

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



INDUCCION DE ORGANOGENESIS Y
EMBRIOGENESIS SOMATICA EN *Pinus cembroides*
(Zucc) y *Pinus halepensis* Mill).

TESIS

PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCION
AGRICOLA

POR

MA. DEL CARMEN OJEDA ZACARIAS

MARIN, N. L.

SEPTIEMBRE DE 1996

TM

SD397

.P58

03

c.1



1080071706

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CENTRO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



INFLUENCIA DE CENIZAS Y
HORMIGONES COMADICA EN Pinus caroliniana
(Zucc) y Pinus halepensis Mill).

T E S I S

PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCION
AGRICOLA

POR

MA. DEL CARMEN OJEDA ZACARIAS

MARIN, R. I.

SEPTIEMBRE DE 1966

12599^e

BIBLIOTECA Agronomía U.A.N.L.

TM
SD 397
P 58
03



(71706)



INDUCCION DE ORGANOGENESIS Y EMBRIOGENEIS SOMATICA EN
Pinus cembroides (Zucc.) y *Pinus halepensis* (Mill)

TESIS

SOMETIDA AL COMITE PARTICULAR COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCION AGRICOLA



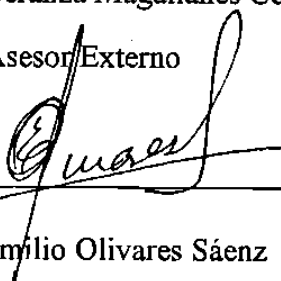
Dra. Ma. Elizabeth Cárdenas Cerda

Director de Tesis



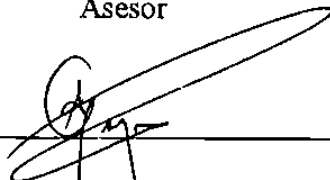
M.C. Ma. Esperanza Magallanes Cedeño

Asesor Externo



Ph.D. Emilio Olivares Sáenz

Asesor



Dra. Aurora Garza Zúñiga

Asesor

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México, quien a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado la beca.

A la Dra. Ma. Elizabeth Cárdenas Cerda, asesora principal, de la presente investigación. Por su invaluable amistad, confianza y apoyo, así como por su valiosa dirección en el desarrollo de la presente investigación, además por haberme transmitido sus conocimientos de cultivo de tejidos vegetales; los cuales han sido de gran utilidad en el desarrollo de mi vida profesional.

Al Ph.D. Emilio Olivares Sáenz, por la asesoría brindada en la interpretación de los análisis estadísticos de la presente investigación y sus acertadas recomendaciones.

A la Dra. Aurora Garza Zúñiga por su participación en la revisión y sugerencias aportadas al presente trabajo.

Al Ph.D. Ronald J. Newton por las facilidades brindadas para la realización del trabajo en el laboratorio a su cargo del Department of Forest Science de la Texas A & M, University College Station, USA.

A la M.C. Esperanza Magallanes Cedeño por su valiosa colaboración e interés mostrado en el desarrollo de la presente investigación; además, por la capacitación brindada sobre la técnica de embriogénesis somática, así como por su valiosa participación en la orientación del presente trabajo.

Al Ph.D. Miguel Angel Capó Arteaga por su colaboración incondicional en la obtención del material vegetal utilizado para la técnica de embriogénesis somática, que sin su colaboración no hubiese sido posible llevar a cabo dicha técnica.

A mis compañeros de generación de la maestría y estudiantes de la maestría en ciencias en producción agrícola por su amistad y compañerismo. Así como a todas aquellas personas que contribuyeron de una u otra forma en la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis Padres, Margarita Zacarías de Ojeda y Juan Isaías Ojeda Lázaro (†). por su gran amor y comprensión.

A mis Hermanos; Por el apoyo moral, amistad y confianza que siempre me han brindado. Especialmente a Leticia. Así como a todos mis sobrinos por ser la alegría de la familia.

A mi gran Amigo M.C. Leobardo Iracheta Donjuan por su amistad siempre brindada.

Al Ing. Julián Robles Hernández por su apoyo moral y ayuda siempre brindada.

BIOGRAFIA

Ma del Carmen Ojeda Zacarias, Nació en Jéruco Michoacán, el 01 de Agosto de 1966. Realizó sus estudios de primaria en la escuela federal Vicente Guerrero en Jéruco Michoacán, la secundaria en la escuela Democracia Social No. 66 en San Pedro Garza García, N. L., el Bachillerato lo realizó en la preparatoria No. 2 de la U.A.N.L., posteriormente ingresó a la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L. recibiendo el título de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista en febrero de 1992.

Realizó el servicio social de marzo a septiembre de 1991., en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la FAUANL.

De marzo de 1992 a julio de 1993, se desempeñó en un laboratorio privado de cultivo de tejidos vegetales.

En agosto de 1993 ingresó como estudiante a la Subdirección de Estudios de Postgrado de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L., obteniendo el grado de maestro en Ciencias en Producción Agrícola en septiembre de 1996.

INDICE DE CONTENIDO

Capítulo	Página
INDICE DE CUADROS.....	X
CLAVE DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XIV
SUMMARY.....	XVII
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1 Generalidades de las Pináceas.....	3
2.2 Importancia Económica de las Pináceas.....	3
2.3 Distribución Geográfica.....	4
2.4 Clasificación Botánica de las Especies.....	5
2.5 Descripción Botánica de las Especies.....	5
2.6 Propagación Tradicional de las Pináceas.....	6
2.7 Propagación <i>in vitro</i>	6
2.8 Factores que Influyen en la Propagación <i>in vitro</i>	7
2.8.1 Especie.....	7
2.8.2 Inóculo o Explante.....	8
2.8.2.1 Edad del explante.....	8
2.8.2.2 Tipo de Explante.....	8
2.8.3 Medio de Cultivo.....	10
2.8.3.1 Efecto de las Sales Inorgánicas.....	10
2.8.3.2 Influencia de los Reguladores de Crecimiento.....	11
2.8.3.3 Efectos de la Sacarosa en el Medio de Cultivo.....	13
2.9 El Cultivo de Tejidos Vegetales en Coníferas.....	14

2.9.1	Micropropagación.....	14
2.9.1.1	Organogénesis.....	15
2.9.1.1.1	Etapas en el proceso de organogénesis.....	15
2.9.1.2	Embriogénesis Somática.....	18
2.9.1.2.1	Origen e Importancia de la Embriogénesis Somática.....	18
2.9.1.2.2	Etapas en el Proceso de Embriogénesis Somática.....	19
3.	MATERIALES Y METODOS.....	23
3.1.	Metodología para Organogénesis.....	23
3.1.1	Desinfección del Material Vegetal.....	23
3.1.2	Predesinfección de la Semilla.....	23
3.1.3	Desinfección de la Semilla.....	24
3.1.4	Medios de Cultivo.....	24
3.1.5	Explante o Inóculo.....	27
3.1.6	Condiciones del Cultivo <i>in vitro</i>	27
3.1.7	Modelo Estadístico.....	27
3.1.8	Inducción y Desarrollo de Yemas Adventicias.....	28
3.1.9	Alargamiento de Yemas.....	29
3.1.10	Formación de Brotes.....	29
3.1.11	Enraizamiento.....	29
3.2	Metodología para Embriogénesis Somática.....	30
3.2.1	Material Biológico.....	30
3.2.2	Predesinfección de los Conos.....	30
3.2.3	Obtención de la Semilla.....	30
3.2.4	Desinfección de la Semilla.....	31
3.2.5	Medio de Cultivo.....	31

3.2.6	Modelo Estadístico.....	31
3.2.7	Explante o Inóculo.....	32
3.2.8	Inducción de Embriogénesis Somática.....	32
3.2.9	Proliferación.....	33
3.2.10	Maduración.....	33
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	35
4.1	Variables Evaluadas en Organogénesis.....	35
4.1.1	Inducción de Callo y Primordios de Yemas.....	35
4.1.2	Número de cotiledones que Formaron Brotes.....	39
4.1.3	Número de Brotes por Cotiledón.....	41
4.1.4	Número de Brotes por Embrión.....	44
4.1.5	Número de Brotes con 5 mm de longitud.....	47
4.1.6	Enraizamiento.....	49
4.2	Variables Evaluadas en Embriogénesis Somática.....	50
4.2.1	Inducción de Tejido Embriogénico.....	50
5.	CONCLUSIONES.....	53
6.	BIBLIOGRAFIA.....	54

INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1	Componentes inorgánicos de los medios DCR y GD.	25
Cuadro 2	Componentes orgánicos adicionados a los medios DCR y GD.	26
Cuadro 3	Tratamientos de Organogénesis.	28
Cuadro 4	Tratamientos de Embriogénesis Somática.	32
Cuadro 5	Análisis de varianza para la variable número de cotiledones con formación de callo y primordios de yemas, obtenidos mediante la técnica de organogénesis en <i>Pinus cembroides</i> y <i>Pinus halepensis</i> .	38
Cuadro 6	Comparación de medias para <i>Pinus cembroides</i> y <i>Pinus halepensis</i> en la variable número de cotiledones que formaron callo y primordios de yemas.	38
Cuadro 7	Comparación de medias para tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento en la variable número de cotiledones que formaron callo y primordios de yemas.	39
Cuadro 8	Comparación de medias para la interacción tiempo-especie en la variable número de cotiledones que formaron callo y primordios de yemas.	40
Cuadro 9	Análisis de varianza para la variable cotiledones con formación de brotes, obtenidos mediante la técnica de organogénesis en <i>Pinus cembroides</i> y <i>Pinus halepensis</i> .	41
Cuadro 10	Comparación de medias para <i>Pinus cembroides</i> y <i>Pinus halepensis</i> en la variable número de cotiledones con formación de brotes.	42

Cuadro 11	Comparación de medias con respecto al tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento en la variable, número de cotiledones que formaron brotes.	42
Cuadro 12	Comparación de medias de la interacción especie- tiempo en la variable número de cotiledones que formaron brotes.	43
Cuadro 13	Análisis de varianza para la variable número de brotes por cotiledón, obtenidos mediante la técnica de organogénesis en <i>Pinus cembroides</i> y <i>Pinus halepensis</i> .	44
Cuadro 14	Comparación de medias para el factor medio de cultivo en la variable número de brotes por cotiledón.	44
Cuadro 15	Comparación de medias para la interacción medio-tiempo en la variable número de brotes por cotiledón.	45
Cuadro 16	Análisis de varianza para la variable número de brotes por embrión, obtenidos mediante la técnica de organogénesis en <i>Pinus cembroides</i> y <i>Pinus halepensis</i> .	46
Cuadro 17	Comparación de medias para <i>Pinus cembroides</i> y <i>Pinus halepensis</i> en la variable número de brotes por embrión.	47
Cuadro 18	Comparación de medias para el factor medio de cultivo en la variable número de brotes por embrión.	47
Cuadro 19	Comparación de medias para la interacción especie-tiempo en la variable brotes por embrión.	48
Cuadro 20	Análisis de varianza para la variable longitud de brotes de 5 mm, obtenidos mediante la técnica de organogénesis en <i>Pinus cembroides</i> y <i>Pinus halepensis</i> .	49
Cuadro 21	Comparación de medias en el factor medio de cultivo en la variable longitud de brotes de 5 mm.	50

Cuadro 22	Comparación de medias en el factor tiempo en la variable longitud de brotes de 5 mm.	50
Cuadro 23	Comparación de medias para la interacción especie-tiempo en la variable longitud de brotes de 5 mm.	51
Cuadro 24	Prueba de χ^2 para el porcentaje de tejido embriogénico en relación al medio de cultivo utilizado.	52
Cuadro 25	Prueba de χ^2 para el porcentaje de tejido embriogénico en relación a las especies utilizadas.	53

CLAVES DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

DCR	=	Gupta y Durzan (1985)
GD	=	Gresshoff y Doy (1972)
BAP	=	bencilaminopurina
NAA	=	ácido naftalenacético
ABA	=	ácido abscísico
2,4-D	=	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
IBA	=	ácido indolbutírico
ml	=	mililitros
mg l ⁻¹	=	miligramos por litro
g	=	gramos
g l ⁻¹	=	gramos por litro
(v/v)	=	volumen sobre volumen
μM	=	micro molar
m	=	metros
cm	=	centímetros
mm	=	milímetros
h	=	horas
min	=	minutos
seg	=	segundos
ha	=	hectáreas
%	=	porcentaje
°C	=	grados centígrados
atm	=	atmosferas
NaOCl	=	hipoclorito de sodio
(H ₂ O ₂)	=	peróxido de hidrógeno
(Tween-20)	=	poliexietileno sorbitan monolaurato

RESUMEN

Tradicionalmente las coníferas son propagadas a partir de semillas, estacas, injertos y fascículos enraizados. Sin embargo, en los últimos años la propagación *in vitro* de especies forestales se ha desarrollado grandemente. Estas técnicas han demostrado ser efectivas en la multiplicación, mejoramiento y conservación de plantas.

Por lo anterior los objetivos del presente trabajo fueron desarrollar un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis* así como comparar los métodos de organogénesis y embriogénesis somática en cuanto a la capacidad de formación de propágulos. En organogénesis específicamente, determinar el medio de cultivo más adecuado, y el tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento.

Para la propagación mediante organogénesis se utilizaron cotiledones de semillas maduras como fuente de inóculo. Estos fueron colocados en 2 medios de cultivo DCR (Gupta y Durzan, 1985) y GD (Gresshoff y Doy, 1972) adicionados con 0.3 mg l^{-1} de BAP y 0.01 mg l^{-1} de NAA; sacarosa, 30 g l^{-1} para (DCR) y 20 g l^{-1} para (GD); 5 g l^{-1} de agar gel y pH 5.7. En estos medios permanecieron por 4 ó 6 semanas en condiciones de $26 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. El arreglo de tratamientos fue un factorial 2^3 con 6 repeticiones. La variable evaluada fue formación de callo y primordios de yemas.

El tejido fue transferido a los medios de cultivo (DCR y GD) sin reguladores de crecimiento, donde permanecieron por 8 semanas; procediéndose a evaluar la variable número de cotiledones con brotes.

Posteriormente los explantes fueron transferidos a los mismos medios de cultivo sin reguladores de crecimiento, adicionados con 0.1% de carbón activado. En estas condiciones permanecieron por 8 semanas, evaluándose las variables número de brotes por cotiledón, número de brotes por embrión y longitud de brotes.

Para el enraizamiento se consideraron brotes de 5 mm de longitud los cuales fueron sometidos a un tratamiento de "pulso" con IBA y NAA; los brotes tratados se sembraron en los medios DCR y GD, sin reguladores de crecimiento con 0.1% de carbón activado, permaneciendo 8 semanas en incubación.

Los análisis de varianza muestran diferencia significativa para especie en todas las variables evaluadas con la excepción de longitud de brotes; mientras que para el factor medio de cultivo no existió significancia para las variables formación de callo y cotiledones que formaron brotes. Para el factor tiempo no resultaron significativas las variables número de brotes por cotiledón y número de brotes por embrión. Las interacciones que resultaron significativas estadísticamente fueron especie -tiempo para todas las variables evaluadas con excepción de la variable brotes por cotiledón; en esta última, se observó diferencia significativa para la interacción medio-tiempo.

Para embriogénesis somática se utilizaron los megagametofitos como fuente de inóculo, los cuales fueron cultivados en los medios DCR (Gupta y Durzan, 1985) y GD (Gresshoff y Doy, 1972) adicionados con 3.0 mg l^{-1} de 2,4-D y 0.5 mg l^{-1} de BAP, sacarosa 30 g l^{-1} para (DCR) y 20 g l^{-1} para (GD) además 5 g l^{-1} de agar-gel, se ajustó el pH del medio a 5.7, los explantes se mantuvieron durante 8 semanas en obscuridad a $26 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. La variable a evaluar fue formación de tejido embriogénico.

En embriogénesis somática, presentó 100% de formación de tejido embriogénico en el medio DCR, mientras que en el medio GD, se obtuvo un 75%.

SUMMARY

Traditionally conifers are propagated by seeds, grafting or rooted fascicles. An alternative to these methods is *in vitro* propagation and it is known that the *in vitro* techniques are effective for the multiplication, improvement and conservation of forest species.

The objectives of the present study were: to establish a protocol for *in vitro* regeneration of *Pinus cembroides* and *Pinus halepensis*; to compare organogenesis and somatic embryogenesis for propagule induction and to determine the culture media and plant growth regulators for somatic embryogenesis.

Cotyledons from mature seeds were used as a source of explant for organogenesis. These cotyledons were cultured on two basal media: DCR (Gupta & Durzan, 1985) and GD (Gresshoff & Doy, 1972); all media were supplemented with 0.3 mg^l⁻¹ of BAP and 0.1 mg^l⁻¹ of NAA; 3% of sucrose was used for DCR medium and 2% for GD; 5 g^l⁻¹ of phytagel. The pH of the media was adjusted to 5.7.

Cultures were maintained for 4-6 weeks at 26 °C in a 16-h photoperiod. The statistical analyses was a factorial 2³ with 6 replications. The variable measured was callus and bud primordia induction.

The meristematic tissue was transferred and maintained for 8 weeks in both DCR and GD media but lacking plant growth. The number of cotyledons with shoots was measured after incubation period.

The explants were then transferred to the same media without plant growth regulators supplemented with 0.1% activated charcoal and after 8 weeks of culture number of shoots per cotyledon, number of shoots per embryo and length of shoots were evaluated.

5 mm shoots were used for rooting following the protocol established by Harry & Thorpe (1994) using same culture media without plant growth regulators and 0.1% activated charcoal. Data was recorded after 8 weeks.

The analyses of variance shows a significant difference for the species in all the variable evaluated except for shoot length. The culture media show a non significant difference for callus and shoot induction from cotyledons. Also the time factor was not significant for the number of shoots produced per cotyledon and number of shoots per embryo. The species-time interaction shows significant difference for all the variables evaluated except for number of shoots per cotyledon.

Megagametophytes from immature seeds of *P. cembroides* and *P. halepensis* were used as a source of explant for somatic embryogenesis. The explants were cultured in DCR and GD supplemented with 3.0 mg l^{-1} of 2,4-D and 0.5 mg l^{-1} of BAP, 3% sucrose for DCR and 2% sucrose for GD; 5g l^{-1} of phytigel were used for all media and pH was adjusted to 5.7. The culture were maintained a 26 °C. Frequency of initiation of embryogenic tissue was scored after 8 weeks on the media used.

In somatic embryogenesis, DCR medium showed 100% for embryogenic tissue formation, while GD 75%.

1. INTRODUCCION

México es un país con una gran riqueza forestal y se considera que es centro de origen de las pináceas. Entre las especies de importancia económica más relevantes, se encuentran los pinos piñoneros; de los cuales se reporta a nivel nacional una superficie de 852,458 ha, donde una de las especies más relevantes es *Pinus cembroides* (Gutiérrez y Tapia 1993). Por otra parte, debido a los programas actuales de reforestación, es necesario contar con materiales que se adapten a condiciones adversas; *Pinus halepensis* al ser una especie que resiste condiciones de sequía y que se adapta bien a suelos pobres (Lambardi *et al.* 1993), resulta una buena opción para ese tipo de programas.

Tradicionalmente las coníferas son propagadas a partir de semillas, estacas, injertos y fascículos enraizados. Sin embargo en los últimos años la propagación *in vitro* de especies forestales se ha desarrollado grandemente, puesto que cuenta con una serie de técnicas modernas tales como la clonación, cultivo de células haploides, formación de embriones somáticos entre otras. Estas técnicas han demostrado ser efectivas en la multiplicación, mejoramiento y conservación de plantas. (Go, Pérez-Orozco y Halos 1993).

La propagación masiva requiere que los inóculos cultivados *in vitro* proliferen y que cada unidad sea capaz de regenerar una planta completa, sin embargo, se han consignado variaciones en la respuesta, incluso dentro de la misma especie; esta variación puede atribuirse a diversos componentes de los medios de cultivo tales como la concentración de citocininas, tipo de inóculo inicial e incluso el tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento. De igual forma se considera que diversas especies del género *Pinus*, responden diferentemente en cuanto a su capacidad de regeneración según la técnica utilizada.

Por lo anterior los objetivos del presente trabajo fueron desarrollar un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis* así como comparar los métodos de organogénesis y embriogénesis somática en cuanto a la capacidad de formación de propágulos. En organogénesis específicamente, determinar el medio de cultivo más adecuado, y el tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento.

HIPOTESIS

- H1: *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis* presentan diferente potencial de regeneración *in vitro*
- H2: El medio de cultivo y el tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento influyen en la formación de diferente número de propágulos, por medio de organogénesis.
- H3: Las técnicas de organogénesis y embriogénesis somática, presentan diferente potencial de regeneración, para *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de las Pináceas.

Las pináceas son árboles o arbustos de tallo leñoso monopódico y ramificado, con hojas pequeñas alternas, opuestas o verticiladas, comúnmente aciculares o escuamiformes y aveceoladas. Las flores femeninas y masculinas forman por lo regular zonas aisladas o en grupos. Sus frutos son por lo común conos con escamas lignificadas o carnosas. Las semillas tienen alas, pero muchas pináceas carecen de ellas. La raíz carece de pelos absorbentes; en sustitución de los mismos se desarrollan hongos que las envuelven y forman micorrizas, las cuales desempeñan el papel de los pelos radicales. Su corteza está más o menos suberificada, en la mayoría de ellas existen canales resiníferos. Por lo general, son plantas perennes, que están renovando constantemente sus hojas (Rzedowski; 1978).

2.2 Importancia Económica de las Pináceas.

Las pináceas tienen en la flora mexicana enorme importancia desde el punto de vista forestal. Ya que generalmente, constituyen la principal fuente de materia prima para productos maderables y desempeñan una fuente importante de empleo en las comunidades rurales y urbanas.

Las semillas son utilizadas como alimento para el hombre y la fauna silvestre; por otro lado son utilizadas en programas de mejoramiento genético (Escoto, 1988).

El género *Pinus*, constituye una gran parte de la riqueza forestal maderable nacional, por su amplio rango de distribución (Martínez, 1953 a).

Pinus cembroides. Es una especie de importancia económica relevante, ya que a nivel nacional se reporta una superficie aproximada de 852,458 hectáreas, con pinos piñoneros. (Gutiérrez y Tapia, 1993). Esta especie se distingue por sus hojas muy cortas en grupos de 3 y por sus semillas grandes comestibles; llegando a producir hasta 4 ton/ha. Se propaga fácilmente por semilla, pero su crecimiento es lento como en los demás pinos.

Además, recomiendan cultivarlos en terrenos pobres y deforestados para así evitar los problemas de erosión; por lo cual, es una especie utilizada en programas de reforestación (Martínez, 1953 b).

Pinus halepensis Es una especie de gran importancia económica debido a su adaptación a suelos pobres, secos y calcáreos. Es particularmente adecuado para reforestación de áreas marginales, debido a que es uno de los pinos más resistentes a la sequía (Lambardi, *et al* 1993), igualmente es importante para propósitos de ornato y reforestación (Ferrer y Rodríguez, 1968).

2..3 Distribución geográfica.

Una gran mayoría se localiza en lugares montañosos, templados y fríos y solamente pocas especies se desarrollan en lugares subtropicales. La familia de las pináceas comprende en México 8 géneros; sin embargo, el género *Pinus* es el de más amplia distribución (Martínez, 1963 a). Este género habita principalmente en zonas templadas y frías aunque también se encuentra en las altas mesetas y montañas de algunas zonas tropicales; se puede desarrollar desde cero hasta 4000 m.s.n.m. (Rzedowski, 1978).

2.4 Clasificación Botánica de las Especies.

Reino:	Vegetal
División:	Embryophyta Siphonogama
Subdivisión:	Gymnospermae
Orden:	Coniferae
Familia:	Pinaceae
Género:	<i>Pinus</i>
Especie:	<i>cembroides</i>
Especie:	<i>halepensis</i>

(Lawrence, 1971).

2.5 Descripción Botánica de las Especies.

Pinus cembroides (Zucc) son árboles de 4 a 6 metros de altura, de ramillas ásperas y flexibles, con hojas cortas de 3 a 5 cm, en grupos de 3 (a veces de 2 a 5), de vainas caedizas, y cono de unos 5 cm; con 5 a 6 semillas grandes comestibles y sin alas, que son los piñones. Se propaga fácilmente por semilla pero su crecimiento es muy lento, como en los demás pinos. Los pinos piñoneros se encuentran en las zonas semiáridas y áridas de la república mexicana (Martínez, 1953 b).

Pinus halepensis (Mill) son árboles que frecuentemente presentan aspecto tortuoso y escaso desarrollo debido a que vive en suelos muy pobres, pero cuando están localizados en buenos suelos, tienen buen crecimiento y porte derecho. Las acículas son finas y flexibles, agrupadas de 2 en 2 de 6 a 10 cm de longitud. Las flores masculinas son amentos agrupados en espigas cilíndricas, de tamaño intermedio. Las flores

femeninas tienen pedúnculo largo desde su primera edad. Las piñas tienen un pedúnculo de 2 cm, son alargadas de 8 cm en promedio, los escudos de las escamas son planos y con los ombligos poco salientes. Las semillas son de unos 4 mm en promedio y el ala es de 3 a 4 veces más grande que esta. La corteza es resquebrajada pero no muy gruesa y de tonos blanquecinos. La madera de esta especie no es de calidad, debido al porte tortuoso que tiene frecuentemente el árbol a consecuencia de los suelos pobres que habita. *Pinus halepensis* es una conífera típica de la región del mediterráneo, que vive desde la orilla del mar hasta los 200 m de altura (Ferrer y Rodríguez, 1968)

2.6 Propagación Tradicional de las Pináceas.

Tradicionalmente las pináceas son propagadas a partir de semillas, estacas, injertos y fascículos enraizados. Sin embargo, la propagación vegetativa presenta una serie de problemas, ya que la capacidad de enraizamiento es baja. Por otro lado, el largo período de crecimiento desde semilla a floración de las coníferas varía de 15 a 20 años; es por eso que el mejoramiento genético de estas especies no ha sido tan rápido como la genética de cultivos agrícolas. (GO, Pérez-Orozco y Halos, 1993), por lo tanto es deseable desarrollar estrategias alternativas que acorten este tiempo. (Atree y Fowke, 1993).

2.7 Propagación *in vitro*.

En los últimos años un gran número de plantas leñosas tanto angiospermas como gimnospermas, han sido propagadas *in vitro*. El cultivo de tejidos es una técnica que ha sido utilizada por diversos investigadores para regenerar coníferas (Sen *et al.*, 1994).

Actualmente la propagación *in vitro* de especies forestales se ha desarrollado grandemente, puesto que cuenta con una serie de técnicas modernas que pueden llegar a sustituir los métodos de propagación vegetativa tradicional (Lambardi *et al.*, 1993).

2.8 Factores que influyen en la propagación *in vitro*.

La propagación de plantas leñosos por cultivo de tejidos vegetales ha adquirido una importancia particular en años recientes; los factores que regulan la propagación *in vitro* han sido objeto de discusión en varios trabajos (Perez-Bermúdez y Sommer, 1987)

Para la propagación de coníferas es bien conocido que los factores importantes a tomarse en cuenta son la especie, el tipo y edad del explante, concentración de sales minerales en el medio de cultivo, sacarosa, reguladores de crecimiento y pH entre otros (Becwar *et al.* citados por Tautorius *et al.* 1991)

2.8.1 Especie.

Se ha sugerido que el uso de tejidos o de plántulas de coníferas, tienen una aplicación potencial para la regeneración *in vitro* (Bornman citados por Patel y Thorpe, 1994). Para lograr desarrollar un sistema de micropropagación en coníferas es necesario adaptar un protocolo modelo ya establecido y modificarlo, para una especie en particular. (Amerson *et al.* citados por Jang y Tainter, 1991)

En los últimos años se ha trabajado grandemente con numerosas especies de pinos y aunque las plántulas han sido regeneradas a partir de varias especies, una propagación masiva redituable ha sido establecida solamente para un número limitado (Sen *et al.* 1994).

2.8.2 Inóculo o explante.

2.9.2.1 Edad del explante.

Conforme una planta envejece, su capacidad regenerativa suele disminuir, y por eso se tiende a utilizar material procedente de plantas jóvenes en mayor proporción que de plantas adultas, especialmente en el caso de árboles y arbustos, por ejemplo, para *Pinus pinaster*, *Sequoia sempervirens*, *Vitis vinifera*, entre otras, el rejuvenecimiento se puede conseguir también por la formación de vástagos adventicios (Pierik, 1990).

2.9.2.2 Tipo de Explante.

Uno de los aspectos críticos para la propagación de coníferas es el tipo de explante (Perez-Bermúdez y Sommer, 1987); debido a que varios tejidos de la misma planta en diversos estadios de desarrollo, difieren en su respuesta cuando son cultivados *in vitro* (Tautorus, *et al.* 1991).

En la mayoría de las especies se han utilizado como explante embriones completos, cotiledones, segmentos de hipocotilo o brotes intactos. (Von Arnold y Eriksson, 1981), así como embriones cigóticos inmaduros, plántulas, megagametofitos, granos de polen, anteras y células en suspensión (Tautorus *et al.* 1991).

Con respecto a lo anterior, Ellis y Judd (1983), trabajando con cotiledones de *Pinus ponderosa* encontraron diferencias en la respuesta *in vitro*, debido a la posición del explante en el medio de cultivo; obteniendo formación de yemas solamente en aquellos explantes que se mantenían en contacto con el medio. Por su parte Sen, *et al.*

(1994) utilizaron con éxito, cotiledones maduros de *Pinus eldarica* para la inducción de brotes *in vitro*.

Así mismo diversos investigadores han utilizado como explante embriones completos para la inducción de yemas en diferentes medios de cultivo (Halos y Go, 1993.; Lambardi, *et al.* 1993.; Harry y Thorpe, 1994).

Se ha comprobado que la frecuencia de formación de brotes es menor cuando se utilizan segmentos de hipocotilo y brotes, comparados con embriones completos en *Pinus contorta* (Von Arnold y Eriksson, 1981).

Por otra parte Patel y Thorpe (1994), trabajando con hipocotilos de *Pinus contorta* obtuvieron respuesta solamente en las porciones mas cercanas a los brotes apicales, mientras que otras se hincharon acumulando sustancias fenólicas y se volvieron senescentes.

La utilización de distintos tipos de explantes, depende del objetivo que se pretenda, en muchos estudios de embriogénesis somática se ha utilizado embriones cigóticos inmaduros como fuente de explante (Chandler *et al.* 1989). Así mismo Jones *et al.* (1993) consignan que para iniciar tejido embriogénico en gimnospermas, los embriones maduros constituyen la fuente de inóculo mas adecuada. Por ejemplo, se obtuvo tejido embriogénico de *Pinus taeda* a partir de embriones cigóticos con megagametofitos intactos de 4 a 5 semanas después de la fertilización (Gupta y Durzan citados por Becwar y Wann, 1990).

Por otra parte, Egertsdotter y Von Arnold (1993) trabajando con protoplastos de *Picea abies*, observaron que presentaban habilidad para entrar a la vía embriogénica,

aunque la frecuencia de división y la formación de colonias varió significativamente dependiendo del tipo de línea celular que utilizaron.

2.8.3 Medio de Cultivo.

Es necesario combinar diversos constituyentes de los medios de cultivo para obtener las diferentes etapas en el cultivo *in vitro*.

Para la propagación *in vitro* de pináceas regularmente se han utilizado medios de cultivo en donde varía la concentración de sales inorgánicas, vitaminas, reguladores de crecimiento, tipo de agente gelificante, pH, concentración de sacarosa entre otros, (Becwar *et al.* citados por Taurus, 1991).

2.8.3.1 Efectos de las Sales Inorgánicas.

La concentración de los macronutrientes y micronutrientes en el medio de cultivo es un factor elemental para la respuesta *in vitro*.

Flinn, *et al.* (1985) al comparar el medio SH contra el MS, encontraron una diferencia significativa en el desarrollo de brotes de *Pinus strobus*; observando que los macronutrientes del medio SH favorecieron la capacidad de formación de brotes.

Por su parte, Lu *et al.* (1991) comparando 5 formulaciones de sales inorgánicas para inducción de yemas en *Picea rubens*, encontraron que tanto el tipo y la concentración del medio básico son importantes para la fase de inducción.

En otros trabajos donde se utilizaron 4 medios de cultivo para la inducción de embriones en *Pinus caribaea*, se obtuvieron en general mejores resultados con el medio de cultivo completo (100% de su concentración) (Laine y David, 1990).

2.8.3.2 Influencia de los Reguladores de crecimiento.

Definitivamente uno de los factores críticos en la composición del medio de cultivo son los reguladores de crecimiento, los que favorecen el desarrollo de estructuras a partir del explante en cultivo. Generalmente, tanto las auxinas como las citocininas son necesarios para el cultivo *in vitro* de coníferas (Atree y Fowke, 1991).

Patel y Thorpe (1994), probaron varios niveles de BAP sobre el crecimiento y desarrollo de brotes en *Pinus contorta*; obteniendo formación de brotes en las puntas de los cotiledones cuando se utilizaron concentraciones bajas de BAP (10^{-7} M), mientras que a concentraciones de 10^{-4} M mostraron un crecimiento achaparrado, incluso después de transferirlos a un medio sin BAP. Por otra parte, utilizando 10^{-5} M de BAP se logró la presencia de primordios de brotes.

Chesick *et al.* (1991), trabajaron con 6 niveles de BA (0, 1, 5, 10, 20 y 50 μ M), para inducción de yemas y alargamiento de brotes en *Pinus strobus*. Encontraron que ningún embrión sobrevivió a los 5 meses sin BA; sin embargo el promedio mas alto para la producción de brotes se observó al nivel de 5 μ M y que los promedios tendieron a disminuir con el incremento de concentraciones de BA, llegando incluso a presentarse un efecto perjudicial significativo a la concentración de 50 μ M.

Por otra parte, Halos y Go. (1993), probaron niveles de BA a concentraciones de 8.9, 22.2, 44.4 y 67.7 μ M para inducción y desarrollo de brotes en *Pinus caribaea*. El

número promedio de brotes por explante que sobrevivió, permaneció igual para todos los tratamientos de BA (9 brotes/embrión a 8.9, 22.2 y 44.4 μM BA y 10 brotes/embrión a 67.7 μM BA). Sin embargo el alargamiento de brotes fue inhibido a 44.4 y 67.7 μM de BA.

En experimentos preliminares con *Pinus halepensis* fue estudiada la influencia de diferentes citocininas como BA, Cinetina, 2ip y Zeatina sobre inducción de yemas adventicias. Todas las citocininas fueron aplicadas a concentraciones de (1.0, 2.5, 5.0 y 10 μM). La mejor citocinina resultó ser BA, la cual fue probada por varios periodos (7, 14, 21, 28 y 35 días) y posteriormente los explantes fueron subcultivado a un medio sin reguladores (Lambardi *et al.* 1993).

Por otro lado, Sen *et al.* (1994), utilizaron 3 citocininas (Cinetina, 2ip y BA) y 4 concentraciones (11, 22, 44 y 66 μM) con la finalidad de determinar el rango óptimo para inducción de yemas en *Pinus eldarica*. En general las concentraciones por arriba de 40 μM resultaron perjudiciales para la producción de brotes; la concentración de 22 μM fue suficiente para producir una respuesta máxima. La mas efectiva de las 3 citocininas probadas fue BA.

Comúnmente el tiempo de exposición de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo está relacionado con la respuesta de los explantes, ya que se conoce que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas. Se considera que la presencia de citocininas es un requerimiento indispensable desde los primeros días del cultivo (Villalobos *et al.*, 1985).

Por ejemplo, en *Pinus contorta* se estudió la diferenciación de primordios y desarrollo de yemas a partir de embriones, los cuales estuvieron influenciados

fuertemente por el tiempo de exposición al BAP. Cuando los embriones eran cultivados por 1 día sobre medio conteniendo BAP y después transferido a un medio sin éstas por 30 días, crecieron como plántulas normales. La exposición al BAP por 2 días causó inhibición del alargamiento de raíces, hipocotilos y cotiledones y no formaron yemas adventicias los cotiledones ni hipocotilos. Con 3 días de exposición al BAP, mostraron una hinchazón considerable y una inhibición significativa del crecimiento de raíz. Los embriones cultivados por 4, 5, y 6 días con BAP mostraron inhibición completa en raíz e hinchazón en hipocotilos y cotiledones. La exposición de 1 semana al BAP resultó en el crecimiento de algunos brotes sobre los explantes. Sin embargo el número de brotes por embrión fue menor de aquellos que se cultivaron por 2 o 3 semanas con BAP. Por último los embriones cultivados por 4 a 7 semanas en presencia de BAP, presentaron formación de callo (Patel y Thorpe, 1994).

Halos y Go (1993), evaluaron la inducción y desarrollo de brotes en *Pinus caribaea*, adicionando al medio de cultivo diferentes concentraciones de BA (8.9, 22.2, 44.4 y 67.7 μM). Se colocaron por 1, 2 y 3 semanas y posteriormente los embriones fueron transferidos a medio MS completo o a la mitad de su concentración. Encontraron una fuerte interacción entre el tiempo de exposición y la concentración de BA. En general, se observó un efecto perjudicial al incrementarse el tiempo de exposición.

2.8.3.3 Efecto de la sacarosa en el medio de cultivo.

La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada y se emplea a una concentración de 2 a 3% ; sin embargo en ciertas especies se emplean concentraciones muy elevadas 5 a 12% (Merino, 1988).

En la mayoría de los trabajos de coníferas se ha utilizado la sacarosa a concentraciones de 2 a 3%. Por ejemplo, Lambardi *et al.* (1993), utilizaron 3 concentraciones de sacarosa (2, 3 y 4%) en 3 medios de cultivo para la propagación de brotes en *Pinus halepensis*. Sin embargo, en otras especies de pinos las concentraciones óptimas de sacarosa varían entre 0.5 y 2% (Mohammed y Vidaver, citado por Halos y Go, 1993).

2.9 El Cultivo de Tejidos Vegetales en Coníferas.

Las técnicas de cultivos de tejidos vegetales pueden ser muy útiles para la rápida propagación clonal de genotipos superiores en un período mas corto (Chesick, 1991). Por lo tanto, representan una alternativa para los problemas forestales, puesto que la propagación *in vitro* puede contribuir en gran medida a la domesticación y propagación masiva de especies de importancia económica y ecológica, así como la propagación clonal de árboles élite; (Go, Perez-Orozco y Halos, 1993).

Estudios previos en diversas especies han demostrado que es factible la clonación de genotipos resistentes a enfermedades, con alta producción de semilla y adaptación a condiciones adversas o con altas tasas de crecimiento por medio de organogénesis y/o embriogénesis somática. (Durzan, citado por Flinn *et al.* 1985).

2.9.1 Micropropagación.

La micropropagación es un proceso que consiste en producir plantas a partir de tejidos o células asépticamente (Hartmann y Kester, 1987).

Actualmente la micropropagación es una de las técnicas que se aplica con éxito en la multiplicación masiva de cultivos hortícolas, ornamentales, frutales y mas recientemente en la propagación de especies perennes; aunque el proceso es mas lento, debido a que los tejidos y órganos mas diferenciados son poco sensibles a las condiciones *in vitro* (Magallanes, 1993).

La organogénesis y embriogénesis somática constituyen los 2 sistemas de propagación *in vitro* mas utilizados en coníferas (Lambardi, *et al* 1993).

2.9.1.1 Organogénesis.

Para propósitos de propagación clonal, el proceso de organogénesis es el mas utilizado, el cual comprende el desarrollo de yemas o de meristemos radicales a partir de los explantes directamente o a partir de callos (Roca y Mroginski, 1991).

En coníferas se ha consignado la estimulación exitosa de yemas adventicias *in vitro* por medio de organogénesis (Von Arnold y Eriksson, 1981; Flinn, *et al.* 1985).

2.9.1.1.1 Etapas en el proceso de Organogénesis en Coníferas.

En coníferas se ha observado que se presentan ciertos patrones de iniciación de yemas sobre los explantes (Patel y Thorpe, 1994). Generalmente la regeneración involucra 4 etapas de desarrollo, en las que cada uno requiere un manejo por separado (Von Arnold y Eriksson, 1981; Gladfeldter y Phillips, 1987).

La ruta organogénica para la regeneración de coníferas involucra las siguientes fases:

- a) Inducción y desarrollo de yemas adventicias
- b) Alargamiento de yemas
- c) Multiplicación de brotes
- d) Enraizamiento

(Lambardi *et al.* 1993; Harry y Thorpe, 1994)

a) Inducción y desarrollo de yemas

Se ha observado que la formación de brotes puede ser inconsistente, por lo tanto, es necesario determinar los parámetros de cultivo que lleven a la formación de brotes adventicios *in vitro* (Von Arnold y Eriksson 1981; Flinn *et al.* 1985).

Diversos investigadores han estudiado los diferentes factores que pueden afectar la inducción y desarrollo de yemas adventicias, por ejemplo Pérez Bermúdez y Sommer (1987), observaron que los embriones de *Pinus elliottii* sobre medio sólido conteniendo citocinina, respondieron a partir de la primera semana. La proliferación celular se inició a partir de los cotiledones y algunas veces de la porción del hipocotilo que estaba en contacto con el medio. Después de 4-5 semanas se observó el desarrollo de yemas a partir de los embriones.

Después de la inducción de yemas es necesario transferir el explante a un medio sin hormonas para permitir el desarrollo posterior de los primordios y favorecer la formación de brotes adventicios (Harry y Thorpe, 1994).

b) Alargamiento de yemas.

Para esta fase de la organogénesis, los explantes se mantienen en un medio sin reguladores de crecimiento. Generalmente las yemas adventicias formadas son separadas del explante original ya que el crecimiento de los brotes aislados puede ser estimulado por la dilución del medio básico (Von Arnold y Eriksson, 1981; Jang y Tainter, 1991); adición de carbón activado (Patel y Thorpe, 1994; Harry y Thorpe, 1994; Sen *et al.* 1994); por la concentración de sacarosa y concentración de agar (Lu *et al.* 1991).

c) Multiplicación de brotes.

Una vez concluida la fase de alargamiento de yemas, los brotes son subcultivados sobre medios de cultivo que pueden ser adicionados con reguladores de crecimiento como BA y zeatina para probar su habilidad para producir brotes axilares (Lambardi *et al.* 1993).

d) Enraizamiento

Aunque la producción de yemas adventicias *in vitro* ha sido exitosa, con frecuencia existe dificultad en el enraizamiento de brotes; aunque algunas veces los brotes adventicios pueden formar raíces espontáneamente, el enraizamiento es mayormente estimulado con la adición de IBA al medio, (Von Arnold y Eriksson, 1981). Así mismo los brotes obtenidos por organogénesis pueden ser tratados con una variedad de reguladores de crecimiento incluyendo IAA, NAA y BAP, (Mott y Amerson, 1981).

Generalmente los brotes que alcanzan entre 15 y 30 mm son sometidos a un tratamiento de pulso con ácido indolbutírico a 1 μM y 10 μM de NAA, (Harry y Thorpe, 1994).

2.9.1.2 Embriogénesis Somática.

2.9.1.2.1 Origen e importancia de la embriogénesis somática.

Embriogénesis Somática: proceso de formación del embrión a partir de células somáticas. Este es un proceso análogo a la embriogénesis cigótica donde una sola célula o un pequeño grupo de células vegetativas son las precursoras del embrión (Ammirato, 1983). A diferencia de la organogénesis, la embriogénesis somática puede recapitular eventos en la embriogénesis cigótica con la producción de embriones que presentan ápices de brotes y raíz (bipolares), (Tautorus, *et al.* 1991).

El primer evento que marcó una época en embriogénesis somática fue el publicado por Steward *et al.* y Reinert en 1958. Sin embargo en los siguientes 29 años se realizó un progreso muy pequeño para el entendimiento de los mecanismos, debido a que se presentaban en frecuencias muy bajas y poca sincronización (Komamine *et al.* 1992).

Esta técnica ha probado ser exitosa para cereales y pastos, los que anteriormente habían mostrado ser recalcitrantes a la manipulación *in vitro*. Así mismo tiene un gran potencial para la rápida propagación de árboles forestales, (Vasil, 1988).

En años recientes la embriogénesis somática ha recibido una mayor atención debido a que puede proveer sistemas útiles para producir plantas clonadas, así como para

la obtención de semillas artificiales (Komamine *et al.*, 1992). Por otro lado, los embriones somáticos pueden ser útiles para el almacenamiento de germoplasma a largo plazo (Tautorus *et al.*, 1991)

2.9.1.2.2 Etapas en el proceso de embriogénesis somática

Se han llevado a cabo esfuerzos considerables en la investigación de embriogénesis somática de coníferas. Durzan y Steward desde 1968, trabajando con *Pinus banksiana* consignan estructuras parecidas al suspensor celular; sin embargo no observaron un desarrollo posterior a embriones o plantas. Lo anterior puede atribuirse a que los estímulos y condiciones necesarias para la inducción y control de la embriogénesis somática, varían en cada etapa según la especie.

Los cultivos embriogénicos de coníferas contienen embriones inmaduros equivalentes a los estadios iniciales de desarrollo de embriones cigóticos (Atree y Fowke, 1991). La embriogénesis somática involucra una recapitulación de muchos de los eventos de desarrollo de la embriogénesis normal (Atree y Fowke, 1993).

Observaciones morfológicas detalladas revelaron 4 fases en el proceso de embriogénesis somática (Fujimura y Komamine, citados por Komamine *et al.*, 1992)

Newton *et al.* (1994), coinciden en señalar las siguientes fases para la regeneración por embriogénesis somática.

- a) Inducción de tejido embriogénico
- b) Proliferación del cultivo embriogénico
- c) Maduración del embrión somático
- d) Germinación del embrión somático

a) Los cultivos embriogénicos de coníferas se han iniciado principalmente de tejidos embrionarios. Estos tejidos incluyen embriones cigóticos inmaduros disectados de semillas colectadas durante la época de crecimiento, o bien embriones cigóticos maduros disectados de semillas almacenadas (Atree y Fowke, 1991). Para especies de pinos se considera que los embriones cigóticos en etapa precotiledonar constituyen un buen explante de desarrollo para la iniciación de tejido embriogénico; en especies de *Picea* es el embrión cigótico inmaduro postcotiledonar (Hakman y Von Arnold, 1988).

La iniciación de embriogénesis somática en especies de pinos es muy dependiente del genotipo (Becwar y Wann, 1990).

En otras especies de pinos, el tejido embriogénico también se ha producido a partir de megagametofitos los cuales contienen embriones cigóticos, (Taurus *et al*, 1990).

Para la mayoría de las especies tanto el explante como el estadio de desarrollo son factores críticos para la inducción de tejido embriogénico. Aunque los embriones cigóticos maduros se consideran menos exitosos, algunas especies de coníferas han producido tejido embriogénico; este es el caso de *Picea rubens* en el que se formó tejido embriogénico principalmente de la región del hipocotilo. Los paquetes celulares embriogénicos en el estadio de desarrollo de embrión filamentosos fueron típicos a aquellos descritos para otras coníferas; fueron blancos, translúcidos, mucilaginosos y consistían de células vacuoladas largas distinguiéndose de células meristemáticas más pequeñas y densas (Harry y Thorpe, 1991).

Por su parte Newton *et al* (1994)., trabajando con *Pinus elliottii*, utilizaron embriones cigóticos inmaduros en un medio DCR adicionado con 2, 4-D y BA,

obtuvieron desarrollo de tejido embriogénico, translúcido y blanco con embriones somáticos del estadio 1. El mejor estadio para la inducción fue cuando se había llevado a cabo la fertilización, pero los cotiledones no se habían formado.

La observación microscópica del tejido también ha revelado la presencia de pequeños conglomerados densos de células altamente citoplasmáticas (masas proembrionicas) con células disgregadas parecidas al suspensor (Becwar y Wann, 1990).

b) El tejido embriogénico es transferido a medios de proliferación (Tautorus *et al*, 1991). La variación en el potencial de desarrollo de embriones somáticos se presentan tanto entre cultivos embriogénicos como entre las formulaciones de los medios probados. (Becwar y Wann, 1990). Los embriones somáticos de coníferas mantenidos en un medio que contenga auxina y citocinina continúan proliferando, pero no maduran (Atree y Fowke, 1991). En esta etapa se observan estructuras globulares opacas y prominentes.

c) Los embriones somáticos deben ser transferidos a diferentes condiciones de reguladores de crecimiento para maduración. Los métodos para inducir maduración de embriones son variables y puede esperarse que diferentes especies e incluso genotipos dentro de una misma especie muestren diferentes respuestas para formar plántulas (Atree y Fowke, 1991).

Con respecto a lo anterior, Harry y Thorpe (1991), trabajando con un medio que contenía ABA, observaron que la actividad meristemática en la masa embrionaria dio lugar a estructuras nodulares; las que eventualmente formaron embriones somáticos maduros. El ABA fue necesario para el desarrollo de estructuras bipolares.

Un factor crítico en la maduración de embriones somáticos parece ser la selección de un tejido apropiado al tratamiento de ABA; puesto que algunos tejidos no presentaron respuesta a éste. Esta respuesta negativa puede estar relacionada al tamaño de la cabeza del embrión somático; así como por la ausencia de sincronía de desarrollo en los tejidos. (Newton *et al*, 1994).

El requerimiento de ABA puede ser variable; algunas líneas necesitan ABA para la maduración de proembriones, mientras que otras lo requieren para lograr la producción de embriones. (Laine y David, 1990).

d) La selección de embriones vigorosos es crítica para la germinación y formación de plántulas. Cuando los embriones son morfológicamente similares a los embriones cigóticos, son removidos para la germinación (Harry y Thorpe, 1991).

Aunque el éxito de embriogénesis somática en algunas especies muestran bajas frecuencias, es necesario transferir esos éxitos a otros géneros como los pinos en los cuales actualmente todavía se muestran bajas frecuencias de inducción y germinación (Atree y Fowke, 1991).

3. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. (F.A.U.A.N.L) de Febrero de 1994 a Agosto de 1995.

Este trabajo fue financiado por la Facultad de Agronomía (Centro de Investigaciones Agropecuarias y la SDEP-FAUANL).

3.1 Metodología para Organogénesis

3.1.1 Desinfección del material vegetal.

La asepsia de los inóculos utilizados es imprescindible para el éxito en cultivo de tejidos vegetales ya que la mayoría de las especies presentan contaminantes superficiales o incluso patógenos endógenos por lo que, de no eliminarse, provocan la pérdida total de los explantes.

Por lo expuesto anteriormente y con el objeto de eliminar los contaminantes superficiales, se procedió a lo siguiente.

3.1.2 Predesinfección de la semilla.

Semillas intactas de cada una de las especies se sometieron a un proceso de predesinfección, se utilizó hipoclorito de sodio comercial (NaOCl) al 6% de ingrediente activo (Cloralex)^{MR} adicionado con 2 g de detergente comercial. En esta solución las

semillas permanecieron 5 min; después las semillas fueron cepilladas y posteriormente enjuagadas con agua de la llave por 5 min.

Se seleccionaron únicamente semillas que presentaban dimensiones uniformes siendo en promedio de 1.5 cm para *Pinus cembroides* y de 0.5 cm para *Pinus halepensis*, eliminándose las cubiertas de las semillas.

3.1.3 Desinfección de la Semilla.

El proceso de desinfección se llevó a cabo bajo una campana de flujo laminar (Alder)^{MR} las semillas eran colocadas por 45 minutos en una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de 12.5 volúmenes. Con el propósito de eliminar el exceso de agente desinfectante, el material fue sometido a tres enjuagues con agua bidestilada esterilizada.

Posteriormente las semillas se transfirieron a etanol al 70 % durante 1 min; realizándose un enjuague con agua esterilizada por 5 min.

Finalmente se sumergieron las semillas durante 5 min. en una solución al 15% (v/v) de hipoclorito de sodio comercial (6 % de ingrediente activo); adicionando con 0.5 ml. de polioxietileno sorbitan monolaurato (Tween-20) seguido de 3 enjuagues por 5 min con agua esterilizada.

3.1.4 Medios de Cultivo.

Los medios de cultivo utilizados fueron DCR (Gupta y Durzan, 1985) y GD (Gresshoff y Doy, 1972).

A continuación se enlistan los componentes inorgánicos de ambos medios de cultivo para 1000 ml de medio.

Cuadro 1. Componentes inorgánicos de los medios DCR y GD.

Nutrientes (mg l ⁻¹)	Medio DCR	Medio GD
NH ₄ NO ₃	400.00	0.00
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.00	200.00
KNO ₃	340.00	1000.00
MgSO ₄ 7H ₂ O	370.00	250.00
KH ₂ PO ₄	170.00	0.00
CaCl ₂ 2H ₂ O	85.00	150.00
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	556.00	0.00
NaHPO ₄ 7H ₂ O	0.00	300.00
NaHPO ₄ H ₂ O	0.00	56.30
KI	0.83	0.75
KCl	0.00	90.00
H ₃ BO ₃	6.20	3.00
MnSO ₄ H ₂ O	22.30	10.00
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.60	3.00
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.25	0.25
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	0.25
NiCl ₂ 6H ₂ O	0.0025	0.00
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.80	27.80
Na EDTA	37.30	37.00

Los componentes inorgánicos anteriormente señalados constituyen los medios de cultivo básicos. Sin embargo en un medio de cultivo es indispensable la adición de componentes orgánicos; en el cuadro 2 se enlistan los componentes orgánicos utilizados en el experimento.

Cuadro 2. Componentes orgánicos adicionados a los medios DCR y GD.

Vitaminas mg l^{-1}	DCR	GD
Tiamina- HCl	1.0	1.0
Glicina	2.0	0.0
Piridoxina-HCl	5.0	0.1
Glutamina	50.0	0.0
Ac. nicotínico	5.0	0.1
Inositol	200.0	10.0
Caseína hidrolizada	500.0	0.0
BAP	0.3	0.3
NAA	0.01	0.01

Para la adición de los reguladores de crecimiento se optó por preparar soluciones concentradas (20 mg / 100 ml de BAP y 10 mg / 200 ml; de NAA).

En cada etapa, los medios de cultivo fueron adicionados con los componentes originales, según la fase de organogénesis.

Se ajustó el pH a 5.7 con un potenciómetro Corning pH 103 ^{MR}, una vez calibrado el pH, el medio se aforó a 1000 ml y posteriormente se agregó 0.5% de agar-gel (5g l^{-1}) pasándose a fundir en horno microondas por 5 a 7 minutos. Los medios de cultivo se vaciaron en frascos de vidrio de alimento infantil, vertiendo 25 ml por unidad y usando tapas plásticas. Todos los medios de cultivo se esterilizaron a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 1 atm de presión por 15 min.

Para el caso del medio DCR se adiciono glutamina, ésta se agregó mediante filtros mullipore una vez que el medio de cultivo fue esterilizado. Este procedimiento se realizó bajo la campana de flujo laminar.

3.1.5 Explante o Inóculo.

Se procedió a utilizar embriones maduros como fuente de inóculo, de los cuales se disectaron los cotiledones y se sembraron en los medios de cultivo en forma horizontal con el propósito de que cada uno de los cotiledones estuviera en contacto con el medio de cultivo.

3.1.6 Condiciones del Cultivo *in vitro*.

Las unidades experimentales fueron colocadas en un cuarto de incubación, con un fotoperíodo de 16 h. luz e intensidad 2000 lux; con una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, la cual se logró proporcionar con el auxilio de un aparato de clima artificial. En estas condiciones permanecieron 4 ó 6 semanas para la etapa de la inducción.

3.1.7 Modelo Estadístico.

El modelo estadístico utilizado para este experimento fue un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2^3 ; donde el factor A son las especies, el factor B son los medios de cultivo y el factor C el tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento, con 6 repeticiones, dando un total de 8 tratamientos.

Cuadro 3. Tratamientos de Organogénesis.

Tratamiento	Especie.	Medio	Tiempo en semanas
1	C	DCR	6
2	C	DCR	4
3	C	GD	6
4	C	GD	4
5	H	DCR	6
6	H	DCR	4
7	H	GD	6
8	H	GD	4

3.1.8 Inducción y desarrollo de yemas adventicias.

Para esta etapa de organogénesis se utilizaron como fuente de inóculo, cotiledones disectados de embriones maduros, los cuales fueron sembrados en los medios de cultivo DCR (Gupta y Durzan, 1985) y GD (Gresshoff y Doy, 1972); adicionados con 0.3 mg l^{-1} de BAP y 0.01 mg l^{-1} de NAA.

En estas condiciones, los explantes permanecieron por 4 ó 6 semanas en un cuarto de incubación a una temperatura $26 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, y un fotoperiodo de 16 horas luz e intensidad de 2000 Lux.

Concluída la etapa de inducción y desarrollo de yemas adventicias, se procedió a evaluar el número de cotiledones que respondieron a los tratamientos; esto es aquellos cotiledones que presentaban visiblemente estructuras nodulares sobre la superficie.

3.1.9 Alargamiento de Yemas.

Para esta etapa, los cotiledones que presentaron primordios de yemas fueron transferidos a los medios DCR y GD pero sin reguladores de crecimiento con el propósito de acelerar el alargamiento. En estas condiciones de cultivo los explantes permanecieron por 6 semanas, donde se procedió a evaluar el número de cotiledones que presentaron brotes; donde se observaran al menos dos primordios foliares bien desarrollados.

3.1.10 Formación de Brotes

Una vez concluida la etapa de alargamiento de yemas, los explantes se transfirieron a los medios de cultivo DCR y GD sin reguladores de crecimiento, adicionados con 0.1 % de carbón activado. En estas condiciones permanecieron por 8 semanas; y se procedió a evaluar las variables siguientes: número de brotes por cotiledón, número de brotes por embrión y número de brotes mayores a 5 mm.

3.1.11 Enraizamiento.

En esta fase, se procedió a separar los brotes, tomándose en consideración únicamente aquéllos que midieran 5 mm o mas. Posteriormente se siguió la metodología citada por Harry y Thorpe (1994), en la que los brotes fueron colocados por 2.5 h en una solución saturada con 1.75 mg NAA y 0.20 mg de IBA estandarizada a un pH de 4.5; posteriormente se sembraron en los medios DCR y GD sin reguladores de crecimiento y con 0.1% de carbón activado. En estas condiciones permanecieron por 8 semanas, en el cuarto de incubación con las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo de las etapas anteriormente mencionadas.

3.2 Metodología para Embriogénesis Somática.

3.2.1 Material Biológico.

Con el propósito de obtener embriones inmaduros en diversas etapas, fueron colectados cada semana conos verdes de *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis* a partir del 30 de junio al 6 de agosto de 1994. Las colectas se realizaron en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, localizada en Buenavista, Saltillo Coah.

Los conos se mantuvieron en bolsas de papel y en una hielera desde el momento de la colecta hasta ser utilizados.

3.2.2 Predesinfección de los Conos.

Para su almacenamiento en el laboratorio, los conos se lavaron con detergente y agua corriente, auxiliándose con un cepillo de cerdas; después se enjuagaron con agua bidestilada y fueron rociados con etanol al 70% (v/v) pasándose a bolsas de papel rociadas también con etanol. En seguida fueron almacenados a una temperatura de 5 °C hasta el momento de la siembra.

3.2.3 Obtención de la Semilla.

Previa a la extracción de las semillas los conos se lavaron con detergente enjuagándose con agua bidestilada y se cortaron longitudinalmente para extraer las semillas.

3.2.4 Desinfección de la Semilla.

Para lograr la desinfección de la semilla se utilizó el siguiente protocolo:

1- Las semillas fueron colocadas en etanol al 100% por 2 min seguido por un enjuague con agua esterilizada.

2- Posteriormente permanecieron por 30 min en una solución de hipoclorito de sodio comercial a 25% (v/v) (NaOCl) adicionado con 0.5 ml de polioxietileno sorbitan monalaurato (Tween-20). Transcurrido el tiempo se realizaron 3 enjuagues con agua bidestilada esterilizada, con el propósito de eliminar los residuos del agente desinfectante, esto fue realizado bajo la campana de flujo laminar (Alder)^{MR}.

3.2.5 Medio de Cultivo.

Los medios de cultivo que se utilizaron en esta técnica son los mismos que en la organogénesis; los medios utilizados para la etapa de inducción de tejido embriogénico fueron adicionados con 3.0 mg l^{-1} de 2,4-D y 0.5 mg l^{-1} de BAP. Posteriormente para la etapa de proliferación, los medios fueron complementados con 0.4 mg l^{-1} de 2,4-D y 0.2 mg l^{-1} de BAP. Por último para la maduración se adicionaron con 0.2 mg l^{-1} BAP y 2.6 mg l^{-1} de ABA; este último aplicado por ultrafiltración.

3.2.6. Modelo Estadístico.

El modelo estadístico utilizado para este experimento fue un diseño completamente al azar, en donde se evaluaron las especies y los medios de cultivo; consistiendo de 6 repeticiones por tratamiento; (cuadro 4).

Cuadro 4. Tratamientos de Embriogénesis Somática.

Tratamiento	Especie	Medio
1	<i>Pinus cembroides</i>	DCR
2	<i>Pinus cembroides</i>	GD
3	<i>Pinus halepensis</i>	DCR
4	<i>Pinus halepensis</i>	GD

3.2.7. Explante o Inóculo.

Realizada la desinfección, las semillas se colocaron en una caja petri esterilizada eliminándose las cubiertas de las semillas, auxiliándose para ello con unas pinzas; procediéndose a extraer los megagametofitos los cuales fueron colocados en los mismos medios de cultivo mencionados anteriormente, adicionados con 3.0 mg l^{-1} de 2,4-D y 0.5 mg l^{-1} de BAP, para la primera etapa del cultivo.

Concluida la siembra, los recipientes fueron colocados en el cuarto de incubación, en condiciones de obscuridad a temperatura de $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.8 Inducción de Embriogénesis Somática.

Los megagametofitos permanecieron en el cuarto de incubación por 8 semanas para esta primera etapa y cada 4 semanas se transferían a medio nuevo. La variable evaluada en esta fase fue inducción o no de tejido embriogénico. Con el objeto de determinar la inducción de tejido embriogénico se procedió a practicar la técnica del acetocarmín, la cual consistió en someter por 30 seg la muestra del tejido a una solución de acetocarmín al 2% (2 g de carmín + 40 ml de ácido acético aforado a 100 ml con

agua destilada). Por último la muestra se colocó en un portaobjetos y se observó al microscopio óptico, donde se clasificó el tejido embriogénico del no embriogénico.

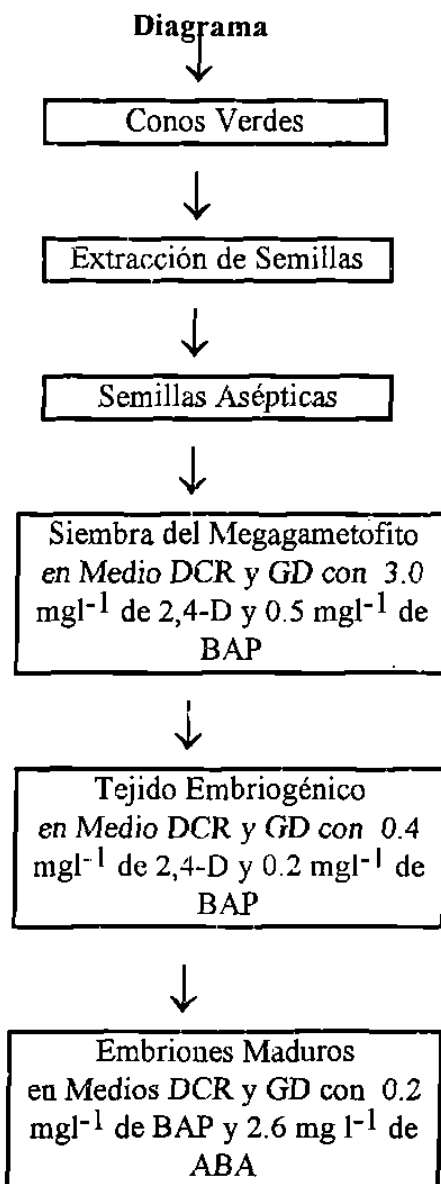
3.2.9 Proliferación.

En esta etapa los explantes fueron transferidos a los mismos medios DCR y GD adicionados con 0.4 mg l^{-1} de 2,4-D y 0.5 mg l^{-1} de BAP; en estos medios permanecieron por 8 semanas y cada 4 semanas se transferían a medios nuevos con el propósito de incrementar el tejido embriogénico.

3.2.10 Maduración.

Se transfirieron a medios adicionados con 0.2 mg l^{-1} de BAP y 2.6 mg l^{-1} de ABA. La transferencia se realizó cada 4 semanas, permaneciendo en estas condiciones 16 semanas en las mismas condiciones de obscuridad en el cuarto de incubación, con el propósito de formación de embriones maduros.

A continuación se presenta de manera esquemática la metodología seguida para la técnica de embriogénesis somática.



Presentación esquemática de la secuencia de la técnica de embriogénesis somática a partir de megagametofitos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Variables Evaluadas en Organogénesis

A continuación se presentan los resultados obtenidos para las variables en estudio, referente a la técnica de organogénesis, los valores fueron transformados calculando la raíz cuadrada para la utilización de los análisis de varianza y asegurar una distribución normal (Snedecor y Cochran, 1971).

Los cotiledones iniciaron los cambios desde la primera semana en cultivo; cambiando su tonalidad de un color crema inicial a una coloración verde con pigmentación púrpura. Sin embargo, no fue sino hasta las 4 semanas de iniciado el cultivo *in vitro*, cuando se hizo evidente la formación de estructuras nodulares parecidas a callo y con presencia de primordios de yemas. La respuesta morfogénica de los explantes en los tratamientos, es similar a lo reportado por diversos investigadores (Patel y Thorpe, 1994; Harry y Thorpe, 1994; Sen *et al*; 1994).

4.1.1 Inducción de Callos y Primordios de Yemas

En el Cuadro 5 se presentan los resultados del análisis de varianza para número de cotiledones con formación de callo y primordios de yemas, obtenidos mediante la técnica de organogénesis en *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis*.

Cuadro 5 Análisis de varianza para número de cotiledones con formación de callo y primordios de yemas, obtenidos mediante la técnica de organogénesis en *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis*.

FV	Gl	CM
Especie (E)	1	1.594*
Medio (M)	1	0.008
Tiempo de Exposición (T)	1	2.129*
ExM	1	0.001
ExT	1	3.140*
MxT	1	0.005
ExMxT	1	0.023
Error	40	0.391
Total	47	0.479

*Significativo ($P < 0.05$); CV = 30.207

Como puede apreciarse, se presentó diferencia significativa entre especies; la comparación de medias mostró que, *Pinus cembroides* tuvo mayor capacidad de respuesta comparado con *Pinus halepensis* para la variable en cuestión (Cuadro 6).

Cuadro 6 Comparación de medias de *Pinus Cembroides* y *Pinus halepensis* en la variable número de cotiledones que formaron callo y primordios de yemas.

Especie	Media
<i>Pinus cembroides</i>	5.06 a
<i>Pinus halepensis</i>	3.57 b

a,b medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Lo anterior confirma lo señalado por Minocha (1980) quien menciona que existen diferencias en los requerimientos para la producción de callo y brotes en diversas especies de pinos; lo cual es atribuido a una serie de factores fisiológicos y morfológicos de la especie así como a otros factores externos del establecimiento *in vitro* (Reilly y Aitken, 1981; Ellis y Judd, 1983; Martínez-Pulido *et al.* 1992).

Como puede observarse en el Cuadro 5, también existe diferencia significativa para el tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento.

La comparación de medias muestra que los cotiledones expuestos por 4 semanas a los reguladores de crecimiento, respondieron favorablemente comparados con los expuestos a 6 semanas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación de medias para tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento en la variable número de cotiledones que formaron callo y primordios de yemas.

Tiempo de exposición	Media
4 semanas	5.19 a
6 semanas	3.45 b

a, b medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Al respecto, Halos y Go (1993) consideraron que la diferencia en la respuesta puede ser atribuída a una asimilación continua del BAP por los tejidos, con lo que se alcanzaría un nivel tóxico; lo anterior podría explicar la disminución significativa en cuanto a la formación de callo y primordios, al incrementarse el tiempo de exposición; Sin embargo, los resultados difieren con lo señalado con Flinn *et al.* (1985), quienes

obtuvieron un incremento en la formación de callo en *Pinus strobus* al prolongarse por 8 semanas la exposición al BAP.

Por otro lado se encontró una interacción significativa ($P = 0.007$) entre especies y tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento, lo que indica que el efecto de tiempo de exposición es diferente en las dos especies. En *Pinus cembroides* se presentó que al incrementarse el tiempo de exposición, el número de callos y primordios de yemas disminuyó; mientras que para *Pinus halepensis* al incrementar el tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento el número de callos y primordios de yemas se mantuvo igual..

Cuadro 8 Comparación de medias para la interacción Tiempo-Especie en la variable número de cotiledones que formaron callo y primordios de yemas.

Tiempo-Especie	<i>Pinus cembroides</i>	<i>Pinus halepensis</i>
4 semanas	7.39a.	3.38 a
6 semanas	3.16 b	3.72 a

a,b medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Posteriormente se procedió a realizar la comparación de medias por la diferencia mínima significativa (DMS) con la finalidad de determinar que especie desarrolla mayor número de callos y primordios de yemas con respecto al tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento; encontrando un $DMS = 0.51$, determinando que *Pinus cembroides* resultó con diferencia significativa a las 4 semanas, comparada ésta con *Pinus halepensis* en el mismo tiempo de exposición, utilizando un $\alpha = 0.05$

4.1.2 Número de Cotiledones que Formaron Brotes.

Una vez que los explantes fueron transferidos a los medios de cultivo de la etapa de proliferación, parte de los cotiledones empezaron a desarrollarse rápidamente, mientras que algunos se necrosaron. En esta variable se presentó diferencia significativa para los factores especie y tiempo de exposición, así como para la interacción especie-tiempo (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de varianza para la variable cotiledones con formación de brotes, obtenidos mediante la técnica de organogénesis en *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis*.

FV	GI	CM
Especie (E)	1	1.979*
Medio (M)	1	1.189
Tiempo de Exposición (T)	1	1.657*
ExM	1	0.031
ExT	1	2.329*
MxT	1	0.034
ExMxT	1	0.003
Error	40	0.445
Total	47	0.533

* Significativo ($P < 0.05$) ; CV = 46.649.

Al realizar la comparación de medias, se observó una mayor respuesta en *Pinus cembroides* que en *Pinus halepensis* en cuanto a la capacidad de formar brotes (Cuadro 10); aunque Jang y Tainter (1991) mencionan que su sistema de micropropagación es un modelo apropiado para demostrar que un solo protocolo puede ser adecuado para varias especies de pinos; los resultados de este trabajo sugieren que es indispensable llevar a

cabo ciertas modificaciones dependiendo de la especie para lograr una máxima eficiencia en la regeneración *in vitro*. Por ejemplo, se ha observado que tejidos idénticos de *Pinus ponderosa* (cotiledones de un mismo embrión) responden de manera diferente al cultivo de acuerdo a su posición en un medio adicionado con BAP (Ellis y Judd, 1987).

Cuadro 10. Comparación de medias para *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis* en la variable cotiledones con formación de brotes.

Especie	Media
<i>Pinus cembroides</i>	2.65 a
<i>Pinus halepensis</i>	1.51 b

a,b medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Así mismo se presentó diferencia significativa para el factor tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento, donde se muestra claramente que a las 4 semanas existió una mayor respuesta que a las 6 semanas (Cuadro 11).

Cuadro 11 Comparación de medias con respecto al tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento en la variable número de cotiledones que formaron brotes.

Tiempo	Media
4 semanas	2.59 a
6 semanas	1.53 b

a, b medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Estos resultados son similares a los mencionados por Patel y Thorpe (1994) quienes trabajando con *Pinus contorta* estudiaron la influencia del BAP con respecto al tiempo de exposición, encontrando que conforme aumentaba éste, la diferenciación de yemas se vió negativamente influenciada.

En la interacción especie-tiempo se encontró diferencia significativa lo cual indica que la respuesta al tiempo de exposición, es diferente en las dos especies. En *Pinus cembroides* se observa que al incrementarse el tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento, la respuesta disminuyó, mientras que en *Pinus halepensis* al incrementarse el tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento, no existió diferencia significativa en el número de cotiledones que respondieron favorablemente.

Cuadro 12 Comparación de medias de la interacción especie-tiempo en la variable número de cotiledones que formaron brotes.

Especie-Tiempo	<i>Pinus cembroides</i>	<i>Pinus halepensis</i>
4 semanas	4.16 a	1.41 a
6 semanas	1.51 b	1.58 a

a,b medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

En este caso el valor del DMS fue (0.55) existiendo diferencia significativa para *Pinus cembroides* a las 4 semanas

4.1.3 Número de Brotes por Cotiledón.

El análisis de varianza para esta variable mostró diferencia significativa para los factores medios de cultivo. así como para la interacción medio de cultivo-tiempo de exposición (Cuadro 13).

Cuadro 13. Análisis de varianza para la variable número de brotes por cotiledón, obtenidos mediante la técnica de organogénesis en *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis*.

FV	GI	CM
Especie (E)	1	0.882
Medio (M)	1	3.621*
Tiempo de Exposición (T)	1	1.050
ExM	1	0.410
ExT	1	0.592
MxT	1	2.854*
ExMxT	1	0.411
Error	40	0.433
Total	47	0.577

* Significativo ($P < 0.05$); CV = 39.402.

La comparación de medias para el factor medio de cultivo muestra que el medio DCR fue superior al GD, los resultados se muestran en el (cuadro 14).

Cuadro 14 Comparación de medias para el factor medio de cultivo en la variable número de brotes por cotiledón.

Medio	Media
DCR	3.76 a
GD	1.96 b

a, b medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Investigaciones previas sugieren que la capacidad morfogenética de los explantes está limitada por la composición del medio nutritivo. (Perez-Bermúdez y Sommer,

1987); considerándose que son los macronutrientes los que regulan la capacidad caulogénica de los medios, ya que los micronutrientes y las vitaminas no juegan un papel decisivo en la estimulación y formación de brotes. Los medios de cultivo que presentaban una alta relación de NO_3 : NH_4 favorecieron la caulogénesis en *Pinus strobus* (Flinn *et al*; 1985).

Por otro lado, se encontró una interacción significativa de ($P = 0.014$) entre medios de cultivo y tiempo de exposición, lo cual muestra que el tiempo de exposición resultó mejor a las 6 semanas, en el medio DCR. Sin embargo, para el medio GD no se presentó diferencia significativa al incrementarse el tiempo de exposición.. (cuadro 15).

Cuadro 15 Comparación de medias para la interacción medio-tiempo en la variable número de brotes por cotiledón.

Medio-Tiempo	DCR	GD
4 semanas	2.40 b	2.22a
6 semanas	5.47 a	1.69a

a,b medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Por tal motivo, se procedió a realizar la comparación de medias donde se encontró que existe diferencia significativa para el medio DCR a las 6 semanas, el valor del DMS fue = 0.54.

La interacción significativa observada en los factores medios de cultivo-tiempo de exposición ha sido consignada por otros investigadores. Halos y Go (1993), detectaron una fuerte interacción entre el tiempo de exposición y la concentración de

BAP; observaron que con un mayor tiempo de exposición se formaron menos yemas adventicias en todas las concentraciones de BAP utilizadas en *Pinus caribaea*; así mismo, la diferenciación de yemas en *Pinus contorta* y su desarrollo posterior estuvieron fuertemente influenciados por la longitud del tiempo de exposición (Patel y Thorpe, 1984). Así mismo se ha observado en *Pinus halepensis* que la exposición al BAP por períodos de más de 28 días puede ser benéfica en la etapa de inducción, sin embargo puede perjudicar en etapas posteriores como el alargamiento de brotes (Lambardi; *et al.* 1993).

4.1.4 Número de Brotes por Embrión.

Los resultados del análisis de varianza para esta variable se muestran en el cuadro 16.

Cuadro 16. Análisis de varianza para la variable número de brotes por embrión, obtenidos mediante la técnica organogénesis en *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis*.

FV	GI	CM
Especie (E)	1	13.354*
Medio (M)	1	12.166*
Tiempo de Exposición (T)	1	1.574
ExM	1	0.883
ExT	1	13.137*
MxT	1	5.443
ExMxT	1	0.597
Error	40	1.642
Total	47	2.400

* Significativo ($P < 0.05$); CV = 47.992

Como puede apreciarse, se presentó diferencia significativa en los factores especie y medio de cultivo, así como para la interacción especie-tiempo de exposición

Se ha señalado anteriormente que no todos los cotiledones (aún de un mismo embrión) responden de igual forma a las condiciones *in vitro*, ya que los explantes tienen un potencial genético variable (Martínez-Pulido, *et al.* 1992); así mismo se considera que en los protocolos de regeneración *in vitro* es indispensable efectuar modificaciones según la especie. En el presente trabajo se considera que *Pinus cembroides* se ajusta de mejor manera al protocolo sugerido por Patel y Thorpe (1984) en lo que respecta a la inducción y desarrollo de brotes *in vitro* al compararla con *Pinus halepensis* (Cuadro 17).

Cuadro 17. Comparación de medias para *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis* en la variable número de brotes por embrión.

Espece	Media
<i>Pinus cembroides</i>	10.24 a
<i>Pinus halepensis</i>	4.62 b

a,b medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Con respecto al factor tiempo de exposición, en esta variable nuevamente el medio de cultivo DCR muestra una mayor ventaja que el medio GD (Cuadro 18). Esta respuesta difiere con lo consignado por Lambardi *et al.* (1993) quienes trabajando con *Pinus halepensis* en diferentes medios de cultivo, incluyendo el DCR encontraron una mayor respuesta en la inducción y desarrollo de yemas con el medio de cultivo AE (Von Arnold y Eriksson, 1981).

Cuadro 18. Comparación de medias para el factor medio de cultivo en la variable número de brotes por embrión.

Medio	Media
DCR	10.11 a
GD	4.70 b

a, b medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Sin embargo un aspecto importante en esta variable es el observado en la interacción especie-tiempo de exposición (Cuadro 19), ya que mientras *Pinus cembroides* respondió favorablemente a las 4 semanas de exposición, para *Pinus halepensis* la mayor respuesta se obtuvo en 6 semanas.

Los resultados coinciden con lo señalado por Lambardi *et al.* (1993) quienes encontraron que exposiciones mayores a 28 días en BAP, fueron benéficas en cuanto a la inducción y desarrollo de yemas; sin embargo Patel y Thorpe (1984) observaron una declinación gradual en el número de brotes de explantes cultivados por periodos de 4 a 7 semanas en *Pinus contorta*; aunque requirieron un mínimo de 15 a 20 días de exposición a BAP para obtener una frecuencia óptima de embriones con respuesta.

Cuadro 19. Comparación de medias para la interacción Especie-Tiempo en la variable brotes por embrión.

Especie\Tiempo	<i>Pinus cembroides</i>	<i>Pinus halepensis</i>
4 semanas	15.28 a	3.24 b
6 semanas	6.25 b	6.20 a

a, b medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Se realizó la comparación de medias por la prueba de DMS, con valor de 1.05, encontrándose diferencia estadística significativa para *Pinus cembroides* a las cuatro semanas de exposición al BAP, concluyéndose que el tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento fue determinante para obtener un mayor número de brotes por embrión.

4.1.5 Número de Brotes con 5 mm o mas de Longitud

En el presente trabajo se observó una diferencia significativa en cuanto a medio de cultivo, tiempo de exposición así como para la interacción especie-tiempo de exposición, en la variable número de brotes con 5 mm de longitud (Cuadro 20).

Cuadro 20. Análisis de varianza para la variable longitud de brotes de 5 mm. obtenidos mediante la técnica de organogénesis en *Pinus cembroides* y *Pinus halepensis*.

FV	Gl	CM
Especie (E)	1	11.999
Medio (M)	1	6.544*
Tiempo de Exposición (T)	1	2.624*
ExM	1	0.709
ExT	1	15.565*
MxT	1	4.817
ExMxT	1	1.334
Error	40	1.803
Total	47	2.462

* Significativo ($P < 0.05$); CV = 54.143

Al realizar la comparación de medias correspondiente, los resultados muestran el medio DCR con un comportamiento superior (Cuadro 21)

Cuadro 21. Comparación de medias en el factor medio de cultivo en la variable longitud de brotes de 5 mm.

Medio	Media
DCR	8.12 a
GD	4.49 b

a, b medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Así mismo al realizar la comparación de medias para el factor tiempo de exposición a los reguladores, se observó una mayor respuesta a las 4 semanas que a las 6 (cuadro 22).

Cuadro 22. Comparación de medias en el factor tiempo en la variable longitud de brotes de 5 mm.

Tiempo	Media
4 Semanas	7.39 a
6 Semanas	5.06 b

a,b medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Al analizar la interacción especie-tiempo de exposición (Cuadro 23), *Pinus cembroides* mostró efectos perjudiciales en esta variable debido al tiempo de exposición mas prolongado. Sin embargo en *Pinus halepensis* se obtuvieron mejores resultados a las 6 semanas.

Cuadro 23. Comparación de medias para la interacción Especie-Tiempo en la variable longitud de brotes de 5 mm.

Especie\Tiempo	<i>Pinus cembroides</i>	<i>Pinus halepensis</i>
4 semanas	14.36a	2.72 b
6 semanas	4.75 b	5.38 a

a, b medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Por tal motivo se realizó la comparación de medias por DMS (con valor de 1.10), existiendo diferencia estadística significativa para *Pinus cembroides*, además de un mayor número de brotes de al menos 5 mm de longitud a las cuatro semanas.

Lo anterior es importante ya que en organogénesis un aspecto determinante es la calidad de los brotes formados, siendo la longitud una de las características que más influyen para su éxito posterior en la etapa de transplante a suelo. Estudios previos han demostrado que la supervivencia de las plántulas en el campo depende de su altura (Sen *et al.* 1993).

4.1.6 Enraizamiento.

En esta etapa no se obtubieron resultados positivos, puesto que con los tratamientos utilizados, no se presentó formación de raíces en ninguno de los brotes tratados.

4.2 Variables Evaluadas en Embriogénesis Somática.

4.2.1 Inducción de tejido embriogénico.

El inicio de tejido embriogénico se obtuvo en ambas especies a partir del megagametofito como explante, el cual fue cambiando de tonalidad de blanco opaco a translúcido y con aspecto mucilaginoso. Posteriormente se observó crecimiento de células en la parte del suspensor. La respuesta en cuanto a la formación del tejido embriogénico es similar a la observada por Becwar *et al.* (1990), y Newton, *et al.* (1994) esto es, presentó un aspecto translúcido a blanco, mucilaginoso, con células parecidas a células del suspensor; con embriones somáticos del estadio 1; dado que los cultivos embriónicos de coníferas contienen embriones inmaduros equivalentes a los estadios de desarrollo inicial de embriones cigóticos (Atree y Fowke, 1991)

Los resultados en embriogénesis somática, mostraron una superioridad numérica en cuanto al porcentaje de inducción de tejido embriogénico en el medio DCR (Gupta y Durzan, 1985). Sin embargo la prueba de χ^2 no resultó significativa, ($P = 0.05$) esto probablemente se debió al tamaño reducido de la muestra.

Cuadro 24. Prueba de χ^2 para el porcentaje de tejido embriogénico, en relación al medio de cultivo utilizado.

Medio de cultivo	Formación de Tejido Embriogénico	No Formación de Tejido Embriogénico	Porcentajes
DCR	12	0	100
GD	9	3	75

$$\chi^2 = 3.42$$

Atree y Fowke (1991) mencionan que entre los medios de cultivo mas utilizados con éxito para inducir tejido embriogénico, está el DCR. Así mismo mencionan que se ha obtenido un crecimiento continuo en cultivos de *Pinus taeda*, solo con la adición de 2,4-D y BA; Becwar *et al.* (1991) además sugieren que el megagametofito proporciona los reguladores de crecimiento necesarios para la inducción, debido a que en algunas especies de pinos no se presenta la inducción de tejido embriogénico cuando los embriones cigóticos son usados como explante. Por su parte, Jones *et al.* (1993) obtuvieron la mas alta frecuencia de inducción en el medio DCR adicionado con 0.5 mg⁻¹ de BA y 3.0 mg⁻¹ de 2,4-D utilizando glutamina como fuente principal de nitrógeno; mencionan además que obtuvieron una mezcla de tejido embriogénico y no embriogénico, caracterizado por células laxas parecidas a las del suspensor, entremezcladas con células pequeñas, compactas y esféricas, parecidas a las masas preembriónicas de tejido embriogénico. Así mismo, señalan que el tejido embriogénico tuvo una corta vida y rápidamente fue enmascarado por tejido no embriogénico. Lo anterior pudo acontecer en el presente experimento puesto que a pesar de los intentos para llevar al tejido embriogénico a la maduración de embriones somáticos, el resultado fue negativo; a excepción de la obtención de 2 embriones somáticos de la etapa cotiledonar que se obtuvieron en los tratamientos con ácido abscísico en *Pinus halepensis* en el medio DCR.

Por otro lado se procedió a realizar una prueba de χ^2 para la variable porcentaje de tejido embriogénico con respecto a especies.

Cuadro 25. Prueba de χ^2 para el porcentaje de tejido embriogénico en relación a las especies utilizadas.

Especies comparadas	Formación de Tejido Embriogénico	No Formación de Tejido Embriogénico	Porcentajes
<i>Pinus halepensis</i>	12	0	100
<i>Pinus cembroides</i>	9	3	75

$$\chi^2 = 3.42$$

La diferencia en el porcentaje de respuesta en cuanto a especies, es otro aspecto en que coinciden diversos investigadores; Jain *et al.* (1989) obtuvieron una frecuencia de iniciación del 6%, mientras que Newton *et al.* (1994) con *Pinus elliottii* reportaron un 9%; por otro lado, Flinn *et al.* citado por Jones *et al.* (1993) obtuvieron una frecuencia del 54%.

Las diferencias observadas en las frecuencias de inducción, reflejan una habilidad variable de las diferentes especies, además de las diferencias en el estadio de desarrollo de los embriones así como de los diversos medios de cultivo utilizados (Atree y Fowke, 1991).

5 CONCLUSIONES

1. Las técnicas de organogénesis y embriogénesis somática presentaron diferente potencial de regeneración para las especies en estudio; siendo la organogénesis la técnica mas eficiente en ambas especies para la regeneración *in vitro*.
2. *Con respecto a la técnica de organogénesis empleada en esta investigación, se observó que tanto el medio de cultivo como el tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento, influyeron en el número de propágulos regenerados.*
3. *Pinus cembroides, mostro mayor capacidad de respuesta in vitro.*
4. El medio de cultivo DCR resultó mas eficiente para la regeneración *in vitro* mediante organogénesis en ambas especies.
5. La capacidad de regeneración *in vitro*, en general se vió disminuida, al incrementarse el tiempo de exposición a los reguladores de crecimiento.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ammirato, P.V. 1983. The regulation of somatic embryo development in Plant Cell Cultures: suspension culture techniques and hormone requirements. *Bio/Technology* 1: 68-74.
- Atree, S. M. and L.C. Fowke. 1991. Micropropagation through somatic embryogenesis in conifers. (ed) in Y. P. S. Bajaj. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 17. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, Canada. 53-70.
- _____. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 35: 1-35 .
- Becwar, M. R., Nagmani, R., and S. R. Wann , 1990. Initiation of embryogenic culture and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can. J. For. Res.* 20 : 810 -817 .
- Chandler, S. F., C. Bateman, C. Blomstedt, D. Willyams and R. Young. 1989. *Forestry Biotechnology at Calgene Pacific*. *Aust. J. Biotechnol.* 3:281-284.
- Chesick, E. E., C. A. Mohn, and W. P. Hackett. 1991. Plantlet multiplication from white pine (*Pinus strobus* L.) embryos *in vitro*; bud induction and rooting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 26: 107-114.
- Ellis, D. D. and R. C. Judd. 1983. SDS. PAGE analysis of bud-forming cotyledons of *Pinus ponderosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 11: 57-65.
- Escoto, C. C. 1988. La importancia de los pinos piñoneros en el estado de Zacatecas. Tesis de licenciatura. División de Ciencias Forestales, U. A. CH.
- Egertsdotter, U. and S. Von. Arnold. 1993. Classification of Embryogenic cell - lines of *Picea abies* as Regards Protoplast Isolation and Culture. *J. Plant Physiol.* Vol. 141: 222-229.

- Ferrer, G. J. M. y D. M. Rodríguez. 1968. Nuestros Árboles Frutales. Ed. Cosol. S. A. ed. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Madrid, España. 28-29 p.
- Flinn, B. S., D. T. Wedd, and W. Georgis. 1985. *In vitro* control of caulogenesis by growth regulators and media components in embryonic explants of eastern white pine (*Pinus strobus*). Can. J. Bot. 64: 1948-1956.
- Gladfelter, H. J., and G. C. Phillips. 1987. De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. in vitro. Reproducible regeneration from long-term callus cultures. Plant Cell Rep. 6: 163-166.
- Go, N.E., G.D Pérez-Orozco, and S.C. Halos. 1993. *In vitro* response of embryos from different provenances of *Pinus caribaea* Var. hondurensis Morelet. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32:1-7.
- Gresshoff, P. M. and C. H. Doy. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. Planta. 107: 161-170.
- Gupta, P. K. and D. J. Durzan. 1985. Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell. Rep. 4: 177-179.
- Gutiérrez, R. R y R. Tapia. 1993. Pruebas de Eficacia del insecticida "decis 2.5 C. E." contra *Conophthorus cembroides*, barrenador de conos y semillas de *Pinus cembroides*. Memorias del VII Simposio Nacional sobre Parasitología Forestal, Monterrey, N.L., México.
- Hakman, I. and S. Von Arnold, 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (white spruce). Physiol. Plant. 72: 579-587.
- Hartmann, H. T. and D. E. Kester. 1987. Propagación de plantas. Principios y prácticas C.E.C.S.A., México, D.F. 549-551.

- Harry, I. S. and T. A. Thorpe. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature zygotic embryos of red spruce. *Bot. Gaz.* 152 (4): 446-452.
- _____. 1994. Regeneration of plantlets through organogenesis from mature embryos of jack pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 37: 159-164.
- Halos, S. C. and N. E. Go. 1993. Micropropagation of *Pinus caribaea* Morelet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 47-57.
- Jalonen, P. and S. Von Arnold. 1991. Characterization of embryogenic cell lines of *Picea abies* in relation to their competence for maturation. *Plant Cell Report.* 10:384-387.
- Jang, J. C. and F. H. Tainter. 1991. Micropropagation of Shortleaf, Virginia and loblolly x shortleaf pine hybrids via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 25: 61-67.
- Jones, N. B., Staden, J. V., and A. D. Bayley, 1993. Somatic Embryogenesis in *Pinus patula*. *J. Plant. Physiol.* Vol. 142: 366-372.
- Komamine, A., R. Kawahara, M. Matsumoto, S. Sunabori, T. Toya, A. Fujiwara, M. Tsukahara, J. Smith, M. Ito, H. Fukuda, K. Nomura, And T. Fujimura. 1992. Mechanisms of Somatic Embryogenesis in Cell Cultures: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 28: 11-14.
- Lawrence, G.H.M. 1971. *Taxonomy of Vascular Plants.* The Macmillan Company: New York. 354 - 364 p.
- Laine, E. and A. David. 1990. Somatic Embryogenesis in Immature Embryos and Protoplasts of *Pinus caribaea*. *Plant. Science.* 69: 215-224.
- Lambardi, M., K. K. Sharma and T. A. Thorpe. 1993. Optimization of *in vitro* bud induction and plantlet formation from mature embryos of aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29: 189-199.

- Lu, C-Y., I. S. Harry, M. R. Thompson, and T.A. Thorpe. 1991. Plantlet regeneration from cultured embryos and seedling parts of red spruce (*Picea rubens* Sarg.) Bot. Gaz. 152(1): 42-50.
- Martínez, M. 1953a. Las Pináceas Mexicanas. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Subsecretaría de Recursos Forestales y de Caza. México 362 p
- _____. 1953b. Las Pináceas del Estado de México. Trabajos de la Comisión Botánica del Estado de México. Dirección de Agricultura y Ganadería, Toluca, México. 18 -19 p.
- _____. 1963. Las pináceas Mexicanas. U. N. A. M. México. 11-39 p
- Martínez - Pulido, C., I. S. Harry and T. A Thorpe. 1992. Optimization of bud induction in cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 29: 247-255.
- Magallanes, C. M. E. 1993. Curso teórico-práctico de micropropagación de especies forestales. Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la F AU.A.N.L.
- Merino, M. E. 1988. Medio de cultivo. En M. D. Hurtado, Y M. M. Merino. (Ed). Cultivo de tejidos vegetales. Ed: Trillas. México, D. F. 70 p.
- Minocha, S. C. 1980. Callus and adventitious shoot formation in excised embryos of white pine (*Pinus strobus*). Can. J. Bot. 58: 366-370.
- Mott, R.L. and Amerson, H.V. 1981. Tissue Culture Plantlets Produced From *Pinus monticola* Embryonic Materials. Forest Res. 27: 299-304.
- Newton, R. J., K.A. Marek-Swize, M. E. Magallanes-Cedeno, N. Dong, S. Sen and S.M. Jain. 1994. Somatic embryogenesis in Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) in S. Jain., P. Gupta and R. Newton (eds.), Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Khaver Netherlands 183-195 p
- Patel, K. R. and T. A. Thorpe. 1994. *In vitro* differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta*) Dougl. ex Loud.) Plant Cell, Tissue Organ Culture 3: 131-142.

- Pérez-Bermúdez, P. and H. E. Sommer. 1987. Factors affecting adventitious bud in *Pinus elliottii* (Engelm) embryos cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 11: 25-35.
- Pierik, R.L. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España. 109 -110 p.
- Reilly, K.H. and J. Aitken. 1981. Reliable plantlet formation from embryos and seedling shoot tips of radiata pine. Physiol. Plant. 53: 170-175.
- Roca, W. M. y L. A. Mroginski. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. 152-153 p.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México Ed. Limusa. México, D. F. 285-313 p.
- Sen, S., M. E. Magallanes - Cedeño, R. H. Kamps, C. R. Mckinley, and R. J. Newton. 1994. *In vitro* micropropagation of Afghan pine. Can. J. For. Res. 24: 1248-1252 .
- Snedecor, G.W y W.G. Corchran. 1971. Métodos estadísticos. Ed: Continental, México, D.F. 402 p.
- Tautorus, T. E., L. C. Fowke, and D. I. Dunstan. 1991. Somatic embryogenesis in conifers. Can. J. Bot. 69: 1873-1899.
- Vasil, I.K., 1988. Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal Crops Bio/ technology, 6: 397-402.
- Villalobos. V. M., E C.Yeung and T.A. Thorpe. 1985. Origin of adventitious shoots in excised radiata pine cotyledons cultured *in vitro*. Can. J. Bot. 63: 2172-2176.
- Von Arnold, S. and T. Eriksson. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. Can. J Bot. 59: 870-974

