes concentraciones de BA sobre la formación de brotes en cotiledones de <i>P. maximartinezii</i> .	33
2	Diferencias en la distribución de los brotes formados sobre cotiledones de <i>P. maximartinezii</i> por efecto de la BA. 1. Cotiledones creciendo en un medio sin BA. De 2 a 5 se muestra la distribución de brotes sobre cotiledones cultivados en un medio con 1.0, 2.5, 5.0 y 7.5 x 10 ⁻⁵ M de BA.	35
3	Diferencias en la capacidad organogenética de los cotiledones. A la derecha cotiledones cortos con algunos brotes sobre su superficie. A la izquierda cotiledones largos los cuales no formaron brotes.	40
4	Diferenciación de brotes adventicios en cotiledones de <i>P. maximartinezii</i> . A. cotiledones después de 7 días en cultivo. B. Cotiledones formando tejido meristemático después de 21 días. C. Cotiledón diferenciando las primeras yemas adventicias después de 34 días. D. Grupos de acículas formándose a lo largo de la superficie del cotiledón después de nueve semanas en cultivo. E. Brotes desarrollándose sobre fragmentos de cotiledón después de 14 semanas. F. Apariencia de los brotes después de 25 semanas.	41

FIGURA		PAG.
5	Variación morfológica en los brotes diferenciada sobre los cotiledones. Izquierda brotes normales. Derecha, brotes translúcidos. Nótese las diferencias en cuanto acículas, tallo y color.	45
6	Brotes de <i>P. maximartinezii</i> después de haber formado el sistema radical.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Acido abcísico
ANA	Acido naftalenacético
AIB	Acido indol-3-butírico
AIA	Acido indol-3-acético
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
BA	N ⁶ -benciladenina
2-iP	N ⁶ 2-Isopentiladenina

RESUMEN

La micropropagación se presenta en la actualidad como una técnica de propagación vegetativa de especies forestales, complementaria a los métodos tradicionalmente usados, los cuales en ocasiones no representan una forma eficiente de propagación. Por lo que se pensó en este tipo de metodología como una forma de propagar y conservar a *Pinus maximartínezii*, especie de pino piñonero que se encuentra en peligro de extinción debido principalmente a su limitada distribución geográfica y a la importancia económica que representa su semilla, misma que constituye su forma de propagación convencional.

En la presente investigación se trató de conocer algunos de los eventos asociados a la diferenciación y desarrollo de los brotes adventicios.

Se probaron dos métodos de germinación de la semilla bajo condiciones asépticas: a) germinación en medio de cultivo y b) germinación en peróxido de hidrógeno al 3%; encontrándose que el germinar en peróxido de hidrógeno permitió eliminar por completo la contaminación. Además el tejido proveniente de estas semillas respondió mejor a las condiciones de cultivo.

Al probar la capacidad organogénica de diferentes tipos de explante (embriones completos, ejes embrionarios y co tiledones), se observó que los cotiledones de semillas germinadas mostraban una capacidad mayor sobre los otros explantes.

Se analizó el efecto de diferentes concentraciones de la benciladenina (1.0×10^{-5} a 7.5×10^{-5} M), sobre la inducción de brotes adventicios sobre los cotiledones. Se encontró una relación directa entre la concentración y el número de brotes formados, obteniéndose la mayor respuesta cuando se incluyó 7.5×10^{-5} M en el medio de cultivo.

Se pudieron observar tres fases durante la diferenciación de brotes adventicios: 1) formación de tejido meristemático, 2) formación de primordios de brote y 3) brotes bien diferenciados. Cada una de estas fases se llevó a cabo en un tiempo determinado y bajo diferentes condiciones de cultivo.

Se intentó el enraizamiento de los brotes obtenidos, empleando diferentes concentraciones de auxinas (ANA y AIB), logrando sólo el 3% de enraizamiento al incluir 3 mg L^{-1} de AIB en el medio de cultivo.

I. INTRODUCCION

Pinus maximartinezii Rzedowski es una de las ocho especies que constituyen al grupo cembroides de pinos piñoneros. Esta especie es originaria de México y su distribución geográfica está sumamente restringida, ya que se encuentra únicamente en el Municipio de Juchipila en el estado de Zacatecas. Este reducto ecológico de *P. maximartinezii* R. cuenta con un área aproximada de 6 km², lo que nos da idea de la poca cantidad de árboles que la cubren. Por otro lado, si consideramos que su forma convencional de propagación es mediante semilla y que a ésta se le da otro tipo de usos como es la alimentación, comprenderemos la competencia que se establece entre su conservación y su importancia económica, lo que la convierte en una especie en peligro de extinción. Siendo necesario por lo tanto, una tecnología que aún cuando tenga su principio en la semilla misma, sea capaz de hacer de ésta, un sistema más eficiente de multiplicación.

De esta forma el cultivo de tejidos mediante la técnica de micropropagación, puede ser una alternativa a la solución de este problema, puesto que, permite producir individuos en niveles altos de multiplicación, en un tiempo relativamente corto. Por lo que resulte necesario conocer los procesos morfogénéticos que anteceden la formación de plantas *in vitro*.

Los objetivos que persigue la siguiente investigación son: a) conocer algunos de los procesos organogenéticos que acontecen durante la diferenciación de brotes adventicios en tejidos cotiledonarios cultivados *in vitro*, b) determinar el efecto que tiene la aplicación de reguladores de crecimiento (citocininas) sobre la diferenciación de estos brotes y c) conocer si es factible la regeneración *in vitro*, de plantas de *Pinus maximartinezii* Rzedowski.

II. ANTECEDENTES

Desde el comienzo de las investigaciones empleando cultivo de tejidos, las gimnospermas han sido estudiadas extensivamente.

Schmidt (1924) intentó cultivar por primera vez embriones de coníferas. A él le siguió Brunner (1932) quien cultivó embriones de *P. pinaster*. Posteriormente Gautheret (1934) obtuvo callos a partir del cambium vascular de *Pinus pinaster* y *Abies pectinata*.

Ball (1950) logró la diferenciación de yemas a partir de callos derivados de nudos de *Sequoia sempervirens* una vez que White y Risser (1964) establecieron la mayoría de los factores físicos y nutricionales necesarios para el crecimiento de tejidos normales y tumorales de *Picea glauca*, se estableció una continuidad en los cultivos de estas especies.

Konar y Oberoi (1965) lograron obtener la formación de estructuras a las cuales denominaron "embrioides" formados sobre cotiledones de *Biota orientalis*, los que desarrollaban brotes pero no raíces.

Benerjee y Radforth (1969) cultivando segmentos de embriones inmaduros, fueron capaces de inducir la formación de brotes y raíces, sobre todo en el suspensor, dando lugar a embriones secundarios. Por otro lado, Konar (1972) logró diferenciar raíces y estructuras similares a brotes sobre callos **obtenidos** a partir de hipocotilos de *Pinus gerardiana*. En *Picea abies* fue posible la inducción de raíces en el extremo basal de yemas de invierno (Chalupa y Durzan, 1973a). Greenwood y Berlyn (1965) cultivando segmento de hipocotilos de embriones dormantes de *Pinus lambertiana* obtienen la regeneración de raíces en la base de estos explantes después de 14 días de haber iniciado el cultivo.

Así Campbell y Durzan (1975) inducen más de 100 yemas sobre segmentos de hipocotilos de *Picea glauca* cuando fueron colocados en un medio definido conteniendo citocininas. Tiempo después éstos mismos autores lograrían el enraizamiento de estos brotes y por lo tanto, la regeneración de plantas (Campbell y Durzan, 1976).

Somer *et al.* (1975), cultivando embriones de *Pinus palustris* lograron diferenciar numerosas yemas adventicias a lo largo de los cotiledones, los cuales cuando fueron transferidos a un medio diferente formaron raíces, obteniendo por primera vez plantas completas.

Cheng (1975), también obtuvo brotes adventicios cuando suministró citocininas a cultivos de callos de *Pseudotsuga menziesii* derivados de embriones cultivados en un medio suplementado con auxinas y citocininas, antes de su transferencia a un medio libre de estos reguladores. Encontrando también que este método podía ser aplicado a casi todas las partes del embrión.

Por otro lado, Coleman y Thorpe (1976) lograron la formación de yemas en cuatro especies de coníferas: *Pinus contorta*, *Thuja plicata*, *Cupressus arizonica* y *Sequoia gigantea* usando hipocotilos y segmentos cotiledonarios de plantas de 10 a 20 días de edad. En *Thuja plicata* se indujeron yemas múltiples sobre la parte adaxial de los cotiledones cuando se utilizaba un medio conteniendo citocininas (BA) en presencia o ausencia de auxinas (ANA) y cuando se usaron las puntas de brote de ramas de árboles de 4 a 10 años. El enraizamiento de los brotes se logró subcultivándolos en un medio con auxinas (AIB).

Después Reilly y Washer (1977) trabajando con embriones de *Pinus radiata*, pudieron inducir brotes adventicios sobre sus cotiledones e hipocotilos, en mayor número cuando estos embriones fueron colocados en un medio con BA. Una vez que los brotes estuvieron bien formados fueron transferidos individualmente a un medio conteniendo auxinas para lograr así la formación de plantas.

Von Arnold y Eriksson (1981) utilizando el mismo explante obtuvieron una respuesta similar. Observaron también que la distribución de los brotes a través del explante dependía de la concentración de citocininas y, que por otro lado, el porcentaje de embriones que daba lugar a brotes adventicios era independiente de ésta. Algunos de estos brotes formaron raíces espontáneamente en un medio diluido, pero otros requirieron de la presencia de auxinas para formarlas. ✓

Weeb y Díaz (1983) estudiando el efecto de BA sobre la formación de brotes en embriones de *Pinus caribaea*, encontraron que estos aparecían sobre todo en la base de los cotiledones y a lo largo del hipocotilo en todos los medios que le contenían, después de cuatro semanas, e iba desde un 15% a un 25% incrementándose hasta un 60 ó 66% cuando se duplicaba el tiempo de exposición a la BA. Después de ocho semanas de subcultivos sobre un medio careciendo de este regulador de crecimiento estos brotes se alargaron.

No obstante que los embriones completos han sido frecuentemente utilizados con buenos resultados en cuanto a la formación de órganos adventicios, varios son los trabajos en los que se ha preferido emplear cotiledones aislados de semillas germinadas, debido a que presentan una serie de características que los coloca por encima de otros tipos de explante (Aitken *et al.*, 1981) como son:

- a) Es un explante homogéneo, ya que en su mayoría esta formado por un solo tipo de células.
- b) La inducción de brotes sobre este explante no experimenta fase de callo.
- c) Se incrementa la superficie de contacto con el medio de cultivo.
- d) La cantidad de tejido meristemático y consecuentemente el número de brotes se puede ver incrementado considerablemente.

Lo anterior se ve apoyado con el hecho de que en la mayoría si no en todos los casos en los que se emplearon embriones completos eran precisamente los cotiledones sobre los que se lograba diferenciar los brotes adventicios, lo que nos da idea de la gran potencialidad que tienen estos como explantes.

Así Cheng (1977) estudiando los factores que afectaban la formación de brotes en cotiledones de *Pseudotsuga manziensis* obtenidos de plántulas de 2 a 8 semanas de edad, los divide en fracciones de 3 mm de longitud y los cultiva sucesivamente en un medio suplementado con varias combinaciones, y concentraciones de auxinas (AIA, AIB, ANA, 2,4-D) y citocininas (BA, 2iP y cinetina) encontrándose que la combinación de estos dos grupos de reguladores estimulaban una ma

yor respuesta, en la producción de brotes. Una vez que los brotes eran diferenciados, lograban crecer vigorosamente cuando se les transfería a un medio sin reguladores. Cheng y Voqui (1977) haciendo algunas modificaciones al método anterior, nuevamente induce brotes los cuales finalmente son enraizados, regenerando plantas completas.

Coleman y Thorpe (1977) también lograron la formación de plantas de *Thuja plicata* Don. cuando cultivaron cotiledones provenientes de plántulas de 10 a 14-días de edad en un medio complementado con diferentes concentraciones de BA, ácido giberélico, ANA y ABA, encontrando que la BA en presencia o ausencia de ABA, producía domos sobre la superficie del explante después de cuatro semanas, los cuales se diferenciaban después en pequeños brotes que en ocasiones formaban raíces en este mismo medio.

Más tarde Aitken *et al.* (1981), experimentan con tres tipos de explante de *Pinus radiata*: 1) embriones completos, disectados de semillas cultivadas en medio, 2) cotiledones extraídos de embriones cultivados en la forma anterior y 3) cotiledones provenientes de semillas germinadas asépticamente. Encontrando que si bien usar cotiledones de embriones completos duplicaba la capacidad de formación de brotes de los embriones enteros por incrementar el área de superficie de los cotiledones en contacto con el medio, el emplear coti

ledones de semillas germinadas significaba un incremento en la capacidad de formar brotes hasta 12.5 veces la del explante anterior, llegándose a formar en promedio 180 brotes en raizables por semilla. Además, la formación de tejido meristemático parecía estar relacionada con el área de superficie y las condiciones fisiológicas del cotiledón. Mott *et al.* (1977) también llevó a cabo un experimento similar para incrementar la producción de *Pinus taeda* de 14 a 21 brotes por embrión. Ellos usaron semillas germinadas, aunque no indicaron si las semillas fueron seleccionadas en un estado particular de desarrollo. Sin embargo, Mott (1978) encontró que conforme el desarrollo de la planta continuaba, el potencial de los cotiledones para formar brotes disminuía.

Vargas (1982) estudiando la morfogénesis en *Pinus patula* igualmente prueba tres diferentes tipos de explante, cuando los cultiva bajo concentraciones elevadas de citocininas con respecto a las de las auxinas: 1) embriones completos, 2) cotiledones de semillas germinadas y 3) el meristemo apical. Observó que cuando se utilizaba al embrión completo, el desarrollo de los brotes ocurría principalmente en la superficie de los cotiledones que estuvieron en contacto con el medio de cultivo. En el caso de los cotiledones que no estuvieron en contacto, produjeron 1 ó 2 brotes solamente, que se originaban en sus extremos distales, lo cual redujo en gran medida el potencial de formación de brotes de este explante. Sin embargo, cuando se utilizaron los cotiledones

de semillas germinadas, fue posible establecer el contacto de éstos con el medio de cultivo, aumentando la superficie en forma considerable, así como el promedio de brotes por explante. Encontró también, que los cotiledones de mayor edad y tamaño disminuían su potencial organogénico y sólo se obtenía callo en la porción basal de los mismos. En el caso del meristemo apical también ofreció posibilidades de inducción de brotes, sólo que estos se originarían de yemas pre-existentes y el número de brotes formados fue menor en el caso de las alternativas anteriores, debido a lo reducido de la superficie en la que se formaron.

Asimismo Bornman (1983) investigó el potencial que poseían las hojas cotiledonarias de *Picea abies* para la micro-propagación empleando cotiledones de plántulas de 7, 14 y 21 días de edad, cultivándolos en cuatro diferentes medios de cultivo que incluían concentraciones relativamente bajas de BA y AIB. De igual manera aplicó altas concentraciones de estos mismos reguladores, mediante pulsos o infusiones, realizando las siguientes observaciones: 1) que la BA mostró máxima respuesta en términos de inducción de brotes cuando se aplicaba en forma individual, 2) que los cotiledones de 14 días respondían mejor en cuanto al número promedio de brotes por hoja (8.2) en comparación con los de 7 y 21 días (2.9 y 5.5, respectivamente). Al mismo tiempo observó que conforme aumentaba la edad del explante se reducía la disponibilidad de los tejidos meristemáticos capaces de dar res -

puesta morfogénica. Los brotes ya formados fueron enraizados por la aplicación de AIB, para lograr de esta forma la regeneración de plantas en un período de 25 semanas, aproximadamente siete plantas por semilla empleada.

Skoog y Miller (citada por Thorpe, 1978) por primera vez dan a conocer la hipótesis en la que proponen que el desarrollo organizado ocurría como resultado de las interacciones cuantitativas entre reguladores de crecimiento, especialmente auxinas y citocininas, y entre estos y otros factores y que es el balance cuantitativo de varios constituyentes químicos interactuando con factores endógenos en un sitio particular del tejido el cual determina el curso del desarrollo. De tal forma que el balance o concentración de estos reguladores ha sido incluido en el medio de cultivo sobre el cual se establecieron los explantes de las especies en las que se ha logrado inducir la formación de órganos. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que los requerimientos que se tengan de estos reguladores pueden variar de una especie a otra y de un tejido a otro, así como del estado fisiológico del explante mismo. Habiendo especies las cuales requieren de una combinación de auxinas más citocininas, como es el caso de *P. pinaster* en donde fue necesaria la presencia de ANA y BA en concentraciones de 5 nM y 0.8 μ M respectivamente, para obtener la formación de brotes (David *et al.*, 1982), de *Pseudotsuga menziesii* quien con 5 μ M de BA más 0.5 a 50 nM

de ANA produjo la frecuencia más alta en la producción de órganos (Cheng, 1977); de *P. palustris* que en un medio suplementado con 22 μM de BA y 10 μM de ANA, manifestó la misma respuesta (Sommer *et al.*, 1975), y de *Picea mariana* quien presentó un incremento en la frecuencia de explantes formando brotes cuando además de BA (10 μM) se le adicionó 0.1 μM de ANA, aunque la cantidad de callo fue mayor que cuando se utilizaba sólo BA (Rumary y Thorpe, 1984).

Asimismo, existen otras especies en las cuales solo se requiere de citocininas exógenas y en donde la adición de auxinas tiene efectos inhibitorios. Al respecto, Campbell y Durzan (1975) trabajando en *Picea glauca* encontraron que la BA era esencial para la inducción de brotes y que cuando la concentración de BA era de 10 μM esta respuesta era inhibida por 10 M de ANA pero no cuando la concentración era de 0.1 μM . Sin embargo, cuando se usaba 0.1 μM de ABA, la inducción era inhibida aún a las concentraciones más bajas de ANA (0.1 μM). Tales resultados fueron confirmados por Rumary y Thorpe (1984).

Por otra parte *P. radiata* no solo respondió a altas concentraciones de BA (111 μM), sino que la presencia de ANA o AIB provocó una disminución en la formación de brotes y la producción de callo (Reilly y Washer, 1977; Biondi y Thorpe, 1982).

Una respuesta similar se obtuvo con *P. contorta* cuando se cultivó embriones en un medio de cultivo conteniendo de 0.1 μM a 100 μM de BA. Encontrándose que en concentraciones bajas (0.1 μM a 1 μM) los brotes adventicios se formaban solo en la punta de los cotiledones mientras que a concentraciones más altas (10 μM) estos eran inducidos sobre los cotiledones completos y más brotes se producían de cada embrión (Von Arnold y Erikson, 1981; Patel y Thorpe, 1984).

Bornman (1983) realizó algunas observaciones de su trabajo con *Picea abies*. La BA mostró su máxima respuesta en términos de inducción de brotes cuando se aplicó en forma sencilla o individual. A las concentraciones de BA empleadas (1, 5 y 10 μM) hubo una disminución en el número de brotes no solo cuando se incluyó 0.05 μM de AIB en el medio, sino especialmente cuando su concentración se incrementó a 0.5 μM .

La literatura permite observar que en términos generales, la inducción de brotes múltiples se ve estimulada por concentraciones elevadas de citocininas con respecto a las auxinas aplicadas exógenamente, y en muchas ocasiones solo se requiere de citocininas como único regulador de crecimiento. Aunque el rango de concentraciones que se ha llegado a utilizar es bastante amplio, las concentraciones de citocininas que han estimulado una mayor respuesta se encuentran entre 0.1 μM y 50 μM y de auxinas de 0.5 μM a 1 μM . Por otro

importante

lado, mientras la formación de brotes es estimulada principalmente por la presencia de citocininas, la inducción de raíces requiere especialmente de la adición de auxinas. Se ha llegado a coincidir con la idea de que las auxinas por sí solas o en combinaciones con las citocininas, cuando se guarda una proporción mayor de las primeras con respecto a las segundas, son capaces de estimular el enraizamiento.

Cheng (1977) después de probar varias concentraciones de ANA (0.25 μM - 2.5 μM), observó que la concentración óptima de este regulador para la promoción de la formación de raíz en *Pseudotsuga menziesii* fue de 0.25 μM . Con esta concentración obtuvo hasta un 80% en la formación de plantas. Además, el emplear niveles más altos de ANA causó la proliferación de callo en la base del brote.

Coleman y Thorpe (1977) empleando 50 μM de AIB logró inducir la formación de raíces adventicias en aproximadamente el 50% de los brotes de *Thuja plicata* Donn. Ellos señalan que la baja eficiencia para la producción de plantas se debe principalmente a la dificultad que se tiene para formar raíces consistentemente.

En el caso de *P. radiata*, el enraizamiento se logró cuando se empleó 2.7 μM de ANA y 4.9 a 9.8 μM de AIB durante cuatro semanas, obteniendo hasta un 80% de eficiencia (Reilly y Washer, 1977).

Rancillac *et al.* (1982) encontró que un período de 12 días en un medio conteniendo $1 \mu\text{M}$ de ANA fue suficiente para promover el sistema radical hasta en un 80% ó 100% en brotes de *Pinus pinaster*, pudiendo mejorar la calidad de la respuesta cuando este período se prolongaba hasta 19 días. En *Picea abies* ocurrió la formación de raíces sobre hojas cotiledonarias de 14 días después de la aplicación de $10 \mu\text{M}$ de AIB (Bornman, 1983).

Se sabe que durante la organogénesis suceden cambios estructurales como consecuencia de procesos bioquímicos, biofísicos y fisiológicos (Thorpe, 1980). Son pocas las especies en las que estos cambios han podido ser descritos. Cheah y Cheng (1978) usando cotiledones de *Pseudotsuga menziesii* describen los diferentes estados del desarrollo de brotes adventicios mediante análisis histológicos de secciones longitudinales de estos explantes durante los primeros 21 días de cultivo. Durante este período fue posible identificar cuatro estructuras anatómicas que fueron: 1) meristemoides, 2) primordio de brotes, 3) ápice del brote con hojas primarias y 4) brotes adventicios. Además, observaron que a los 4 días en cultivo se daba la proliferación de células nuevas en las capas hipodérmicas, las cuales después de sufrir una serie de divisiones formaban grupos de células pequeñas con citoplasma denso y núcleo prominente. Esta agrupación de células se hacía cada vez más evidente hasta llegar a formar lo que se reconoció como meristemoide, el cual se especula dará origen a

un brote adventicio. Posteriormente Yeung *et al.* (1981), al estudiar los eventos histológicos asociados con la formación de brotes en cotiledones de *P. radiata* cultivados en presencia de BA, encontraron que la actividad mitótica comenzaba a ser mayor principalmente en la epidermis y las primeras tres capas subepidérmicas que se encontraban en contacto con el medio de cultivo, lo que se reflejó en una rápida y pronunciada utilización de las sustancias de reserva (lípidos y azúcares libres) y una alta tasa de respiración entre los días 0 y 3 de cultivo.

Villalobos *et al.* (1984a) estudiaron los primeros eventos asociados con la inducción de brotes mediante la comparación de la síntesis de macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas) en cotiledones de *P. radiata* cultivados en presencia o ausencia de citocinina (BA) durante los primeros 5 días en cultivo. Encontraron que existía una incorporación activa de ^3H -timidina, ^3H -uridina y ^3H -leucina en las moléculas de ADN, ARN y proteínas respectivamente. En los cotiledones formando brotes la incorporación se realizó principalmente en las capas epidérmicas y subepidérmicas en contacto con el medio. En los cotiledones cultivados en ausencia de BA la incorporación sucedió en forma azarosa. La tasa de síntesis de ARN y proteínas fue más alta en los cotiledones cultivados en ausencia de BA, que en los cotiledones formando brotes, durante las primeras 48 horas después de las cua-

les, la síntesis fue similar. Por el día 3 en cultivo se observó más proteína marcada en los tejidos creciendo en BA, sobre todo en las células epidérmicas y subepidérmicas. La incorporación de ^3H -timidina estuvo igualmente concentrada en los núcleos de estas mismas células alrededor del día 5.

Por otro lado, Douglas *et al.* (1982) observaron que los niveles de lípidos decrecían rápidamente durante los primeros estados en la iniciación de los brotes y las clorofilas se incrementaron a lo largo del período de cultivo permaneciendo estables por el día 10. Los carotenoides estuvieron presentes en niveles relativamente bajos, todo este tiempo, estos cambios coincidieron con el desarrollo de los cloroplastos. Además, la mayor incorporación de ^{14}C -glucosa, ^{14}C -acetato ó ^{14}C -bicarbonato sucedió durante el período de formación de tejido meristemático (Obata-Sasamoto *et al.*, 1984).

Villalobos *et al.* (1984b) encontraron que al igual que las citocininas la luz también tuvo un importante papel en la formación de brotes en cotiledones de *P. radiata*. Ellos observaron que los cotiledones cultivados en presencia de BA, pero en obscuridad continua, no lograron diferenciar tejido meristemático. Exposiciones a la luz durante los 3 primeros días en cultivo permitieron que tejido meristemático se desarrollara por el día 21. Una formación de tejido meristemático

co más pronunciada, sucedió cuando los cotiledones fueron expuestos a la luz por períodos más largos (7 a 21 días). Además, observaron que el período de luz no necesariamente tenía que ser al inicio de cultivo, sino que podía ser dado des - pués de 10 días, pero después de 21 días de haber permanecido en obscuridad, transferirlos a la luz, no permitiría la formación de brotes. Así algunas veces después de 10 a 21 días de cultivo en la obscuridad, la capacidad para formar brotes se perdía.

Villalobos *et al.* (1985) utilizando cotiledones de *P. radiata* observó que después de tres días en cultivo era posible detectar la aparición de estructuras organizadas las cuales surgían a partir de una célula subepidérmica que llegaba a dividirse en dirección periclinal. Más tarde una de estas células se dividía en dirección anticlinal dando lugar a una estructura tricelular. Durante el quinto día se hacía posible la diferenciación de unas estructuras que se componían de 6 u 8 células, y que denominaron promeristemoides. Una ca - racterística importante de mencionar sobre estas estructuras es que se encontraban muy juntas y el espacio intercelular entre ellas era reducido. Durante la diferenciación de los promeristemoides, las sustancias de reserva en forma de lípidos y proteínas ya habían sido completamente utilizadas (Douglas *et al.*, 1982).

Después del día 10, estas estructuras dieron lugar a meristemoides, los cuales hicieron que los cotiledones adoptaran una apariencia nodular. A los 21 días aproximadamente tomaba lugar la aparición de primordios de hoja como una prolongación de la epidermis. De tal manera que las células epidérmicas del cotiledón fueron capaces de adaptarse a los cambios de tamaño y forma que sufría el explante.

III. MATERIALES Y METODOS

Material biológico

Las semillas de *Pinus maximartinezii* Rzedowski fueron proporcionadas por la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma de Chapingo. Estas semillas provienen de polinización abierta y fueron colectadas en el año de 1984 en el Cerro de Piñones, Pueblo Viejo, Municipio de Ju - chipila en el estado de Zacatecas, Zac. México.

1. Germinación de la semilla

Con el objeto de obtener plántulas en condiciones asépticas se probaron dos métodos de germinación.

1.1 Germinación en medio de cultivo

Se removió la cubierta de las semillas en forma mecánica para posteriormente ser desinfectadas con hipoclorito de sodio al 6% (cloro comercial) durante 20 minutos. Después de esto, las semillas permanecieron en agua corriente de la llave por 24 horas, siendo nuevamente desinfectadas superficialmente por el procedimiento anterior, más tres enjuagues con agua destilada estéril. Se envolvieron con plástico adherente (ega-pack) y se mantuvieron a 4°C durante 48 horas, sometiéndolas posteriormente a una tercera desinfección con

hipoclorito de sodio al 6% durante 20 minutos, seguida de tres últimos enjuagues con agua destilada estéril. Los embriones fueron disectados y colocados horizontalmente en cajas de petri de plástico de 90 x 15 mm conteniendo 35 ml de medio de cultivo básico de Schenk y Hildebrandt modificado por Reilly y Washer (SH) (ver Apéndice I) más 2.5×10^{-5} M de BA. El medio se ajustó a un pH de 5.7 - 5.8, solificándolo con 7 g/l de agar. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

1.2 Germinación en peróxido de hidrógeno al 3%

Cincuenta semillas fueron escarificadas por la parte micropilar, y se colocaron en peróxido de hidrógeno al 3% (vo/vol) en la que permanecieron por 7 días; durante este tiempo la solución fue renovada cada 2 días.

Una vez que germinaron (7 días) las semillas provenientes de los dos métodos de germinación probados, les fueron disectados los cotiledones. Posteriormente estos cotiledones se colocaron en cajas de petri conteniendo medio de cultivo de Schenk y Hildebrandt (Apéndice I) suplementado con 2.5×10^{-5} M de BA. En el medio se colocaron 20 cotiledones por caja de petri. Las cajas fueron selladas y puestas en el cuarto de incubación. Las evaluaciones correspondientes se hicieron considerando los parámetros siguientes:

1. Porcentaje de germinación.
2. Porcentaje de contaminación.
3. Porcentaje de cotiledones que formaron brotes.
4. Número de brotes por cotiledón.

2. Selección del explante

Con el objeto de determinar que explante mostraba mayor capacidad morfogénica se realizó un ensayo en el cual se probaron: 1) embriones completos germinados en medio de cultivo; 2) cotiledones y ejes provenientes de embriones cultivados en medio y 3) cotiledones de semillas germinadas en peróxido de hidrógeno al 3%. Los explantes fueron disectados y colocados en medio de cultivo básico SH con 2.5×10^{-5} M de BA.

3. Iniciación de brotes adventicios

Para la iniciación de brotes adventicios, se utilizó el medio básico SH, suplementándolo con diferentes concentraciones de BA que fueron: 0, 1.0, 2.5, 5.0 y 7.5×10^{-5} M. Para llevar a cabo este experimento se utilizaron los cotiledones de las semillas provenientes del mejor método de germinación. Se colocaron los cotiledones de 50 semillas (1000 cotiledones) en cajas de petri con medio de cultivo complementado con BA a las concentraciones antes mencionadas (200 cotiledones por tratamiento), quedando algunos de los cotiledones de

cada una de las 50 semillas en todas las concentraciones. Se colocaron 20 cotiledones por caja de petri tomando a cada cotiledón como unidad experimental por considerar que no hay interacción entre ellos (Villalobos, 1986, comunicación personal). A las 14 semanas de haber iniciado el cultivo, se cuantificó para cada uno de los tratamientos, el número de cotiledones que formaron brotes y el número de brotes por co tiledón.

4. Desarrollo de los brotes

Una vez que se formaron las primeras yemas los cotiledo nes fueron transferidos al mismo medio básico (SH) pero sin BA. Cuatro semanas después estos cotiledones fueron fraccio nados entre 3 a 5 partes, y puestos en frescos con 30 ml de este medio. Después de cuatro semanas, fueron transferidos al mismo medio. Se realizaron trasplantes de este material a un medio fresco cada cuatro semanas. Cuando los brotes al canzaron una longitud aproximada de 0.5 a 1 cm, se separaron del explante inicial, colocándolos individualmente en tubos de ensaye de 80 x 20 mm conteniendo 15 ml de medio básico, con el 50% de la concentración de sales minerales, 2% de sa- carosa y el doble de la concentración de hierro, bajo estas condiciones permanecieron por 6 semanas aproximadamente.

En todos los experimentos las disecciones, siembras y trasplantes de material, se realizaron bajo condicio

nes asépticas, para lo cual se empleó una campana de flujo laminar.

5. Condiciones físicas

Los cultivos fueron mantenidos en una cámara de ambiente controlado con una temperatura de $29 \pm 2^\circ\text{C}$, un fotoperíodo de 16 horas y una intensidad lumínica de $28 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{seg}$.

6. Enraizamiento

Cuando los brotes alcanzaron un tamaño de 2.0 a 2.5 cm se trató de inducir la formación de raíz, mediante los siguientes tratamientos:

6.1 Cincuenta brotes fueron colocados en tubos de ensayo conteniendo 15 ml de agua solidificada con agar (7 g/l) más 0.5 mg/l de ácido naftalenacético (ANA) y 1.0 mg/l de ácido indolbutírico (AIB). A los 7 días estos brotes fueron removidos de este medio, lavándolos posteriormente con agua destilada estéril y colocándolos en charolas conteniendo un sustrato a base de grava, tezontle, arena de río, vermiculita y tierra de jardín (1:1:1:1:1) humedecido con la mitad de la concentración de sales minerales del medio SH. La charola se cubrió con plástico con el objeto de obtener una alta humedad relativa (90% aproximadamente). El sustrato fue regado cada 3 días con esta misma solución.

6.2 Cuarenta y cinco brotes también fueron puestos individualmente en tubos de ensaye con 15 ml de medio básico de Gresshoff y Doy (1972) modificado por Reilly y Washer (Apéndice II) o medio SH a la mitad de la concentración de sales y 2% de sacarosa más diferentes combinaciones de auxinas (Cuadro 1).

Cada 10 días durante 30 días, 15 de estos brotes fueron transferidos al medio básico de Schenk y Hildebrandt o Gresshoff y Doy, pero sin auxinas.

Nota: Cada uno de los tratamientos con auxinas probados que se muestran en el Cuadro 3 (A, B, C, D, E, F) constó de 45 brotes.

7. Análisis de datos

Los datos obtenidos acerca del número de brotes formados por cotiledón fueron analizados mediante un análisis de varianza simple para un diseño completamente aleatorizado, y una prueba de Tukey con la cual se compararon las medias. Se aplicó una prueba de X^2 para k muestras independientes para analizar los resultados obtenidos en cuanto al número de cotiledones que formaron brotes en los diferentes tratamientos. Se calculó el coeficiente de correlación entre las variables estudiadas.

Quadro 1. Concentraciones de auxinas (ANA y AIB) empleadas para suplementar el medio de enraizamiento de los brotes adventicios de *P. maximartinezii*.

Tratamiento	ANA (mg/l)	AIB (mg/l)
A	0	0
B	0.05	0.05
C	0.5	1.0
D	1.0	2.0
E	0.0	3.0
F	0.0	5.0

IV. RESULTADOS

1. Germinación

El 70% de las semillas que permanecieron en peróxido de hidrógeno al 3%, germinaron después del séptimo día. Este día fueron disectados los embriones, los que presentaron diferentes tonalidades, desde el blanco hasta el verde intenso. Esta diferencia en color de alguna manera se correlacionó con la longitud del cotiledón y el tamaño de la radícula, ya que el color blanco se asociaba a los cotiledones de menor longitud y la radícula más corta y el verde intenso a los co tiledones más elongados y la radícula más larga.

El 95% de los embriones germinados en medio de cultivo se tornaron verdes después de los 7 días. Esta condición ca racterizó los embriones germinados. Sin embargo, el color verde no fue homogéneo para todo el embrión, sino solo para la parte que no se encontraba en contacto con el medio de cultivo. Los cotiledones en contacto con el medio permanecieron blancos, constituyendo aproximadamente el 50% del total. Aún cuando no se puede decir que todos los embriones presentaron el mismo color, la diferencia no fue tan notoria como en el caso de las semillas germinadas en peróxido.

Una vez que los cotiledones de las semillas germinadas se establecieron en medio de cultivo, se pudo calcular el porcentaje de contaminación. Al respecto no se observó contaminación en ninguno de los métodos ensayados (Cuadro 2).

Los cotiledones de semillas germinadas en peróxido y los germinados en medio, comenzaron a elongarse y engrosarse después de 10 días en cultivo. No obstante, el engrosamiento no se presentó en la misma magnitud, ya que fue mayor en los cotiledones de semillas germinadas *in vitro*. Se observó que después de 10 días en cultivo éstos cotiledones tomaban una consistencia succulenta, rugosa y translúcida. En estos mismos cotiledones se observaron también pequeñas manchas o puntos oscuros que se distribuían a todo lo largo. Conforme transcurrió el tiempo en cultivo, estos cotiledones se tornaron oscuros y más tarde murieron. Los cotiledones incoloros, nunca adquirieron color verde, tampoco se elongaron ni se engrosaron y para el día 15 en cultivo murieron sin haber formado tejido meristemático ni brotes. Ninguna de estas características fueron observadas en los cotiledones de las semillas germinadas en peróxido.

El número de cotiledones que formaron brotes fue significativamente mayor cuando las semillas se germinaron en peróxido (32%), comparativamente con aquellos germinados en medio de cultivo (2%). En cuanto al número de brotes por coti

Cuadro 2. Respuesta de los cotiledones provenientes de semillas germinadas mediante los dos métodos de germinación probados.

Tratamiento	% germinación	% cotiledones con brotes	No. brotes por cotiledón
Peróxido	70	32	14.0
Medio de cultivo	96	2	13.6

ledón tampoco hubo diferencia, ya que para ambos métodos fue igual (Cuadro 2). De estos resultados destacó que emplear peróxido de hidrógeno al 3% resultó ser el mejor y en los subsiguientes experimentos se utilizaron los cotiledones de las semillas germinadas mediante este proceso.

2. Selección del explante

Embrión completo

Los embriones completos no presentaron formación de brotes. Fue evidente que después de 7 días de que los embriones fueron colocados en el medio de cultivo, éstos se elongaron y tomaron coloración verde, pero conforme transcurrió el tiempo los hipocotilos comenzaron a hincharse, sin que las raíces desarrollaran. Los cotiledones se hincharon y se curvieron hacia el interior. Este hinchamiento aumentó el volumen de los cotiledones, hasta perder su forma característica y aparecer como una masa amorfa de tejido. En estos explantes en ningún momento se pudo distinguir la formación de brotes. Después de ocho semanas en el medio de cultivo, los cotiledones se tornaron color café, y finalmente murieron.

Cotiledones

El análisis del número de cotiledones de *Pinus maximartinezii* señaló que esta especie cuenta con un promedio de 20.5 cotiledones por semilla (observaciones en base a 100 embriones).

Los cotiledones provenientes tanto de semillas germinadas en peróxido, como de embriones germinados *in vitro*, se sembraron en un medio de cultivo con BA. Después de 9 días de cultivo, estos se elongaron y engrosaron adquiriendo una coloración verde. Sin embargo, esta respuesta no se presentó en la misma magnitud, ya que los cotiledones provenientes de embriones germinados *in vitro* presentaron menor elongación y engrosamiento. Asimismo, un número considerable de cotiledones de las semillas germinadas *in vitro*, al cabo de 10 días de cultivo aproximadamente, tomaban una consistencia suculenta y rugosa, volviéndose a la vez translúcidos y conforme transcurría el tiempo en cultivo, se tornaban oscuros y finalmente morían. Los cotiledones de los embriones que habían permanecido en contacto con el medio de cultivo durante la germinación (los cuales constituían casi el 50% del total), siempre permanecieron blancos y nunca se elongaron, tampoco se engrosaron, muriendo posteriormente sin haber formado tejido meristemático, ni brotes. Los cotiledones que no presentaron estas características después de 21 días aproximadamente, desarrollaron tejido meristemático en su superficie. Posteriormente, a partir de este tejido meristemático se inició la formación de pequeños primordios de brote, que finalmente dieron lugar a brotes completamente desarrollados. En el extremo basal del cotiledón se pudo notar la formación de un pequeño callo que nunca se extendió hacia el resto del cotiledón.

Ejes embrionarios

En las condiciones experimentales ensayadas, los ejes embrionarios mostraron muy baja capacidad organogenética. Primeramente, el eje se hinchó y se elongó aproximadamente un tercio de su longitud original. En algunos explantes el aumento de volumen llegó a ser muy pronunciado y nunca se observó tejido meristemático ni yemas. Solo en dos de los hipocotilos que mantuvieron su estructura se logró observar la formación de uno o dos brotes sobre todo en la región próxima al ápice.

3. Efecto de la BA sobre la formación de brotes

La respuesta de los cotiledones a la presencia de BA se describe a continuación:

Fue evidente que cotiledones cultivados en ausencia de BA no formaron brotes en ningún caso. Sin embargo, cuando la BA estuvo presente en los diferentes medios, siempre se apreció la formación de brotes. Se encontraron diferencias en la distribución y número de brotes, dependiendo de la concentración de BA. Observándose una relación directa entre la concentración y el número de brotes formados (Fig. 1). La misma tendencia se encontró en cuanto al número de cotiledones que formaron brotes. Cuando se empleó la concentración más baja de BA ($1 \times 10^{-5} M$) los brotes se diferenciaron con mayor frecuencia en la zona de corte y las puntas de los

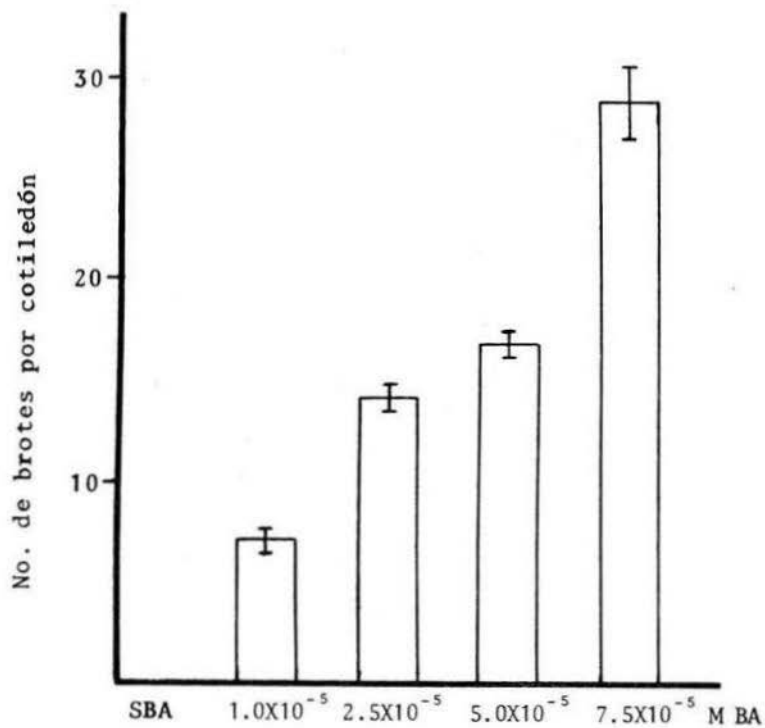


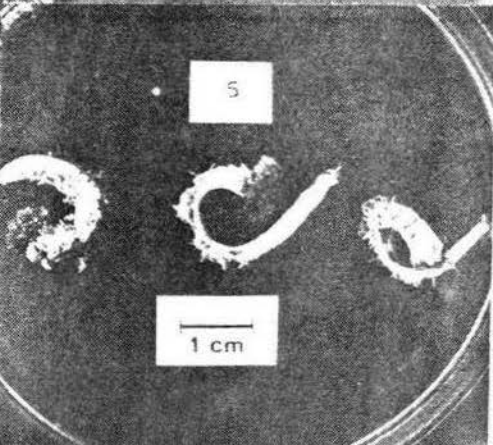
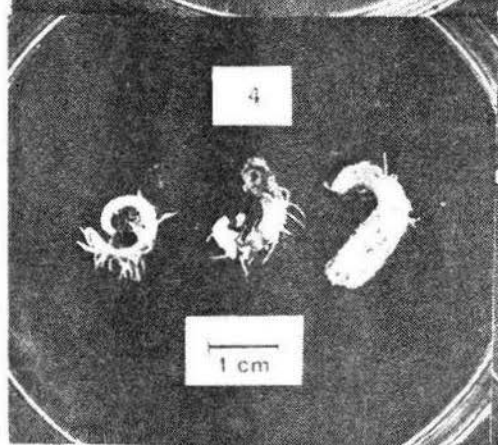
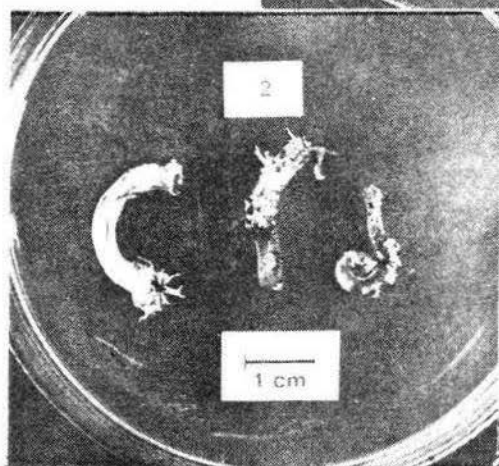
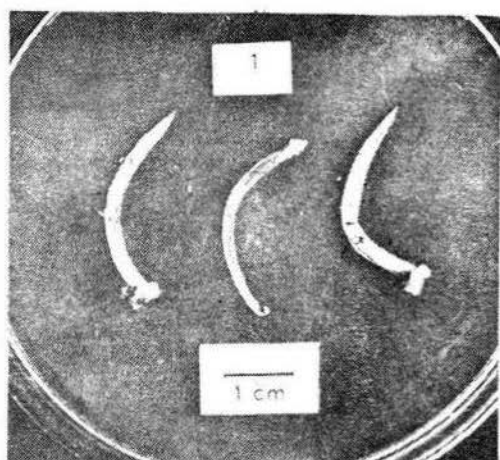
Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de BA sobre la formación de brotes en cotiledones de *P. maximartinezii* ($\bar{X} \pm E.S.$). SBA (sin BA).

cotiledones, aunque en ocasiones también a lo largo de su superficie (Fig. 2-2). En esta concentración se observó la menor frecuencia de cotiledones con brotes (34%) y el menor número de brotes por cotiledón (Cuadro 3).

Conforme se incrementó la concentración de BA, hasta $7.5 \times 10^{-5} M$, los brotes se distribuyeron más homogéneamente en la superficie de los cotiledones (Fig. 2-5), observándose que tanto el número de cotiledones que formaron brotes, como el número de brotes por cotiledón se vieron incrementados (Cuadro 3). El análisis de varianza realizado no refleja diferencias significativas en cuanto al número de brotes por cotiledón al emplear una concentración de 2.5 y $5.0 \times 10^{-5} M$ de BA y el número de cotiledones que formaron brotes básicamente fue el mismo.

Por otro lado la mayor respuesta a la BA fue cuando se utilizó una concentración de $7.5 \times 10^{-5} M$, en donde el 53% de los cotiledones formaron en promedio 29 brotes por cotiledón (Cuadro 3). Los cotiledones de todos los tratamientos su - frieron rompimiento de la epidermis. Este fenómeno se hizo más evidente en los cotiledones que habían permanecido en el medio con 2.5 y $5.0 \times 10^{-5} M$. No se encontraron diferencias significativas en la longitud de los cotiledones provenientes de los diferentes tratamientos con BA. El resultado de las mediciones de los diferentes cotiledones por tratamiento, señalan una longitud aproximada a 21 mm para todos los trata

Figura 2. Diferencias en la distribución de los brotes formados sobre cotiledones de *P. maximartinezii* por efecto de la BA. 1. Cotiledones creciendo en un medio sin BA. De 2 a 5 se muestra la distribución de brotes sobre cotiledones cultivados en un medio con 1.0, 2,5, 5.0 y 7.5×10^{-5} M de BA respectivamente.



Cuadro 3. Respuesta en la formación de brotes en cotiledones de *P. maximartinezii* expuestos a diferentes concentraciones de BA.

Concentración de BA (M)	% cotiledones con brotes	No. brotes por cotiledón	No. brotes por semilla
SBA	0	0	0
1×10^{-5}	34	7.2 ± 0.7	160
2.5×10^{-5}	44	14.3 ± 0.9	280
5.0×10^{-5}	44	17.0 ± 0.7	360
7.5×10^{-5}	53	29.1 ± 1.8	580

mientos con BA (Cuadro 4). Comparativamente los cotiledones del medio control (sin BA) mostraron una longitud mayor (27 mm). Se pudo constatar que los cotiledones en presencia de BA que se encontraban muy elongados por lo regular no formaban tejido meristemático y por lo tanto tampoco formaban brotes. En los cotiledones pequeños, sin embargo a menudo se pudo observar la presencia de algunos brotes sobre su superficie (Fig. 3).

4. Desarrollo de los brotes

Durante los primeros 7 días en presencia de BA, los cotiledones adquirieron un color verde más intenso, al mismo tiempo comenzaron a elongarse aproximadamente una tercera parte más de su longitud inicial (Fig. 4A). Para los 14 días en cultivo los cotiledones alcanzaron casi dos veces su longitud inicial, notándose un aumento en volumen. Después de 21 días la superficie de los cotiledones, mostraron rugosidades cada vez más evidentes conforme transcurría el tiempo en cultivo (Fig. 4B). A los 34 días aproximadamente, a partir de estas zonas rugosas se diferenciaron pequeñas protuberancias con forma de yemas. En ocasiones también se pudo observar primordios foliares, los cuales algunas veces surgían directamente como una prolongación de la epidermis del cotiledón y en otras se diferenciaba sobre un pequeño tallo que se formaba con anterioridad (Fig. 4C). Una vez que los cotiledones fueron transferidos a un medio sin BA, los brotes co -

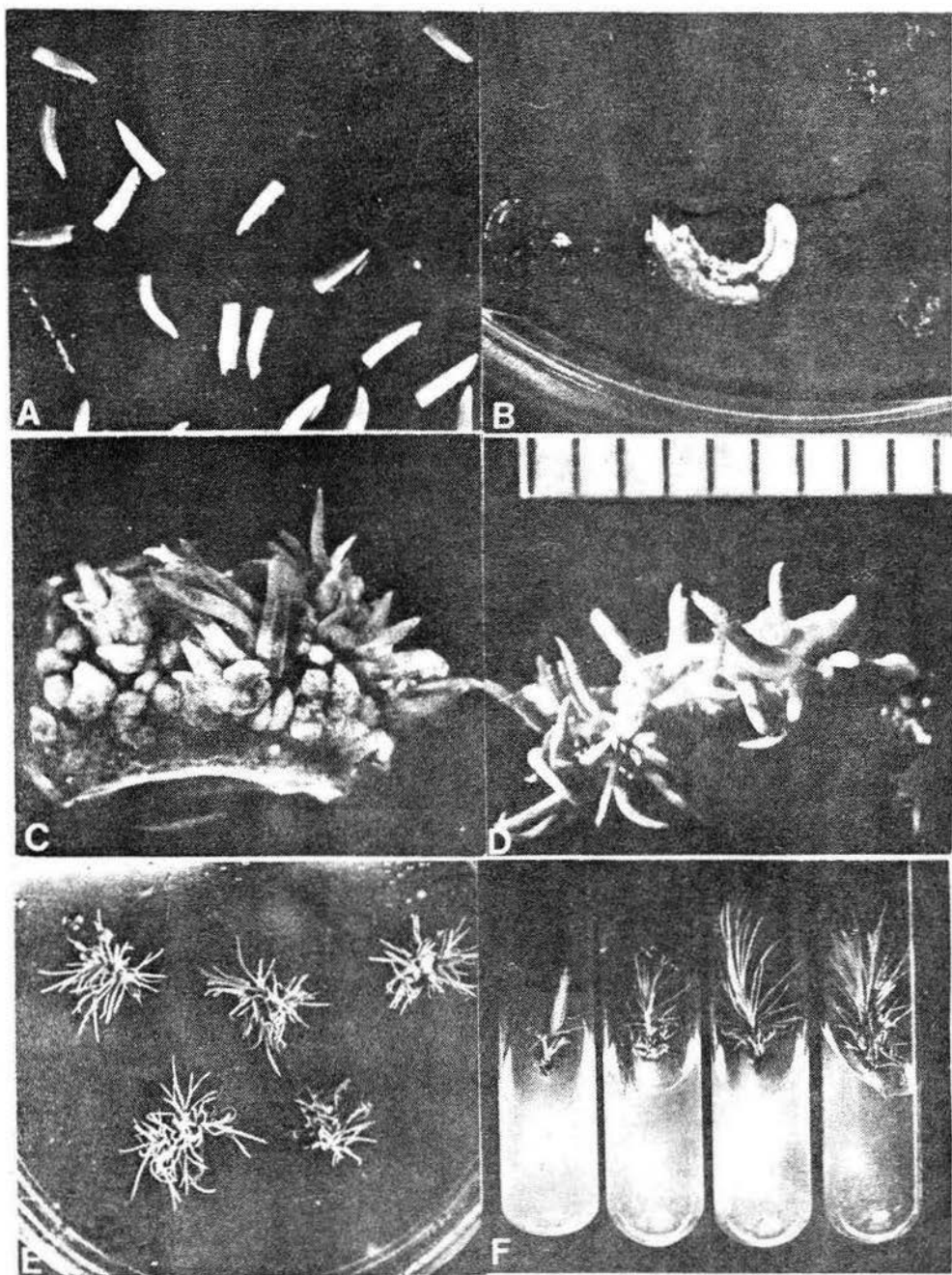
Cuadro 4. Longitud de los cotiledones después de 34 días de haberse mantenido en ausencia (SBA) o presencia de BA.

Tratamiento	Longitud mm
SBA	27.4 \pm 0.4
BA 1×10^{-5} M	22.2 \pm 0.3
BA 2.5×10^{-5} M	20.2 \pm 0.4
BA 5.0×10^{-5} M	20.1 \pm 0.3
BA 7.5×10^{-5} M	22.2 \pm 0.4



Figura 3. A la derecha cotiledones cortos con algunos brotes sobre su superficie. A la izquierda cotiledones largos los cuales no formaron brotes.

Figura 4. Diferenciación de brotes adventicios en cotiledones de *P. maxímartinezii*. A. Cotiledones después de 7 días en cultivo. B. Cotiledones formando tejido meristemático después de 21 días. C. Cotiledón diferenciando las primeras yemas adventicias después de 34 días. D. Grupos de acículas formándose a lo largo de la superficie del cotiledón después de nueve semanas en cultivo. E. Brotes desarrollándose sobre fragmentos de cotiledón después de 14 semanas. F. Apariencia de los brotes después de 25 semanas.



menzaron a elongarse, sin embargo no todos lo hicieron a la misma velocidad, lo que provocó una diferencia en tamaños en un rango aproximado de 3 a 6 mm. El trasplante al medio sin BA no fue suficiente estímulo para el desarrollo de los brotes ya que fueron pocos los brotes elongados, observándose únicamente pequeñas acículas en grupo (Fig. 4D).

Cuando los cotiledones se cortaron en fragmentos, un mayor número de brotes logró crecer, encontrándose que mientras menor fuera el número de brotes unidos al fragmento, estos alcanzaban una longitud mayor en menos tiempo (Fig. 4E). Cuando los brotes se dejaron por mayor tiempo (10 semanas) sin trasplante, las acículas adquirieron una tonalidad amarillenta en proporción al tiempo sin trasplante. El tamaño del brote fue importante, ya que cuando se les quiso aislar y cultivar en forma individual, los brotes muy pequeños murieron, en cambio los brotes con estructura bien definida lograron elongarse. Así el tamaño aproximado de los brotes con mayor índice de sobrevivencia fue de 6 mm en adelante.

Se pudo observar que los fragmentos del cotiledón adquirían una consistencia dura y presentaban una coloración obscura sobre todo en el lugar del corte entre uno y otro fragmento. Además el medio en el que permanecían estos fragmentos también adquirió un tono oscuro. Esto sucedió aproximadamente en el 60% del material. Se observó que conforme ma-

por fuera el número de trasplantes, este efecto iba desapareciendo paulatinamente.

Los brotes diferenciados en la superficie del cotiledón en contacto con el medio, por lo general crecieron hacia el interior del medio de cultivo, siendo común que estos brotes adoptaran un color verde diferente al de los brotes que se desarrollaron en la parte opuesta al medio de cultivo, dándoles una apariencia translúcida y suculenta. Estos brotes presentaron hojas cortas, arrugadas y con un color más intenso (Fig. 5).

5. Enraizamiento

Solo empleando 3 mg/l de AIB se logró estimular la diferenciación de raíz, aunque únicamente en el 3% de los brotes (Fig. 6). En los tratamientos en los cuales se empleó ANA solo o en combinación con AIB fue frecuente observar la formación de callo en la zona del brote que se encontraba en contacto con el medio de cultivo. Este callo se hizo más evidente cuando los brotes permanecieron expuestos a la auxinas por tiempos prolongados. En ocasiones la masa de callo alcanzó un volumen considerable, extendiéndose a las hojas basales, por lo que se hizo difícil distinguir si existían primordios de raíz. Cuando se utilizó solamente AIB fue menos común observar la formación de callo. No existieron diferencias al emplear las sales de los medios de Gresshoff y

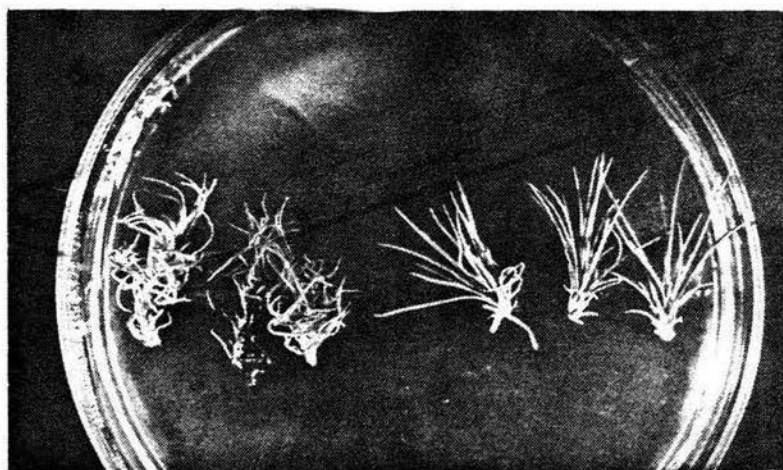


Figura 5. Derecha, brotes normales. Izquierda, brotes translúcidos. Nótese las diferencias en cuanto acículas, tallo y color.

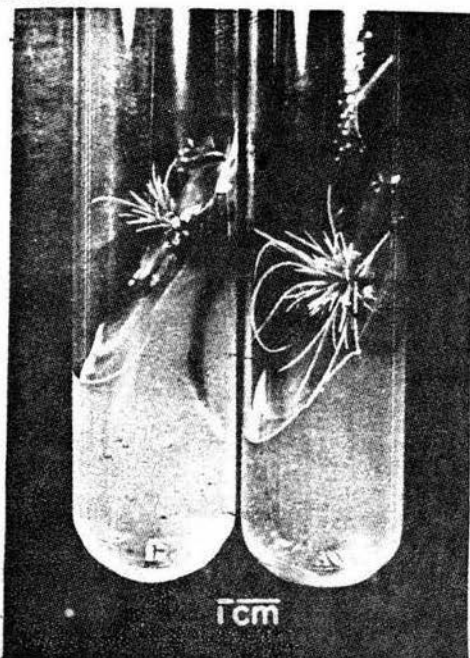


Figura 6. Brotes de *P. maximartinezii* después de haber formado el sistema radical.

Doy o las de Schenk y Hildebrandt, ya que los brotes mostraron el mismo comportamiento en ambos medios de cultivo. Fue posible la formación de raíces espontáneamente, aunque en baja frecuencia.

Respecto al tratamiento de enraizamiento en suelo, el 100% de los brotes murió después de los primeros 8 días, debido principalmente al ataque de hongos.

V. DISCUSION

Un serio problema en el estudio organogenético de *P. maximartínezii* fue que la semilla, al provenir de polinización abierta y sin ningún pretratamiento fitosanitario mostró una alta incidencia de hongos. Con el objeto de controlar la contaminación por hongos se pretendió desinfectar la semilla, y a pesar de haber probado varios desinfectantes y diferentes concentraciones de ellos, no fue posible obtener semillas utilizadas en el cultivo *in vitro*.

Se pudo observar que conforme aumentaba la concentración y el tiempo de exposición a cualquiera de los desinfectantes empleados, disminuía el porcentaje de germinación, pero el emplear bajas concentraciones de éstos, provocaba altos índices de contaminación.

El problema de la contaminación de la semilla fue resuelto al germinar en medio de cultivo o en el peróxido de hidrógeno. El pretratar las semillas con peróxido es un método que normalmente ha sido utilizado para acelerar la germinación (Bonilla y Rava, 1963; Ching, 1959; Takacs, 1964). Sin embargo, Trappe (1961) y Riffle y Springflied (1968) encontraron que el peróxido era efectivo para desinfectar semi

llas sin causarles daño; esto pudo ser comprobado con las semillas de *P. maximartinezii*, ya que permitió evitar la contaminación hasta en un 100%. Al parecer el peróxido de hidrógeno activa la germinación, acelerando la respiración durante la fase anterior a la movilización de sustancias de reserva. Varios mecanismos posiblemente expliquen esta activación; por ejemplo se puede considerar que hay una destrucción directa del peróxido por acción de la catalasa, lo que provoca la liberación de oxígeno molecular el cual a su vez incrementa la tasa de respiración y facilita la oxidación de sustancias grasas (James, 1953; Chance y Williams, 1956). Otra posibilidad es que la peroxidasa reacciona con el peróxido para oxidar inhibidores de crecimiento, presentes en los tejidos, por ejemplo altas concentraciones de auxinas (Waygood y Maclachlan, 1956) y puede ser que el peróxido de hidrógeno actúa directamente como un aceptor de electrones cuando un donador de hidrógeno está presente aumentando la tasa de respiración (Barron *et al.*, 1953 y Dolin, 1955).

Al parecer el emplear peróxido de hidrógeno no supera la estratificación de la semilla (Ching, 1959). Sin embargo, los cotiledones de semillas germinadas en peróxido respondieron mejor a las condiciones de cultivo, que los cotiledones de semillas que fueron estratificadas primero y luego germinadas en medio de cultivo. No obstante, las diferencias, sobre todo en la coloración que presentaron los cotiledones de

las semillas germinadas en peróxido, se reflejaron al momento de cultivarlos. Al parecer, los cotiledones de color verde claro mostraron mayor capacidad para responder a las condiciones de cultivo que los cotiledones muy verdes o casi blancos. Fue evidente que ninguno de los cotiledones verde intenso o blancos, logró igualar el número de brotes producidos por los cotiledones de color verde claro. Posiblemente las células de los cotiledones más verdes y más alargados se encontraban demasiado diferenciados para poder ser inducidos a una actividad meristemática (Aitken *et al.*, 1981). Algo similar pudo haber ocurrido en los cotiledones sin color, aunque posiblemente el estado de diferenciación de estos no haya sido el principal problema, ya que a menudo lograban formar brotes.

Estas diferencias de alguna forma impidieron aumentar la eficiencia en cuanto a la formación de brotes. Lo ideal hubiera sido que todos los cotiledones presentaran una coloración homogénea, ya que de esta manera sería factible obtener hasta un 100% de explantes formando brotes. No obstante, resulta necesario también, mejorar el porcentaje de germinación, para poder incrementar la cantidad de material disponible.

Los resultados muestran claramente que de los cuatro tipos de explante probados en esta investigación, los cotiledo

nes de semillas germinadas en peróxido de hidrógeno fueron los mejores explantes para la formación de brotes, ya que nos permitió obtener un número de brotes muy superior al de los otros tejidos. Al respecto Aitken *et al.* (1981) observó que los cotiledones de semillas germinadas **tenían una capacidad** para formar brotes 12.5 veces mayor que **la que presentaban** los cotiledones de embriones cultivados en medio. Mott *et al.* (1977) también usó este sistema para **incrementar la producción** de brotes en *P. taeda* de 14 a 21 brotes por embrión. Vargas (1982) igualmente reconoce las **ventajas de emplear** cotiledones como explante en *P. patula*.

Se ha observado (Aitken *et al.*, 1981; Vargas, 1982; Villalobos y Robledo, en revisión), que la mayoría de las veces en las que se han empleado embriones completos, fueron los cotiledones los que lograron diferenciar brotes adventicios sobre su superficie. Las características que hacen que los cotiledones sean superiores a otros tipos de explante ya fueron mencionadas con anterioridad (ver antecedentes), pero entre las más importantes se podría mencionar, que al emplear cotiledones se establece un mejor contacto del tejido con el medio de cultivo, además de incrementar al mismo tiempo la superficie sobre la cual los brotes pueden ser formados, ya que en *P. maximartinezii* prácticamente toda la superficie del cotiledón se vió cubierta por estos órganos (dependiendo de la concentración de BA empleada). Así, el número de bro-

tes obtenidos por semilla se incrementó considerablemente, ya que aún cuando sólo se formaran pocos brotes por cotiledón, considerando que esta especie tiene un promedio de 20 cotiledones por semilla, el número de brotes es todavía mayor al que se obtendría cultivando embriones completos, puesto que por lo regular solo los cotiledones y algunas veces los hipocotilos de estos embriones, que se encuentran en contacto con el medio, son capaces de diferenciar brotes. Además, el desarrollo de los brotes formados sobre embriones completos es muy heterogéneo. Se ha observado que los brotes diferenciados a partir del ápice generalmente crecen más rápido que los que se forman sobre los cotiledones (Vargas, 1982). En la presente investigación se observó que cotiledones provenientes de una misma semilla germinada en peróxido se comportaban de manera similar en cultivo.

El tipo de tejido o tejidos que constituye cada tipo de explante influye en su capacidad morfogénica. Así por ejemplo, los cotiledones básicamente están formados de células parenquimáticas las cuales poseen una alta plasticidad fisiológica y pueden ser capaces de llevar a cabo una actividad meristemática (Esau, 1977), lo que las hace más susceptibles a los procesos organogénicos. Comparativamente los ejes embrionarios, tienen una función de conducción primordialmente, por lo que es de esperarse que el tejido más desarrollado aquí sea el tejido vascular, el cual por su grado

de diferenciación va perdiendo su capacidad morfogénica.

Por otro lado, se tienen evidencias de que durante la germinación existe un transporte de citocininas desde la radícula hasta los cotiledones (Konopskaya, 1977). Se ha sugerido que las citocininas que se exportan desde los ejes embrionarios de dicotiledóneas, son responsables del inicio de la actividad enzimática hidrolítica en los cotiledones (Davies y Chapman, 1979; Gepsten y Ilan, 1979). Hutton y Van Staden (1982) encontraron que ^{14}C -t-zeatina aplicada a la punta de la radícula de semillas de *Phaseolus vulgaris* C. fue rápidamente transportada a los cotiledones durante los primeros estados de la germinación, lo cual se correlacionó con la transferencia de reservas de alimento de los cotiledones a los ejes embrionarios en desarrollo. Konopskaya (1977) encontró que en plántulas de chícharo de 3 días de edad, la actividad de las citocininas fue encontrada sobre todo en epicótilos y radículas con solo una pequeña cantidad en los cotiledones, pero por el día 7, el contenido de citocininas ya había incrementado en los cotiledones. Este tipo de procesos pudo tomar lugar en *P. maximartinezii* y puede ser otro factor que ayude a explicar las diferencias en la capacidad morfogénica de los explantes.

Los resultados obtenidos mostraron que la BA no sólo fue necesaria para lograr la diferenciación de brotes adven-

ticios en cotiledones de *P. maximartinezii*, sino que ésta se requirió en niveles altos para lograr una respuesta favorable como se indicó, en ningún momento se observó la formación de brotes sobre los cotiledones cultivados en un medio sin BA. Así, mientras mayor fue la concentración, el número de brotes formados por cotiledón, se vió incrementado. De esta manera fue posible obtener en promedio hasta 580 brotes por semilla, cuando se empleó la concentración más alta ($7.5 \times 10^{-5} M$), aunque concentraciones más bajas también dieron resultados satisfactorios. Estos resultados nos permiten decir que *P. maximartinezii* posee un potencial alto para diferenciar brotes, comparable con el de otras especies en las que se ha logrado esta respuesta, como son *Pseudotsuga menziesii* (Cheng y Voqui, 1977) y *P. radiata* (Aitken et al., 1981), entre otras.

Las diferencias observadas en la distribución de los brotes sobre el cotiledón pudieran ser atribuídas a la presencia de diferentes concentraciones de BA en el medio de cultivo. Así, es posible que los cotiledones expuestos a las concentraciones más bajas ($1 \times 10^{-5} M$) generalmente logran diferenciar brotes solo en los extremos debido a una deficiencia de citocinina exógena y endógena.

De tal forma que cuando la citocinina exógena se encontrara en niveles bajos o no existiera, los niveles endógenos probablemente no serían los necesarios para inducir la forma

ción de brotes.

Se sabe que aparentemente las células cotiledonarias no son capaces de sintetizar *de novo* los niveles adecuados de citocininas (Cheah y Cheng, 1978) por lo que es posible que niveles bajos de éstas, solo lograran estimular a las células más receptoras. Cabe señalar que en los extremos las células son más jóvenes y consecuentemente más susceptibles al efecto de la BA. Es lógico pensar entonces que conforme se incrementaba la citocinina en el medio, existía una mayor posibilidad de lograr estimular un mayor número de células al proceso organogénico y no solo a las de los extremos. De ahí que los brotes se distribuyeran más homogéneamente y en un número mayor en los cotiledones cultivados en un medio de concentraciones más altas de citocininas. En *P. radiata* (Biondi, 1980; Biondi y Thorpe, 1982) y *P. contorta* (Von Arnold y Eriksson, 1981), también se pudo observar un comportamiento de los cotiledones en cultivo similar al expuesto aquí. Es decir, a concentraciones bajas de BA los brotes adventicios fueron formados solo en la punta de los cotiledones, mientras que a concentraciones más altas, los brotes fueron inducidos sobre el cotiledón completo y un número mayor de brotes fue producido.

Aún cuando en *P. maximartinezii* el efecto de la BA sobre la elongación de los cotiledones cultivados no fue tan

evidente como en otras especies tales como *P. radiata*, en donde los cotiledones creciendo en medio libre de BA fueron casi cinco veces más largos que los explantes tratados con BA, se pudo observar que los cotiledones de todos los tratamientos con BA presentaban una longitud menor que los que se encontraban en un medio sin BA. Por lo que es posible que uno de los papeles de la BA en este sistema fuera el de restringir la elongación del cotiledón.

En la diferenciación de brotes adventicios inducidos sobre cotiledones de *P. maximartinezii* se pudieron observar varias fases: 1) formación de tejido meristemático; 2) formación de primordios de brote; 3) brotes bien diferenciados. Cada una de estas fases se llevó a cabo en un tiempo determinado y bajo diferentes condiciones de cultivo. Así, para la formación óptima de los brotes adventicios fue necesaria la presencia de BA en el medio de cultivo por aproximadamente 4 ó 5 semanas, una vez que comenzaron a emerger los primeros primordios, los explantes tuvieron que ser transferidos a un medio sin BA, para permitir su desarrollo. Se observó, que mantener los brotes en el medio de inducción por un período de tiempo mayor (8 semanas o más) provocaba que los brotes crecieran lentamente. Von Arnold y Eriksson (1978) observaron que mantener el explante una vez que había formado yemas, por un período de tiempo mayor de cinco semanas, reducía considerablemente el porcentaje de brotes formados. En esta in

vestigación, sin embargo, no todos los primordios en el medio sin BA, crecieron con la misma rapidez. Se encontró diferencias en tamaños, posiblemente por competencia o una inhibición mutua entre los brotes (Biondi, 1980).

Tanto en *P. radiata* (Biondi, 1980) como en *P. contorta* (Von Arnold y Eriksson, 1981) se ha observado que los brotes inducidos con concentraciones de BA altas, se desarrollaban más lentamente, en contraste con los brotes formados en concentraciones más bajas. En *P. maximartinezii* no fue posible observar una diferencia clara en el desarrollo de los brotes inducidos en las diferentes concentraciones de BA y solo al emplear la concentración más baja ($1.0 \times 10^{-5} M$), se pudo observar que los brotes se desarrollaban ligeramente más rápido. Sin embargo esto pudo no solo deberse al efecto de la BA, sino también al hecho de que a mayor concentración, también mayor era el número de brotes formados por cotiledón, lo que pudo haber provocado, que existiera una competencia más marcada entre los brotes, que en el caso de los cotiledones con una cantidad mucho menor de estos, como ocurrió en las concentraciones más bajas. Se requirió de fragmentar los cotiledones para que un mayor número de brotes lograra elongarse, quizás porque de esta manera se atenuaba el efecto de competencia e inhibición. Al respecto, Von Arnold y Eriksson (1978), encontraron que sobre cada embrión de *Picea abies*, solo dos ó tres yemas lograban elongarse al mismo

tiempo y cuando se aislaban yemas de 3 a 5 mm comenzaban a elongarse nuevos brotes.

Los brotes translúcidos y suculentos observados en *P. maximartinezii* ya habían sido encontrados antes en *P. radiata*. Se pensaba que este fenómeno estaba relacionado con niveles bajos de citocinina en el medio o con el potencial osmótico del mismo. Sin embargo, Aitken (1980, datos no publicados), encuentra que la presión osmótica externa influye poco o no influye en la producción de brotes translúcidos en *P. radiata*. Pero que niveles más altos de BA durante un período extra de tres semanas, causaba una disminución en el número de estos brotes, pero también se disminuía el número de brotes normales producidos. Este autor encontró que los brotes translúcidos tenían grandes espacios de aire dentro de ellos y su morfología era similar a la de plantas que crecen en un medio ambiente con abundante agua. De tal forma que se piensa que estos brotes absorben o transportan muchos nutrientes y agua. Este fenómeno en *P. maximartinezii*, se dio con mayor frecuencia en los brotes que crecían sobre la superficie del cotiledón en contacto con el medio, posiblemente porque su cercanía con él era tal, que estos brotes tuvieron la oportunidad de absorber una mayor cantidad de nutrientes. El obscurecimiento del medio de cultivo así como de los cotiledones, es algo que fue evidente en esta investigación y se ha observado que es una de las dificultades en

plantas leñosas y algunas especies hortícolas. Se puede deber comúnmente, a la deposición de polifenoles y de productos de oxidación. También puede haber un incremento en lignina, suberina y cutina que a menudo modifica tanto la composición del medio, como la absorción de metabolitos (Tran Thanh Van, 1981). Se considera que el realizar un mayor número de trasplantes o aislar los brotes formados del resto del cotiledón ayudaría a resolver este problema.

Uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la obtención de plantas *in vitro* de especies forestales, es la inducción del sistema radical. No obstante, este problema no se presenta en la misma magnitud para todas las especies, ya que se pueden encontrar algunas que tienen la capacidad para formar raíces aun sin la aplicación exógena de auxinas, como son *Thuja plicata* (Coleman y Thorpe, 1977), *Pinus contorta* (Von Arnold y Eriksson, 1981) y *P. patula* (Vargas, 1982). Sin embargo, esta respuesta no rebasa al 1%, del mismo modo pueden existir casos aunque no muy frecuentes, en los que hasta un 10% de los brotes formaron raíces espontáneamente, en el mismo medio de elongación, como es el caso de *P. caribaea* (Villalobos y Robledo, en revisión). En el caso de *P. maximartinezii*, a pesar de haber estimulado el enraizamiento mediante varios tratamientos con auxinas, y tratar de emplear la concentración de sacarosa y nutrientes comúnmente usadas por otros autores (Reilly y Washer, 1977; Rancillac *et al.*, 1982; Aitken *et al.*, 1982; Patel y Thorpe

1984), solo en uno de los tratamientos probados (3 mg/l de AIB) se logró, aunque en baja proporción, la formación de raíz. Esto apoya lo observado por otros autores pues cada especie tiene sus requerimientos.

En el presente estudio no fue posible establecer las condiciones adecuadas para la formación del sistema radical. Se considera que quizás sea necesario ampliar el rango de concentraciones de auxinas aquí probado o ensayar otras combinaciones. Otra alternativa a contemplar en futuras investigaciones es el empleo de diferentes niveles de sacarosa, ya que aún cuando es común incluir el 2% en el medio de cultivo, Cheng y Voqui (1977) encontraron que el emplear concentraciones más bajas que 2% (0.5 a 1%), estimulaba el enraizamiento y que un exceso de la misma reducía la vitalidad de los brotes. Contradictoriamente, Minocha (1980), observó que altas concentraciones (3 - 6%) favorecían este proceso. La temperatura es otro de los factores que se ha visto que afecta la formación de raíz. Existen evidencias de que la temperatura puede influir en el modo de acción de las auxinas. Se esperaría que las células cultivadas a temperaturas mayores de 24°C fueran metabólicamente más activas, que las que permanecen en temperaturas más bajas (19 ó 20°C). Así el efecto hormonal de las auxinas se podría expresar estimulando la formación de raíces adventicias a bajas temperaturas o estimulando la proliferación de callo a temperaturas

más altas, lo cual podría evitar que las células se organizaran para dar origen a los primordios radicales (Cheng y Voqui, 1977). Esto pudo suceder en los brotes de *P. maximartinezii* que se expusieron por tiempos prolongados al ANA. No obstante, en los brotes que fueron inducidos por períodos más cortos y que no se dio la proliferación de callo, tampoco se observó la formación de raíces.

El tipo de citocinina que se empleó para inducir la formación de brotes adventicios también pudo haber influido en la capacidad de enraizamiento ya que Webb y Street (1977), demostraron que los brotes de *Pinus contorta* y *Picea sitchensis*, formaban más raíces cuando se empleo 2-iP o cinetina para la inducción de los brotes, que cuando se utilizó BA. También notaron que las citocininas con una capacidad de inducción de brotes alta, inhibían tanto el enraizamiento como la elongación de los brotes. Por otro lado, se debe considerar la dificultad para duplicar *in vitro* la combinación de condiciones medio ambientales necesarias para la inducción de raíces, debido a que las condiciones de frío, humedad, alta intensidad lumínica, combinadas con un sustrato caliente y poroso, difícilmente son logrados *in vitro* (Boulay, 1977). Apoyando esta idea se puede mencionar que cuando se trató de enraizar en charolas, se tuvieron muchos problemas principalmente con el control en la humedad, puesto que si se mantenía una humedad relativa alta se provocaba una rápida y abundante

dante proliferación de hongos que finalmente causaban la muerte de los brotes antes de que se pudiera formar el sistema radical.

VI. CONCLUSIONES

El empleo del peróxido de hidrógeno al 3% en la germinación de las semillas de *Pinus maximartínezii*, eliminó la contaminación en un 100% y permitió una mejor respuesta del tejido cuando se le cultivo *in vitro*.

De los cuatro tipos de explante probados los cotiledones de semillas germinadas mostraron tener una capacidad mayor para formar brotes adventicios.

La gran heterogeneidad de la semilla hizo difícil la selección del material en un mismo estado fisiológico que nos permitiera obtener una respuesta más homogénea.

Fue necesaria la presencia de BA en el medio de cultivo para la diferenciación de brotes adventicios, pudiéndose obtener hasta 580 brotes por semilla empleada cuando la BA se encontraba en el medio a una concentración de $7.5 \times 10^{-5} M$.

Aún cuando en la presente investigación no se logró inducir el sistema radical en buena medida, ya que sólo el 3% de los brotes formó raíz en un medio con 3 mg/l de AIB, sabemos que los brotes regenerados *in vitro* poseen la capacidad

para hacerlo. Sin embargo, es necesario estudiar con mayor profundidad los factores que determinan el proceso, puesto que el enraizamiento es uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la diferenciación *in vitro* de plantas de gimnospermas.

Se puede decir que como en otras especies es factible la formación de plantas de *P. maximartínezii* a partir de cotiledones.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Aitken, J., K.J. Horgan y T.A. Thorpe. 1981. Influence of explant selection on the soot-forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. Can. J. For. Res. 11: 112-117.
- Aitken, J., K. Horgan y D.R. Smith. 1982. Micropropagation of radiata pine. Vgeskrif for Jordbrug. 19: 375-382.
- Ball, E. 1950. Differentiation in a callus of *Sequoia sempervirens*. Growth 14: 295-325.
- Banerjee, J.N. y N.W. Radforth. 1969. *In vitro* studies on the developing embryos of *Pinus resinosa*. Bot. Mag. Tokyo. 82: 329-340.
- Barron, E.S.G., L. Seki y P. Johnson. 1953. Studies on the mechanism of action of ionizing radiations. VIII. Effect of H₂O₂ on cell metabolism, enzymes and proteins. Arch. Biochem. Biophys. 41: 188-202.
- Biondi, S. 1980. Some aspects of plant organogenesis in cultured explants. Tesis. M. Science. Univ. Calgary, Calgary. 181 p.
- Biondi, S. y T.A. Thorpe. 1982. Growth regulator effects metabolite changes in respiration during shoot initiation in cultured cotyledon explants of *Pinus radiata*. Bot. Gaz. 143(1): 20-25.
- Bonilla, J.A. y C.A. Rava. 1963. Aceleración de la germinación de semillas de *Pinus pinaster*. Boletín. Depto. Fores. Montevideo 5: 1-6.

- Bornman, C.H. 1983. Possibilities and constraints in the regeneration of trees from cotyledonary needles of *Picea abies* *in vitro*. *Physiol. Plant.* 57: 5-16.
- Boulay, M. 1977. Multiplication rapide du sequoia *sempervirens* en culture *in vitro*. AFOCEL. *Etud. Rech.* 9: 83-145.
- Brunner, G. 1932. Beiträge zur Entwicklungsphy. Siologie der Kiefernkeim linge. *Jb. Wiss. Bot.* 76: 407-440.
- Campbell, R.A. y D.J. Durzan. 1975. Induction of multiple buds and needles in tissue culture of *Picea glauca*. *Can. J. Bot.* 53: 1652-1657.
- Campbell, R.A. y D.J. Durzan. 1976. Vegetative propagation of *Picea glauca* by tissue culture. *Can. J. For. Res.* 6: 240-243.
- Chalupa, V. y D.J. Durzan. 1973a. Growth of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) tissue and cell cultures.
- Chance, B. y G.R. Williams. 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances in Enzymol.* 17: 65-134.
- Cheah, K.T. y T.Y. Cheng. 1978. Histological analysis of adventitious bud formation in cultured Douglas-fir cotyledon. *Am. J. Bot.* 65: 845-849.
- Cheng, T.Y. 1975. Adventitious bud formation in culture of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb Franco). *Plant Sci. Lett.* 2: 97-102.
- Cheng, T.Y. 1976. Vegetative propagation of Western Nemlock (*Tsuga heterophylla*) through tissue culture. *Plant and Cell Physiol.* 17: 1347-1350.
- Cheng, T.Y. 1977. Factors affecting adventitious bud formation of cotyledon culture of Douglas fir. *Plant. Sci. Lett.* 9: 179-187.

- Cheng, T.Y. y T.H. Voqui. 1977. Regeneration of Douglas fir plantlets through tissue culture. *Science*. 198: 306.
- Ching, T.M. 1959. Activation of germination in Douglas fir seed by hidrogen peroxide. *Plant Physiol.* 34(5): 557-563.
- Coleman, W.K. y T.A. Thorpe. 1976. Induction of buds in tissue cultures of four different conifers. *Plant Physiol (Suppl.)* 57: 67.
- Coleman, W.K. y T.A. Thorpe. 1977. *In vitro* culture of estern red cedar (*Thuja plicata*). I. Plantlet formation. *Bot. Gaz.* 138: 298-304.
- Dolin, M.I. 1955. The DPNH-oxidizing enzymes of streptococcus faecalis. II. The enzyme utilizing O₂, cytochrome C, peroxide and 2-6-dichlorophenolindophenol or ferricyanide as oxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 55: 415-435.
- Davies, H.V. y J.M. Chapman. 1979. The control of food mobilization in seeds of *Cucumis sativus* L. II. The role of the embryonic axis. *Planta.* 146: 585-590.
- Douglas, T.J., V.M. Villalobos, M.R. Thompson y T.A. Thorpe. 1982. Lipid and pigment changes during shoot initiation in cultured explants of *Pinus radiata*. *Physiol. Plant.* 55: 470-477.
- David, A., H. David y T. Meteilie. 1982. *In vitro* adventitious budding on *Pinus pinaster* cotyledons and needles. *Physiol. Plant.* 56: 102-107.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants*. 2a. Ed. John Wiley and Sons. Inc. California 550 p.
- Gautheret, R.J. 1934. Culture du tissu cambial. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 198: 2195-2196.

- Gepstein, S. y I. Ilan. 1979. Cytokinin induced amylolytic activity in bean cotyledons: Identification of the regulated enzyme. *Plant. Cell. Physiol.* 20: 1603-1607.
- Greenwood, M.S. y G.P. Berlyn. 1965. The regeneration of active root meristems *in vitro* by hypocotyl sections from dormant *Pinus lambertiana* embryos. *Can. Jour. Bot.* 43: 173-175.
- Hutton, M.J. y J. Van Staden 1982. Cytokinins in germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L. II. Transport and metabolism of $8 [^{14}C]$ t-zeatin applied to radicle. *Ann. Bot.* 49: 693-699.
- James, W.O. 1953. *Plant respiration*. Oxford University Press. Londres.
- Kirby, E.G. y M.E. Schalk. 1982. Surface structural analysis of cultured cotyledons of Douglas-fir. *Can. J. Bot.* 60: 2729-2733.
- Konopskaya, L.N. 1977. Content of cytokinins in pea seeds during germination. *Soviet Plant Physiol.* 236: 113-115 (Transl. from *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 236: 1270-1272).
- Konar, R.N. y Y.P. Oberoi. 1965. *In vitro* development of embryoids on the cotyledons of *Biota orientalis*. *Phytomorphol.* 15: 137-140.
- Konar, R.N. 1972. Tissue and cell culture of pine and allied conifers. Report of research sponsored under USDA. PL. 480, Delhi, 35 pp.
- Minocha, S.C. 1980. Callus and adventitious shoot formation in excised embryos of white pine (*Pinus strobus*). *Can. J. Bot.* 58: 366-370.
- Mott, R.L., R.H. Smeltzer, A. Mehra-Palta y B.J. Zobel. 1977. Production of forest trees by tissue culture. *Tappi.* 60: 62-64.

- Mott, R.L. 1978. Interaction of seed pre-treatments and growth regulators on bud regeneration from excised pine cotyledons. In Abstracts. 4th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Calgary. Abstr. 108, p. 29.
- Obata-Sasamoto, H., V.M. Villalobos y T.A. Thorpe. 1984. ^{14}C -metabolism in cultured cotyledon explants of radiata pine. *Physiol. Plant.* 61: 490-496.
- Patel, K.R. y T.A. Thorpe. 1984. *In vitro* differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud.) *Plant Cell Tissue Organ Culture.* 3: 131-142.
- Rancillac, M., M. Faye y A. David. 1982. *In vitro* rooting of clone shoots in *Pinus pinaster*. *Physiol. Plant.* 56: 97-101.
- Reilly, K.J. y J. Washer. 1977. Vegetative propagation of radiata pine by tissue culture: plantlet formation from embryonic tissue. *N.Z. For. Sci.* 7: 199-206.
- Riffle, J.W. y H.W. Springfield. 1968. Hydrogen peroxide increases germination and reduces microflora on seed of several southwestern woody species. *For. Sci.* 14(1): 96-101.
- Rumary, C. y T.A. Thorpe. 1984. Plantlet formation in black and white spruce. I. *In vitro* techniques. *Can. J. For. Res.* 14: 10-16.
- Schmidt, A. 1924. Veberdie chlomplyllbild in koniferenembryo. *Botan. Arch.* 5: 260-282.
- Sommer, H.E., C.L. Brown y P.P. Kormanik. 1975. Differentiation of plantlets in long leaf pine (*Pinus palustris*, Mill) tissue cultured *in vitro*. *Bot. Gaz.* 136: 196-200.

- Takacs, E.A. 1964. Utilización del agua oxigenada concentrada para estimular la germinación de *Pinus taeda* L. Suplemento forestal. Inst. Nal. Tec. Agro. Argentina. p. 45-46.
- Thorpe, T.A. 1978. Regulation of organogenesis *in vitro*. In: Propagation of higher plants through tissue culture: A Bridge between research and application. Univ. of Tennessee Symp. Proc. April 16-19, 1978. Knoxville, Tn. pp. 87-101.
- Thorpe, T.A. 1980. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11A: 71-111.
- Tran Thanh Van, K.M. 1981. Control of morphogenesis *in vitro* cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 32: 291-311.
- Trappe, J.M. 1961. Strong hydrogen peroxide for sterilizing coats of tree seed and stimulating germination. J. For. 59: 828-829.
- Vargas, J.J. 1982. Morfogénesis *in vitro* de *Pinus patula* Schl. Et Cham. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 126 p.
- Villalobos A., V.M., M.J. Oliver, E.C. Yeung y T.A. Thorpe. 1984a. Cytokinin-induced switch in development in excised cotyledons of radiata pine cultured *in vitro*. Physiol. Plant. 61: 483-489.
- Villalobos A., V.M., D.W.M. Leung y T.A. Thorpe. 1984b. Light-cytokinin interactions in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. Physiol. Plant. 61: 497-504.
- Villalobos A., V.M., E.C. Yeung y T.A. Thorpe. 1985. Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons cultured *in vitro*. Can. J. Bot. 63: 2172-2176.

- Von Arnold, S. y T. Eriksson. 1978. Induction of adventitious buds on embryos of Norway spruce grown *in vitro*. *Physiol. Plan.* 44: 283-287.
- Von Arnold, S. y T. Eriksson. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.* 59: 870-874.
- Waygood, E.R. y G.A. Maclachlan. 1956. The effect of catalase, riboflavin and light on the oxidation of indoleacetic acid. *Physiol. Plantarum* 9: 607-617.
- Webb, K.J. y H.E. Street. 1977. Morphogenesis *in vitro* of *Pinus* y *Picea*. *Acta Hortic.* 78: 259-269.
- Weeb, D.T. y O. Díaz S. 1983. Cytokinin induced bud formation on caribbean pine (*Pinus caribaea* Morlet) embryos *in vitro*. *Plant Sci. Lett.* 32: 17-21.
- White, P.R. y P.G. Risser. 1964. Some basic parameters in the cultivation of spruce tissue. *Physiol. Plan.* 17: 600-619.
- Yeung, E.C., J. Aitken, S. Biondi y T.A. Thorpe. 1981. Shoot histogenesis in cotyledon explants of radiata pine. *Bot. Gaz.* 142: 494-501.

VIII. A P E N D I C E

Apéndice I. Medio Schenk y Hildebrandt (1972) modificado por Reilly y Washer (1977).

Compuesto	mg L ⁻¹
<u>Macronutrientes</u>	
KNO ₃	2500.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	400.0
NH ₄ H ₂ PO	300.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	200.0
<u>Micronutrientes</u>	
MnSO ₄ · H ₂ O	20.0
H ₃ BO ₃	5.0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.0
KI	1.0
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.2
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.2
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.2
<u>Vitaminas</u>	
Tiamina HCl	5.0
Acido nicotínico	5.0
Piridoxina HCl	0.5
<u>Hierro</u>	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	15.0
Na ₂ EDTA	20.0
Sacarosa	30000.0

Apéndice II. Medio Gresshoff y Doy (1972) modificado por Reilly y Washer (1977).

Compuesto	mg L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	200.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	150.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250.0
KNO ₃	100.0
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	90.0
Na ₂ HPO ₄	30.0
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	38.3
Mn SO ₄ · H ₂ O	10.0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	3.0
H ₃ BO ₃	3.0
KI	0.75
Cu SO ₄ · 5H ₂ O	0.25
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
Inositol	10.0
Tiamina HCl	1.0
Acido nicotínico	0.1
Piridoxina	0.1
Sacarosa	20000.0