

175
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

***Cultivo in vitro de embriones
maduros de Pinus ayacahuite Ehrenb.***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

RICARDO SOTELO MARTINEZ

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

RESUMEN	3
1 INTRODUCCIÓN	6
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.	9
3. ANTECEDENTES	11
3.1 IMPORTANCIA DEL <i>Pinus ayacahuite</i> Ehrenb.	11
3.2 CULTIVO in vitro DE CONÍFERAS	12
3.2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.	12
3.2.2 PROPAGACIÓN VEGETATIVA.	12
3.2.3 CULTIVO DE EMBRIONES	17
3.2.3.1 FACTORES NUTRIMENTALES	19
3.3 CARACTERÍSTICAS DEL INÓCULO.	22
3.3.1 EDAD	22
3.3.2 ÉPOCA DE COLECTA	24
3.3.3 TAMAÑO	25
3.3.4 LOCALIZACIÓN EN LA PLANTA PARENTAL	25
3.4 CONDICIONES QUE INTERVIENEN EL CULTIVO in vitro.	26
3.4.1 NUTRIMENTOS	26
3.4.2 REGULADORES DEL CRECIMIENTO	30
3.4.3 Ph DEL MEDIO	32
3.4.4 SUBSTRATO	32
3.4.5 LUZ	33
3.4.6 TEMPERATURA	33
4. MATERIAL Y MÉTODOS	36
4.1 ESTABLECIMIENTO DE LOS INÓCULOS	36
4.1.1 DESINFECCIÓN	36
4.1.2 MEDIO DE CULTIVO	38
4.1.3 REGULADORES DEL CRECIMIENTO	38
4.2 PROLIFERACIÓN	42
4.3 TOMA DE DATOS.	42
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	44
5.1 DESINFECCIÓN.	44
5.2 MEDIO DE CULTIVO.	45
5.3 EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO	48
5.3.1 AUXINA; ANA	48
5.3.2 CITOCININAS	50
5.3.2.1 CINETINA	50
5.3.2.2 2iP	50
5.3.2.3 BENCIL AMINO PURINA (BA)	53
5.3.3 INTERACCIÓN AUXINA-CITOCININAS	53
5.3.3.1 ANA-Cinetina/2iP	54
5.3.3.2 ANA-BA	54
5.4 ZONA DE FORMACIÓN DE LOS BROTES SOBRE LOS EMBRIONES	65
5.5 DESARROLLO DE LOS BROTES	66
6 CONCLUSIONES.	68

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	FASES DEL CULTIVO <u>IN VITRO</u> DE EMBRIONES DE PINO.....	18
2	DIAGRAMA DE GRADIENTES DE MADUREZ EN ARBOLES....	23
3	NUMERO PROMEDIO POR TRATAMIENTO, PRODUCIDOS POR ANA Y BA EN MEDIO SH.....	59
4	NUMERO TOTAL DE BROTES POR TRATAMIENTO DE ANA Y BA EN MEDIO SH.....	61
5	NUMERO PROMEDIO DE BROTES POR TRATAMIENTO PRODUCIDOS POR ANA Y BA EN MEDIO DCR.....	63
6	NUMERO TOTAL DE BROTES POR TRATAMIENTO DE ANA Y BA EN MEDIO DCR.....	65

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PAGINA
1 FORMULACION MAS AMPLIAMENTE UTILIZADAS.....	27
2 CONCENTRACION DE CLORURO DE MERCURIO SOBRE EL % DE SUPERVIVENCIA EN EMBRIONES EN CULTIVO....	37
3 MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS <u>IN VITRO</u> EN EMBRIONES DE <u>Pinus ayacahuite</u>	39
4 CONCENTRACION DE REGULADORES PARA EL MEDIO SH..	40
5 CONCENTRACION DE REGULADORES PARA EL MEDIO DCR..	41
6 EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y PRODUCCION DE BROTES.....	47
7 EFECTO DE ANA INDIVIDUAL EN LA PRODUCCION DE CALLO EN MEDIO SH.....	49
8 PRODUCCION DE CALLO Y BROTES EN TRATAMIENTOS DE CITOCININAS INDIVIDUALES EN MEDIO SH.....	52
9 EFECTO DE ANA Y BA EN LA PRODUCCION DE CALLO Y BROTÉS EN MEDIO SH.....	56
10 EFECTO DE ANA Y BA EN LA PRODUCCION DE CALLO Y BROTÉS EN MEDIO DCR.....	57
11 NUMERO PROMEDIO DE BROTES POR EMBRION, DE ACUERDO A ACADA TRATAMIENTO, PRODUCIDOS POR ANA Y BA EN EL MEDIO SH A 5 MESES.....	58
12 NUMERO TOTAL DE BROTES POR TRATAMIENTO CON ANA Y BA EN MEDIO SH.....	60
13 NUMERO PROMEDIO DE BROTES POR TRATAMIENTO, PRODUCIDOS POR ANA Y BA EN MEDIO DCR.....	62
14 NUMERO TOTAL DE BROTES POR TRATAMIENTO DE ANA Y BA EN MEDIO DRC.....	64

RESUMEN

El *Pinus ayacahuite* Ehrenb constituye una de las 50 especies nativas de México, se caracteriza por formar poblaciones aisladas de tamaño variado en diversas regiones montañosas del país. Es una especie muy apreciada por sus características maderables; considerada importante por poseer madera de buena calidad, utilizada normalmente en chapa, papel, pulpa, postes, construcciones y por su madera suave es utilizada en artesanía.

En la actualidad se menciona que la demanda mundial de los productos forestales se incrementará considerablemente en las próximas décadas. Tales pronósticos no se alejan mucho de la realidad si tomamos en cuenta la creciente demanda por parte de las industrias, lo cual limita drásticamente la existencia de los bosques. Ante este panorama, es necesario producir árboles que respondan a la demanda de derivados forestales. Es necesario, por un lado, plantar árboles de ciclo corto, y por otro lado, aplicar un sistema que permita la multiplicación masiva de los individuos con las características deseadas.

Actualmente, la genética forestal y los sistemas tradicionales de propagación ofrecen posibilidades muy limitadas para obtener y multiplicar estos genotipos en gran escala. El largo período de crecimiento desde la semilla hasta la floración (de 15 a 20 años) es uno de los grandes obstáculos para el mejoramiento genético convencional no sólo para el *Pinus ayacahuite*; además la mitad o tres cuartas partes de la información acumulada mediante estudios generacionales se desaprovechan por falta de continuidad de los programas a largo plazo o por la pérdida de la fuente de la semilla. Ante este panorama poco alentador, la técnica de cultivo in vitro representa una posible solución para los problemas forestales.

Este trabajo plantea aplicar ciertos principios del cultivo in vitro para mostrar el potencial de la técnica en la propagación, en una especie en donde no existe hasta ahora ningún antecedente relacionado. Se pretende conocer los procesos morfogénéticos que ocurren en los embriones maduros de *Pinus ayacahuite*, cultivados en diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA), para producir brotes adventicios.

Se utilizaron semillas de polinización abierta. Los embriones maduros disectados fueron desarrollados sobre la superficie del medio SH (Schenk y Hildebrant, 1972) o en el DCR (Gupta y Durzan, 1985), adicionados con ANA y BA, individual o combinados a diferentes concentraciones.

La inducción múltiple de yemas adventicias sobre la superficie de los cotiledones fue estimulada con mayor eficacia (para ambos medios de cultivo) solo cuando se encontraron actuando al mismo tiempo ANA y BA, la concentración de ANA tuvo que ser baja (0 o 10^{-7} M), con respecto a BA (10^{-5} o 2.5×10^{-5} M), aunque en el medio SH con los mismos tratamientos se obtuvo formación de brotes, la máxima iniciación de brotes adventicios y desarrollo de los mismos fue mostrado en el medio DCR.

La presencia individual de ANA (independientemente de su concentración) produjo la formación de callo. En todas las concentraciones utilizadas de citocininas (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 2.5×10^{-5} y 10^{-4} M) individuales mostraron siempre la inducción de yemas, siendo solo BA requerido para la formación de yemas múltiples.

El desarrollo de plántulas requiere de un procedimiento diferente; que consiste en un distinto balance de reguladores y nutrimentos para cada una de las etapas de desarrollo.

El alargamiento de los brotes fue logrado con la transferencia de los brotes a un medio basal con el 50% de su concentración, sin reguladores de crecimiento y con 20 g l^{-1} de sacarosa.

La metodología para la obtención de brotes en embriones de *Pinus ayacahuite* Ehrenb queda establecida y muestra el potencial de la técnica en la propagación masiva y su posible aplicación en el mejoramiento de la especie una vez que se obtenga el enraizado de los brotes y se pueda hacer evaluaciones en campo.

INTRODUCCION

1 INTRODUCCIÓN

Las especies forestales representan un recurso para la producción de madera, sustancias químicas y energía, además de su indiscutible importancia ecológica y silvestre.

Por las características de las especies forestales la creciente demanda tanto en la industria mueblera, constructora, química y papelería como, para las necesidades ecológicas de reforestación y la utilización potencial de derivados vegetales para la producción de energéticos, han provocado la disminución considerable en los bosques.

La falta de planificación en la reforestación, producción, uso y aprovechamiento de productos forestales en nuestro país han contribuido en gran medida a esa disminución. De igual forma, se deben considerar los estragos causados por enfermedades, parásitos, incendios y tala inmoderada, en virtud de no existir programas de protección forestal.

Se menciona que la demanda mundial para las próximas décadas tendrá un incremento considerable, hasta un punto en que se ha hecho necesaria la adopción de medidas que tiendan a la preservación y al mejoramiento de las reservas arbóreas. Ante este panorama, es necesario producir árboles que respondan, en el presente y futuro, a la demanda de derivados forestales, de individuos que presenten ciclos cortos de vida y de características deseables. Una eficiente explotación forestal debe de excluir árboles de poca calidad y de crecimiento lento y heterogéneo, debido a que nuestro país exige el mejoramiento genético de árboles superiores, con madera de buena calidad, tronco uniforme, rápido crecimiento, alto rendimiento del tronco con relación a la biomasa, resistencia a enfermedades y plagas; de árboles que puedan adaptarse a diversos climas y a variaciones ambientales (como la contaminación), que respondan eficientemente a las prácticas forestales y que sean capaces de fijar su propio nitrógeno, ya que la fertilización artificial es económicamente incosteable. El mejoramiento genético surge como una buena y a veces única solución para mejorar el rendimiento en las especies forestales.

Sin embargo, las técnicas actuales de mejoramiento tienen posibilidades limitadas, por las complicaciones que derivan de características inherentes a los árboles, tales como los ciclos de vida largos, las fases pronunciadas de juvenil y madurez, la posición inaccesible de los órganos reproductores y las distancias grandes entre árboles selectos. A pesar de esto la propagación vegetativa representa un camino más directo para obtener las características genéticas de un árbol "elite" maduro. Aunque se enfrenta a varios obstáculos. Dentro de este tipo de propagación, el cultivo ^{in vitro} ofrece un gran potencial de ayuda a los métodos tradicionales de propagación, al incrementar el proceso de producción de variedades genéticamente superiores provenientes de la selección de poblaciones naturales o del mejoramiento convencional y de un número limitado de semillas de polinización controlada. Su principal ventaja en los programas

de mejoramiento y propagación, es su potencialmente ilimitada capacidad de multiplicación. La multiplicación *in vitro* de especies forestales contribuye en gran medida a la domesticación y mejoramiento. El actual sistema de propagación por cultivo *in vitro* en coníferas se ha venido desarrollando y afinando continuamente. Se espera que en un futuro próximo las coníferas se propagarán eficientemente por este método de la misma manera que se están multiplicando otras especies forestales (caoba, cedro, roble, etc).

El *Pinus ayacahuite* es una especie muy apreciada por sus características maderables; con madera de buena calidad, utilizada normalmente en chapa, pulpa, postes, construcciones y por su madera suave es utilizada en artesanía. Se recomienda como especie ornamental y para plantaciones comerciales. Sus características biológicas, económicas y sociales hacen de esta una especie importante para el país.

**OBJETIVOS
E
HIPOTESIS**

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

Por lo anterior el presente trabajo tuvo los objetivos siguientes:

1. Conocer los fenómenos que ocurren durante el establecimiento e inducción de brotes múltiples en los embriones maduros de Pinus ayacahuite Ehrenb cultivados in vitro.
2. Observar y determinar los efectos producidos por los medios de cultivo SH (1972) y DCR (1985) en la producción de brotes adventicios sobre los embriones de Pinus ayacahuite Ehrenb.
3. Determinar los fenómenos morfogénéticos que puedan causar las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento empleados: ANA, 2iP, cinetina y BA, en embriones maduros in vitro.

Así mismo se probarán las hipótesis siguientes:

1. La producción múltiple de brotes sobre el embrión se obtendrá manipulando a los reguladores en forma individual o en combinación.
2. La máxima iniciación de brotes adventicios estará afectado (además de las concentraciones de los reguladores) por las concentraciones totales de las sales de cada uno de los medios de cultivo empleados.
3. El alargamiento de los brotes es inducido, al reducir las sales del medio basal al 50% de concentración sin la adición de reguladores de crecimiento.

ANTECEDENTES

3. ANTECEDENTES

3.1 IMPORTANCIA DEL Pinus ayacahuite Ehrenb.

El Pinus ayacahuite conocido comúnmente como ayacahuite, aclote, salacahuite y pino blanco constituye una de las 50 especies de pinos nativos de México (Martínez, 1948).

Es un árbol de 20 a 30 m. de altura a veces mayor, con un diámetro de 60 a 70 cm. Ramas extendidas, ramillas moreno grisáceas, delgadas y flexibles, con las hojas como penacho en la punta, copa subcilíndrica, corteza dividida en placas irregulares cuando joven, ceniza y moreno rojizo; tornándose posteriormente áspera. Hojas agrupadas en fascículos de 5, de 11 a 13 cm. de largo y en ocasiones hasta 20 cm. delgadas de color verde oscuro. Conos subcilíndricos atenuados de 20 a 35 cm. un poco encorvados y colgantes comúnmente por pares, con tinte ocre, muy resinosos, semillas oscuras o moreno oscuras, de 12 cm. de largo, con ala desarrollada de 1.5 a 2 cm. de largo por 6 a 10 mm de ancho, con un peso aproximado de 0.3 gr (Martínez, 1948; Eguiluz, 1982).

Se caracteriza por formar poblaciones aisladas de tamaño variado en diversas regiones montañosas del país, tiene una amplia distribución en el eje neovolcánico, se reporta para los estados de Puebla, Morelos, Veracruz, Hidalgo, Michoacán, Guerrero, México y D.F. (Martínez, 1948).

Geográficamente se extiende desde el paralelo 18° 20' al 21° 00' de latitud norte, del meridiano 96° 56' al 102° 35' de latitud oeste y su rango altitudinal va de los 2000 a los 3700 mts. sobre el nivel del mar, con mayor frecuencia a los 2900 MSNM (Eguiluz, 1978).

3.2 CULTIVO in vitro DE CONÍFERAS

3.2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

El primer informe de organogénesis in vitro de árboles forestales fue hecho por Gautheret (1940) quien descubrió yemas adventicias en cultivo de tejido cambial de Ulmus campestris descubriendo las condiciones para su diferenciación y desarrollo anatómico. Más tarde Jacquiot (1949;1951) señala que la formación de yemas adventicias también se presenta en árboles de más de 180 años de edad. Determinó los efectos de auxinas exógenas, adenina e inositol en la diferenciación de yemas e interpretó sus resultados para indicar que la organogénesis in vitro fue controlada por un mínimo de 2 factores antagonísticos. Este trabajo es notable en cuanto a que fue dado antes de descubrir las citocininas.

Wolter (1968) comunica rediferenciación de plántulas a partir de callo de Populus tremuloides. Winton (1968) cultiva callo de Populus tremuloides, obteniendo brotes enraizados. Este fue el primer ejemplo en el cual el genotipo superior de un árbol fue propagado in vitro, teniendo en cuenta que esta especie ha sido muy difícil de enraizar por métodos convencionales. Desde entonces, se han obtenido plántulas de más de 120 especies e híbridos de árboles forestales cultivados in vitro. Cerca del 80% de éstas son maderables.

3.2.2 PROPAGACIÓN VEGETATIVA.

Considerando el ritmo de deterioro del recurso forestal en México, se prevé que en un futuro no muy lejano los bosques puedan ser incapaces de satisfacer la demanda creciente de productos forestales, de manera que se deben plantear alternativas para resolver este problema; una de ellas consiste en el establecimiento de plantaciones forestales comerciales altamente productivas, con las especies más adecuadas y que tengan involucrada alguna estrategia de mejoramiento genético. El impacto del hombre sobre las masas forestales ocasiona que éstas vayan desapareciendo en forma gradual, lo cual obviamente provoca una disminución de los recursos genéticos. De esta forma, con el paso del tiempo será difícil implementar programas de mejoramiento genético basados en especies nativas y se recurrirá entonces a la importación de productos forestales, o bien, a la introducción de especies exóticas que posiblemente no se adapten a las condiciones de nuestro país (Barbosa,1987).

El género Pinus es uno de los más importantes desde el punto de vista económico, ya que por la superficie que cubren sus especies, es base para la industria de la zona templado-fría del país; con especies de este género se realizan importantes programas de reforestación, por lo que es importante encontrar la forma de reproducirlos vegetativamente, con el objeto de establecer una producción de semillas certificadas y/o plántulas vigorosas que por sus características incrementen la cantidad y calidad de las cosechas de madera en plantaciones forestales (Carrera, 1977; Barbosa, 1987).

El uso de la propagación vegetativa para producir árboles en forma comercial, estrictamente hablando, no es un método de mejoramiento, pero ésta asociado con la selección y permite obtener un avance considerable en el mejoramiento de las especies que se trabajan utilizando este método (Barbosa, 1987).

La selección fenotípica, con métodos convencionales de propagación, combinada con el ensayo de clones, es un procedimiento por el cual se puede lograr un avance considerable en el mejoramiento de especies, dentro de una sola generación sexual. En esta forma, la propagación vegetativa tradicional se convierte en una herramienta potencialmente útil para cualquier método de mejoramiento de árboles forestales; y si las técnicas de propagación vegetativa son económicas, permiten que cualquier genotipo superior se pueda repetir indefinidamente para uso comercial (Carrera, 1977, Bogdanou, 1979). La propagación asexual de árboles en términos generales, consiste en la obtención de nuevos individuos a partir de partes vegetativas. Este proceso es posible, debido a que ciertos órganos asexuales poseen capacidad de regeneración, es decir, de formar sus partes "faltantes", si se colocan bajo condiciones favorables al crecimiento.

La propagación vegetativa convencional es ampliamente usada por fruticultores, floricultores, horticultores y mejoradores, que reproducen las plantas que presentan la capacidad de reproducción asexual para aislar y conservar clones, ecotipos o variedades de importancia económica; de modo que esta técnica es de utilidad para mejorar sus productos (Zobel et al., 1979). El interés por estos estudios en la rama forestal, radica en que por medio de la reproducción vegetativa se pueden multiplicar íntegramente árboles seleccionados en base a características deseables que se quieren perpetuar como; velocidad de crecimiento, rectitud del fuste, ángulo de inserción de ramas, vigor, resistencia a plagas y enfermedades, etc; es decir, que este método permite la multiplicación y preservación de genotipos valiosos, los cuales son posibles de desarrollar en plantaciones especiales denominadas huertos semilleros, cuya finalidad se encamina a la preservación y producción abundante de semillas de alta calidad, para programas

de mejoramiento y plantaciones comerciales (Barbosa, 1987).

Los métodos de propagación principalmente injertado y enraizado de fascículos tienen ahora un mejor desarrollo para estos propósitos y su potencial para producir propágulos para plantaciones se está incrementando para transferir estas ganancias genéticas del mejoramiento a poblaciones comerciales, para obtener heterocigotos en cruces de híbridos y para obtener especies útiles que están restringidas en su aprovechamiento, por problemas en el desarrollo final de la semilla. Con la venida del cultivo *in vitro*, la perspectiva para el uso general de la propagación vegetativa en el mejoramiento genético de una amplia gama de especies es convertido en realidad y es tiempo de considerar los valores y riesgos del uso de esto en la domesticación, estrategias y producción masiva de árboles forestales (Libby y Rauter, 1984). Sin embargo, hasta ahora, solo muy pocas especies son propagadas vegetativamente por medios convencionales para plantaciones comerciales, la mayoría de los estudios han sido a nivel experimental, ya que las especies del género *Pinus* son difíciles de propagar vegetativamente, especialmente por el alto costo que presenta la ejecución y el establecimiento de los injertos. Cuando los árboles son adultos; se registra al respecto una variación considerable entre las diferentes especies del género, e incluso se ha reportado variabilidad en su propagación agámica aún dentro de la misma especie (Zsuffa, 1974).

En la actualidad los métodos de propagación vegetativa más empleados en las especies forestales son ; los injertos y el enraizado de fascículos. Por medio de los injertos se obtienen buenos resultados, su propósito es el preservar fenotipos selectos, multiplicarlos y crear huertos clonales para la producción de semillas de alta calidad para pruebas de progenie y usos comerciales, pero pueden no tener éxito cuando se presentan síntomas de incompatibilidad, entre el descendiente y el rizoma, fenómeno muy difundido entre clones de algunas especies y prevé el primer obstáculo para el productor de árboles. El enraizado, aunque, elimina el efecto de incompatibilidad, presenta otros problemas, tales como diferencias en la facilidad de enraizado en las distintas especies del género o aún en diferentes árboles de la misma especie (Girovard, 1970; Banes y Burley, 1987). En las especies forestales las aplicaciones de estas técnicas han sido limitadas, en función de la escasa facilidad de éstas para propagarse por medios vegetativos, especialmente de árboles maduros y en virtud de que a escala comercial se requeriría gran cantidad de yemas de arbolado maduro, y sería una práctica sumamente costosa que afectaría las ganancias al obtener la cosecha final. Por lo anterior, esta práctica en especies forestales generalmente se reduce a utilizarlas en combinación con la selección fenotípica

para establecer huertos semilleros, y ensayos clonales para evaluar la aptitud combinatoria final. Se ha emprendido diversos estudios con el propósito de conocer los factores implicados en la propagación asexual de los pinos, para tratar de tener los métodos y técnicas más adecuadas para cada especie (Mott, 1980; Barley, 1987).

En la actualidad, considerables recursos son investigados en el desarrollo de cultivos de órganos (Fossard et al., 1974), tejidos (Bonga y Durzan, 1983; Naguani y Bonga, 1985; Hasnain y Cheliak, 1986; Jelaska y Bornman, 1986), células y protoplastos (Dodds, 1983) para la producción comercial de árboles (Hasnain et al., 1986; Mott y Amerson, 1982). La producción vegetativa por cultivo de haploides es también sugerida para algunas especies (Lu et al., 1981). Torres (1989) menciona que el futuro y desarrollo del cultivo in vitro yace en su uso como herramienta en la investigación básica y aplicada y la subsecuente utilización de esta técnica para la producción de árboles mejorados a escala comercial. En general, la investigación del mejoramiento de árboles involucra 3 fases fundamentales; selección, crianza y pruebas de progenie. El cultivo in vitro ofrece el potencial de amplificación de un genotipo en cualquier de éstas etapas, a través de la rápida producción de clones (Sommer et al., 1987).

En el presente, los esfuerzos intensivos en el mejoramiento de árboles está confinado a coníferas relativamente pocas. A través del cultivo in vitro, puede ser relativamente fácil capturar inmediatamente genotipos superiores de algunas especies y ser multiplicados pronto o almacenados, para usos posteriores. El mismo procedimiento puede ser también aplicado a árboles con características no incluidas comúnmente en programas presentes y a través de variación somaclonal producir árboles con nuevas características.

Para el éxito del sistema del cultivo in vitro sobre un proyecto de mejoramiento de árboles es necesario; que se presente una alta frecuencia de organogénesis o embriogénesis, el producto final del sistema debe de ser plántulas o embriones maduros. Las plántulas obtenidas deben sobrevivir al cambio de ambiente experimental, presentar cierta fortaleza en sus tejidos y funcionar en el campo en una forma similar a las plántulas obtenidas por injerto, los clones deben contener las mismas características del cual provienen o mantener variaciones en una manera predicha, y el criterio más importante; el decidir si los métodos de propagación por cultivo in vitro pueden auxiliar en el mejoramiento de cualquier árbol, es decir, evaluar que ventajas pueden proveer sobre las técnicas existentes (Jones, 1987; Sommer et al., 1987).

Otros usos para las técnicas del cultivo in vitro son

potencialmente importantes y algunas pueden tener aplicación en especies forestales (Bonga, 1977; Jones, 1987; Torres, 1989), estos incluyen los siguientes:

a) El cultivo in vitro puede ser usado para liberar de patógenos virales. Las cepas libres de virus tienen que ser multiplicadas para producir números comercialmente útiles, por métodos convencionales o por posteriores cultivos in vitro.

b) La propagación directa de genotipos selectos para producir árboles clonales.

c) Hibridación somática.

d) Ingeniería genética.

Aunque el término "cultivo in vitro" es comúnmente utilizado para incluir todo tipo de cultivo vegetal aséptico, es preferible usar los siguientes términos (Torres, 1989):

a) Cultivo de plántulas.

b) Cultivo de órganos.

c) Cultivo de embriones.

d) Cultivo de tejidos o callo.

e) Cultivo en suspensión y cultivo de células aisladas o agregados celulares.

f) Cultivo de protoplastos.

g) Cultivo de anteras o haploides.

Para una cobertura más amplia de las técnicas del cultivo in vitro revisar a Vasil et al., 1979; Walbot, 1981; Evans et al., 1983.

3.2.3 CULTIVO DE EMBRIONES

Es aceptado que los tejidos cultivados provenientes de plántulas jóvenes o semillas son el mejor material para obtener respuestas morfogénicas. Este es el motivo de que la formación de callo, raíz y yemas-brotes sea obtenido más fácilmente cuando se cultivan

inóculos embrionicos de diversas coníferas (Thorpe y Biondi,1984).Por eso es que, a pesar de los buenos resultados obtenidos en los procesos organogénicos en cultivos de células indiferenciadas (callo y células en medio líquido), la mayoría de los trabajos, tienen su interés enfocado en la regeneración de plántulas mediante una vía o proceso que evite a lo máximo la fase de propágulo de inestabilidad genética, el cultivo de embriones es una vía que es muy utilizada para la propagación de plantas superiores (David,1982; Bhojwani y Razdan,1983) (fig 1).

Los primeros intentos en el cultivo de embriones de gimnospermas fueron realizados por Schmid en 1924 (citado por Raghavan y Srivastava,1982), quien cultivó in vitro embriones de Pinus sylvestri.

Varios trabajos experimentales han surgido desde los inicios de esta técnica y actualmente la utilidad del cultivo in vitro es mucho más amplia (Thompson y Zaerr,1981; Mott,1981):

- a) Permite determinar los requerimientos nutricionales necesarios para el desarrollo embrionario in vitro.
- b) Amplia los conocimientos en la complejidad del desarrollo del embrión in situ.
- c) Elimina la latencia de semillas en ciertas especies, acortando el ciclo biológico.
- d) Determina la viabilidad de las semillas.
- e) Suministra material microclonal.
- f) Produce y rescata embriones inmaduros de cruza híbridas.
- g) Permite entender los procesos relevantes de la embriogénesis somática en programas de micropropagación.

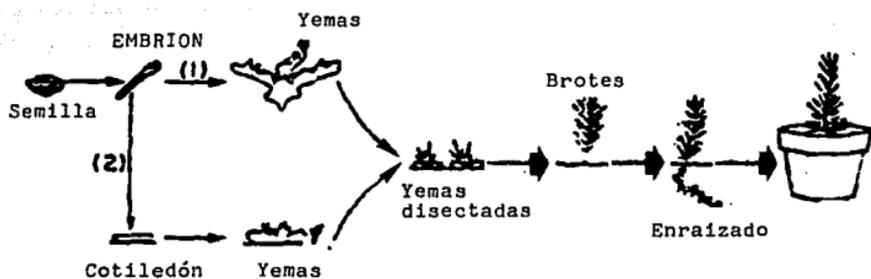


Figura 1. Fases del cultivo in vitro de embriones de pino.

3.2.3.1 FACTORES NUTRIMENTALES

Los primeros intentos en el cultivo de embriones maduros dan por evidencia que los inóculos requieren de un medio sencillo, aunque, las sales minerales y una fuente de carbohidratos en forma de sacarosa fueron los únicos componentes mayores del medio, otras sustancias son frecuentemente añadidos para obtener mejor crecimiento. Como resultado, la incorporación de vitaminas tales como biotina, ácido nicotínico, ácido ascórbico, ácido pantoténico, piridoxina y tiamina en el medio basal es ahora parte del medio nutrimental para el cultivo de embriones. Sin embargo, se menciona que si bien las vitaminas son utilizadas en el medio de cultivo de embriones, su presencia no siempre es esencial (Raghavan, 1980; Raghavan y Srivastava, 1982).

Algunos autores consideran que el efecto más importante para el cultivo de embriones es la selección y concentración adecuada de las sales del medio de cultivo que soportará el desarrollo progresivo del inóculo (Bhojwani y Razdan, 1983; Kolevsk et al., 1983). Aún cuando Reilly y Brown (1976) mencionan que la composición química de la solución mineral no juega un papel fundamental en la formación de brotes de Pinus radiata varios trabajos han demostrado que las soluciones nutrimentales influyen en gran medida en el tipo de respuesta obtenida en otras especies (Toribio y Pardo, 1989). Pérez y Sommer (1987) cultivaron embriones de Pinus elliotii en tres diferentes medios nutritivos. Los dos primeros contenían sales mayores del medio MS a diferentes concentraciones, que no promovieron respuestas morfogénicas, el tercer medio contenía sales mayores de Risser y White, con una concentración de nitrógeno más baja, que permitió el mejor desarrollo de las yemas.

El medio SH es comúnmente utilizado en el desarrollo de tejidos de angiospermas, pero también tiene grandes aplicaciones en cultivos de inóculos de gimnospermas, el medio SH el cual contiene menor cantidad de amonio que otros, es un estimulador de la inducción y el desarrollo de yemas adventicias en embriones maduros de especies forestales, aún cuando el medio DCR es relativamente nuevo, se han obtenido buenos resultados en el desarrollo de brotes en árboles maduros principalmente de coníferas (Mapes et al., 1981; Bornman, 1983; Gupta y Durzan, 1985). Los trabajos desarrollados para determinar los efectos causados por la presencia del nitrógeno han permitido indicar los componentes más apropiados y sus niveles óptimos en el crecimiento de embriones de diferentes especies forestales (Raghavan y Srivastava, 1982): El NH_4NO_3 y KNO_3 son frecuentemente utilizados como fuentes de nitrógeno inorgánico en el cultivo de embriones, sin embargo, para el caso de varios pinos

el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es la forma usual de emplearse el nitrógeno (González dato no publicado). Monier (1975) indica que la adición de nitrógeno en forma de aminoácidos al medio de cultivo puede estimular el crecimiento de los embriones. Generalmente la glutamina es utilizada por ser la más efectiva para el crecimiento. Resultados similares se han observado al adicionar la mezcla de aminoácidos en forma de caseína hidrolizada.

Otro factor que puede ser determinante en el crecimiento de los embriones maduros corresponde al tipo y concentración de reguladores del crecimiento que se encuentran en ese momento en el medio de cultivo. Bhojwani y Razdan (1983) indican que el crecimiento y diferenciación de los embriones depende, en gran medida, de reguladores de crecimiento, principalmente auxinas y citocininas. Aún cuando los requerimientos y tipos de reguladores varía entre las especies (Coleman y Thorpe, 1976). El papel de las auxinas, parece indicar, no ser esenciales, al menos para la inducción de yemas adventicias y para el caso de embriones, cuando se emplean, se adicionan a concentraciones bajas (Sommer y Brown, 1975). La presencia de auxinas, puede producir anomalías cromosómicas que se reflejan en la baja o nula respuesta morfogénica (Monier, 1978). A la fecha, los mejores resultados en la inducción de yemas o brotes se obtiene al emplear citocininas, principalmente benciladenina (BA). Las concentraciones de citocininas es inicialmente alta (50 mg L^{-1}), reduciéndose al entrar a la fase de proliferación (Winton y Verhagen, 1977; Reilly y Washer, 1977). Sin embargo, el tipo de citocinina y la concentración depende del género y especie de pino. En Pinus pinaster (David y David, 1977) la inducción de yemas fue inducida con más eficiencia en cotiledones cuando al medio se le adiciono BA que cuando se empleó 2iP o cinetina.

La sacarosa es la fuente más común de energía para el cultivo de embriones, su importancia comparada con otros azúcares en el mantenimiento de los inóculos in vitro en numerosas especies, es discutida por Bhojwani y Razdan (1983). Smith (1973) menciona que la sacarosa es añadida al cultivo de embriones no solo como una fuente segura de energía, sino también como un factor importante para mantener la osmolaridad apropiada del medio, lo que hace que se convierta en extremadamente importante en los cultivos de embriones; Para cumplir con esta función la concentración óptima varía con la edad del desarrollo del inóculo, sin embargo, los embriones maduros crecen bastante bien con 2%, pero los embriones jóvenes requieren por lo regular de concentraciones más altas. A este respecto Raghavan y Torrey (1964) mencionan que cuando el embrión avanza en edad sus requerimientos en concentración de sacarosa es baja.

Varios autores (Raghvan y Srivastava, 1982; Bhojwani y Razdan, 1983),

consideran que no sólo los componentes nutrimentales del cultivo, determinan el tipo de crecimiento y diferenciación de los embriones, sino que también el potencial formativo de yemas adventicias está generalmente afectado por parámetros ambientales que actúan en forma colectiva, tales como pH, radiación luminosa, temperatura e intercambio gaseoso.

3.3 CARACTERÍSTICAS DEL INÓCULO.

Las células vegetales tienen cierta capacidad potencial para dividirse y crear un individuo completo y semejante a aquél del que se tomó la muestra. Esta capacidad llamada totipotencialidad indica que las células poseen toda la información necesaria para la regeneración de una nueva planta. Aún sin conocer plenamente los efectos de los factores físico-químicos ocurridos en un árbol es de gran importancia efectuar una buena selección del tejido por cultivar, para que se pueda expresar de forma íntegra tal capacidad regenerativa. Se han ensayado casi todos los tejidos y órganos presentes en las especies leñosas con amplio intervalo de respuestas (Konar y Maymani, 1974; Shimamoto et al., 1983; Augé y Boccon-Gibod, 1986).

3.3.1 EDAD

Dentro del árbol existen zonas que retienen su estado juvenil (fig 2) por mayor tiempo que el resto del individuo, por lo que es de gran importancia considerar la relación de este factor con el tipo de inóculo que se selecciona para la propagación in vitro de una especie determinada (Vargas, 1982; Bonga, 1983). El estado de maduración es un problema importante en la propagación, especialmente con coníferas, las respuestas obtenidas con inóculos tomados de árboles de varias edades y/o en diferentes localizaciones del árbol son por lo general diferentes (Boulay, 1989). Este es motivo por el que la formación de yemas adventicias, callo y raíz sea exitosamente obtenida cuando se obtienen de inóculos con características embrionales, es conocido que los tejidos cultivados, provenientes de semillas o plántulas jóvenes son el mejor material para obtener respuestas morfogénicas (Thorpe y Biondi, 1984; Augé, 1986; Tiribio y Pardo, 1989).

Los tipos de respuestas que se obtienen en los inóculos de diferentes edades, depende del estado fisiológico en que se encuentre en ese momento el tejido en cultivo. Por ejemplo, los primordios de hojas de varias coníferas, si bien, distintos anatómicamente, producen brotes; al incrementarse la edad la producción decrece y la incidencia de hojas desarrolladas aumenta, así; en las primeras etapas, los primordios, tienen el mismo desarrollo potencial como al de los brotes de los cuales derivaron (Meins, 1986). Similarmente, Winton, (1978) y David (1982) indican que la intensidad de la respuesta in vitro de las especies leñosas depende del estado fisiológico y bioquímico del árbol parental, en el momento de la disección, presumiblemente todos los inóculos tienen el mismo potencial, a pesar de la edad del material, sólo que en tejidos más diferenciados este potencial está suprimido. Bonga, (1977) propone que entre el material juvenil y maduro existe una acumulación de sustancias inhibitorias y observa que durante la madurez existe una concentración de ácido absísico, etanol y algunos fenoles.

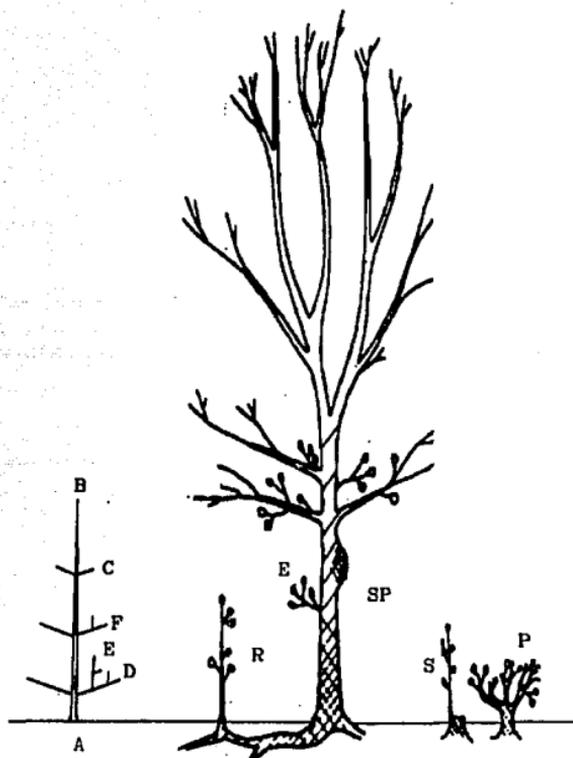


Figura 2. Diagrama de gradiente de madurez en árboles.

FIGURA 2 Diagrama de gradientes de madurez en árboles.

La madurez en una conífera de forma regular. El grado de madurez de un meristemo apical es inversamente proporcional a la distancia entre la unión raíz/vástago A y el meristemo. Debido a que las ramas laterales son más cortas que los entrenudos, a partir de los cuales se originan, si consideramos las distancias AB, AC, AD, AE, AF el meristemo B es el más maduro y el meristemo f el más juvenil. Derecha, la madurez en diferentes frondosas. La densidad de trama indica el grado de madurez. Los vástagos epicórmicos E, esferoblastos Sp, brotes de raíz y renuevos R, brotes de cepa o retoños S y los árboles frecuentemente podados P son juveniles. En la zona juvenil o porción del tronco no ramificado, se aprecia la retención de hojas cercanas al mismo, en invierno y los ángulos obtusos de las ramas, en la zona madura, en cambio, se puede apreciar los ángulos agudos de las ramas *Bonga, 1982*.

Kondrasheva (1973) menciona que cuando se cultivan varios fragmentos de ramas y tallo, tomadas de diferentes partes del *Pinus sylvestris* en medio MS suplementado con reguladores, la proliferación de callo en inóculos de posiciones altas, empiezo primero y es más intensa que en el material de partes bajas del árbol y que, aunque todas las partes vegetativas tienen capacidad proliferativa, los tejidos que son cronológicamente jóvenes tienen más actividad de crecimiento. Además, de los cambios fisiológicos ocurridos en el fenómeno de madurez de los tejidos, las concentraciones óptimas de reguladores del crecimiento varía considerablemente, siendo generalmente difíciles para dar respuestas organogénicas (David, 1982).

3.3.2 ÉPOCA DE COLECTA

La reacción obtenida del inóculo puede depender del grado de variabilidad de las condiciones en que se encuentre el árbol, así como de los efectos ambientales que interactúan directamente sobre su crecimiento. Varios árboles pueden ser fácilmente cultivados cuando los inóculos son derivados de individuos con crecimiento activo, pero otros pueden producir brotes sólo de árboles en estado de latencia. Augé (1986) indica que el ciclo anual de los árboles tiende a cambiar el equilibrio fisiológico del individuo; durante la primavera los órganos crecen y los análisis demuestran la presencia de reguladores como *auxina*, *citocininas* y *giberelinas*, durante el verano este flujo de sustancias disminuye, en el otoño aparecen los inhibidores, por lo que, es de esperarse que los tejidos puestos en un medio de cultivo tengan reacciones diferentes si se colocan en un medio de la misma composición.

La época de colecta es frecuentemente considerada como un factor crítico para la propagación vegetativa, Selbyn y Harvey (1985) observan un fuerte efecto de las estaciones del año en la capacidad de los inóculos para formar yemas adventicias en *Picea sitchensis*. Existen otros ejemplos donde indican que el efecto de la fecha de colecta en el funcionamiento de los inóculos *in vitro* es un resultado del estado fisiológico del árbol parental y el nivel de los reguladores en el momento de la disección (Ball et al., 1978; Bytchenkova, 1963a; Bytchenkova, 1963b; Bytchenkova, 1967; Bonga, 1984; Selby y Harvey, 1985; Bonga, 1987; Francllet et al., 1987; Bonga y Von Anderkas, 1988; Hontola, 1988; Toribio y Pardo, 1989; Lin et al., 1991).

3.3.3 TAMAÑO

El tamaño del material vegetal es otro factor que puede afectar el desarrollo final; cuanto mayor sea el volumen del inóculo más determinantes serán los equilibrios endógenos, por lo que el medio de cultivo no tendrá más que una influencia limitada. Por el contrario un material pequeño será orientado con mayor facilidad por las propiedades del cultivo (Vidalie et al., 1986). Por esta razón se propone que el tamaño del inóculo no deberá ser extremadamente grande, sino un tejido que permita la regeneración con facilidad, que presente una cantidad adecuada de reservas alimenticias y una apropiada cantidad de reguladores endógenos; ni tampoco tan pequeños, para evitar lesiones sobre su superficie, además de que son difíciles de manipular (Aartrijk, 1984).

3.3.4 LOCALIZACIÓN EN LA PLANTA PARENTAL

Los cultivos establecidos, tomados de diferentes partes vegetativas del árbol, pueden diferir en su patrón de desarrollo. Cuando se utiliza un método de propagación, se pueden considerar cambios en la respuesta, si los inóculos son tomados de diferentes zonas dentro del mismo individuo (Boulay, 1989). La parte más "apropiada" del árbol, para iniciar un cultivo dependerá, entonces, de la especie y el tipo de proliferación que se desea obtener, y esto a su vez del genotipo y estado de desarrollo del árbol (Murashige, 1977; Thomas et al., 1979; Green y Rhodes, 1982; Harms, 1982; Hussey, 1986). Así; Banks (1979) señala que células de callo, originadas de zonas con características juveniles, forman brotes, mientras que aquellos que se obtienen de partes maduras forman embriones somáticos. Wernilke y Brette (1980) mencionan que el tejido cercano a la base de las hojas juveniles de Picea abies tratadas con 2,4-D forman una excelente proliferación de brotes, mientras que el tejido de otras regiones no muestran ningún cambio. Variaciones similares en la capacidad de proliferación es mencionada por Meins et al., (1980) y Turgeon (1982) en diferentes coníferas.

3.4 CONDICIONES QUE INTERVIENEN EL CULTIVO *in vitro*.

3.4.1 NUTRIMENTOS

Ya que existe una clara división de las funciones en los diferentes tejidos de un árbol, la biosíntesis de metabolitos orgánicos requieren de nutrientes esenciales, la necesidad de un medio de cultivo para suplemento orgánico en particular puede ser debido a la incapacidad del tejido para producir éste o a una nueva necesidad como resultado de un cambio en el metabolismo. La formulación de un solo medio no puede ser sugerido enteramente satisfactorio para todos los tipos de inóculos vegetales (Murashige y Skoog, 1962; Dodds y Roberts, 1984; Yeoman, 1986). La composición general de ciertos medios nutritivos son revisados por Gamborg et al., (1976) y Huang y Murashige (1977).

Todo medio de cultivo, consiste de varios tipos de componentes; sales inorgánicas, una fuente de energía y carbono, aditivos orgánicos definidos e indefinidos (incluyendo vitaminas), reguladores del crecimiento (cuando son necesarios) y posiblemente un agente solidificante. Todos, estos componentes son manipulados para lograr resultados deseables en diferentes tipos de inóculos. Las formulaciones más ampliamente utilizadas es la de Murashige y Skoog (1962) y Schenk y Hildebrand (1972) (cuadro 1).

Las sales inorgánicas en el medio de cultivo incluye los macro y micronutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de los tejidos; los compuestos químicos requeridos en altas concentraciones, a parte del hidrógeno y carbono son llamados macroelementos (elementos mayores); nitrógeno, fósforo, azufre, calcio, magnesio y potasio (Bhojwani y Razdan, 1983). La concentración óptima de cada nutriente para lograr la máxima velocidad de crecimiento varía considerablemente entre las especies.

El nitrógeno es añadido en forma de nitrato y amonio o en combinación, por lo regular, el nitrógeno forma parte de los aminoácidos, vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos. Se recomienda que, para asegurar un adecuado suministro de nitrógeno inorgánico, es conveniente añadirlo en forma de nitrato y amonio, ya que el nitrato es utilizado por las células sólo cuando el Ph del medio declina hacia la alcalinidad. Al respecto Ingstad (1979) manifiesta que en *Pinus sylvestris*, el nitrógeno es mejor metabolizado en forma de NH_4^+ que NO_3^- ; sin embargo, altos niveles de amonio en ocasiones puede causar pérdida del potencial morfogénico, debido a que al incrementar el radio de $NH_4^+ \text{---} NO_3^-$ existe un decremento de cationes, especialmente de potasio y este ión es necesario para realizar procesos morfogénicos. Similarmente Gamborg y Shyluk (1970, citado por Gamborg et al, 1976) mencionan que la alta concentración de amonio puede reducir el

crecimiento celular en algunos sistemas vegetales y eso reduce la velocidad de supervivencia y desarrollo de primordios de ascículas en el cultivo de Douglas-fir (Thompson y Zaerr, 1981). La reducción en los niveles de KNO₃ y NH₄NO₃ es esencial para la inducción de yemas adventicias en brotes maduros y meristemas disectados, por lo menos para Pseudotsuga menziesii (Thompson y Zaerr, 1981; Bekkouli et al., 1985).

Cuadro 1. Composición química de algunos medios empleados en el cultivo *in vitro* de coníferas (mg l⁻¹).

Compuesto	Murashige y Skoog (1962)	Schenk y Hildebrant (1972)	Bornman (1981)
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	400
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	300	-
NH ₄ NO ₃	1650	-	-
KNO ₃	1900	2500	2000
Ca(NO ₃) ₂ ·2H ₂ O	-	-	500
CH ₃ N ₂ O	-	-	150
KH ₂ PO ₄	170	-	270
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	400	250
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	10	0.17
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	1	3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.2	0.025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85	15	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	200	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.1	-	0.025
KCl	-	-	300
KI	0.83	1	0.25
H ₃ BO ₃	6.2	5	1.5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
NaFe.EDTA.2H ₂ O	-	-	37.5
Na ₂ .EDTA	37.25	20	-
Mio-inositol	100	100	90
Tiamina.HCl	0.1	5	1.7
Ácido nicotínico	0.5	0.5	0.6
Piridoxina.HCl	0.1	0.5	1.2
Pantotenato de Calcio	-	-	0.5
Biotina	-	-	0.125
Glicina	2	2	2
Ácido fólico	-	-	1.1

Murashige, T. y F. Skoog. 1962. *Physiol Plantarum*. 15:473-479.

Schenk, R.W. y A.C. Hildebrant. 1972. *Can. J. Bot.* 50:199-204.

Bornman, C.H. 1981. *Symposium on Clonal Forestry. Sweden*. pp.43-56.

El fósforo en general puede estar representado en el medio de cultivo en forma de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ KH_2PO_4 , (Dodds y Roberts, 1984). El sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) satisface ambos requerimientos de magnesio y azufre (Bhojwani y Razdan, 1983).

La adición de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ o $\text{Ca}(\text{Na}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pueden ser utilizados para satisfacer las necesidades de calcio (Dodds y Roberts, 1983), el nivel de calcio y su concentración con otros macroelementos es analizado en forma más concreta por Bornman (1983). El potasio se encuentra presente en KNO_3 , KCl y KH_2PO_4 . Los iones cloruro están normalmente como KCl o CaCl_2 . Aunque el sodio no es generalmente requerido por las plantas puede ser esencial para cultivos con vías fotosintéticas C4 (Dodds y Roberts, 1984).

Además de los macronutrientes, las células vegetales requieren de pequeñas cantidades de ciertos elementos (micronutrientes). Los micronutrientes requeridos por las células de plantas superiores son: cobre, zinc, hierro, manganeso, boro, molibdeno y cobalto; el aluminio y níquel utilizados por Heller, (1953) pueden no ser esenciales (Bhojwani y Razdan, 1983).

En el medio original de White (1943), el hierro es añadido en forma de $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, pero es reemplazado por FeCl_2 , para cultivos de raíz. Sin embargo, el FeCl_2 no provee una fuente de hierro apropiada pues sólo esta disponible para los tejidos con un Ph de 5.2, es sabido que en cultivos de raíz, en un lapso de una semana de incubación, el Ph del medio cambia del valor inicial de 4.9-5.0 a 5.8-6.0 y las raíces empiezan a mostrar síntomas de deficiencia del elemento. Para superar este problema en muchos cultivos, el hierro es utilizado como Fe-EDTA, en esta forma el metal permanece disponible hasta un Ph de 7.6-8.0 (Bhojwani y Razdan, 1983).

Bhojwani y Razdan, (1983) mencionan algunos síntomas por deficiencia de ciertos elementos.

Los compuestos orgánicos son la otra parte del medio de cultivo: Las vitaminas y los aminoácidos son de gran importancia ya que la cantidad y tipo utilizados pueden variar de una especie a otra y cambiar por completo los resultados esperados. Las vitaminas tienen funciones catalíticas en sistemas enzimáticos y son requeridos sólo en cantidades muy pequeñas. Varios cultivos celulares son capaces de sintetizar todas las vitaminas esenciales, pero aparentemente en cantidades muy menores a las necesitadas por las células, por lo que para lograr un mejor crecimiento de los tejidos es frecuente el suplemento de algunas vitaminas y aminoácidos (Bhojwani y Razdan, 1983; Dodds y Roberts, 1984). Algunos autores consideran que la vitamina B₁ (tiamina) pueden ser la única que se emplee en todos

los cultivos. Sus necesidades para el cultivo *in vitro* es especialmente evidente a niveles bajos (Gamborg et al., 1976; Bhojwani y Razdan, 1983; Dodds y Roberts, 1984). Yemas adventicias son exitosamente inducidas en cultivos de cotiledones de *Pseudotsuga menziesii* y posteriormente los brotes son alargados y enraizados empleando tiamina como vitamina exógena (Cheng, 1977; Cheng y Voqui, 1977).

El mio-inositol es frecuentemente suministrado en el medio, y aunque su función no es clara, se conoce que ayuda a mantener las condiciones osmóticas; es usualmente añadido en concentraciones de 100 a 500 mgL⁻¹ (Goldfard y Zaerr, 1989). Abdullah et al., (1989) mencionan que si bien, el papel de esta vitamina no es completamente entendido, se sabe que interviene en la síntesis de fosfolípidos y en las pectinas de la pared celular. Gamborg et al., (1976) y Goldfard y Zaerr, (1989) indican que vitaminas como la piridoxina, ácido nicotínico y pantotenato de calcio pueden estimular el crecimiento de los inóculos.

Varios medios de cultivo muestran diferencias en su composición con respecto a la presencia de aminoácidos (Bhojwani y Razdan, 1983). De acuerdo a varios autores, se considera que es ventajoso reducir los niveles de nitrógeno inorgánico en el medio basal y suplementarlo con fuentes orgánicas tales como aminoácidos (Al-Talib y Torrey, 1959; Chalupa, 1983; Gupta y Durzan, 1985). Sin embargo, en la mayoría de los trabajos, con excepción de la glicina, los aminoácidos no son añadidos al medio de cultivo (Dodds y Roberts, 1984).

La forma específica de nitrógeno en que es añadido puede afectar el éxito del cultivo. El amonio y la glicina inhiben el crecimiento de células en suspensión cuando son añadidos al medio MS, mientras que el nitrato y la glutamina, en las mismas concentraciones son estimulantes (Lee, 1983).

Otras numerosas mezclas de compuestos nitrimentales, de composición indefinida, tales como; agua de coco, extracto de malta, jugo de tomate y extracto de levadura son utilizados para promover el crecimiento de ciertos callos y órganos vegetales.

No obstante, el uso de estas sustancias podría ser evitado con el tiempo, ya que se pretende dar una mejor definición a los constituyentes del cultivo (Bhojwani y Razdan, 1983; Dodds y Roberts, 1984). Los extractos de frutos pueden afectar la reproducibilidad de los resultados, ya que la calidad y cantidad de los constituyentes promotores del crecimiento en los extractos frecuentemente varían con la edad de los tejidos y de los organismos donadores. Con la finalidad de desarrollar medios sintéticos apropiados, varios investigadores han reemplazado

efectivamente las combinaciones nutritivas naturales, incrementando las concentraciones de varios nutrientes inorgánicos, particularmente potasio y nitrógeno (Mapes y Zaerr, 1981; Bhojwani y Razdan, 1983).

La sacarosa es la fuente más común de carbono utilizado en el medio para el cultivo de una gran variedad de especies de coníferas. La glucosa (Harvey y Grasham, 1969; Chalupa, 1983) y fructuosa son también utilizados, aunque, Al-Talib y Torrey (1959) no encuentran diferencias significativas en el crecimiento de las yemas de algunas coníferas en cultivos conteniendo sacarosa, glucosa y fructuosa o en una combinación de fructuosa y glucosa, Bhojwani y Razdan (1983) mencionan que su superioridad comparada con otros azúcares es muy grande.

3.4.2 REGULADORES DEL CRECIMIENTO

Varios cultivos *in vitro* muestran absoluto requerimiento a los reguladores del crecimiento para mantener la proliferación en un medio básico, conteniendo fuentes de carbono y nitrógeno, sales minerales inorgánicas y vitaminas. Son componentes esenciales del medio morfogénético y generalmente las varias investigaciones están dedicadas a determinar el óptimo regulador y las concentraciones para lograr los resultados deseados en cultivos de muchas especies, ya que los requerimientos adecuados varía considerablemente con los tejidos, y esto depende a su vez de los niveles endógenos. Cuatro clases principales de reguladores del crecimiento son importantes en el cultivo *in vitro*; auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico, las 2 primeras son consideradas como morfogénéticas primarias en la iniciación de un cultivo *in vitro* (Halpenn, 1969; Greshof, 1978; Fosket, 1980; Tran, 1981; Hams, 1982; Krikorian, 1982; Hussey, 1986; Goldfar y Zaerr, 1989).

Entre las auxinas disponibles el ácido indol-3-acético de origen natural, es conocida por ser menos activa que otros reguladores; fácilmente degradada en cultivos vegetales, ya que fácilmente pierde su función biológica por la acción de la luz y oxidación enzimática (Dodds y Roberts, 1984). Las auxinas 2,4-D y IBA son más efectivas, que por, ser compuestos sintéticos no están sujetas a la misma oxidación (Dodds y Roberts, 1984; Hussey, 1986).

Las auxinas inducen rápidamente la formación de callo; en varias especies la organogénesis es frecuentemente rara cuando se aplican solas. Estimulan el alargamiento de brotes y promueven la división celular, además de iniciar la formación de raíz, pueden hacerlo mismo con la floración e inducir el amarre de frutos. Establecen la dominancia apical, estimulan las actividades cambiales y pueden afectar los fenómenos de abscisión y la diferenciación de capas de

abscisión (Weaver, 1976; Dodds y Roberts, 1984; Hussey, 1986; Nobutaka, 1988).

Las citocininas más ampliamente utilizadas en el cultivo *in vitro* son: bencil amino purina (BA), cinetina y zeatina; las dos primeras son compuestos sintéticos. Los dos efectos principales de las citocininas son; el provocar la división celular y regular la diferenciación en los tejidos disectados, además de que se requieren tanto en la iniciación como en la continuación del cultivo. La disponibilidad de estas sustancias ha hecho que sea posible el cultivo de varias especies (Linsmaier y Skoog, 1965; Weaver, 1976; Dodds y Roberts, 1984; Nobutaka, 1988). Aún cuando depende de la especie, la bencil amino purina (BA) es considerada eficiente en términos de inducción de yemas adventicias (Webb y Street, 1977; Von Arnild, 1978). Al respecto Chalupa (1983) menciona que BA es más efectiva que la cinetina en las concentraciones de 1 a 2 mg l⁻¹ para la inducción de yemas adventicias en latencia. El medio también incluye 0.05 a 0.01 mg l⁻¹ de ANA.

Cualquier cambio en el equilibrio entre auxinas y citocininas puede por lo general afectar las expresiones del crecimiento celular en un tejido; cuando la cantidad de citocininas es baja en proporción con las auxinas generalmente se produce un desarrollo de raíz, pero si se eleva, se desarrolla brotes y cuando la concentración entre ambos reguladores es la misma se desarrolla tejido calloso (Murashige, 1974; Weaver, 1976; Narayanaswamy, 1977; Hussey, 1986; Nobutaka, 1988). En general para todos los tejidos vegetales, la inducción de yemas adventicias requiere de altas concentraciones de citocininas y poca o ninguna concentración de auxinas. Trabajos recientes, en algunas coníferas, confirman que no es necesaria la adición de auxinas puesto que las citocininas son suficientes para inducir formación de brotes. Los trabajos realizados por Abdullah et al., (1989) con *Pinus brutia* apoyan esta conclusión, pues la alta producción de brotes en tejido embrionario, es obtenido en medio suplementado con sólo citocininas. Sin embargo, otros autores apoyan la idea de que, para lograr una respuesta morfogénica deseable, es necesario una proporción precisa de auxina-citocinina (Fosket, 1980; Zaerr y Mapes, 1981).

En estudios realizados en tejidos embrionicos de una gran cantidad de coníferas, se observa que para la producción de yemas adventicias es indispensable que se adicionen al medio basal una concentración alta de BA (por lo general 10⁻³-10⁻⁴ M) y niveles muy bajos de ANA (10⁻⁷ M) (Sommer, 1975; Cheng, 1977; Von Arnold y Eriksson, 1978; Mapes et al., 1981; Thompson, 1981).

3.4.3 Ph DEL MEDIO

Los cultivos *in vitro* toleran un rango de Ph de 5.2 a 5.8, los procedimientos comunes de ajuste del Ph de los nutrientes del medio son realizados con ácido o base, antes de los procedimientos de esterilización por medio de autoclave. No obstante, el rango característico de Ph puede variar para algunas especies (Martín,1980;Skirvinn et al.,1986). Skirvin et al., (1986) mencionan que existen diferencias significativas entre los valores de Ph iniciales y postesterilización particularmente en el rango de 5.8 - 8.5, este efecto se observa con y sin agar, además, indican que a un mayor tiempo de esterilización mayor el cambio de Ph en términos de acidez y que los cambios en el Ph después de la esterilización, son menores cuando se incrementan los niveles de agar. Existen otros reportes que mencionan que las altas temperaturas utilizadas en esta etapa, pueden causar un cambio en el Ph (Mann et al., 1982; Singha,1982). El tejido en el medio, el tipo de autoclave, la posición dentro del recipiente, la calidad de los nutrientes y la calidad del agua son otros factores que pueden influir en un cambio significativo del Ph, en periodos muy cortos; 48 hrs (Skirvin et al.,1986). Además, Behagel (1972);Martín, (1980) y Douglas, (1980) mencionan que las diferencias en los valores del Ph, registradas, son inevitables debido a la producción de iones amonio (NH_4) provenientes de los sulfatos de amonio, y cloruro de amonio y la producción de iones nitrato (NO_3) producidos por nitrato de sodio y potasio, cuando son utilizados por las células.

Por otro lado, Bhojwani y Razdan (1983) mencionan que, en general, un Ph alto de 6.0, proporciona una solidificación del medio y un Ph inferior a 5.0 no muestra solidez satisfactoria.

3.4.4 SUBSTRATO

Para el éxito de la regeneración de plantas *in vitro*, el medio de nutrientes debe ser apropiado en composición química y en propiedades físicas ya que el metabolismo y por lo tanto las respuestas de los inóculos se puede modificar por completo, dependiendo de que se encuentre en un medio sólido o líquido, es muy importante, entonces, seleccionar el tipo de medio (Boccon-Gibdd,1986;Abdullah et al.,1989).

El agar es el agente solidificante más común para cultivos *in vitro*, su importancia comparada con otros substratos en el mantenimiento de los inóculos de varias coníferas, es mencionada por White y Risser, (1964).

El medio líquido es utilizado principalmente para establecer

cultivos en suspensión de células individuales o agregados. Aún cuando, los cultivos en suspensión parecen favorecer a la formación de embriones somáticos, no existen evidencias precisas de una regeneración completa en el caso de especies de coníferas, debido a estas consideraciones, se sugiere que es necesario emplear un medio de cultivo que contenga substrato sólido o semi-sólido que ayude a la fijación del tejido; a la vez que permita la diferenciación y desarrollo de los inóculos (Wimton y Huntinen, 1976; Street, 1977; Vargas, 1982; Abdullah et al., 1989).

3.4.5 LUZ

Las características de radiación, las cuales influyen en el desarrollo de las plantas en general, son también las que afectan el tejido vegetal en cultivo, estos aspectos son generalmente; intensidad, calidad y longitud, en el período de exposición. Se considera la luz como uno de los más importantes factores ambientales; la densidad y composición espectral, todos influyen en el alcance y grado de diferenciación en el cultivo in vitro. Es altamente probable que el papel de la luz en la formación de brotes, este relacionado a algún proceso enzimático (Murashige, 1974; Seibert y Kodkade, 1980).

La morfogénesis in vitro es también influenciada por ciclos de luz/oscuridad y parece que existe una relación entre las demandas fotoperiódicas de plántulas intactas y en cultivo. Investigaciones con el tejido embrionario de Pinus brutia in vitro queda claramente que un fotoperiodo resulta en una alta proporción de yemas más que en una iluminación continua. Es común que un régimen de fotoperiodo sea empleado con inóculos de todos los orígenes y para todos los estados de regeneración, donde muchos de los estudios en cultivos de coníferas no tienen evaluación crítica de requerimientos de luz, de interés práctica es la observación de que un régimen de 16 hrs. luz/8 hrs. oscuridad, sea satisfactorio a muchos cultivos, incluyendo a todas las especies de pinos los cuales son reportados in vitro (Abdullah et al., 1989).

3.4.6 TEMPERATURA

La temperatura de incubación influye directamente sobre la velocidad metabólica de los tejidos in vitro, llegando a determinar la respuesta morfogenética final. Sin embargo, existe poca información a cerca de los efectos y los mecanismos que regulan las respuestas observadas (Narayanaswamy, 1977; Vargas, 1982). La mayoría de los tejidos son desarrollados a temperaturas cercanas a los 25 ° C, pero las temperaturas ambientales usuales de las especies concernientes pueden ser tomadas en cuenta. Martín (1980) y Abdullah et al., (1989) indican que la mayor parte de los tejidos

cultivados crecen dentro del rango de temperatura de 20-27°C. La velocidad máxima de propagación es, sin embargo, a una temperatura precisa para la especie en estudio. Es recomendable ajustar la temperatura del cultivo dentro de los recipientes antes de los niveles de la cámara de cultivo (Murashige,1974;Abdullah et al.,1989).

**MATERIAL
Y
METODOS**

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Embriogénesis del Centro de Fruticultura del Colegio de Posgraduados y se emplearon semillas de polinización abierta de Pinus ayacahuite proporcionadas por el Centro de Genética Forestal A.C.

4.1 ESTABLECIMIENTO DE LOS INÓCULOS

4.1.1 DESINFECCIÓN

Las semillas de Pinus ayacahuite fueron completamente sumergidas en una solución de detergente con agitación, por 5 minutos enjuagadas en tres ocasiones con agua destilada. La desinfección se hace superficialmente con cloruro de mercurio a varias concentraciones; 0.1, 0.5, 0.8, 1.0 y 1.5% (P/V) (cuadro 2) durante 5 minutos, las semillas se enjuagan con agua destilada-estéril por 5 ocasiones, se dejan remojo por 24 hrs, en un pequeño volumen de agua destilada-estéril a condiciones ambientales de laboratorio en oscuridad ($18-22^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$).

Transcurrido el tiempo de imbibición, se continuó con el proceso de esterilización superficial; las semillas son sumergidas en etanol al 70% (V/V) durante 1 minuto, posteriormente en cloruro de mercurio a 0.1, 0.5, 0.8, 1.0 y 1.5% (P/V) durante 5 minutos, se enjuagan con abundante agua destilada-estéril por 5 ocasiones bajo condiciones estériles.

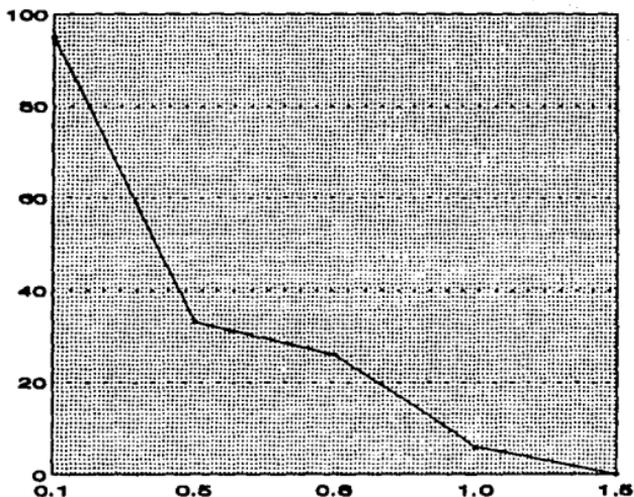
Los embriones se extraen de la semilla y se colocan en cajas de Petri conteniendo agua estéril, de uno a dos minutos con el objeto de hidratar y quitar los residuos del edospermo, antes de ser colocados en el medio de cultivo.

Los embriones son colocados en forma horizontal sobre la superficie del medio (20 ml), previamente servido en frascos de boca ancha (56x75mm), se inóculan 3 embriones por frasco; cada tratamiento utilizado requiere de 5 repeticiones dando un total de 15 embriones por tratamiento.

Todos los tratamientos son colocados en un cuarto de incubación, iluminados con lámparas fluorescentes en forma continua (3,000 lux) a una temperatura constante de $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

CONCENTRACION DE CLORURO DE MERCURIO (%)	TIEMPO DE ESTERILIZACION (MIN)	% DE LA SUPERVIVENCIA EN EMBRIONES IN VITRO
0.1	5	95.0
0.5	5	33.0
0.8	5	26.0
1.0	5	6.0
1.5	5	0.0

Cuadro 2. Efecto del Cloruro de Mercurio sobre la supervivencia de embriones in vitro.



Gráfica del % de supervivencia de embriones a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio

4.1.2 MEDIO DE CULTIVO

Para la inducción de estructuras morfogénicas se utilizan los medios básicos SH (Schenk y Hildebrand, 1972) y DCR (Gupta y Durzan, 1985) (cuadro 3). La solidificación es realizada con agar purificado a 7.5 G l⁻¹ de concentración para el medio SH y 6.0 G l⁻¹ para el medio DCR, el Ph es ajustado a 5.8 antes de la esterilización por medio de autoclave a 121°C y 1.14 cm² de presión, durante 15 minutos, la fuente de energía es suministrada en forma de sacarosa a 30g l⁻¹, la composición química de ambos medios se muestra en el cuadro 1.

4.1.3 REGULADORES DEL CRECIMIENTO

Para el crecimiento y diferenciación de embriones de Pinus ayacahuite cultivados in vitro, es necesario suplementar el medio basal con reguladores de crecimiento, el cuadro 4 , muestra la concentración para el medio SH y el cuadro 5 , para el medio DCR.

Cuadro 3. Medios empleados en el cultivo in vitro de embriones de Pinus ayacahuite (Schenk y Hildebrand, SH (1972) y Gupta y Durzan, DCR (1985).

COMPONENTE	MEDIO	
	SH mg l ⁻¹	DCR mg l ⁻¹
KNO ₃	2500	340
NH ₄ NO ₃	-	400
NH ₄ H ₂ PO ₄	300	-
Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	-	556
KH ₂ PO ₄	-	170
MgSO ₄ · 7H ₂ O	400	370
CaCl ₂ · 2H ₂ O	200	85
H ₃ BO ₃	5	6.2
MnSO ₄ · H ₂ O	-	22.3
MnSO ₄ · H ₂ O	20	-
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1	8.6
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.2	0.25
KI	1	0.83
FeSO ₄ · 7H ₂ O	15	27.8
Na ₂ EDTA	20	37.3
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.2	0.025
NiCl ₂ · 6H ₂ O	-	0.025
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.2	0.25
GLICINA	-	2
MIO-INOSITOL	10	200
TIAMINA · HCl	5	1
PIRIDOXINA · HCl	0.5	0.5
AC. NICOTÍNICO	5	0.5
SACAROSA	30000	30000
AGAR	7500	6000

AUXINA	ANA	CITOCININAS			CONCENTRACION MOLAR *		
		K	2iP		BA		
		0.0*	10 ^{-7*}	10 ^{-6*}	2.5X10 ^{-5*}	10 ^{-5*}	10 ^{-4*}
	0.0*	1	2	3	4	5	6
	10 ^{-7*}	7	8	9	10	11	12
	10 ^{-6*}	13	14	15	16	17	18
	10 ^{-5*}	19	20	21	22	23	24
	10 ^{-4*}	25	26	27	28	29	30

Cuadro 4.

Concentraciones de reguladores : ANA-K, 2iP y BA en combinación el medio SH para la inducción de brotes adventicios en embriones maduros de Pinus ayacahuite

ANA	CONCENTRACION MOLAR *					
	BA	0.0 *	10^{-7} *	10^{-6} *	2.5×10^{-5} *	10^{-5} *
0.0 *	1	2	3	4	5	6
10^{-7} *	7	8	9	10	11	12

Cuadro 5. Concentraciones regulares ANA-BA en combinación en medio DCR, para la inducción de brotes adventicios en embriones maduros de Pinus ayacahuite

4.2 PROLIFERACIÓN

Para obtener la diferenciación completa, individualización y alargamiento de los brotes presentes en embriones de Pinus ayacahuite se reduce la concentración de sales de los medios SH y DCR al 50%, sin reguladores de crecimiento, junto con 2% de sacarosa y 1% de carbón activado para efectos positivos en el alargamiento. Sólo los brotes con una longitud de 5 mm son disectados y colocados en las condiciones anteriores, todos aquellos que no logran alcanzar el desarrollo permanecen con el embrión hasta alcanzar dicho tamaño.

4.3 TOMA DE DATOS.

Características de crecimiento y diferenciación consideradas:

Callo;

1. Tiempo de formación.
2. Lugar de formación.
3. Tamaño; pequeño, mediano, grande.
4. Textura.
5. Número de embriones por callo.
6. Coloración.

Brotación.

1. Tiempo de formación.
2. Lugar de formación.
3. Número de brotes por embrión.
4. Número de embriones con brotes.

RESULTADOS Y DISCUSION

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 DESINFECCIÓN.

Los cultivos estériles para embriones de *Pinus ayacahuite* son obtenidos en 90% de todos los tratamientos probados. El tipo de esterilizante y los períodos de sumersión son altamente específicos para la especie, todas las etapas son necesarias para obtener una asépsia óptima, en el desarrollo de brotes. No obstante, altas concentraciones de cloruro de mercurio; 0.5, 0.8, 1.0 y 1.5% muestran efectos no favorables en la supervivencia de los inóculos. Los embriones de *Pinus ayacahuite* no son, por lo tanto, resistentes a la acción intensa del compuesto, ya que, solo 0.1% de concentración permite su crecimiento (cuadro 2). En otras especies, a pesar de su toxicidad, el compuesto es también utilizado como un apropiado esterilizante; Toribio y Pardos (1989) lo utilizan en proporciones de 0.2 y 0.5% (p/v) por 2 y 4 minutos respectivamente en semillas de *Pinus sylvestris*.

Se menciona además, que la secuencia de detergente, etanol y cloruro de mercurio, hipoclorito de sodio y cloro para la esterilización superficial de semillas o embriones de pino, es efectiva para prevenir la contaminación por hongos y bacterias. El etanol y cloro son considerados por varios autores como buenos desinfectantes, principalmente de coníferas (Dahmere y Mock, 1977; Vargas, 1982; Hu y Wang, 1986).

5.2 MEDIO DE CULTIVO.

Algunos autores (Raghavan, 1980; Raghavan y Srivastava, 1982) consideran que el medio de cultivo para embriones debe de ser "sencillo"; contar con sólo con una base sales minerales y sacarosa y que la presencia de ciertos compuestos no son esenciales; los resultados en el cultivo de embriones de Pinus ayacahuite muestran todo lo contrario, ya que la velocidad de crecimiento y diferenciación de brotes es significativamente incrementada en el medio DCR, en donde, de manera general, el medio es más rico en elementos nutrimentales que el medio SH (cuadro 3), consideramos, además, que el efecto más importante del cultivo de embriones de esta especie, es la selección y concentración del medio de cultivo, que soporta el desarrollo progresivo de los inóculos.

Monier (1975) y González (no publicado) mencionan que dentro de los constituyentes químicos del medio más importantes para el cultivo de embriones, se encuentran las fuentes de nitrógeno inorgánico. El NH_4NO_3 y KNO_3 y la glicina, presentes en el medio DCR posiblemente estimulan con mayor eficacia el desarrollo de los embriones. Dodds y Roberts (1984), consideran que es importante la reducción de las fuentes de nitrógeno inorgánico en el medio basal para el cultivo de embriones y que se debe de suplementar con nitrógeno orgánico; como aminoácidos. El uso de aminoácidos es particularmente importante, ya que provee a las células vegetales de una fuente inmediatamente disponible de nitrógeno, el cual generalmente puede ser tomado por las células más rápidamente que el nitrógeno inorgánico. La glicina presente en el medio DCR, es considerada como necesaria en el cultivo de inóculos de este tipo (Al-Talib y Torrey, 1959; Chalupa, 1983; Gupta y Durzan, 1985).

Aunque, el uso del medio basal SH es aplicado exitosamente en el cultivo de embriones maduros de ciertas coníferas (Mapes et al., 1981; Bornman, 1983), los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran que el potencial formativo de brotes adventicios en el medio DCR es aumentado considerablemente en relación al medio SH; este aumento, parece estar relacionado con la supervivencia de los embriones y no al número de brotes por embrión vivo, ya que la supervivencia inicial (a 1 mes) de los embriones en el medio SH es de 42% y 93% en el medio DCR, después de 5 meses en cultivo todos los embriones producen primordios de brotes. Son detectadas diferencias no significativas en el número de brotes entre los 2 medios (cuadro 6). El efecto de la composición del medio de nutrientes, es también mencionada por Flinn et al., (1978), quienes encuentran que el medio SH es superior al MS. En este estudio los embriones desarrollados en MS producen callo aparentemente vitrificado.

Por otro lado existen datos (Romberger y Tabor, 1971), acerca de que la capacidad formativa de brotes adventicios es mejorada, cuando se disminuye la concentración de agar en el medio, posiblemente la concentración de agar (6 g l^{-1}) presentada en el medio DCR contribuye en gran medida a la alta sobrevivencia de los embriones, que conduce a la diferenciación de un alto número de brotes.

MEDIO	NUMERO DE EMBRIONES		PORCIENTO DE		PROMEDIO DE BROTOS EN 5 MESES POR EMBRION
	INICIALMENTE CULTIVADOS	VIVOS A 2 MESES	SUPERVIVENCIA A 1 MES	EMBRIONES VIVOS AUN MES VIVIENTES Y CON BROTOS A 5 MESES	
SH	72	33	46	42	20
DCR	72	60	66	93	36

LA 6 EFECTO DEL MEDIO SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y PRODUCCION DE BROTOS EN EMBRIONES Pinus ayacahuite EN CULTIVO CON ANA Y BA *

* ANA : 10^{-7} M
 BA : 10^{-5} M

5.3 EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO

5.3.1 AUXINA; ANA

La respuesta individual (cuadro 7) en el medio SH registra la formación de callo, sin encontrarse indicios de posible organogénesis (formación de yemas). Sin embargo, existen diferencias cualitativas en aspecto, textura, coloración y forma del callo para las diferentes concentraciones. Torres (1988) menciona que las auxinas son generalmente incluidas al medio de cultivo para estimular la producción de callo y crecimiento celular.

En concentraciones 10^{-7} y 10^{-6} M ANA, la formación de callo (presentado a la cuarta semana) es escasa, de color verde, que pronto se oxida (cinco semanas) tornándose entonces de color pardo, el tejido se inicia en la parte final de la radícula o en pequeñas heridas causadas en el momento de extracción del embrión, propagándose por casi toda la superficie del inóculo. El tejido calloso en 10^{-3} M ANA, muestra una alta velocidad de proliferación. El callo embriónico es observado al final de la primera semana; de gran tamaño, mucilaginoso y translúcido; típico de los tejidos embriónicos de otras coníferas (Finer et al., 1989). De acuerdo a Dodds y Roberts (1984), el desarrollo de crecimiento del tejido en este tratamiento es considerado como típico, debido a que el aumento de volumen es proporcional al tiempo de desarrollo.

La concentración alta de ANA (10^{-4}) que comúnmente forma callo, es generalmente inhibitoria de la morfogénesis. La oxidación del callo se realiza en un período de tiempo más corto, la velocidad de proliferación disminuye con respecto a los tratamientos anteriores. El embrión muere a la sexta semana.

En varios casos las condiciones de no organogénesis son reemplazadas por un balance preciso de auxina/citocinina, para obtener primordios de brotes, ya que, los brotes adventicios en varios embriones maduros de Pinos no son observados cuando han faltado citocininas en el medio (Capbell y Durzan, 1975; Ellis y Bilderback, 1984).

TRATAMIENTOS No.	ANA	PRODUCCION DE CALLO	LUGAR DE FORMACION	TIEMPO DE FORMACION ★	TAMAÑO	FORMACION DE BROTES
7	10 ⁻⁷	+	R	5-6	++	-
13	10 ⁻⁶	+	R	4-5	++	-
19	10 ⁻⁵	+	R	4-5	+++	-
25	10 ⁻⁴	+	R	3	+	-

Cuadro 7. Efecto de ANA individual sobre la producción de callo en medio SH.
 + : Presente. - : Ausente. R Radicula: ★: Semanas.
 Tamaño : + : Pequeño. ++: MEDiano. +++ : Grande.

5.3.2 CITOCININAS

Datos obtenidos en este y otros trabajos (Sommer, 1975; Cheng, 1977; Thompson, 1981) indican que los embriones de varias coníferas, son excelentes fuentes de brotes adventicios, en un medio conteniendo citocininas, en especial bencil amino purina (BA), que promueve la diferenciación celular. La inducción de brotes adventicios en embriones de Pinus ayacahuite cultivados con BA muestran más eficacia morfogénica que 2iP y cinetina. BA ha mostrado ser más efectiva que 2iP y cinetina en la inducción de brotes en cotiledones de Pseudotsuga menziesii (Cheng, 1977) y en secciones de embriones y cotiledones de Pinus contorta y Picea sitensis (Webb y Street, 1977).

Travan y Thomas (1981) indican que BA es conocida por ser la citocinina más efectiva en la diferenciación de brotes adventicios en muchas especies coníferas; la concentración y duración de óptima de la fase inductiva varía con la especie; en ocasiones es la única citocinina que induce yemas adventicias sobre embriones de algunas coníferas.

5.3.2.1 CINETINA

Concentraciones menores de 10^{-4} (inclusive) de cinetina, la formación de yemas adventicias es observada en 2 de 15 embriones (cuadro 8) en un periodo de 6 semanas. La característica que predomina es la producción de callo, que siempre se inicia en la parte final de la radícula, de coloración verde-amarilla y tamaño muy pequeño, que rara vez cubre por completo al embrión, lo que dificulta la diferenciación de yemas adventicias. Los tratamientos 10^{-3} , 2.5×10^{-3} y 10^{-4} M de cinetina sólo estimula la formación de callo, que se inicia en la zona radical y en pocas ocasiones cubre por completo al embrión; coloración verde más intenso. El alargamiento de los cotiledones es más notorio que el resto de las demás partes del embrión.

5.3.2.2 2iP

En 10^{-7} M 2iP existe poca formación de callo (cuadro 8) de coloración amarilla que pronto presenta muestras de oxidación (2da. semana), el embrión no presenta crecimiento evidente y muere cuando se oxida por completo el callo. La inducción de tejido calloso es observada a 5 días después de la inoculación.

Concentraciones 10^{-6} y 10^{-5} provocan la presencia de yemas adventicias, siempre en los cotiledones; la producción de yemas es observada en 5 de 15 embriones empleados por tratamiento (cuadro 8), presentes a la sexta semana, la producción de callo

(cuando se presenta) es iniciada a los 7 días en la zona radical, de tamaño pequeño con una pigmentación amarilla. En concentraciones 10^4 , la formación de callo se desarrolla notablemente, cubriendo por completo al embrión al final de la quinta semana, de color verde. La producción de tejido indiferenciado no permite la formación de yemas adventicias.

TRATAMIENTOS			PRODUCCION DE CALLO	TIEMPO DE FORMACION*	TAMAÑO	TEXTURA	COLORACION	FORMACION DE BROTES
2	10 ⁻⁷	K	+	5	X	F	V-A	+
2	10 ⁻⁷	2IP	+	4	X	F	A	-
2	10 ⁻⁷	BA	+	5	XXX	F	V	+
3	10 ⁻⁶	K	+	4	X	F	V-A	+
3	10 ⁻⁶	2IP	+	3	X	F	A	+
3	10 ⁻⁶	BA	+	4	XXX	F	V	+
4	2.5X10 ⁻⁵	K	+	4	XXX	F	V	-
4	2.5X10 ⁻⁵	2IP	+	4	X	F	A	+
4	2.5X10 ⁻⁵	BA	+	4	X	F	V	+
5	10 ⁻⁵	K	+	4	XXX	F	V	-
5	10 ⁻⁵	2IP	+	3	XXX	F	A	+
5	10 ⁻⁵	BA	+	4	X	F	V	+
6	10 ⁻⁴	K	+	4	XXX	F	V	-
6	10 ⁻⁴	2IP	+	3	XXX	F	V	-
6	10 ⁻⁴	BA	+	4	XXX	F	V	+

Cuadro 8. Producción de callo y brotes en tratamientos de citocininas individuales para el medio SH.

X: Pequeño XXX: Grande. +: Presente. -: ausente.
 F: Friable. V: Verde. A: Amarillo. V-A: Verde-Amarillo. ★: Semanas.

5.3.2.3 BENCIL AMINO PURINA (BA)

En los recientes años, parece ser la citocinina más utilizada y considerada la más potente, en términos de inducción de yemas adventicias en comparación a otras citocininas; fácilmente obtenible y altamente efectiva (Webb y Street, 1977; Von Arnold, 1978; Mapes y Zaerr, 1981). Sin embargo, se menciona que bajas concentraciones, incluidas en el medio promueven la callosidad (Harvey y Grasham, 1969; Winton, 1972; Winton y Verhage, 1977; Thompson, 1981; Durzan, 1982).

Las concentraciones de BA en el medio de inducción de yemas adventicias sobre embriones de Pinus ayacahuite son altas; 2.5×10^{-5} y 10^{-3} M; los embriones muestran absoluto requerimiento de BA, para desarrollar y mantener la proliferación de yemas. La concentración es un factor determinante para la obtención de un gran número de estas estructuras morfo genéticas, ya que, las concentraciones 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-4} M, aunque promueven algunas yemas, el tejido calloso formado (característica más común) impide su desarrollo posterior. El callo muestra un volumen pequeño de color verde-amarillo, la oxidación se presenta al final de 20 semanas. En el rango de 2.5×10^{-5} - 10^{-3} M BA, esta localizada la mejor respuesta organogenética para la formación de yemas en embriones de Pinus ayacahuite para el medio SH (cuadro 8).

El desarrollo organogénico de embriones de Pinus ayacahuite cultivados en medio DCR, bajo las mismas condiciones anteriores de concentración (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 2.5×10^{-5} y 10^{-4} M BA) muestran resultados similares que con el medio SH. Sin embargo, el tiempo de aparición de las yemas disminuye de 7 semanas (medio SH) a 4 semanas para el medio DCR, además, la cantidad de embriones con yemas aumenta de 7 (medio SH) a 10 embriones para el medio DCR (cuadro 8).

5.3.3 INTERACCIÓN AUXINA-CITOCININAS

Para obtener un cultivo más efectivo en el desarrollo del embrión, así como para lograr una respuesta morfo genética deseable, es necesario una proporción precisa de auxina-citocinina; es vital encontrar la clase y concentraciones de reguladores óptima. Se han probado, casi todos los tipos de auxinas y citocininas existentes para tal objetivo; mostrando que ANA/BA es la combinación más utilizada, que permite el desarrollo organogenético en varias coníferas.

Skoog y Miller (1957) son los primeros en reportar que la proporción de auxina/citocinina determinan el tipo y grado de organogénesis en cultivos in vitro.

El tipo de morfogénesis que ocurre en el cultivo de embriones de Pinus ayacahuite depende en gran medida de la proporción y concentración de ANA/citocininas presentes en el medio.

5.3.3.1 ANA-Cinetina/2iP

La presencia de ANA-cinetina/2iP en el medio SH muestran características muy similares; en todos los casos, más del 50% de los cultivos produjeron callo. No obstante, la formación de yemas adventicias (en 40% de todos los embriones ocurre sólo cuando las citocininas se adicionan en mayor concentración, con respecto a ANA (10^{-7} ; cinetina o 2iP 10^{-5} y 2.5×10^{-3} M). Las otras combinaciones (10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-4} M) también inducen yemas, pero con menor eficiencia (4%). El mayor volumen de callo es observado en concentraciones superiores de 10^{-7} M de ANA junto con 10^{-6} y 10^{-7} M de 2iP y cinetina.

5.3.3.2 ANA-BA

En general consideramos que el cultivo de tejido juvenil (embriones), en un medio conteniendo ANA y BA proporcionan la mejor respuesta organogenética (cuadros 9,11,12). Los resultados muestran que BA (altas concentraciones; 2.5×10^{-5} y 10^{-3} M) es la única citocinina que induce yemas adventicias en embriones maduros de Pinus ayacahuite. Por otro lado, la presencia de ANA a bajas concentraciones (10^{-7}) es necesaria para aumentar la inducción de yemas, BA solo, no es suficiente para obtener la respuesta. Cuando ANA es añadida al medio, el porcentaje de embriones con yemas adventicias aumenta y el patrón de formación cambia (cuadros 9,11,12).

Cuando la concentración de ANA añadida es entre 10^{-6} y 10^{-5} M (en medio SH, cuadros 9,11,12) (figuras 3 y 4), la formación de yemas en posición subterminal de los cotiledones es inhibida y una gran cantidad de hojas aparecen (FIG 3,4)

En 10^{-7} M, la inhibición de yemas en el área subterminal cesa y un pequeño aumento en el número de yemas neoformadas por inóculo es registrado, en concentraciones altas (10^{-4} M) existe un incremento de proliferación desorganizado de callo no organogenético (cuadros 9,11,12) (figuras 3,4). De este modo, es claro que un apropiado balance de auxina/citocinina es necesario para lograr la formación óptima de yemas bien formadas.

Es observado que la concentración de BA necesaria para obtener el mejor porcentaje de embriones con yemas, aumenta regularmente de 10^{-3} a 2.5×10^{-3} M. El alto porcentaje de embriones con primordios de yemas (90%) son obtenidos en el medio DCR con 10^{-5} M BA y 10^{-7} M ANA (cuadros 10,13 y 14, figuras 5 y 6). Al final de la primera semana. Aunque, algunos trabajos en coníferas mencionan que la inclusión de ANA simultáneamente con BA no es necesario, ya que solo la citocinina se encuentra ser suficiente para producir formación de yemas en cultivo; Fosket (198) menciona que, la adición de ANA siempre a baja concentración, aumenta la producción de organogénesis, por lo que, es necesario idear una proporción precisa de auxina/citocinina. Actualmente ANA y BA son los reguladores más efectivos que promueven la formación de yemas en varias especies de pinos. La formación segura de yemas múltiples en embriones de Pinus ayacahuite es obtenida en la proporción de 10^{-7} M ANA/ 10^{-3} M BA en el medio DCR (cuadros 10, 13 y 14). El tiempo de formación organogénica disminuye considerablemente de 7 meses (medio SH) a 4 meses en el medio DCR (cuadros 10,13,14).

TRATAMIENTOS	ANA	GA	PRODUCCION DE CALLO	FORMACION DE BROTES	No. MAXIMO DE BROTES	NUMERO \bar{X} DE BROTES	TIEMPO DE FORMACION	TAMANO MAXIMO
	0	0	-	-				
	0	10^7	+	-				
	0	10^6	+	-				
	0	2.5×10^{-5}	+	+	5	3.2	5	.5
	0	10^5	-	+	10	6.2	5	.5
	0	10^4	-	+	12	6.6	5	.5
	10^7	0	+	-				
	10^7	10^7	+	-				
	10^7	10^6	-	+	15	7.6	5-6	5-1
	10^{-7}	2.5×10^{-5}	-	+	22	14.3	4-5	1
	10^{-7}	10^5	-	+	41	35.6	4-5	2
	10^7	10^4	-	+	25	20.1	5	1

Cuadro 9. Efecto de ANA y BA sobre la producción de callo y brotes en medio DCR.

+ : Presente. - : Ausente. ★ : Semanas. ★★ : Centímetros.

TRATAMIENTOS No.	ANA	BA	PRODUCCION DE CALLO	FORMACION DE BROTES	No. MAXIMO DE BROTES	NUMERO X DE BROTES	TIEMPO DE FORMACION*	TAMAÑO MAXIMO**
8	10^{-7}	10^{-7}	+	-	-			
9	10^{-7}	10^{-6}	+	-	-			
10	10^{-7}	2.5×10^{-5}	-	+	15	8.9	6-7	1
11	10^{-7}	10^{-5}	-	+	30	19.8	6-7	1.5
12	10^{-7}	10^{-4}	-	+	11	6.6	10-11	1
14	10^{-6}	10^{-7}	+	-	-			
15	10^{-6}	10^{-6}	+	-	-			
16	10^{-6}	2.5×10^{-5}	+	+	11	6.4	8	.5
17	10^{-6}	10^{-5}	+	+	10	5.8	8-9	.5
18	10^{-6}	10^{-4}	+	+	8	4.5	10-11	.5
20	10^{-5}	10^{-7}	+	-	-			
21	10^{-5}	10^{-6}	+	-	-			
22	10^{-5}	2.5×10^{-5}	+	+	5	2.9	10	.3
23	10^{-5}	10^{-5}	+	+	5	2.7	9-10	.3
24	10^{-5}	10^{-4}	+	-	-			
26	10^{-4}	10^{-7}	+	-	-			
27	10^{-4}	10^{-6}	+	-	-			
28	10^{-4}	2.5×10^{-5}	+	-	-			
29	10^{-4}	10^{-5}	+	-	-			
30	10^{-4}	10^{-4}	+	-	-			

Cuadro 10. Efecto de ANA y BA sobre la producción de callo y brotes en medio SH.

+ : Presente. -: Ausente. ★: Semanas. ★★: Centímetros.

TRATAMIENTOS			Número de embriones inicialmente cultivados	Número \bar{X} de brotes
No.	ANA	BA		
8	10^{-7}	10^{-7}	15	0
9	10^{-7}	10^{-6}	15	0
10	10^{-7}	2.5×10^{-5}	15	8.9
11	10^{-7}	10^{-5}	15	19.8
12	10^{-6}	10^{-4}	15	6.6
14	10^{-6}	10^{-7}	15	0
15	10^{-6}	10^{-6}	15	0
16	10^{-6}	2.5×10^{-5}	15	6.4
17	10^{-6}	10^{-5}	15	5.8
18	10^{-5}	10^{-4}	15	4.5
20	10^{-5}	10^{-7}	15	0
21	10^{-5}	10^{-6}	15	0
22	10^{-5}	2.5×10^{-5}	15	2.9
23	10^{-5}	10^{-5}	15	2.7
24	10^{-4}	10^{-4}	15	0
26	10^{-4}	10^{-7}	15	0
27	10^{-4}	10^{-6}	15	0
28	10^{-4}	2.5×10^{-5}	15	0
29	10^{-4}	10^{-5}	15	0
30	10^{-4}	10^{-4}	15	0

Cuadro 11.

Número promedio (\bar{X}) de brotes por embrión de acuerdo a cada tratamiento, producidos por ANA y BA en el medio SH a 5 meses.

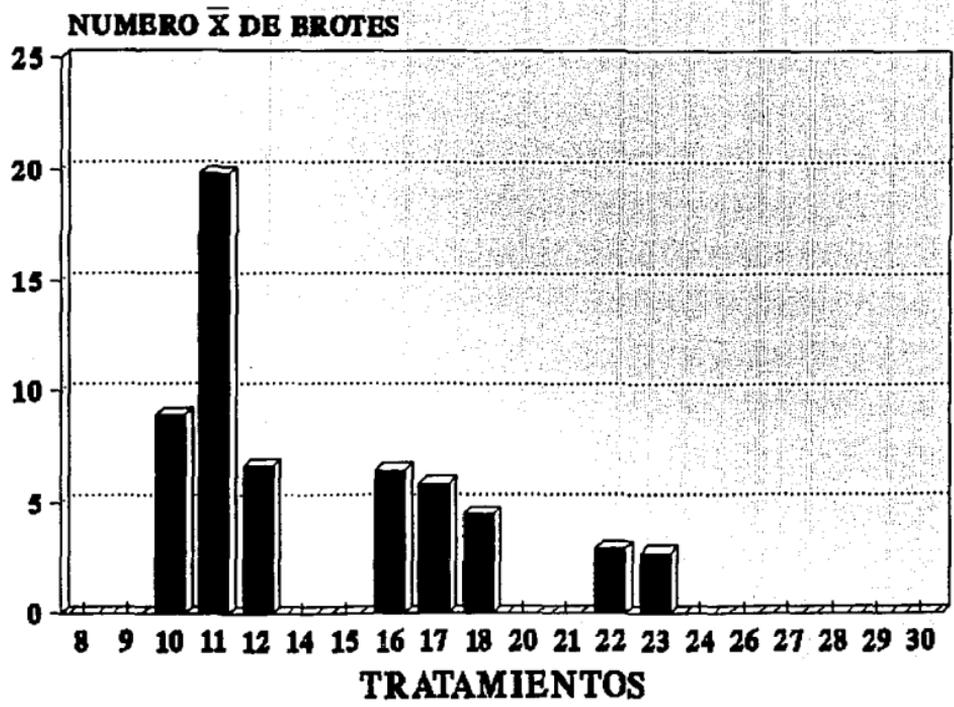


Fig.3. Número promedio (\bar{X}) por tratamiento, producidos por ANA y BA en el medio SH.

TRATAMIENTOS			NUMERO TOTAL DE BROTOS POR TRATAMIENTO
No.	ANA	BA	
8	10^{-7}	10^{-7}	0
9	10^{-7}	10^{-6}	0
10	10^{-7}	2.5×10^{-5}	134
11	10^{-7}	10^{-5}	250
12	10^{-6}	10^{-4}	99
14	10^{-6}	10^{-7}	0
15	10^{-6}	10^{-6}	0
16	10^{-6}	2.5×10^{-5}	96
17	10^{-6}	10^{-5}	94
18	10^{-5}	10^{-4}	68
20	10^{-5}	10^{-7}	0
21	10^{-5}	10^{-6}	0
22	10^{-5}	2.5×10^{-5}	44
23	10^{-5}	10^{-5}	41
24	10^{-4}	10^{-4}	0
26	10^{-4}	10^{-7}	0
27	10^{-4}	10^{-6}	0
28	10^{-4}	2.5×10^{-5}	0
29	10^{-4}	10^{-5}	0
30	10^{-4}	10^{-4}	0

Cuadro 12. Número total de brotes tratamiento, con ANA y BA en el medio SH a 5 meses.

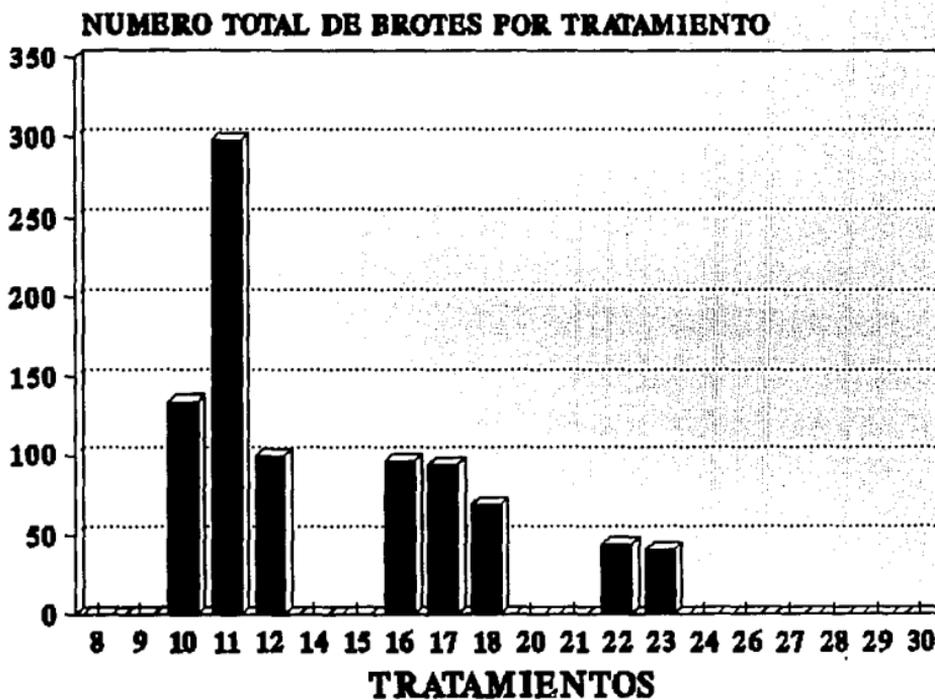


Fig.4 . Número total de brotes por tratamiento de ANA y BA en medio SH.

TRATAMIENTOS			NUMERO \bar{X} DE BROTES
No.	ANA	BA	
1	0	0	0
2	0	10^{-7}	0
3	0	10^{-6}	3.2
4	0	2.5×10^{-5}	6.2
5	0	10^{-5}	6.6
6	0	10^{-4}	0
7	10^{-7}	0	0
8	10^{-7}	10^{-7}	0
9	10^{-7}	10^{-6}	7.6
10	10^{-7}	2.5×10^{-5}	14.3
11	10^{-7}	10^{-5}	35.6
12	10^{-7}	10^{-4}	20.1

CUADRO 13. Número promedio (\bar{x}) de brotes por embrión de acuerdo a cada tratamiento, producidos por ANA y BA en el medio DCR a 5 meses

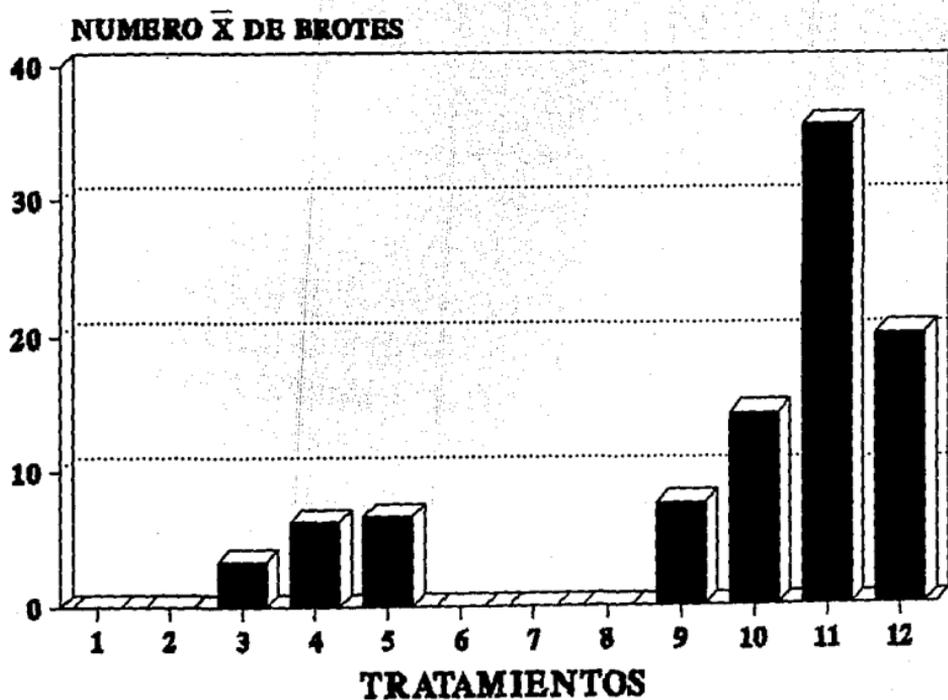


Fig. 5. Número promedio (\bar{X}) de brotes por tratamiento producidos por ANA y BA en medio DC R.

TRATAMIENTOS			NUMERO TOTAL DE BROTES POR TRATAMIENTO
No.	ANA	BA	
1	0	0	0
2	0	10^{-7}	0
3	0	10^{-6}	0
4	0	2.5×10^{-5}	48
5	0	10^{-5}	93
6	0	10^{-4}	99
7	10^{-7}	0	0
8	10^{-7}	10^{-7}	0
9	10^{-7}	10^{-6}	114
10	10^{-7}	2.5×10^{-5}	215
11	10^{-7}	10^{-5}	535
12	10^{-7}	10^{-4}	302

CUADRO 14. Número total de brotes por tratamiento, de ANA y BA en el medio DCR a 5 meses

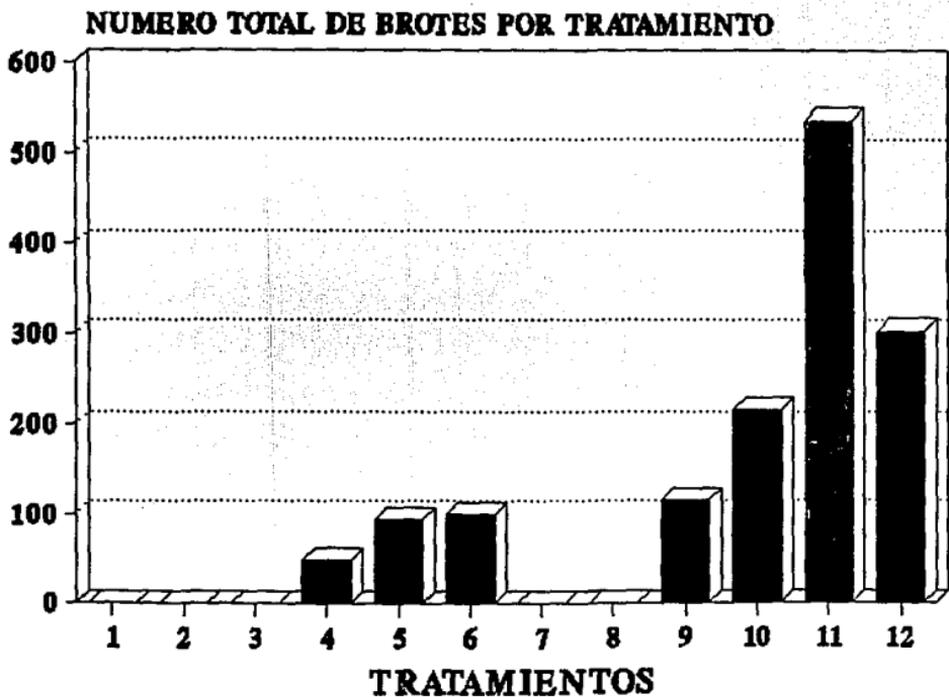


Fig. 6. Número total de brotes por tratamiento de ANA y BA en medio DCR.

5.4 ZONA DE FORMACIÓN DE LOS BROTES SOBRE LOS EMBRIONES

Hasta donde la localización de neoformación es observada (en 10^{-7} M ANA/ 10^{-4} M BA) las yemas aparecen en la cercanía de la posición subterminal y basal de los cotiledones. Es un hecho generalizado que las yemas adventicias provienen de una zona de diferenciación debajo de la epidermis. El cambio más obvio en los embriones de varios pinos durante los 3 primeros días, es la división de las células subepidérmicas y el alargamiento de las células cercanas al estoma.

El alargamiento es el resultado del aumento y división de las células que al poco tiempo (1 semana) producen un meristemoide prominente. Debido a la formación de meristemoides en los cotiledones se adquiere una superficie nodulada. En los embriones cultivados de Pinus ayacahuite en nuestro trabajo en medio DCR, las nodulaciones dan origen a pequeñas yemas en las primeras 4 semanas. La observación de yemas sobre los cotiledones, es posible de observar en aquellos embriones que alcanzan un tamaño promedio de 0.8 cm. en donde los cotiledones aumentan de volumen más que cualquier otra parte del embrión, siempre de color verde. More (1976) menciona que sólo los cotiledones de Pinus ponderosa que aumentaron considerablemente su volumen inicial de 1.5 mm. a 4.0 mm de color verde característico, muestran en observaciones histológicas, nodulaciones a lo largo de la superficie, a los 11 días.

Parece ser que la orientación de los embriones con respecto al medio nutritivo, es un factor importante en la iniciación y desarrollo de yemas; ya que sólo los cotiledones en contacto directo con el medio sólido promueven su desarrollo. Ellis y Bildebrack (1984) observan que los embriones forman yemas múltiples a lo largo de los cotiledones cuando, estos están en contacto sobre la superficie del cultivo, las yemas no se promueven cuando se encuentran por debajo o arriba de la superficie.

5.5 DESARROLLO DE LOS BROTES

Varios tratamientos son utilizados en el alargamiento de yemas neoformadas en *Pinus ayacahuite*;

Reducción de la concentración (50%) de sales del medio basal DCR, sin reguladores y 2% de sacarosa, después de un período de 4 semanas en medio de iniciación. La reducción en la concentración del medio basal hasta 1/6 es en ocasiones necesaria (Tsai y Huang, 1985).

Ramos (1990) describe, al brote como aquél, que muestra un tallo bien definido, ascículas con longitud proporcional y con el meristemo apical definido donde se generan nuevas ascículas. Estas características, se observan en el medio DRC, adicionado con $10^{-7}M$ ANA/ $10^{-3}M$ BA, el cual permite brotes de fácil disección para el posterior alargamiento. Se menciona que existe una relación entre la concentración de reguladores y sales minerales y el número de yemas neoformadas por lado, y la capacidad de crecimiento de yemas en brotes por otro lado (Palet y Berlyn, 1982). Es evidente que el tipo de medio y las concentraciones de reguladores utilizadas en el cultivo de embriones de *Pinus ayacahuite* (DRC: $10^{-7}M$ ANA/ $10^{-3}M$ BA) determinan el desarrollo óptimo de los embriones para brotes individuales. Es determinante, que el medio de inducción no es apropiado para el posterior desarrollo y crecimiento de brotes.

Se carece de información de como los reguladores, los cuales inicialmente son requeridos para el proceso de inducción, afecta el futuro desarrollo de brotes.

Una característica muy difundida del cultivo *in vitro* de especies forestales, es la alta variabilidad de respuestas, debido principalmente al hecho de que la mayor parte de las poblaciones de árboles son altamente heterogéneas (Sommer y Caldas, 1981). La capacidad para formar yemas es asincrónico en embriones de *Pinus ayacahuite* entre los diferentes tratamientos e incluso en embriones del mismo tratamiento; Los brotes que alcanzan el promedio establecido (0.8 cm.) son removidos y colocados en un medio de diferenciación, mientras que los brotes que presentan una longitud pequeña se transfieren a un medio con las mismas características junto con el embrión completo. La capacidad de brotes promovidos en cada embrión es altamente variable; algunos presentan hasta 40 brotes y otros cero. Esto marca la importancia del genotipo en procesos de morfogénesis en embriones de *Pinus ayacahuite*.

La producción de brotes bajo otras condiciones de cultivo también se describe:

-Los brotes promovidos en el medio en el medio SH con $10^{-7}M$ ANA/ $10^{-4}M$ BA muestran un tamaño menor, con ascúculas bien definidas pero la formación de cúmulos de hojas primarias no permiten la disección correcta hasta después de 4 semanas más que para el medio DRC, algunas yemas no lograron desarrollarse aún hasta después de este período.

-La presencia de BA adicionado individual en el medio SH promueve el desarrollo de brotes con tallo corto y ascúculas bien definidas, difíciles de disectar.

-Concentraciones $10^{-7}M$ ANA/ $2.5 \times 10^{-3}M$ BA muestran la formación de brotes unidos entre sí, con tallo corto formando racimos de ascúculas.

-La presencia de brotes con tallo corto pero con ascúculas bien definidas (con $10^{-7}M$ ANA/ $2.5 \times 10^{-3}M$ BA, medio DRC) que después de 7 semanas se alarga, vía callo es logrado cuando el tejido indiferenciado es transferido a un medio de diferenciación.

Todos los brotes promovidos requieren de 2 transferencias en un medio de diferenciación para lograr su desarrollo y alargamiento antes de ser considerados como individuos independientes. Horgan y Aiten (1981) mencionan que los brotes individuales de embriones maduros de *Pinus radiata* requieren de 2 transferencias antes de ser iniciada la inducción de raíz, de otro modo se presenta una escasa supervivencia de los embriones.

6 CONCLUSIONES.

Con los resultados obtenidos en éste trabajo, se muestra que es posible la obtención de brotes adventicios en embriones de Pinus ayacahuite Ehreb., cultivados in vitro mediante el suministro de nutrimentos y reguladores de crecimiento adecuados. Por lo tanto es posible la obtención de plantas completas una vez que se superen los obstáculos relacionados con la formación de raíz.

La formación de brotes en embriones de Pinus ayacahuite es posible utilizando altas concentraciones de BA con respecto a ANA para ambos medios SH y DCR. La formación de callo se presenta cuando solo es añadido ANA en todas las concentraciones utilizadas o cuando las citocininas son añadidas al medio a bajas concentraciones.

El alargamiento de los brotes obtenidos con los medios SH y DCR se logra satisfactoriamente con la reducción de sacarosa hasta 20 g/l sin reguladores de crecimiento y al 50% de su concentración.

La única estructura embrionaria involucrada en la formación de brotes adventicios son los cotiledones. La iniciación del tejido calloso siempre se inicia en la parte radical del embrión, extendiéndose en algunos tratamientos a las demás estructuras.

La comparación de ambos medios con respecto a la formación de brotes adventicios muestra resultados similares ya que los mejores tratamientos son los mismos para el medio SH y DCR. Sin embargo, el medio DCR muestra mayor capacidad morfogénica, ya que permite que se formen mayor cantidad de brotes en un tiempo menor que en el medio SH.

Es evidente que ésta técnica permitirá la obtención de cantidades apreciables de plántulas provenientes de una fuente. Sin embargo, existen varios problemas por resolver, que permitan comprender los factores determinantes en cada una de las etapas involucradas en la propagación.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA



7 BIBLIOGRAFÍA

- Aartrijk, V. 1984. Adventitious bud formation from bud-scale explants of *Lilium espicosum* thumb. In vitro. Dissertation, agricultural University, Wageningen, the Netherlands, 1-79.
- Abdullah, A.A., Yeoman, M.M. and Grace, J. 1989. Calabrian pine (*Pinus brutia* Tenore). In: Biotechnology in agriculture and forestry 5. Trees II. Bajaj, S.P.Y. (Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg N.Y.
- Al-Talib, K.H. and Torrey, J.G. 1959. The aseptic culture of isolated buds of *Pseudotsuga taxifolia*. *Plant Physiol.* 34:630-637.
- Augé, R. 1986. Fenómenos fisiológicos vinculados a la realización de cultivos in vitro. En: *Cultivos in vitro*. Ed. Científica. México, D.F. pag: 9-21.
- Augé, R. y Boccon-Gibod, J. 1986. Aplicaciones en la horticultura. En: *Cultivo in vitro*. Ed. Científica. México, D.F. pag: 91-123.
- Ball, E.A., Morris, D.M. and Rydellius, J.M. 1978. Cloning of *Sequoia sempervirens* from mature trees through tissue culture. *Proc Round table conf. "In vitro" Multiplication woody species* (pp, 181-226). Gembloux, Belgium, June. 6-8.
- Banks, M.S. 1979. Plant regeneration from callus from growth phases of English ivy, *Hedera helix* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 92, 349-353.
- Barbosa, G.M.G. 1987. Manual de injertos de especies forestales. Centro de genética forestal, A.C. Boletín técnico. No. 1.
- Barnes, R.D. y Burley, J. 1987. Vegetative propagation for improved tropical forest trees. In: *Improving vegetatively propagated crops*. Abbott, A.J. and Atkin, R.K. (Eds.) Academic Press.
- Behagel, H.A. 1972. The pH sterilization. In: *Effects of sterilization on components in nutrients media*. Van
- Bragt, J., Mossel, D.A.A., Pierik, R.L.M., Veldstra, H. (Edts.) Veenman, H. Zone N.V. Netherlands, pp: 117-120.
- Bekkooui, F., Francllet, A. and alker, N. 1985. Culture in vitro de méristems de Douglas age et juvénile. *Ann Rech Sylv. AFOCEL*. 1984, pp: 45-73.
- Biondi, S. and Thorpe, T.A. 1981. Clonal propagation of forest trees species. *Symp. on tissue culture of economically important plants*. Singapore. Ed. A.N. Rao.
- Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K. 1983. Tissue culture media. In: *Plant tissue culture: Theory and practice*. Elsevier Science Publishers B.V. pp: 25-42.
- Boccon-Gibod, J. Necesidades nutritivas de los tejidos en condiciones asepticas. En: *Cultivo in vitro*. Ed. Científica. pp: 43-52.
- Bogdanov, B. 1979. (Vegetative propagation of *Pinus strobus* for production of high quality seed). *Forestry Abstracts*. 41(6): 240.
- Bonga, J.M. 1977. Applications of tissue culture in forestry. In: *Applied and fundamental aspects of plant, tissue and organ culture*. Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. (Eds.) Springer, Berlin Heidelberg N.Y. pp: 93-108.
- Bonga, J.M. and Durzan, D.J. 1982. "Tissue culture in forestry" *Martinus Nijhoff/Dr. Junk, Dordrecht, Netherlands*.

- Bonga, J.M. 1983. In vitro propagation of conifers. In: Clonal forestry. Proc. Proc 19th Meet Ca tree improvemen Assoc, Toronto Can. pp-75-83.
- Bonga, J.M. 1984. Adventitious shoot and root formation in tissue cultures of mature Larix decidua. In: International symposium of recent advances in forest Biotechnology Institute, Traverse City, Michigan. Hanover, J., Kanosky Dand and Keothey, D.
- Bonga, J.M. 1987. Clonal propagation of mature trees: Problems and possible solutions. In: Cell and tissue culture in forestry. Bonga, J. M. and Durzan, D. J. (Eds.). Vol. 1/pp; 249-271. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.
- Bonga, J.M. and Von Aderkas, P. 1988. Attempts to micropropagate mature Larix decidua Mill. In: Somatic cell genetics of woody plants. Ahuja, M.R. (Ed.). pp-115-168. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- 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. and Francllet, A. 1977. Recherches sur la propagation végétative du Douglas: Pseudotsuga menziesii (Mirrb). Franco. Possibilités d'obtention de plants viables à partir de la culture in vitro de Bourgeons de pieds-mères juveniles. C.R. Acad. Sci. 284 ;1405-1407.
- Boulay, M. 1989. Redwood (Sequoia sempervires). In: Biotechnology in Agriculture and forestry 5. Trees II. Bajaj, S.Y.P (Ed.). Springer-Verlag.
- Bychenkova, E.A. 1963a. An investigation of callus formation in certain trees and shrubs by the method of tissue culture in vitro. Dokl Akad SSSR. 151(3): 732-736.
- Bychenkova, E.A. 1963b. The study of proliferation of cambium and parenchyma of branches from trees in cultures in vitro. Biol Plant. 5(4): 302-309.
- Bychenkova, E.A. 1967. Methods of in vitro tissue culture of Scots pine. Rast Resurs Mosk. 3: 460-465.
- Carrera, G.M.S. 1977. La propagación vegetativa en el género Pinus. Ciencia Forestal; 2(7): 3-29.
- Chalupa, V. 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. Commun Inst. For. Cech. 13: 7-39.
- Cheng, T.Y. 1977. Factors affecting adventitious bud formation of cotyledon culture of Douglas-fir. Plant Sci Lett. 9: 179-187.
- Cheng, T.Y. and Voqui, T.H. 1977. Regeneration of Douglas-fir plantlets through tissue culture. Science. 198: 306-307.
- Coleman, . and Thorpe, T.A. 1976. In vitro culture of eastern red cedar (Thuja plicata Dann.). I. Plantlet formation. Bot. Gaz. 138: 298-304.
- Dahmere, A. and Mock, K. 1977. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative

- ▶ humidity. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 106:515-518.
- ▶ David, A. and David, H. 1977. Manifestations of diverse potentialities organogenes d'organes ou de fragments d'organes de pin maritime (*Pinus pinaster*) en culture in vitro. *C. ACAD. SC.* 284:627-630.
- ▶ David, A. 1982. In vitro propagation of gymnosperm. In: *Tissue culture in forestry*. Bonga, J.M. and Durzan, D. (Eds.). Martinus Nijhoff. The Hague Netherlands. pp:72-108.
- ▶ Durzan, D.J. 1982. Somatic embryogenesis and sphaeroblasts in conifers cell suspension. In: *Plant tissue culture*. Fuji ara, A. (ed.). 5th Int. Congress tissue, cell cult. Maruzen, Tokio. pp:113-114.
- ▶ Dodds, J.H. 1983. The use of protoplast technology in tissue culture of trees. In: "Tissue culture of trees". Dodds, J.H. (Ed.). pp:103-112. Croom Helm London.
- ▶ Dodds, J.H. and Roberts, L. 1984. *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University Press.
- ▶ Douglas, D.K. 1980. Nutrition and metabolism. In: *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. Staba, E.J. (Ed.). Chemical Rubber Company Press, Boca Raton Florida. pp:21-58.
- ▶ Eguiluz, P.T. 1978. Ensayo de integración sobre el género *Pinus* en México. Tesis profesional UACH. Departamento de Bosques. Chapingo México. pag. 623.
- ▶ Ellis, D.D. and Bilderback, E.D. 1984. Formation mult of buds in culture of embryos of *Pinus ponderosa*. *J. Plant Physiol.* 115:201-204.
- ▶ Evans, D.A., Sharp, R., Ammirato, P.V. and Yamada, Y. 1983. "Handbook of plant cell culture. In: *Techniques for propagation and breeding*. Vol. 1. pp:970. Macmillan, N.Y.
- ▶ Finer, J.J., Kriebel, B.H. and Becar, R.M. 1989. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern hite pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Reports* Springer-Verlag. 8:203-206.
- ▶ Fosket, O.E. 1980. Hormonal control of morphogenesis in cultured tissue. In: *Plant growth substances*. Skoog, F. (Ed.). Spriger, Berlin Helderberg N.Y. pp:362-369.
- ▶ Fossard, R.A., de Nitsch, C., Cressi ell, R.J., and Lee, E.C.M. 1974. Tissue and culture of *Eucalytus*. *N.Z.J. For. Sci.* 4, 267-278.
- ▶ Franclet, A., Boulay, M., Bekkaoui, F., Fauret, Y., Verschoure-Martouze nt, B. and alker, N. 1987. Rejuvenation. In: *Cell and tissue culture in forestry*. Bonga, J.M. and Durzan, D.J. (Eds.). Vol. 1. pp:282-248. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.
- ▶ Fridborg, G., Pedersen, M., Landstrom, L. and Eriksson, T. The effect of activated charcoal on tissue cultures; adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiol Plant.* 43, 104-106.
- ▶ Gamborg, O.L., Murashige, T., Thorpe, T.A. and Vasil, I.K. 1976. Plant tissue culture media. *In vitro.* 12, 473-478.
- ▶ Girovard, R.M. 1970. Rooting plain and heel culttings of Sprunce, forest research laboratory, departament of fisheries and forestry, Quebec 10, Canada the plant propagator, vol. 16. No. 1.
- ▶ Golgfard, B. and Zaerr, B.J. 1989. Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*

- Mirb.Franco). In: *Biotechnology in agriculture and forestry 5. Trees II*. Bajaj, S.P.Y (Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg N.Y. pp:524-548.
- Gupta, P.K. and Durzan, D.J. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and Sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Rep.* 4:177-179.
 - Green, C.E. and Rhodes, C.A. 1982. Plant regeneration in tissue cultures of maize. In: *Maize for biological research*. Sheridan, F. (Ed.). University of North Dakota Press, Grand Forks, ND, USA. pp:367-372.
 - Gresshof, P.M. 1978. Phytohormones and growth and differentiation of cells and tissues cultured in vitro. In: *Phytohormones and related compounds a comprehensive treatise*. Letham, D.S., Goodin, P.B. and Higgins, T.J. (Eds.). Elsevier/North-Holland, Amsterdam. Vol. II. Pp:1-29.
 - Harms, C.T. 1982. Maize and cereal protoplasts-facts and perspectives. In: *Maize for biological research*. Sheridan, F. (Ed.). University of North Dakota Press, Grand Forks, ND, USA. pp:373-448.
 - Harvey, E.A. and Grasham, J.L. 1969. Procedures and media for obtaining tissue cultures of 12 conifer species. *Can. J. Bot.* 47:547-549.
 - Hasnain, S. and Cheliak, . 1986. Tissue culture in forestry: Economic and genetic potential. *For. Chronicle.* 62, 219-225.
 - Hasnain, S., Pigeon, R. and Overend, R.P. 1986. Economic analysis of the use of tissue culture for rapid forest improvement. *For. Chronicle.* 62, 240-245.
 - Hohtola, A. 1988. Seasonal changes in explant viability and contamination of tissue from mature Scots pine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 15:211-227
 - Hu, C. and Yang, D. 1986. Embryo culture: Technique and applications. In: *Handbook of plant cell culture*. Evans, D.A., Sharp, R. and Ammirato, P.V. (Eds.). Vol. 4.
 - Huang, L. and Murashige, T. 1977. Plant tissue culture media: Major constituents. *Tissue culture association manual.* 3, 539-548.
 - Hussey, G. 1986. Vegetative propagation of plants by tissue culture. In: *Plant cell culture technology*. Yeoman, M.M. (Ed.). Botanical monographs. V. 23. pp:29-66.
 - Ingestad, T. 1979. Mineral nutrient requirements of *Pinus sylvestris* and *Picea abies* seedling. *Physiol Plant.* 45:373-380.
 - Jacquiot, C. 1949. Observations sur la néformation de bourgeons chez le tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé in vitro. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 229. 529-530.
 - Jacquiot, C. 1951. Action du mésoinositol et de la 1, adenine sur la formation de bourgeons par le tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé in vitro. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 233. 815-817.
 - Jelaska, S. and Bornman, C.H. 1986. Application of cell culture methods in forestry. In: "Proceedings 18th IUFRO world Congress. Division 2, vol. II" pp.554-564.
 - Jones, L.H. 1987. Clonal propagation of plantation crops. In: *Improving*

- vegetatively propagated crops. Abbott, A.J. and Atkin, R.K. (Eds.). Academic Press. N.Y.
- Klein, R.M. 1964. Repression of tissue culture growth by visible and near visible radiation. *Plant Physiol.* 39, 536.
 - Klein, R.M. and Edsall, P.C. 1967. Interference by near ultraviolet and green light growth of animal and plant cell cultures, photochem. *Photobil.* 6, 841.
 - Kondrasheva, N.Y. 1973. Comparative capacity for proliferation of resin duct calls of branches and stem sapwood of *Pinus sylvestris* in tissue culture. *Lesnoi* 2h16(2):31-33.
 - Konar, R.N. and Nayamani, R. 1974. Tissue culture as method for vegetative propagation of forest trees. *N.Z.J. For. Sci.* 4(2):279-290.
 - Krikorian, A.D. 1982. Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. *Biol. Rev. Cambridge.* 57, 151-218.
 - Kolevsk-Pletikapk, B., Jelaska and Berljak, J. 1983. Bud and shoot formation in juvenile tissue culture of *Pinus nigra*. *Silvae Genetica.* 32; (3-4); 115-118.
 - Lee, M.S. 1983. Factors related to growth and nitrogen assimilation in cell cultures of Douglas-fir. Ph.D. thesis, Rutgers Univ. New Brunswick, N.J.
 - Libby, J. and Rauter, R.M. 1984. Advantages of clonal forestry. *For Chronicle.* 60, 145-149.
 - Lin, Y., Michael, R. agner and Heidmann, L.J. 1991. In vitro formation of axillary buds by immature shoots of ponderosa pine. *Plant cell, tissue and organ culture.* 26:161-166.
 - Linsmaier, E.M. and Skoog, F. 1965. Organic growth factors requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 18:100-127.
 - Lu, C.H., Chiang, H.F. and Liu, V.H. 1981. Induction and cultivation of pollen plants from poplar pollen. In: "Plant tissue culture: Proceedings of the Beijing (Peking) Symposium, 1978" Pitman, London.
 - Mapes, M.O. and Zaerr, J.B. 1981. The effect of female gametophyte on the growth of cultured Douglas-fir embryos. *Ann. Bot. (London).* 48:557-582.
 - Mapes, M.O., Young, P.M. and Zaerr, J.B. 1981. Multiplication in vitro du Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) par la induction precoce d'un bourgeonnement adventif et axillaire. Colloque International sur la culture in vitro des essences forestieres. AFFOCEL. -- Fontainebleau-France. pp:109-114.
 - Martin, M.S. 1980. Environmental factors. In: *Plant tissue culture as a source of biochemical*. Staba, E.J. (Ed.). Press. Inc. Boca Raton, Flor.
 - Martínez, M. 1948. Los pinos mexicanos. 2a. Ed. Botas. México. pag:82-90.
 - Meins, F.Jr., Lutz, J. and Foster, R. 1980. Factors influencing the incidence of habituation for cytokinin of tobacco pith tissue in culture. *Planta* 150, 264-268.
 - Meins, F.Jr. 1986. Determination and morphogenetic competence in plant tissue culture. In: *Plant cell culture technology*. Yeoman, M.M. (Ed.). Blackwell Scientific Publications.
 - Monnier, M. 1975. Culture in vitro de l'embryon immature de Capsella

- bursapastoris Moench (1), Rev. Cytol. Biol. Veg. 39:1-12.
- ▶ Monnier, M. 1978. Culture zygotic embryos. In: Frontiers of plant tissue culture. Thorpe, T. A. (Ed.). Univ. of Cal. Press, CA. pp:277-286.
 - ▶ More, M. B. 1976. Development early of embryo of pine ponderosa (*Pinus ponderosa*). In, medium of culture definite. Rev. Cytol. Biolo. Veg. 39:1-12.
 - ▶ Mott, R. L. and Amerson, H. V. 1982. A tissue culture process for the clonal production of Loblolly pine plantlets. N. Carolina Agric. Res. Ser. Tech. Bull. 271; pp:14.
 - ▶ Mott, R. L. 1980. Trees. In: Cloning agricultural plants via in vitro techniques. B. V. Conger (Ed.). CRC. Press, Inc. Florida.
 - ▶ Mott, R. L. and Amerson, H. V. 1981. Tissue culture plantlets produce from *Pinus monticola* embryonic materials. Forest. Sci.; 27(2); 299-304.
 - ▶ Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 135-166.
 - ▶ Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium rapid growth and bioassays hit tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.
 - ▶ Naguani, R. and Bonga, J. M. 1985. Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. Can. J. For. Res. 15, 1088-1091.
 - ▶ Narayanasamy, S. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. In: Plant cell, tissue and organ culture (Reiner, J. and Bajaj, Y. P. S. (Eds.)). Springer-Verlag, Berlin. pp:179-248.
 - ▶ Nobutaca, T. 1988. Chemistry of plant hormones. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida.
 - ▶ Pérez, B. P. and Sommer, E. H. 1987. Factors affecting adventitious bud induction in *Pinus ellioti* embryos cultured in vitro. Plant Cell Tissue Organ Cult. 11(1), 25-36.
 - ▶ Raghavan, H. and Torrey, J. C. 1964. Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of *Capsella* in culture. Plant Physiol. 39; 691-699.
 - ▶ Raghavan, H. 1980. Embryo culture. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11B; 209-240.
 - ▶ Raghavan, H. and Srivastava, P. S. 1982. Embryo culture. In: Experimental embryology of vascular plants. Jhori, M. (Ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg N. Y. pp:195-227.
 - ▶ Ramos, V. C. A. 1990. Inducción de brotes adventicios en embriones de *Pinus cembroides*. Zucc. Cultivados in vitro. Tesis profesional. ENEPI. UNAM. México. D. F. pag:105.
 - ▶ Reilly, K. and Brown, C. L. 1976. In vitro studies of bud and shoot formation in *Pinus radiata* and *Pseudotsuga menziesii*. Ga. For. Res. 86:1-9.
 - ▶ Reilly, K. and Asher. 1977. Vegetative propagation of radiata pine by tissue culture. Plantlet formation from embryonic tissue. Nz. For. Sci. 7:199.
 - ▶ Romberger, J. A. and Tabor, C. A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. I. agar and autoclavin effects. Ann. J. Bot. 58, 131-140.
 - ▶ Schenk, R. and Hilderbrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50:199-204.
 - ▶ Seibert, M. and Kokkade, G. P. 1980. Environmental factors. In: Plant

- tissue culture as a source of biochemical. Staba, E.J. (Ed.). Press, Inc. Boca Raton, Florida. Pp:124-138.
- ▶ Selby, C. and Harvey, B.M.R. 1985. The influence of natural and in vitro bud flushing on adventitious bud production in sitka Spruce (*Picea sitchensis*) bud and needle cultures. N.P.100:549-562.
 - ▶ Shimamoto, K., Ackermann, N. and Dierks-Venling, C. 1983. Expression of zein in long-term endosperm cultures of maize. *Plant Physiol.* 73:915-920.
 - ▶ Skirvin, M.R., Chu, C.M., Mann, L.M., Young, H., Sullivan, J. and Fermanian, T. 1986. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time and culture plant material. *Plant Cell Reports.* 5:292-294.
 - ▶ Smith, D.L. 1973. Nucleic acid, protein and starch synthesis in developing cotyledons of *Psium arrense* L. *Ann. Bot.* 37:795-804.
 - ▶ Sommer, H.E., Bro, N.C.L. and Korma, P.P. 1975. Differentiation of plantlets in long leaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured in vitro. *Bot. Gaz.* 138:196-200.
 - ▶ Sommer, D.R. and Caldas, L.S. 1981. In vitro methods applied to forest trees. In: *Methods and applications in agriculture*. Thorpe, T.A. (Ed.). Academic press, London N.Y. pp:349-358.
 - ▶ Sommer, H.E., etzstein, H.Y. and Merkle, S.A. 1987. Application of tissue culture techniques to forest trees. In: *Improving vegetatively propagated crops*. Abbott, A.J. and Atkin, R.K. (Eds.). Academic Press. N.Y.
 - ▶ Street, H.E. 1977. Cell (suspension) cultures-techniques. In: *Plant tissue and cell culture*. Street, H.E. (Ed.). Black ll Scientific Publishers, Oxfor. pp:61-102.
 - ▶ Thomas, E., King, P.J. and Potrykus, I. 1979. Improvement of crop plants via single cells in vitro-an assessment. 2. *Pflanzenzuechtig.* 82, 1-30.
 - ▶ Thompson, D.G. and Zaerr, J.B. 1981. Induction of adventitious buds on cultured shoot tip of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) Colloque International sur culture in vitro des essences furetieres. AFOCEL. Fontainebleau-France. pp:167-174.
 - ▶ Thorpe, T.A. and Biondi, S. 1984. Conifers. In: *Handbook of plant cell culture*. Sharp, R., Evans, D.A., Ammirato, P.V. and Yamada, Y. (Eds.) vol. 2 Mac Millan, N.Y. pp:435-470.
 - ▶ Toribio, M. and Pardos, A.J. 1989. Scots pine (*Pinus sylvestris*). In: *Biotechnology in agriculture and forestry 5. Trees II*. Bajaj, S.P.Y. (Ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg N.Y. pp:479-506.
 - ▶ Torres, C.K. 1989. Tissue culture techniques for horticultural crops. Sigma Chemical Company Tissue culture departament. An Avi Book. N.Y.
 - ▶ Tran, T. and Thomas, K.M. 1981. Control of morphogenesis in vitro cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32:291-312.
 - ▶ Tsai, H.C.S. and Huang, F.H. 1985. Vegetative propagation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) through tissue culture. *Proc. In: 18th Southern forest trees improvement confer. Univ. Miss.* (Ed.). USA. pp:51-55.

- Turgeon, R. 1982. Cytokinesis, cell expansion and the potential for cytokinin autonomous growth in tobacco pith. *Plant Physiol.* 70, 1071-1074.
- Vargas, H. J. 1982. *Morgogénesis in vitro de Pinus patula Sche. et Cham. Tesis profesional. Departamento de Bosques. UACH. Chapingo. México. pag:126.*
- Vasil, I. K., Ahuja, M. R. and Vasil, V. 1979. Plant tissue cultures in genetics and plant breeding. *Adv. Genet.* 20, 127.
- Vidalie, H., Augé, R., Beauchesne, G., Boccon-Gibod, J., Decourtye, L., Digat, B., Galandrin, J. C. L. and Morand, J. C. L. 1986. Cultivo de embriones. *Cultivo in vitro. Ed. Científica. México. pag. 34-89.*
- Von Arnold, S. and Eriksson, T. 1978. Induction of adventitious buds of embryos of Norway spruce grown in vitro. *Physiol Plant.* 44:283-287.
- Wlbott, V. 1981. The application of genetics to plant. In: "Impacts of applied genetics-micro-organisms, plants and animals". Congress of the USA, office of technology Assessment, D.C. pp:137-164.
- Weaver, J. R. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en agricultura. *Ed. Trillas. México. pag:113-172.*
- Webb, K. J. and Street, H. E. 1977. Morphogenesis in vitro of Pinus and Picea. *Acta Hortic.* 78:259-269.
- Wernicke, . and Brettel, R. 1980. Somatic embryogenesis from sorghum bicolor leaves. *Nature.* 287, 138-139.
- Winton, L. L. 1968. Plantlets from aspen tissue cultures. *Science.* 160, 124-135.
- Winton, L. L. and Verhagen, S. A. 1977. Shoot from Douglas-fir cultures. *Can. J. Bot.* 55:1246-1250.
- Winton, L. L. and Huhtinen. 1976. Tissue cultures of trees. In: *Modern methods in forest genetics.* Mikscke, J. P. (Ed.) Springer-Verlag, Berlin. pp:243-264.
- Winton, L. L. 1978. Morphogenesis in clonal propagation of woody plants. In: *Frontiers of plant tissue culture. Proc. of the 4th International Congress of Plant tissue and cell culture.* Thorpe, T. A. (Ed.) pp419-426.
- Winton, L. L. and Verhagen, S. A. 1977. Shoot from Douglas-fir cultures. *Can. J. Bot.* 55:1246-1250.
- Whuite, P. R. and Risser, P. 1964. Some basic parameters in the cultivation of Spruce tissues. *Physiol Plant.* 17:600-619.
- Wolter, K. E. 1968. Root and shoot initiation in aspen callus cultures. *Nature.* 219:509-510.
- Yeoman, M. M. 1986. *Plant cell culture technology.* Yeoman, M. M. (Ed.) Blackwell scientific publications. Oxford.
- Zsuffa, L. 1974. Rooting of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) Cuttings. *Canadian Journal of Forest Research.* Vol. 4. pp:557-561.
- Zobel, B., Jett, J. B. and Paschke, J. 1979. Methods and techniques in trees improvement. *Vegetative propagation. Syllabus for 591. Section II:27-39.*