



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS Y FORESTALES**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Micropropagación de genotipos seleccionados de
Pinus oocarpa Schiede**

TESIS QUE PRESENTA:

BIOL. ADRIANA ABARCA LIERA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Asesor:

**Doctor en Ciencias Biológicas Alejandro Martínez
Palacios**

Morelia, Michoacán, Septiembre de 2014



AGRADECIMIENTOS

Han sido muchas las experiencias y emociones vividas en el transcurso de este programa educativo. Y ahora mientras escribo estas líneas, muchos recuerdos vienen a mi memoria; cada uno de ellos viene acompañado de la imagen de una o varias personas. A todos gracias por su apoyo desinteresado, compartiendo con ustedes un logro más; y especialmente:

Con un testimonio de eterno agradecimiento por el gran amor y la confianza que siempre me brindan: mis padres Teresa y Raymundo, mis generosos hermanos Temo y Ray, y mi preciada hermana Verónica.

A mi madre y familia adoptiva: Norma Martínez, este mérito también es su logro.

Asther Adonai, este presente simboliza mi gratitud por impulsarme a concluir mi trabajo, compartiendo contigo este logro académico.

A mis amigos por sus palabras de motivación y apoyo incondicional: Amanda, Rosita, Osiel, Silvia, Claudia, mis amigos de laboratorio: Lidia, Luis Enrique, Lya, Lalo, Christian, Paulina, gracias por hacer más amena mi estancia.

Al D. C. Alejandro Martínez, por su apoyo, asesorías, observaciones y recomendaciones acertadas, durante la elaboración de este trabajo de tesis.

En especial a la D. C Martha Pedraza, por el apoyo en los cortes histológicos y la interpretación de los mismos.

A los integrantes de la comisión revisora, por los acertados comentarios y observaciones para la elaboración y mejora del presente manuscrito: D. C. Martha Pedraza, D. C. Patricia Delgado, D. C. Cuauhtémoc Sáenz y al D. C. Víctor Chávez.

A la Comisión Forestal del Estado de Michoacán y a la Unión Nacional de Resineros por la aportación de semilla de *Pinus oocarpa*.

Con un especial agradecimiento a la Secretaría del Posgrado Lili, por la accesibilidad y amabilidad brindadas.

DEDICATORIA

El surgimiento de un nuevo ser conlleva a nuevas aventuras llenas de emociones inimaginables. Este triunfo esta dedicado a ti Votán Adonai, que desde tu concepción eres "Curi", mi sol. Has sido mi mayor motivación de vida, mi fortaleza. El mejor tesoro que han enviado para emprender un nuevo viaje lleno de triunfos.

Con amor, respeto y sinceridad

Tú madre y amiga

“La forja de la nueva verdad exige casi siempre severas abstenciones y renunciaciones. Convendrá durante la susodicha incubación intelectual que el investigador, a modo de sonámbulo, atento sólo a la voz del hipnotizador, no vea ni considere otra cosa que lo relacionado con el objeto de estudio: en la cátedra, en el paseo, en el teatro, en la conversación, hasta en la lectura meramente artística, buscará ocasión de intuiciones, de comparaciones y de hipótesis, que le permitan llevar alguna claridad a la cuestión que le obsesiona. En este proceso adaptativo nada es inútil: los primeros groseros errores, así como las falsas rutas por donde la imaginación se aventura, son necesarios, pues acaban por conducirnos al verdadero camino, y entran, por tanto en el éxito final, como entran en el acabado cuadro del artista los primeros informes bocetos”.

Santiago Ramón y Cajal

CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE CUADROS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
I. RESUMEN GENERAL.....	9
II. SUMMARY.....	10
III. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	11
3.1 Pinos en México.....	12
3.1.1 Importancia económica y estado actual de los pinos.....	12
3.1.2 Descripción botánica y distribución geográfica de <i>Pinus oocarpa</i> Schiede.....	14
3.2 Micropropagación en coníferas.....	16
3.2.1 Propagación vía organogénesis en <i>Pinus</i>	17
3.2.2 Propagación vía embriogénesis somática en <i>Pinus</i>	19
3.3 HIPÓTESIS.....	26
3.4 JUSTIFICACIÓN.....	27
IV. OBJETIVOS.....	28

MORFOGENÉISIS *in vitro* DE CALLO A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS INMADUROS DE *Pinus oocarpa* SCHIEDE EX SCHLTDL.

Resumen.....	30
Abstract.....	30

Introducción.....	31
Materiales y Métodos.....	32
Resultados.....	34
Discusión.....	37
Conclusiones.....	39
Literatura citada.....	40

**INDUCCIÓN *in vitro* DE BROTES A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS
MADUROS DE *Pinus oocarpa* SCHIEDE EX SCHLTDL.**

Resumen.....	46
Abstract.....	46
Introducción.....	47
Materiales y Métodos.....	48
Resultados.....	49
Discusión.....	53
Conclusiones.....	55
Literatura citada.....	56
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	59
VI. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.....	62
ANEXO 1.....	72
ANEXO 2.....	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Embriogénesis somática en pinos.....	20
Capítulo I. Cuadro 1. Número y porcentaje de extrusión e iniciación de callo generado en la inducción de embriogénesis somática en los explantes en <i>P. oocarpa</i>	35
Capítulo II. Cuadro 1. Análisis factorial de la inducción de brotes en <i>Pinus oocarpa</i> , medio DCR y DCR/2 modificados con BA.....	50
Capítulo II. Cuadro 2. Análisis factorial de la respuesta de brotes por explante en embriones cigóticos de <i>P. oocarpa</i> en medio DCR y DCR/2 modificado con BA.....	50
Capítulo II. Cuadro 3. Inducción de brotes en embriones cigóticos de <i>P. oocarpa</i> en medio DCR y DCR/2 modificados con BA.....	50
Capítulo II. Cuadro 4. Análisis factorial de la respuesta de elongación de brotes de <i>Pinus oocarpa</i> en Medio DCR y DCR/2 modificado con BA.....	51
Capítulo II. Cuadro 5. Alargamiento y supervivencia de brotes de <i>Pinus oocarpa</i> , ocho semanas después de cultivo en el medio DCR y DCR/2 modificados con BA.....	51
Capítulo II. Cuadro 6. Inducción de raíz en brotes de <i>Pinus oocarpa</i> en medio DCR/2.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Pinus oocarpa</i> Schiede.....	15
Capítulo I. Figura 1. Extrusión del megagametofito completo, y megagametofito a la mitad, y multiplicación de callo; a partir del embrión cigótico inmaduro en el medio de cultivo 1250.....	34
Capítulo I. Figura 2. Histología de callos de <i>Pinus oocarpa</i> generados a partir de embriones cigóticos inmaduros.....	35
Capítulo I. Figura 2. Tasa de crecimiento de callo de <i>Pinus oocarpa</i> a partir del megagametofito completo (MG) y megagametofito a la mitad (MG/2) en el medio 1250.....	36
Capítulo II. Figura 1. Presencia de brotes en embriones cigóticos maduros de <i>P. oocarpa</i>	49
Capítulo II. Figura 2. Respuesta de enraizamiento en brote de <i>P. oocarpa</i> en medio DCR/2.....	52

I. RESUMEN

La presente investigación reporta las fases iniciales de propagación, vía embriogénesis somática y organogénesis en *Pinus oocarpa* Schiede, una de las especies maderables y resineras importantes en el país. Mediante la vía embriogénesis somática se emplearon los megagametofitos completos y a la mitad, a partir de semillas inmaduras con tres repeticiones. En la fase de inducción de masas de tejido, los resultados mostraron la obtención de callo no embrionario, no estableciéndose ninguna línea embriogénica, sin embargo, se obtuvo mayor porcentaje de extrusión y proliferación de callo en el megagametofito completo. Por otro lado, en la organogénesis se sembraron 50 embriones cigóticos maduros con 5 repeticiones se registró la mayor respuesta para la inducción de brotes en el medio DCR en ausencia de BA y en el medio DCR/2 con 0 y 0.5 mg l⁻¹ de BA. En la fase de enraizamiento la respuesta fue baja (<1%), debido a varios factores que influyen en la rizogénesis, tales como, la ontogenia, medio de cultivo, y el genotipo. Los resultados muestran que esta especie tiene potencial regenerativo, a partir del embrión cigótico maduro e inmaduro para los dos tipos de respuestas morfogénicas.

Palabras clave: *Pinus oocarpa*, embriogénesis somática, organogénesis, megagametofito.

II. SUMMARY

The present study reports the initial stages of propagation, via somatic embryogenesis and organogenesis in *Pinus oocarpa* Schiede, one of the important timber species and resiniferous in the country. Via somatic embryogenesis using full and half megagametophytes, were used from immature seeds with three replications. In the induction phase of tissue mass, the results showed no obtaining embryogenic callus, embryogenic line without establishing any, however, higher extrusion rate and proliferation of callus was obtained full megagametophyte. Furthermore, in organogenesis 50 mature zygotic embryos were plated with 5 replicates as response to shoot induction in the medium in the absence of BA DCR and the DCR/2 medium containing 0 to 0.5 mg l⁻¹ was registered BA. In the rooting phase response was low (<1%) due to several factors that influence rhizogenesis, such as ontogeny, medium, and genotype. The results show that this species has regenerative potential, from the mature and immature zygotic embryo for the two types of morphogenic responses.

Keywords: *Pinus oocarpa*, somatic embryogenesis, organogenesis, megagametophyte.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

Dentro de las estrategias para la conservación de los ecosistemas forestales en los últimos años, los bosques plantados han recibido la mayor parte de las inversiones debido a los beneficios que supone su establecimiento (FAO, 2009). La introducción de programas de mejoramiento genético en las coníferas, permite ganancia genética, la cual, se logra principalmente a través de ensayos de progenies. Los genotipos superiores dentro de las mejores familias después son usados para establecer huertos semilleros para producir semillas genéticamente mejoradas (Klimaszewska *et al.*, 2007).

Se ha puesto énfasis en el desarrollo de tecnologías de propagación más eficientes en cuanto a producción y costo económico (Walter *et al.*, 2007), para permitir el despliegue masivo de los árboles mejorados y el implemento de plantaciones forestales.

Dentro de la propagación clonal, la micropropagación tiene varias ventajas sobre la macropropagación (Villalobos y Thorpe, 1991), como son: la producción de un elevado número de plantas y la posibilidad de crioconservar a largo plazo las líneas embriogénicas, mientras que los árboles correspondientes son evaluados en campo (Merkle y Nairn, 2005; Nehra *et al.*, 2005). Con estas técnicas es posible la producción de los mismos genotipos de forma continua a lo largo del tiempo, la captura de mayores ganancias genéticas, la flexibilidad de utilizar de forma rápida clones apropiados en función de los objetivos de mejora y/o las condiciones ambientales y la capacidad de gestionar la diversidad y la ganancia genética en las plantaciones forestales (Park, 2002).

En el presente proyecto se propuso desarrollar la micropropagación de *Pinus oocarpa* mediante embriogénesis somática y/u organogénesis como una fase inicial encaminada al establecimiento de plantaciones forestales clonales de alto rendimiento. El desarrollo y optimización de estas herramientas

biotecnológicas permite la obtención de material clonal de pinos, para fines de reforestación, y plantaciones forestales comerciales.

3.1 Pinos en México

México se ubica en cuarto lugar a nivel mundial en biodiversidad y endemismo (Mittermeier *et al.*, 1998). El género *Pinus*, representado por 72 especies, formas y variedades, son las de mayor frecuencia en los bosques de coníferas en México (Perry, 1991). La superficie forestal estimada en México para el año 2002 fue de 146, 118,323 ha, mientras que para 2007 ésta cambió a 144, 529,211 ha (FAO, 2010).

La mayor parte de las especies sujetas a mejoramiento genético (39 de los 72 taxa del género *Pinus* existentes en México) son utilizadas en su mayoría para la producción de madera; esto explica porque este género es tan importante en términos económicos y su amplio rango de distribución natural en México (Martínez, 1953).

3.1.1 Importancia económica y estado actual de los pinos

Los bosques contribuyen decisivamente a la mitigación del cambio climático y al suministro de productos y servicios ecosistémicos fundamentales para la prosperidad de la humanidad. Los bosques y las actividades forestales han sido fundamentales en el desarrollo de la civilización moderna (FAO, 2012).

A mediados del siglo XX muchos países reconocían que los bosques debían gestionarse con múltiples fines y no sólo para producir madera. Entraron en vigor leyes que estipulaban los usos múltiples de los bosques, como la recreación, la flora y fauna silvestres y el agua, además de la madera. En muchos casos, el mal gobierno y la corrupción ocasionaron el agotamiento rápido de los bosques, sin que se proporcionara ningún beneficio concomitante a la sociedad. Entre las estrategias para hacer realidad la contribución potencial de los bosques a un futuro sostenible, figuran la mejora de la calidad y la cantidad de los bosques mediante la plantación de árboles y la inversión en servicios de los ecosistemas; la promoción de las pequeñas y medianas empresas basadas en los bosques para reducir la pobreza rural y mejorar la

equidad; el aumento del valor a largo plazo de los productos madereros para reutilizar, reciclar y emplear la madera para producir energía; y la mejora de las comunicaciones y los vínculos en el ámbito físico e institucional (FAO, 2012).

La deforestación deja de ser un problema grave en la mayor parte de los países que han alcanzado cierto nivel de desarrollo económico y han adoptado prácticas forestales acertadas sobre la base de compromisos políticos. No obstante, debe quedar claro que la incorporación de los bosques en toda estrategia de futuro sostenible no es opcional sino obligatoria (FAO, 2012).

Mundialmente las empresas plantadoras tienen amplios programas de mejoramiento para elevar su productividad. En la encuesta realizada entre plantadores mexicanos, el 89% manifestó no contar con un programa de mejoramiento genético como parte de sus programas de plantaciones; sin embargo, un programa de plantaciones que no contemplan técnicas de mejoramiento genético está encaminada al fracaso (CONAFOR, 2012).

Las plantaciones forestales serán los proveedores futuros de madera y responsables del mantenimiento y restauración del medio ambiente (CONAFOR, 2012).

Una de las ventajas de las plantaciones es la oportunidad de trabajar con especies con mejores características genotípicas y fenotípicas; la selección y mejoramiento de las especies utilizadas en las plantaciones forestales depende, principalmente, del tipo de producto que se requiere, clima y las condiciones del suelo (Musálem, 2006).

Sin embargo, los programas de mejoramiento genético en especies forestales se complican, entre otras razones, por sus largos ciclos biológicos (crecimiento lento, floración tardía), la fuerte influencia de los procesos de maduración y las pobres correlaciones de los caracteres entre individuos jóvenes y adultos. Según la revisión de Toribio (2001), el desarrollo de herramientas biotecnológicas está permitiendo en la actualidad acelerar la mejora genética de las especies forestales; considerando la regeneración de plantas mediante

técnicas de cultivo de tejidos, la biotecnología que es capaz de dar una significación práctica a otras herramientas biotecnológicas (por ejemplo la biología molecular). Aunque las especies forestales se les considera recalcitrantes para las técnicas de cultivo *in vitro*, en la actualidad se ha logrado regenerar plantas a partir del cultivo de tejidos en varias de ellas; convirtiéndose la regeneración clonal de árboles adultos vía embriogénesis somática, una realidad para algunas especies.

3.1.2 Descripción botánica y distribución geográfica de *Pinus oocarpa* Schiede

Árbol de 15 a 30 metros de altura, con un diámetro de 40 a 75 cm, con la copa por lo común redondeada y frecuentemente compacta, presenta fascículos de 5 hojas y vaina persistente (15-30 cm), conos ovoides y cortos en forma de roseta (5.5-8 cm) (Fig.1) (Martínez, 1948; Perry, 1991). Dicha especie se localiza en el suroeste de México y América Central (Dvorak *et al.*, 2009), en Michoacán se distribuye en la parte centro-occidental de la cordillera Neovolcánica y en la parte NE y Sur de la Sierra de Coalcomán, donde forma bosques de considerable extensión. Especie considerada como subtropical, por encontrarse frecuentemente en ecotono con la vegetación tropical de angiospermas en altitudes de 700-2000 metros; forma masas puras, aunque frecuentemente forma asociaciones con *Pinus lawsonii*, *P. pringlei*, *P. leiophylla*, *P. douglasiana*, *P. michoacana* var. *cornuta*.

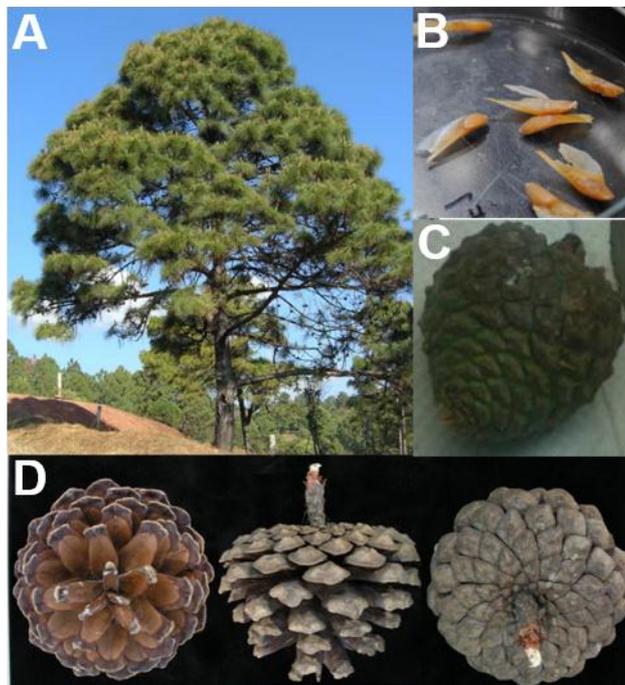


Figura 1. *Pinus oocarpa* Schiede (A). Semillas inmaduras (B). Conos ovoides inmaduros (C). Conos ovoides maduros (D).

La especie ha mostrado estar bien adaptada a los incendios frecuentes, a las fuertes sequías periódicas y a los terrenos degradados. Son varias las especies de encino, a la cual está asociada *P. oocarpa* (Madrigal, 1982).

Pinus oocarpa se encuentra dentro de la lista de especies prioritarias para la reforestación en México definidas por la CONABIO y la CONAFOR (CONAFOR, 2012). Además su madera es usada para construcciones, rieles de tren, postes, productos de resina, entre otros (Zamora, 1981). Es de gran importancia por el potencial para reforestaciones de restauración ecológica y para plantaciones comerciales en la zona de transición entre los bosques de coníferas y la selva baja caducifolia, ya que es de las pocas especies de pinos adaptadas a las condiciones climáticas de esa zona de transición en la ladera del sur del Eje Neovolcánico y en la Sierra Madre del Sur en Michoacán (Viveros *et al*, 2005).

Se han establecido extensas plantaciones comerciales de *P. oocarpa* en zonas tropicales y subtropicales de Colombia, Brasil y en varios países de África (Dvorak *et al.*, 2000). A pesar de la gran importancia de *P. oocarpa* en otros países en México recibe una atención marginal (Viveros *et al.*, 2005).

3.2 Micropropagación en coníferas

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 recientemente en la propagación de especies perennes; aunque el proceso es más lento, debido a que los tejidos y órganos más diferenciados son poco sensibles a las condiciones *in vitro* (Magallanes, 1993).

Las técnicas de cultivos de tejidos vegetales son muy útiles para la rápida propagación clonal de genotipos superiores en un período más corto (Chesick, 1991). 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 (Menzies y Aimers-Halliday 2004).

Existen varios trabajos que describen protocolos de propagación *in vitro* de distintas especies de *Pinus* (*P. halepensis*, *P. canariensis*, *P. ayacahuite*, *P. pinea*, *P. heldreichii*, *P. tadea*) (Lambardi *et al.*, 1993; Martínez-Pulido *et al.*, 1994; Saborio *et al.*, 1997; González *et al.*, 1998; Stojicic *et al.*, 1999; Tang y Guo, 2001; Sul y Korban, 2004), sólo se conoce uno referente al cultivo de tejidos en *Pinus oocarpa* (Lara-Chávez, 2011).

En la actualidad, diversas especies de pinos mexicanos se han integrado a los programas de mejoramiento genético (Styles, 1993). Sin embargo, se ha explorado muy poco el uso de las técnicas de propagación clonal que complementen a estos programas y permitan el despliegue masivo de los árboles con genotipos deseables. Dentro de las técnicas de propagación clonal, las técnicas de micropropagación basadas en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, en particular la embriogénesis somática, tienen varias ventajas sobre el enraizamiento de estacas y los injertos (macropropagación). Las ventajas más sobresalientes son, el potencial de superioridad en la propagación, la reducción de los tiempos de multiplicación, la criopreservación del material propagativo, las posibilidades para el desarrollo de semillas

artificiales (embriones encapsulados) y la manipulación genética mediante las técnicas del ADN recombinante (Villalobos y Thorpe, 1991). La micropropagación se puede realizar mediante dos vías: a) la organogénesis y, b) la embriogénesis somática.

3.2.1 Propagación vía organogénesis en *Pinus*

En el caso de las coníferas, la organogénesis es la formación de brotes a partir de las células meristemáticas o de las células somáticas de un explante, los cuales se separan del tejido que los originó para después enraizar (Villalobos y Thorpe, 1991).

Se ha reportado organogénesis en especies de pinos, tales como: *P. palustris* (Sommer *et al.*, 1975, citado por Villalobos y Thorpe, 1991), *P. radiata* (Bergman y Stomp, 1994), *P. ponderosa* (Ellis y Bilderback, 1989), *P. canariensis* (Harry y Thorpe, 1991), *P. pinea* (Moncaleán *et al.*, 2005), y *P. massonianna* (Zhang *et al.*, 2006); en estos estudios la regeneración directa de yemas axilares y adventicia directa es la más reportada, sin embargo también se reporta la regeneración de brotes a partir de tejido indiferenciado, además de la regeneración de plántulas a partir de callos (derivados de protoplastos a partir de semillas de 11 días de edad) para *Pinus oocarpa* (Laine *et al.*, 1988).

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; Gladfelter y Phillips, 1987). De acuerdo a Lambardi *et al.* (1993) y Harry y Thorpe (1994), la ruta organogénica para la regeneración de coníferas involucra las siguientes fases:

- 1) Inducción y desarrollo de yemas adventicias
- 2) Alargamiento de yemas
- 3) Multiplicación de brotes
- 4) Enraizamiento

1) Inducción y desarrollo de yemas adventicias

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, se observó que los embriones de *Pinus elliottii* sobre medio sólido conteniendo citocinina, respondieron a partir de la primera semana (Pérez Bermúdez y Sommer, 1987).

2) Alargamiento de yemas

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).

3) 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 u otras citocininas para probar su habilidad para producir brotes axilares (Lambardi *et al.*, 1993).

4) 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).

3.2.2 Propagación vía embriogénesis somática en *Pinus*

Cuando los embriones no proceden de la fusión de gametos sino que se diferencian a partir de células somáticas, se denomina embriogénesis somática. Los embriones somáticos, al igual que los cigóticos, son capaces de germinar y convertirse en plantas. Las ventajas que proporciona la propagación por embriogénesis somática son la producción de un elevado número de plantas y la posibilidad de crioconservar a largo plazo las líneas embriogénicas, mientras que los árboles correspondientes son evaluados en campo (Merkle y Nairn 2005; Nehra *et al.*, 2005).

La embriogénesis somática (ES) ha sido descrita como la tecnología más prometedora para la propagación clonal a mayor escala de coníferas (Stasolla *et al.*, 2003).

A comienzos del siglo XX, Haberlandt (1902) predijo que si todas las células de un organismo tenían la misma información genética que la célula inicial o cigoto, sería posible revertir su expresión génica, de manera que volvieran a expresar el patrón de desarrollo embriogénico hasta formar auténticos embriones de origen somático. Los primeros trabajos en los que se logró esta expresión de la totipotencia de las células fueron publicados en zanahoria por Levine (1947), Reinert (1958) y Steward (1958). Desde entonces se han desarrollado protocolos para esta vía de regeneración en numerosas especies.

En la familia Pinaceae, se ha descrito la obtención de embriogénesis somática en más de cuarenta especies e híbridos, pertenecientes a cinco géneros (*Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* y *Pseudotsuga*). No obstante, la mayoría de los estudios sobre el desarrollo del proceso se han realizado en *Picea*, particularmente en *P. abies*, *P. glauca*, *P. glauca* x *P. engelmannii*, y *P. mariana*, debido principalmente a la facilidad en la obtención de respuestas

embriogénicas. Además, solo en pocos casos se ha llegado al establecimiento de plantas en vivero o campo.

En coníferas, la embriogénesis somática se describió por primera vez en *Picea abies* (Chalupa, 1985; Hakman *et al.*, 1985) a partir de embriones cigóticos. En el mismo año, se describió la obtención de ES en *Larix decidua* a partir del megagametofito (Nagmani y Bonga, 1985) y en *Pinus radiata* en embriones cigóticos (Smith *et al.*, 1985).

Después del primer trabajo de embriogénesis somática en *P. radiata*, el número de especies del género *Pinus* en los que se ha logrado inducir ES ha ido aumentando. El cuadro 1 muestra los primeros resultados de embriogénesis somática obtenidos en diferentes especies de pinos.

Especie	Explante	RCV (μM)			Respuesta	Referencia
		2,4-D	BA	ABA		
<i>P. radiata</i> D. Don	MG	0.57	-	1.15	ES	Smith <i>et al.</i> , 1985
<i>P. taeda</i> L.	EM	0.05	0.2	-	ES, PL	Gupta y Durzan, 1987
<i>P. elliotii</i> Engelm	EI	9	4.5	9	ES	Jain <i>et al.</i> , 1989
<i>P. strobus</i> L.	EI	9	4.5	38	ES	Finer <i>et al.</i> , 1989
<i>P. nigra</i>	EI	9	2.25	94	ES	Salajová y Salaj., 1992
<i>P. patula</i> Schiede et Deppe	EI	13.5 μM	11	4.9	ES, PL	Jones y van Staden, 1995
<i>P. koraiensis</i> Sieb et Zucc	EI	10	5	-	ES	Bozhkov <i>et al.</i> , 1997
<i>P. banksiana</i> Lamb.	EM	4	4	-	ES, PL	Park <i>et al.</i> , 1999
<i>P. monticola</i> Dougl.	EI	2.25	2.25	120	ES, PL	Percy <i>et al.</i> , 2000
<i>P. roxburghii</i>	EI	10	5	-	ES	Arya <i>et al.</i> ,

Sarg.						2000
<i>P. kesiya</i>	EM	22	4.5	15	ES	Deb y Tandon, 2002
<i>P. brutia</i> Ten.	EI	13.6	2.2	80	ES	Yildirim <i>et al.</i> , 2006
<i>P. armandii</i> Franch.	MG	3	1	100	ES, PL	Maruyama <i>et al.</i> , 2007
<i>P. rigida</i> x <i>P. taeda</i>	EI	13.5	4.4	100	ES, PL	Kim y Moon, 2007

Cuadro 1. Embriogénesis somática en pinos (* ES: embriones somáticos; PL: plantas; EM: embrión maduro; EI: embriones inmaduros; MG: megagametofito; RCV: reguladores de crecimiento vegetal; 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BA: benciladenina; ABA: Ácido abscísico).

El tejido embriogénico de coníferas tiene una morfología diferente a las masas embriogénicas inducidas en angiospermas, se describe como un tejido blanco, translúcido, hidratado y de consistencia mucilaginoso, con un alto grado de organización de células embrión-suspensor (MES) (Gupta y Durzan, 1987).

Estas proliferaciones están constituidas por múltiples embriones en un estado de desarrollo muy inicial, que presentan una cabeza embrionaria con células meristemáticas de citoplasma denso, adherida a una región de células alargadas y altamente vacuoladas que corresponden a las células del suspensor. Estas zonas se diferencian en su afinidad para ser teñidas con acetocarmín y azul de Evans: las células embrionarias se tiñen de rojo mientras que las células vacuoladas del suspensor se tiñen de azul.

La embriogénesis somática consta de una serie de etapas: inducción de la respuesta embriogénica, mantenimiento y proliferación de las masas embriogénicas, maduración de los embriones somáticos, germinación y conversión de los embriones en plantas.

Fases de la Embriogénesis Somática:

a) Inducción de la respuesta embriogénica

Debido a que las células somáticas contienen toda la información genética necesaria para crear un organismo completo y funcional, la inducción de

embriogénesis somática se basaría en la reprogramación de un patrón de expresión somático hacia un patrón de expresión embriogénico.

Se ha descrito que las condiciones de cultivo, la inclusión de reguladores del crecimiento vegetal y el estrés provocado por el cultivo, juegan un papel importante en la reprogramación del patrón de expresión génica (von Arnold *et al.*, 2002; Fehér *et al.*, 2003). El requerimiento de reguladores como las auxinas y las citocininas en la iniciación de las respuestas embriogénicas, vendría determinado por el tipo de explante inicial y su grado de desarrollo (von Arnold *et al.*, 2002). La selección adecuada de los explantes es crítica para conseguir con éxito la inducción de embriogénesis somática (Taurus *et al.*, 1991), asumiéndose que la posibilidad de obtener la respuesta disminuye con la edad ontogénica del explante (Lelu *et al.*, 1987).

Los componentes del medio nutritivo y las condiciones de cultivo también influyen en la respuesta embriogénica. En coníferas, los medios de cultivo más utilizados son: DCR (Gupta y Durzan, 1985); BM3 (Gupta y Durzan, 1985), MSG (Becwar *et al.*, 1990); P6 (Teasdale *et al.*, 1986) modificado por Pullman y Johnson (2002) y denominado 505; WV5 (Coke, 1996); LV (Litvay *et al.*, 1985) modificado por Klimaszewska *et al.* (2001) y denominado mLv; LP (Lepoivre modificado por Aitken-Christie, 1984); y VE (von Arnold y Eriksson, 1981).

Estos medios pueden suplementarse con fuentes de nitrógeno orgánico (L-glutamina, hidrolizado de caseína o mezcla de diferentes aminoácidos), reguladores del crecimiento vegetal (RCV), y otros aditivos como carbón activo (CA), nitrato de plata, biotina, ácido fólico, inhibidores de giberelinas, ácidos orgánicos o vitaminas E y B12 (Klimaszewska *et al.*, 2007; Pullman y Johnson, 2002; Pullman *et al.*, 2003, 2005, 2006; Toering y Pullman, 2005).

Los reguladores del crecimiento empleados normalmente son las auxinas 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y ANA (ácido 1-naftalenacético), y la citocinina BAP (6-bencilaminopurina), aunque existen reportes en los que se ha empleado otro tipo de reguladores como el ácido abscísico (ABA) (Pullman *et al.*, 2003).

b) Proliferación y mantenimiento de las masas embriogénicas

Una vez que se ha iniciado la respuesta embriogénica, las masas de embriones somáticos se transfieren a medio de cultivo fresco para su proliferación, con diversas frecuencias según autores. El medio de cultivo de proliferación puede tener la misma composición que el medio de iniciación o variar su composición, reduciéndose a menudo la concentración de auxinas y citocininas. Generalmente la frecuencia del subcultivo del material embriogénico se realiza generalmente cada dos semanas, se mantienen los cultivos en oscuridad a 23-25 °C.

Las masas embriogénicas se caracterizan atendiendo a diferentes morfotipos en función del número de agregados celulares presentes en las masas, las estructuras embrionarias que muestran, y el desarrollo y organización de los suspensores (Ramarosandratana *et al.*, 2001; Breton *et al.*, 2005). Se distinguen tres morfotipos: el liso, como masas con cabezas embrionarias poco desarrolladas; el granular, como masas nodulares con embriones con cabezas más desarrolladas y suspensores cortos y gruesos; el picudo, como masas con embriones con cabezas desarrolladas y suspensores largos y gruesos; definiéndose también morfotipos intermedios (Breton *et al.*, 2002).

El desarrollo de estos morfotipos parece depender del genotipo, aunque en ocasiones pueden observarse cambios no controlados de morfotipo en determinados genotipos a lo largo del cultivo. Se ha observado que el subcultivo prolongado de los tejidos embriogénicos puede ocasionar la pérdida de su capacidad embriogénica (Breton *et al.*, 2006), generar variaciones somaclonales (cambios genéticos o epigenéticos) (Berlyn *et al.*, 1986, Fourré *et al.*, 1997; Tremblay *et al.*, 1999), afectar la integridad del embrión durante el desarrollo, además del riesgo de perder los cultivos por contaminación. Una solución a estos problemas se consigue con la crioconservación del material nada más al iniciarse la respuesta embriogénica (Cyr, 2000; Hägman *et al.*, 2000).

c) Maduración de embriones somáticos

Durante la maduración, los embriones somáticos experimentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, entre los que se desatacan el equilibrio

hormonal, el almacenamiento de sustancias de reserva y la adquisición de la tolerancia a la desecación (von Arnold *et al.*, 2002).

El desarrollo de los embriones cigóticos y los somáticos, se diferencia principalmente por las condiciones ambientales impuestas durante su desarrollo. Mientras que en la semilla los embriones cigóticos se desarrollan en el interior del tejido materno, los embriones somáticos crecen aislados de estas estructuras estando sujetos a las condiciones impuestas por el cultivo. El ambiente físico como el químico dentro de la semilla afecta al crecimiento y desarrollo de los embriones cigóticos (Yeung, 1995). Por el contrario, el ambiente en el que los embriones somáticos se desarrollan no es el óptimo para su desarrollo, teniendo esto que ver con la baja frecuencia de conversión y la baja calidad de los embriones observada en muchas especies. Por lo que, es importante reproducir *in vitro* las características únicas del ambiente *in ovulo*, la composición hormonal y la osmolaridad, lo que resulta la formulación de medios de maduración adecuados para mejorar el desarrollo de los embriones (Yeung, 1995).

El desarrollo de los embriones en coníferas se inicia con la parada de la capacidad proliferativa celular, mediante la retirada de auxinas y citocininas del medio de cultivo y la aplicación de ABA (Stasolla *et al.*, 2002). La proliferación excesiva del tejido embriogénico durante los tratamientos de maduración es el principal impedimento para que se complete la diferenciación de los embriones somáticos (Lelu *et al.*, 1999; Harvengt, 2005).

Otra alternativa para estimular la maduración de embriones es restringir la disponibilidad de agua y nutrientes en los cultivos embriogénicos, la cual, se basa en el incremento de la concentración del agente gelificante, determinando un aumento de la dureza del gel. En embriogénesis somática se utilizan normalmente dos tipos de agentes gelificantes en los medios de cultivo: "gellan gum" (Gerlite o Phytigel™) y agar (Klimaszewska y Smith, 1997).

La reducción del contenido de agua celular mediante la desecación parcial también facilita la maduración. Se ha descrito que con la desecación parcial de callos embriogénicos de arroz se mejoraban las tasas de maduración y

regeneración (Rancé *et al.*, 1994). En *Pinus patula*, la desecación parcial de las masas embriogénicas hasta un contenido en humedad relativa del 47% producía un incremento en el número de embriones somáticos obtenido (Malabadi y van Staden, 2005) y en *Pinus kesiya*, con el mismo método, la reducción en el contenido de humedad hasta el 52% también originaba este incremento (Malabadi *et al.*, 2004). Se ha observado que el estrés causado por la ausencia de nutrientes puede ejercer un efecto regulador en el desarrollo de los embriones somáticos (Fernández-Guijarro *et al.*, 1994; von Aderkas y Bonga, 2000).

d) Germinación de embriones

La embriogénesis somática es un proceso complejo, en el que la calidad, la supervivencia y el crecimiento de las plantas somáticas regeneradas dependen de las condiciones utilizadas en las fases anteriores. Solamente los embriones somáticos maduros con morfología normal, con suficientes sustancias de reserva acumuladas y que hayan adquirido tolerancia a la desecación, podrán germinar y convertirse en plantas con éxito. La germinación conlleva el desarrollo coordinado del tallo y la raíz, mientras que la conversión se refiere a la supervivencia de las plántulas germinadas en condiciones *ex vitro* (von Arnold *et al.*, 2002).

3.3 HIPÓTESIS

Los embriones cigóticos maduros e inmaduros de *Pinus oocarpa* son explantes que permiten la propagación de la especie mediante el cultivo *in vitro* de tejidos, y es el balance hormonal el que determina la respuesta morfogénica para la micropropagación.

- Para la regeneración vía embriogénesis las concentraciones altas de auxinas en combinación con bajas en citocininas inducirán las mejores tasas de inducción de tejido embriogénico.
- En la regeneración vía organogénesis las concentraciones altas de citocininas en combinación con bajas y/o ausencia de auxinas producirán las mejores tasas de inducción de brotes.

3.4 JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia que tiene la especie en su ambiente natural, y al gran uso comercial de su madera (resina y derivados), el lograr establecer sistemas de propagación clonal de genotipos superiores, permitirá avanzar considerablemente en el mejoramiento genético de plantaciones forestales.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer una metodología de propagación clonal vía organogénesis y/o embriogénesis somática de *Pinus oocarpa* empleando embriones cigóticos maduros e inmaduros como explantes, respectivamente.

Objetivos particulares:

Experimento vía Organogénesis

- Determinar las concentraciones de reguladores del crecimiento que favorezcan la mejor tasa de inducción de brotes a partir embriones cigóticos maduros.
- Evaluar el efecto del medio de cultivo DCR a concentraciones media y completa de macro y micronutrientes, en las fases de inducción y elongación de brotes
- Determinar las concentraciones de auxinas y citocininas que favorezcan el enraizamiento de los brotes vía organogénesis.

Experimento vía embriogénesis somática

- Determinar las concentraciones de reguladores del crecimiento vegetal que favorezcan la inducción de tejido embrionario con capacidad regenerativa a partir de embriones cigóticos inmaduros.
- Efecto del uso del como explantes del megagametofito completo y a la mitad en la inducción de callo.
- Determinar la histología del callo proembriogénico.
- Evaluar la tasa de crecimiento de callo en la fase de proliferación

CAPÍTULO I

MORFOGENÉISIS *in vitro* DE CALLO A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS INMADUROS DE *Pinus oocarpa* SCHIEDE EX SCHLTDL.

***In vitro* MORPHOGENESIS OF CALLUS FROM IMMATURE ZYGOTIC EMBRYOS OF *Pinus oocarpa* SCHIEDE EX SCHLTDL.**

**Abarca Liera Adriana¹, Sáenz Romero Cuauhtémoc¹, Pedraza
Santos Martha E²., Delgado Valerio Patricia², Chávez Ávila Víctor M.³ y
Martínez Palacios Alejandro¹**

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, UMSNH. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México.

²Facultad de Agrobiología, UMSNH, Uruapan, Michoacán, México. Paseo Gral. Lázaro Cárdenas y Berlín S/N, Colonia Viveros, C.P. 60170, Uruapan, Michoacán.

³Jardín Botánico, IB-UNAM. 04510 Distrito Federal, México.

adrixliera@gmail.com, alejmtzpalacios@gmail.com

RESUMEN

En este capítulo se reporta la inducción de callo embriogénico a partir, de embriones cigóticos inmaduros de *Pinus oocarpa*. Para la inducción se emplearon como explantes el megagametofito completo y a la mitad, en el medio de cultivo 1250 con reguladores de crecimiento vegetal (4.52 mg l⁻¹ 2, 4-D, 4.44 mg l⁻¹ BA, 4.65 mg l⁻¹ KIN, 3.78 mg l⁻¹ ABA). El megagametofito completo presentó mayor porcentaje de extrusión (63 %), desarrollo de callo y número de extrusiones (46 %), la extrusión es considerada cuando uno o más embriones cigóticos salen del megagametofito. El callo obtenido fue identificado como tejido no embrionario, debido a que presenta células muy diferenciadas. La mayor tasa de crecimiento de callo generado de la extrusión (57.68%), se presentó en el megagametofito completo ($y = 0.075$).

Palabras clave: Megagametofito, embriogénesis somática, *Pinus oocarpa*, extrusión.

ABSTRACT

In this chapter the induction of embryogenic callus from reports, immature zygotic embryos of *Pinus oocarpa*. For induction were used as explants full and half megagametophyte in 1250 medium with plant growth regulators (4.52 mg l⁻¹ 2, 4-D, 4.44 mg l⁻¹ BA, 4.65 mg l⁻¹ KIN, 3.78 mg l⁻¹ ABA). Full megagametophyte extrusion rate was higher (63%), callus development and number of extrusions (46%), the extrusion is considered when one or more out of the megagametophyte zygotic embryos. The callus obtained was identified as non-embryonic tissue, since it has very differentiated cells. The highest rate of callus growth generated extrusion (57.68%), was presented in full megagametophyte ($y = 0.075$).

Keywords: Megagametophyte, somatic embryogenesis, *Pinus oocarpa* extrusion.

INTRODUCCIÓN

Los bosques ocupan actualmente unos 4,000 millones de hectáreas, que representan cerca del 31 % de la superficie del planeta (FAO, 2010). El género *Pinus* destaca entre las especies forestales porque en este género se sustenta la industria forestal (FAO, 2012). En la actualidad, la biotecnología proporciona nuevas herramientas, añadidas a las convencionales, para la mejora genética de especies forestales; entre estas herramientas se encuentra la embriogénesis somática que ocurre bajo condiciones *in vitro*. El proceso de embriogénesis somática puede producir un gran número de embriones cigóticos y plantas a partir de una semilla; por lo tanto, es un medio de propagación clonal de masa (Klimaszewska *et al.*, 2007).

La selección adecuada de los explantes crítica para tener éxito en la inducción de embriones somáticos (Tautorus *et al.*, 1991), porque se asume que la posibilidad de obtener la respuesta disminuye con la edad ontogénica del explanto (Lelu *et al.*, 1987). Generalmente, para la iniciación de embriogénesis somática en coníferas se utilizan como explantos las semillas inmaduras, cuando el embrión cigótico dominante está en un estado de desarrollo precotiledonar y aún quedan embriones subordinados, esto es cuando ha transcurrido entre 3-6 semanas después de la fecundación (Becwar *et al.*, 1990).

El requerimiento de reguladores como las auxinas y las citocininas en la iniciación de las respuestas embriogénicas, vendría determinado por el tipo de explanto inicial y su grado de desarrollo (von Arnold *et al.*, 2002). La selección adecuada de los explantos es crítica para conseguir con éxito la inducción de embriogénesis somática (Tautorus *et al.*, 1991). Los embriones cigóticos inmaduros son los explantos donde se ha registrado una mayor respuesta a la inducción de embriogénesis somática en *Pinus*, *Larix* y *Pseudotsuga* (Tautorus *et al.*, 1991; Attree y Fowke, 1993; Bonga *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 2005; Jasik *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999; Klimaszewska y Cyr, 2002), en embriones cigóticos maduros se han obtenido frecuencias menores.

Los componentes del medio nutritivo y las condiciones de cultivo también influyen en la respuesta embriogénica. En coníferas, los medios de cultivo más utilizados se basan en las siguientes formulaciones: DCR (Gupta y Durzan,

1985); BM3 (Gupta y Durzan, 1985), MSG (Becwar *et al.*, 1990); P6 (Teasdale *et al.*, 1986) modificado por Pullman y Johnson (2002) y denominado 505; WV5 (Coke, 1996); LV (Litvay *et al.*, 1985) modificado por Klimaszewska *et al.*, (2001) y denominado mLv; LP (Lepoivre mod. por Aitken-Christie, 1984); y VE (von Arnold y Eriksson, 1981). En coníferas, generalmente, se utilizan medios de cultivo sólidos para la iniciación de cultivos embriogénicos siendo el agente gelificante más utilizado el “gellan gum”, aunque algunos autores han iniciado respuestas embriogénicas en medios de cultivo líquidos (van Winkle y Pullman, 2005; Pullman y Skryabina, 2007). Los reguladores del crecimiento empleados normalmente son las auxinas 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y NAA (ácido 1-naftalenacético), y la citoquinina BAP (6- bencilaminopurina), aunque existen trabajos en los que se ha empleado otro tipo de reguladores como el CPPU (N-(2-cloro-4-piridil)-N'-fenilurea) (Park *et al.*, 2006), TDZ (Guevin y Kirby, 1997), brasinoesteroides (Pullman *et al.*, 2003a) e incluso ABA (Pullman *et al.*, 2003b).

Para especies de pinos distribuidos en México, existe escaso conocimiento sobre el tema, solo se han reportado la inducción de masas de tejido en 5 especies (*P. taeda*, *P. radiata*, *P. patula*, *P. pseudostrobus* y *P. oocarpa*). Por lo que es necesario realizar estudios en especies de importancia ecológica y económica como *P. oocarpa* ya que es una de las especies más usadas para la producción de madera y obtención de resinas. Por lo anterior, en el presente trabajo se planteo como objetivo determinar la respuesta morfogenética *in vitro* en embriones cigóticos inmaduros *Pinus oocarpa* Schiede ex Schldl.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y desinfección de explantes. La colecta de conos inmaduros de *Pinus oocarpa* Shiede ex Schldl se realizó a principios de Febrero del 2013 en la localidad de Tumbisca, Municipio de Morelia, Michoacán. Estos conos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 50% con 2 gotas de Tween 20 por cada 100 ml de solución durante 15 minutos, después se colocaron en etanol al 70% durante 15 minutos. Posteriormente se realizaron cuatro lavados en agua destilada estéril, se extrajeron las semillas y fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2.5% y cinco gotas de Tween

20 por cada 100 ml de solución durante 5 minutos. Después se sumergieron en etanol al 70% durante 1-2 minutos; en cada inmersión se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Los megagametofitos fueron aislados y colocados en el medio de iniciación, bajo condiciones asépticas de acuerdo con el sistema reportado por Lara-Chávez *et al* (2011).

Inducción de masas de tejido. Se evaluó la respuesta para la formación de masas de tejido a partir de los megagametofitos completos y megagametofitos a la mitad, en el medio 1250 con reguladores de crecimiento vegetal [4.52 mg l⁻¹ de 2, 4-D, 4.44 mg l⁻¹ de BA, 4.65 mg l⁻¹ de KIN y 3.78 mg l⁻¹ de ABA] como iniciador de generación de callo embriogénico (Pullman *et al.*, 2006), solidificado con Phytigel al 0.3% (Lara-Chávez *et al.*, 2011). Cada condición del explante megagametofito completo y a la mitad, consistió de 3 repeticiones, la repetición fue una caja de Petri (de 100 x 15 mm con 25ml de medio de cultivo y 8 explantes). Los cultivos se subcultivaron cada 10 días. Se registró el número y porcentaje de extrusión (el embrión cigótico inmaduro es visible en el megagametofito) y tejido del callo, durante 5 semanas.

Fijación y corte de tejidos. Se seleccionaron callos de 50 mg del megagametofito completo y a la mitad a las 12 semanas de subcultivo; y se conservaron en FAA (formalina: ácido acético: etanol y agua en proporción 10:5:50:35 v/v), luego se lavaron tres veces con agua de la llave y se deshidrataron en un cambiador automático de soluciones (marca Fisher) programado para hacer los cambios cada ocho horas. La deshidratación se inició con Cellosolve® 50 % (un cambio), 100% (cuatro cambios) y xileno (cuatro cambios); inmediatamente después, se incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes anatómicos de 10 µm en el micrótopo rotatorio (American Optical) y se montaron sobre portaobjetos con adhesivo de gelatina (0.5 g de gelatina+ 0.1g de fenol+ 0.05 g de alumbre de cromo+ 100 ml de agua destilada). Para extender los tejidos, los portaobjetos se colocaron sobre una platina a 55 °C y se escurrió el exceso del adhesivo de gelatina. Los tejidos se tiñeron con safranina y verde fijo. Las preparaciones se montaron con resina, se les colocó un cubreobjetos y se secaron en la estufa a 52 °C. Los cortes se observaron en microscopio óptico (Leica) y las imágenes se registraron en fotomicrografías para su interpretación.

Proliferación del callo. Los callos generados fueron separados del explante y transferidos a medio de cultivo 1250 con reguladores de crecimiento vegetal [0.55 mg l⁻¹ 2,4-D, 0.22 mg l⁻¹ BA, 0.21 mg l⁻¹ KIN, 0.66 mg l⁻¹ ABA] adicionado con los antioxidantes ácido cítrico (0.15 g l⁻¹), ácido ascórbico (0.15 g l⁻¹), y ácido fólico (0.25 mg l⁻¹) (Pullman *et al.*, 2006; Lara-Chávez *et al.*, 2011), realizándose subcultivos en intervalos de 10 días, se mantuvieron en la oscuridad con una temperatura de 25°C ± 2.

Análisis estadísticos. Para evaluar la respuesta de extrusión e iniciación de “callo”, se realizó un Anova de una vía, las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos fue determinado por la prueba de Tukey ($p < 0.05$). La tasa de crecimiento de “callo” fue evaluada mediante el siguiente modelo de regresión lineal: $y=mx+b$. En donde: y =media de la subpoblación, m =pendiente, x = valor, y b = punto de origen. Los análisis estadísticos se realizaron en el Programa R 3.0.2.

RESULTADOS

Inducción de masas de callo. La extrusión inició a partir de la cuarta semana del cultivo de los explantes (Fig. 1A, 1B), la multiplicación de callo se registró en la octava semana (Fig. 1C). Se evaluó la extrusión y desarrollo de callo de los explantes en el medio 1250 (Cuadro 1).

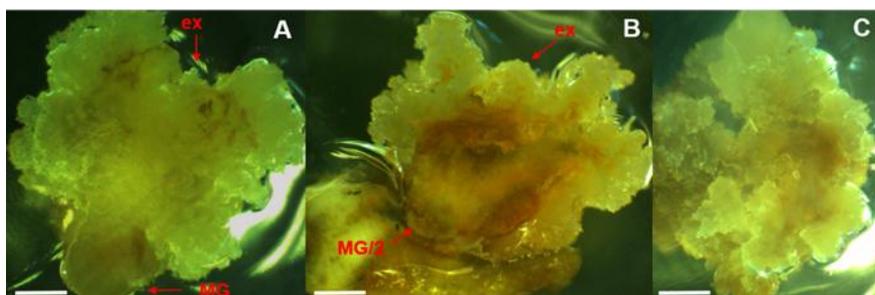


Figura 1. Extrusión del megagametofito completo (A), y megagametofito a la mitad (B), multiplicación de callo (C); a partir del embrión cigótico inmaduro en el medio de cultivo 1250 (C=2.2 mg l⁻¹ 2, 4-D, 0.9 mg l⁻¹ BA, 0.84 mg l⁻¹ KIN y 2.64 mg l⁻¹ ABA). Extrusión (ex); megagametofito (MG). Barra= 1 mm.

Explante	No. explantes	Extrusión		Desarrollo de callo	
		Número	% basado en No. explantes	Número	% basado en No. extrusiones
MG	100	63	63*	29	46*
MG/2	162	37	22.8	9	39.5

Cuadro 1. Número y porcentaje de extrusión e iniciación de callo generado en la inducción de embriogénesis somática en los explantes en *P. oocarpa*. * $p=0.009$.

Los resultados muestran que hay diferencia significativa en el tipo de explante, con el megagametofito completo el porcentaje de extrusión aumentó casi tres veces y el desarrollo del callo aumentó en 6.5 %, en contraste con el uso del megagametofito a la mitad ($p=0.009$) (Cuadro 1).

Identificación del tejido. Durante el examen histológico de los callos, se observó un gradiente de diferenciación de las células que lo componen; las células de la periferia, de parénquima, isodiamétricas, de paredes celulares primarias, en división activa. Las células del centro de la masa de callo, con paredes celulares secundarias, lignificadas, con abundante formación de elementos de vaso y presencia de fibras agrupadas en haces (Fig. 2).

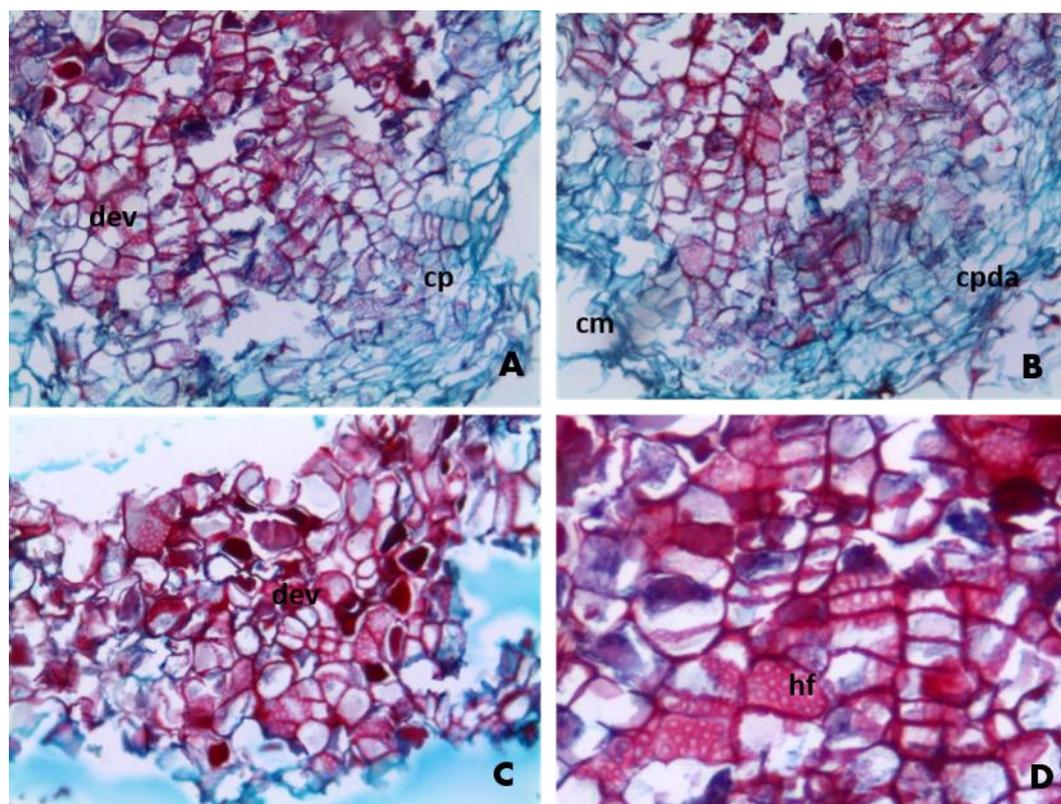


Figura 2. Histología de callos de *Pinus oocarpa* generados a partir de embriones cigóticos inmaduros. A) y B) Callo de 12 semanas después del establecimiento del subcultivo. C) Células de parénquima en diferenciación. D) Presencia de fibras. cp= células de parénquima; cpda= células de parénquima en división activa; dev= diferenciación de elementos de vaso; hf= haces de fibras dentro del tejido calloso; cm=capa de mucílago.

Proliferación del callo. El subcultivo de iniciación de callo generado en extrusión, al ser subcultivado en medio 1250 con fitoreguladores [0.55 mg l⁻¹ 2,4-D, 0.22 mg l⁻¹ BA, 0.21 mg l⁻¹ KIN, 0.66 mg l⁻¹ ABA] indujo la mejor respuesta (57.68%) de crecimiento de callo en el explante de megagametofito completo, en contraste con el MG/2, $y = 0.075$ (Fig. 3).

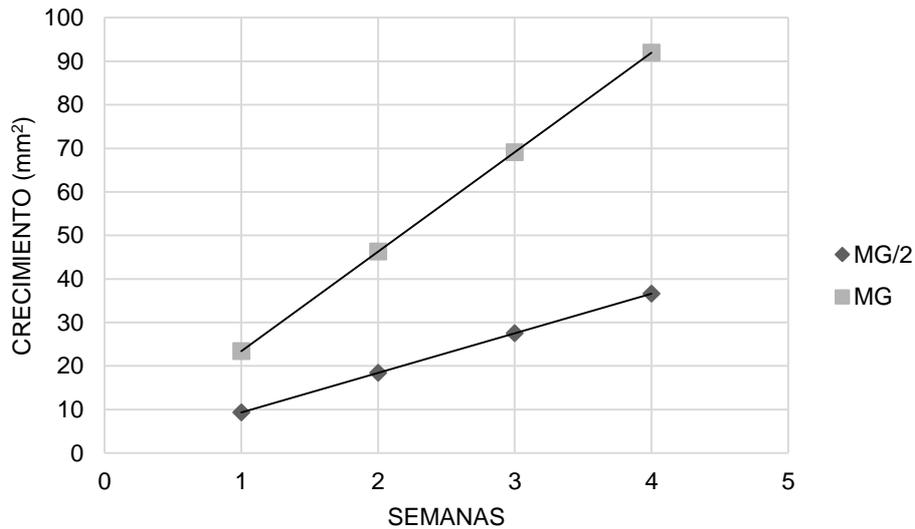


Figura 3. Tasa de crecimiento de callo de *Pinus oocarpa* a partir del megagametofito completo (MG) y megagametofito a la mitad (MG/2) en el medio 1250 (0.55 mg l⁻¹ 2, 4-D, 0.22 mg l⁻¹ BA, 0.21 mg l⁻¹ KIN, 0.66 mg l⁻¹ ABA). Regresión lineal: Modelo $y=mx+b$, $y = 0.075$.

DISCUSIÓN

Inducción de masas de callo. Los resultados de este trabajo son mayores (46%) en especies de pinos ya descritos en respuestas en la inducción de masas de callo, tales como *Pinus pinaster* en medio DCR (20.1% respuesta de desarrollo de callo) (Miguel *et al.*, 2004) y *P. nigra* en el medio DCR con 0.5 mg l⁻¹ de ANA y 2 mg l⁻¹ de BA (26.53%) (Salajová y Salaj, 2005). En *Pinus taeda* (53.4%) en medio 505 con 1mg l⁻¹ ABA, 2 mg l⁻¹ de ANA, 0.55 mg l⁻¹ de BA y 0.53 mg l⁻¹ de KIN (Pullman y Johnson, 2002), *P. strobus* en medio DCR (35%), *P. monticola* y *P. brutia* en medio DCR (11.6%) (Yildirim *et al.*, 2006). Todos ellos llegan a la conclusión que las diferencias en las frecuencias de iniciación de masas embriogénicas se debieron a compuestos estimuladores producidos por el megagametofito femenino (Pullman y Johnson, 2002; Klimaszewska *et al.*, 2001). En *Pinus oocarpa*, es posible inducir callo proembriogénico con el método que se empleó en este trabajo, aunque el tiempo de inducción de callo fue un poco mayor, en comparación con la respuesta de inducción de callo con las especies de pino ya descritas anteriormente.

Identificación del tejido. Las fotomicrografías de cultivos de callos de *Pinus oocarpa* mostraron, que se trata de callos muy diferenciados en donde es difícil que se logre regeneración de embriones somáticos, sólo es factible a partir de las células de parénquima de la periferia que se encuentran en división, aunque no se observa una protodermis definida. Sin embargo, se notó una capa de mucílago que protege la superficie del callo. Se ha hipotetizado acerca de la posible función de esta capa de mucílago en la integración y reconocimiento de células morfogénicas. En varias plantas cultivadas *in vitro* este mucílago está compuesto de pectinas que pueden tener una función en la adhesión de célula a célula (Popielarska *et al.*, 2006).

Para la mayoría de las especies de pinos, la iniciación de embriones somáticos está restringida y limitada a embriones cigóticos inmaduros (Stasolla y Yeung, 2003; Salajová y Salaj, 2005; Carneros, 2009). Aunque la mayoría de las extrusiones a partir del megagametofito podían establecerse como líneas embriogénicas en algunas especies (Miguel *et al.*, 2004; Salajová y Salaj, 2005), en otras se observaron diferencias entre las frecuencias de extrusión e iniciación de embriogénesis somática (Percy *et al.*, 2000; Pullman y Johnson,

2002). La extrusión es necesaria para la iniciación de embriogénesis somática. En *P. taeda*, 0.01% de las extrusiones originaron líneas embriogénicas (MacKay *et al.*, 2006). Frecuentemente, las masas embriogénicas iniciadas pierden su capacidad proliferativa con el tiempo en cultivo; por lo tanto, hay que diferenciar entre la extrusión inicial y el crecimiento continuo en el tiempo de las masas extruídas (Becwar y Pullman, 1995).

Proliferación del callo. El medio de cultivo de proliferación puede tener la misma composición que el medio de iniciación o variar su composición, reduciéndose a menudo la concentración de auxinas y citocininas. La frecuencia del subcultivo del material embriogénico se realiza generalmente cada dos semanas, manteniéndose los cultivos en oscuridad a 23-25°C.

Se ha observado que el subcultivo prolongado de los tejidos embriogénicos puede ocasionar la pérdida de su capacidad embriogénica (Breton *et al.*, 2006), afectar la integridad del embrión durante el desarrollo, además del riesgo de perder los cultivos por contaminación. Una solución a estos problemas se consigue con la crioconservación del material al iniciarse la respuesta embriogénica (Cyr, 2000; Hägman *et al.*, 2000).

Los ensayos basados en la composición de los medios no fueron lo suficientemente amplios como para llegar a conclusiones acerca de su efecto en la iniciación de líneas embriogénicas. Aunque algunos estudios destacan que la composición del medio nutritivo no es determinante para la obtención de embriones somáticos en algunas coníferas (Li *et al.*, 1998; Miguel *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

Se demostró que el megagametofito completo extraído a partir del embrión cigótico inmaduro de *Pinus oocarpa* tiene el potencial regenerativo, para producir callo y posteriormente embriones somáticos, a partir de las células del parénquima de la periferia que se encuentran en división. Sin embargo, la especie mostró un comportamiento recalcitrante en la fase de proliferación de callo y ninguna masa de tejido pudo establecerse como línea embriogénica.

LITERATURA CITADA

- Aitken-Christie, J. 1984.** Clonal propagation: gymnosperms. En: Vasil, I. K. (Ed.) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol 1. Academic Press, Orlando, Fla. USA. 82-95 pp.
- Attree, S. M., and L. Fowke. 1993.** Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 35: 1-35.
- Becwar, M. R. and G. S. Pullman. 1995.** Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) En: Jain, S., P. K. Gupta, R. J. Newton (Ed.) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 287-301 pp.
- Becwar M. R., R. Nagmani and S. R. Wann. 1990.** Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). Can. J. For. Res. 20: 810-817.
- Bonga, J. M., K. Klimaszewska, M. A. Leluand, and P. von Aderkas. 1995.** Somatic embryogenesis in *Larix*. En: Jain, S., P. K. Gupta, R. J. Newton (Ed.) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Netherlands. 315-340 pp.
- Carneros E. 2009.** Embriogénesis somática de pino piñonero (*Pinus pinea* L). Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá, España. 274 pp.
- Coke, J. E. 1996.** Basal nutrient medium for *in vitro* cultures of loblolly pine. US Patent 6117678.
- Cyr, D. 2000.** Cryopreservation: roles in clonal propagation and germplasm conservation of conifers. En: Engelmann, F., H. Takagi (Ed.) Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Japan International Research Centre for Agricultural Sciences. Tsukuba/International Plant Genetic Resources Institute. Rome. 261-268 pp.
- FAO. 2010.** Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010: informe nacional México. Departamento Forestal-FAO. Roma, Italia. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/013/al567S/al567S.pdf>. (Accesada en Junio de 2010).

- FAO. 2012.** Situación de los bosques del mundo. Roma. <http://www.fao.org/docrep/016/i3010s/i3010s.pdf>. (Accesada en Junio de 2012).
- González, M. V., M. Rey, R. Tavazza, S. La Malva, L. Cuozzo, and G. Ancora. 1998.** *In vitro* adventitious shoot formation on cotyledons of *Pinus pinea*. HortScience 33: 749-750.
- Guevin, T. G., and E. G. Kirby. 1997.** Induction of embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies fraseri* (Pursh) Poir. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 49: 219-222.
- 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.
- Gupta P. K., R. Timmisand, and D. Holmstrom. 2005.** Cryopreservation of embryonal cells. En: Jain, S. M., P. K. Gupta (Ed.) Forestry Sciences. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. 77: 567-572 pp.
- Hägman, H., T. Aronen and L. Rynänen. 2000.** Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers. En: Jain, S. M., P. K. Gupta, R. J. Newton (Ed.) Somatic embryogenesis in Woody plants. Vol 6. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 707-728 pp.
- Klimaszewska, K., Y-S Park, C. Overton, I. MacEacheron, and J. M. Bonga. 2001.** Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 37: 392-399.
- Klimaszewska K., J-F Trontin, M. R. Becwar, C. Devillard, Y-S Park, and M. A. Walter. 2007.** Recent Progress in Somatic Embryogenesis of Four *Pinus* spp. Tree and For. Sci. Biotechnol. 1:11-25.
- Lara-Chávez A., B. Flinn, and U. Egertsdotter. 2011.** Initiation of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of Oocarpa pine (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schlechtendal). Tree Physiology 31: 539-554.
- Lelu M. A., M. Boulay and Y. Arnaud. 1987.** Obtention de cals embryogenes a partir de cotylédons de *Picea abies* (L.) Karst. Prélèvés sur the jeunes plantes âgées de 3 a 7 après germination. C. R. Acad. Sci. Paris 305 (III): 105-109.
- Li, X., F. Huang and E. Gbur. 1998.** Effect of basal medium, growth regulators and phytigel concentration of embryogenic cultures from immature

- zygotic embryos of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Plant Cell Rep. 17: 298-301.
- Litvay, J. D., D. C. Verma and M. A. Johnson. 1985.** Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell Rep. 4: 325-328.
- MacKay J. J., M. R. Becwar, Y-S Park, J. P. Cordero and G. S. Pullman. 2006.** Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding. Tree Genetics & Genomes 2: 1-9.
- Martínez-Pulido, C., I. S. Harry and T. A. Thorpe. 1994.** Effect of various bud induction treatments on elongation and rooting of adventitious shoots of Canary Island pine (*Pinus canariensis*). Plant Cell Tissue Organ Cult 29:247-255.
- Miguel C., S. Gonçalves, S. Tereso, L. Marum, J. Maroco and M. Oliveira. 2004.** Somatic embryogenesis from 20 open-pollinated families of Portuguese plus trees of maritime pine. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 76: 121-130.
- Park, Y-S., M. A. Lelu-Walter, L. Harvengt, J. F. Trontin, I. MacEacheron, K. Klimaszewska and J. M. Bonga. 2006.** Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 86: 87-101.
- Percy R. E., K. Klimaszewska and D. R. Cyr .2000.** Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine. Can. J. For. Res. 30: 1867-1876.
- Popielarska, M., H. Ślesak and G. Góralski. 2006.** Histological and sem studies on organogenesis in endosperm-derived callus of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward). Acta Biol. Cracoviensa. 48/2: 97-104.
- Pullman, G. S. and A. Skryabina. 2007.** Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. Plant Cell Rep. 26: 873-887.
- Pullman G. S., R. Chopra and K-M Chase. 2006.** Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: improvements in embryogenic tissue

initiation by supplementation of medium with organic acids, vitamins B12 and E. *Plant Sci.* 170: 648-658.

Pullman, G. S., S. Johnson, G. Peter, J. Cairney and N. Xu. 2003a. Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination and gene expression. *Plant Cell Rep.* 21: 747-758.

Pullman, G. S., K. Namjoshi and Y. Zhang. 2003b. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): Improving culture initiation with abscisic acid, silver nitrate, and cytokinins adjustments. *Plant Cell Rep.* 22: 85-95.

Pullman G. S., and S. Johnson. 2002. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation rates. *An. For. Sci.* 59: 663-668.

Saborio, F., W. S. Dvorak, J. K. Donahue and T. Thorpe. 1997. *In vitro* regeneration of plantlets from mature embryos of *Pinus ayacahuite*. *Tree Physiol* 17:787-796.

Salajová T. and J. Salaj. 2005. Somatic embryogenesis in *Pinus nigra*: embryogenic tissue initiation, maturation and regeneration ability of established cell lines. *Biol. Plant.* 49:333-339.

Stasolla C. and E. C. Yeung. 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue Organ Culture.* 74: 15-35.

Stojičić, D., S. Budimir and L. Čulafić. 1999. Micropropagation of *Pinus heldreichii*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 59:147-150.

Tautorus T. E., L. C. Fowke and D. I. Dunstan. 1991. Somatic embryogenesis in conifers. *Can. J. Bot.* 69: 1873-1899.

Teasdale, R. D., P. A. Dawson and H. W. Woolhouse. 1986. Mineral nutrient requirements of a loblolly pine (*Pinus taeda*) cell suspension culture. *Plant Physiol.* 82: 942-945.

van Winkle, S. C. and G. S. Pullman. 2005. Achieving desired plant growth regulator levels in liquid plant tissue culture media that include activated carbon. *Plant Cell Rep.* 24: 201- 208.

von Arnold, S., and T. Eriksson. 1981. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.* 59: 870-874.

- von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok, and L. Filonova. 2002.** Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69: 233-249.
- Yildirim, T., Z. Kaya, and K. Işik. 2006.** Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* Ten. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 87: 67-76.

CAPÍTULO II

INDUCCIÓN *in vitro* DE BROTES A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS MADUROS DE *Pinus oocarpa* SCHIEDE EX SCHLTDL.

In vitro SHOOT INDUCTION FROM MATURE ZYGOTIC EMBRYOS OF *Pinus oocarpa* SCHIEDE EX SCHLTDL.

Abarca Liera Adriana¹, Sáenz Romero Cuauhtémoc¹, Pedraza Santos Martha E.², Delgado Valerio Patricia², Chávez Ávila Víctor M³ y Martínez Palacios Alejandro¹

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, UMSNH. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México.

²Facultad de Agrobiología, UMSNH, Uruapan, Michoacán, México. Paseo Gral. Lázaro Cárdenas y Berlín S/N, Colonia Viveros, C.P. 60170, Uruapan, Michoacán.

³Jardín Botánico, IB-UNAM. 04510 Distrito Federal, México.

adrixliera@gmail.com, alejmtzpalacios@gmail.com

RESUMEN

Embriones cigóticos maduros de *Pinus oocarpa* sembrados en DCR/2 registraron 80% de viabilidad al ser cultivados sin reguladores del crecimiento. Se subcultivaron para inducir la respuesta de brotes, el mejor porcentaje de respuesta a brotes se registró en el medio DCR/2 con 0 (53.4%) y con 0.5 (58.2 %) mg l⁻¹ de BA y en DCR basal (57.3 %). Se registró la mayor respuesta de brotes (2.10) por explante se generó en medio DCR/2 con 1 mg l⁻¹ BA y en DCR con 0.5 (1.97 brotes) y con 1 mg l⁻¹ de BA (2.07 brotes). El análisis factorial para la fase de elongación de brotes fue significativo para el factor medio ($p=0.008$) y la interacción medio-BA ($p=0.027$). Los valores significativos de supervivencia *in vitro* de brotes se registró en los medio DCR/2 en ausencia de BA (32.9%) y con 0.5 mg l⁻¹ de BA (35.4%). La respuesta de raíz fue baja y espontánea (0.03%).

Palabras clave: Embriones cigótico, *Pinus oocarpa*, organogénesis, Benciladenina.

ABSTRACT

Mature zygotic embryos of *Pinus oocarpa* placed in DCR / 2 showed 80% viability when grown without growth regulators. Subcultured for inducing response to shoots, the best percentage shoots response was recorded in the medium DCR/2 to 0 (53.4%) and 0.5 (58.2%) mg l⁻¹ BA and basal DCR (57.3 %). The greatest response of shoots (2.10) per explant was recorded was generated in the medium DCR/2 with 1 mg l⁻¹ BA and DCR with 0.5 (1.97 shoots) and 1 mg l⁻¹ BA (2.07 shoots). Factor analysis for the shoot elongation phase was significant for the medium factor ($p = 0.008$) and medium-BA interaction ($p = 0.027$). Significant values of *in vitro* survival of recorded shoots in DCR/2 medium in the absence of BA (32.9%) and 0.5 mg l⁻¹ BA (35.4%). The roots response was low and spontaneous (0.03%).

Keywords: Zygotic embryos, *Pinus oocarpa*, organogenesis, benzyladenine.

INTRODUCCIÓN

Pinus oocarpa Schiede ex Schltdl. es una especie de importancia para reforestaciones de restauración ecológica y para plantaciones comerciales en la zona de transición entre los bosques de coníferas y la selva baja caducifolia (Viveros-Viveros *et al.*, 2005). Dicha especie ha mostrado estar bien adaptada a los incendios frecuentes, a las fuertes sequías periódicas y a los terrenos degradados. Su madera es usada para construcciones, rieles de tren, postes, además de que es una especie resinera (Zamora, 1981). La selección de genotipos superiores ya sea en campo o a través de mejoras en huertos semilleros, requiere de utilizar sistemas de propagación que mantengan sus características silvícolas para mejorar el rendimiento comercial de plantaciones (FAO, 2009). *Pinus oocarpa* se encuentra dentro de la lista de especies prioritarias para la reforestación en México definidas por la CONABIO y la CONAFOR (CONAFOR, 2012). Los sistemas de propagación clonal vía organogénesis en pinos es un reto que ha permitido avances en algunas especies y en muy pocas los resultados pueden ser considerados aplicables de forma eficiente en la propagación comercial (McCown, 2000; Bonga *et al.*, 2010). Los factores que limitan la propagación vegetativa en pinos son el genotipo, diferencia no solo entre especies, sino también a nivel de familias y medios hermanos (Bergman y Stomp, 1994; Tang y Gou, 2001), de igual forma, el tipo de explante y su estadio ontogénico, el medio de cultivo, el balance hormonal, las condiciones físicas de cultivo *in vitro* (Aitken-Christie *et al.*, 1985; Ellis y Bilderback, 1989; Chang *et al.*, 1991; Muriithi *et al.*, 1993; Dumas y Monteuis, 1995; Calixto y Pais, 1997; Tang y Guo, 2001; Valdés *et al.*, 2001, Saborio *et al.*, 1997; Ragonezi *et al.*, 2010).

La micropropagación en especies forestales, particularmente los pinos requieren de periodos largos de ensayo e investigación para obtener resultados o avances en la propagación (Noh *et al.*, 1988; Dumas y Monteuis, 1995). No se han presentado investigaciones sobre organogénesis en *Pinus oocarpa*. Por lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo establecer avances en la propagación *in vitro* vía organogénesis a partir de embriones maduros y cotiledones completos en *Pinus oocarpa*, especie forestal de gran importancia en el estado de Michoacán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y desinfección de explantes. Se usaron semillas maduras de *Pinus oocarpa* colectadas a granel y semillas del árbol R18 seleccionados fenotípicamente (fuste recto, no plagado, poda natural) de San José de Las Cañas, Michoacán. Las semillas fueron colectadas en el año 2012 se etiquetaron, deshidrataron y almacenaron a 6°C en el laboratorio de Biotecnología y Genética Vegetal, hasta su uso en el año 2013. Las semillas previo a la extracción del embrión y su siembra *in vitro*, se desinfectaron por 15 minutos en una solución al 50% de hipoclorito de sodio (6% de cloro activo), a la cual se adicionó unas gotas de Tween 20. Posteriormente se colocaron en etanol al 70% durante 15 minutos y se enjuagaron cuatro veces en agua destilada estéril.

Inducción *in vitro* de brotes. Se extrajeron los embriones maduros y fueron sembrados en medio de cultivo DCR (Gupta y Durzan, 1985) con el 50% de las sales minerales (DCR/2), en el cual permanecieron por tres días para seleccionar únicamente los embriones viables. Posteriormente fueron transferidos a los medios DCR y DCR/2, ambos modificados con 0, 0.5 y 1 mg l⁻¹ de BA (benciladenina). Se establecieron seis tratamientos, cada uno con cinco repeticiones, la unidad experimental de cada tratamiento constó de 5 embriones por cajas de Petri. El proceso fue tomado de forma similar al reportado para *Pinus lambertiana* (Gupta y Durzan, 1985). Los explantes fueron subcultivados a medio fresco cada 30 días por 4 meses hasta que alcanzaron un promedio de 10 mm de longitud.

Elongación *in vitro* de brotes. Los brotes fueron disectados del tejido inductor y subcultivados al medio DCR y DCR/2, ambos modificados con 0, 0.5 y 1 mg l⁻¹ de BA, con subcultivos al mismo medio de elongación cada 30 días por dos meses. Se analizó el número de brotes elongados y el porcentaje de supervivencia de los mismos.

Enraizamiento *in vitro* de brotes. Para su enraizamiento, los brotes fueron trasplantados al medio DCR/2 con tres modificaciones de fitohormonas, y un control con carbón activado: a) 1 mg l⁻¹ de BA y 25 mg l⁻¹ de ANA (ácido

naftalenacético; b) 1 mg l⁻¹ de BA y 25 mg/l de IBA (ácido indolbutírico); c) 1mg l⁻¹ de BA más 25 mg l⁻¹ IBA y 25 mg l⁻¹ AIA (ácido indolacético); y d) 5 g l⁻¹ de carbón activado. Se realizaron subcultivos cada 30 días durante seis meses. Las diversas respuestas se registraron bajo observaciones con ayuda de un microscopio estereoscópico 10x. Se registró el porcentaje y número de brotes que formaron raíz.

Análisis estadísticos. En la inducción de brotes se realizó un anova factorial, las medias se diferenciaron mediante la prueba de Tukey. La fase de enraizamiento fue analizada mediante un Anova de una vía $p < 0.05$. Se empleó el programa estadístico R.

RESULTADOS

Viabilidad de la semilla. Los embriones cigóticos aislados de *Pinus oocarpa* registraron aproximadamente un 80% de respuesta de viabilidad, al ser cultivados por tres días en medio DCR/2 sin reguladores de crecimiento vegetal.

Inducción y elongación de brotes. Se registró la formación de brotes, de los cuales se podían definir a las cuatro semanas de cultivo (Fig.1). Los brotes se originaron a partir del eje hipocótilo radicular, de los cuales se observó la formación de ápices foliares.

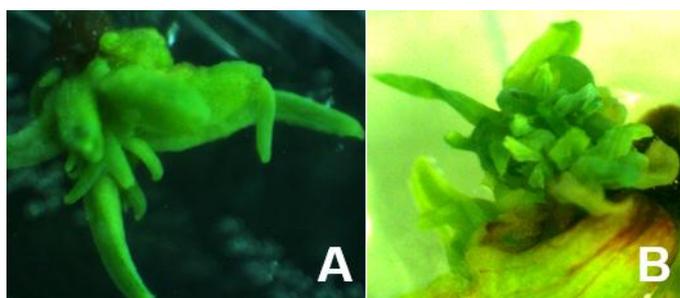


Figura 1. Presencia de brotes en embriones cigóticos maduros de *P. oocarpa*. (A) Medio DCR/2 con 0.5 mg l⁻¹ de BA; (B) medio DCR con 1 mg l⁻¹ de BA.

El análisis factorial registró diferencias significativas en el número de explantes con brotes y el número de brotes por explante, debido a la concentración de BA adicionada, sin embargo no hubo significancia para el factor medio de

cultivo, ni entre la interacción del medio de cultivo y la concentración de BA (Cuadros 1 y 2).

Cuadro 1. Análisis factorial de la inducción de brotes en *Pinus oocarpa*, medio DCR y DCR/2 modificados con BA, $p < 0.05$.

Fuente de variación	Grados de Libertad	F	p
BA	2	3.83	0.022
Medio	1	0.18	0.671
Medio*BA	2	1.50	0.224
Error	262		

Cuadro 2. Análisis factorial de la respuesta de brotes por explante en embriones cigóticos de *P. oocarpa* en medio DCR y DCR/2 modificado con BA.

Fuente de variación	Grados de Libertad	F	p
BA	2	4.37	0.013
Medio	1	0.18	0.666
Medio*BA	2	1.60	0.202
Error	262		

El medio DCR y DCR/2 en ausencia de BA y DCR/2 adicionado con 0.5 mg l⁻¹ de BA registraron el mejor porcentaje de respuesta de inducción de brotes (57.3, 53.4, 58.2 %, respectivamente (Cuadro 3). Los resultados de la respuesta de brotes por explante, registró diferencias significativas en la concentración de BA, generando en el medio DCR/2 con 1.0 mg l⁻¹ de BA (2.1), y en medio DCR con 0.5 (1.97) y 1.0 mg l⁻¹ de BA (2.07) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Inducción de brotes en embriones cigóticos de *P. oocarpa* en medio DCR y DCR/2 modificados con BA. Letras diferentes son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha = 0.05$); d.e.= desviación estándar.

Medio de cultivo	BA (mg l ⁻¹)	n	Explantes con Brotes (%)		Brotes/ explante, d.e.	
DCR/2	0.0	39	53.4	a	1.87 ± 0.9	b
DCR/2	0.5	46	58.2	a	1.71 ± 0.0	b
DCR/2	1.0	49	47.6	b	2.10 ± 0.8	a
DCR	0.0	39	57.3	a	1.74 ± 0.7	b
DCR	0.5	43	50.6	b	1.97 ± 0.7	a
DCR	1.0	52	48.1	b	2.07 ± 0.7	a
Promedio		44.6	52.5		1.91±0.63	

En la elongación de brotes de BA no existió diferencia significativa ($p = 0.372$) por efecto de la concentración de BA adicionada al medio de cultivo, aunque si existió significancia por efecto del medio de cultivo de manera independiente ($p = 0.027$) y la interacción de este factor de variación con la concentración de BA ($p = 0.008$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis factorial de la respuesta de elongación de brotes de *Pinus oocarpa* en Medio DCR y DCR/2 modificado con BA.

Fuente de variación	Grados de Libertad	F	p
BA	2	1.04	0.372
Medio	1	2.56	0.027
Medio*BA	2	4.83	0.008
Error	262		

En relación al porcentaje de supervivencia de brotes elongados el análisis de Tukey muestra las mejores respuestas en el medio DCR/2 con 0 (24) y 0.5 mg l⁻¹ de BA (28) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Alargamiento y supervivencia de brotes de *Pinus oocarpa*, ocho semanas después de cultivo en el medio DCR y DCR/2 modificados con BA.

Medio de cultivo	BA (mg l ⁻¹)	n	No. brotes elongados (supervivencia a)		Super-vivencia (%)
DCR/2	0.0	73	24	a	32.9
DCR/2	0.5	79	28	a	35.4
DCR/2	1.0	103	16	b	15.5
DCR	0.0	68	18	b	26.5
DCR	0.5	85	20	b	23.5
DCR	1.0	108	17	b	15.7

Inducción *in vitro* de raíz. Los brotes separados del medio inductor y subcultivados a medio de elongación, mantenidos por 8 semanas, se emplearon para su enraizamiento al alcanzar 11 a 20 mm de longitud. La inducción de raíces en los brotes fue involuntario, no significativo, únicamente se registró en un brote en presencia de 25 mg l⁻¹ de IBA (Cuadro 6).

Cuadro 6. Inducción de raíz en brotes de *Pinus oocarpa* en medio DCR/2 modificado con auxinas y citocininas, o carbón activo (C.A.). No registró diferencia significativa $p=0.05$.

BA (1 mg l ⁻¹) con:			C.A. (mg l ⁻¹)	n	Brotos con raíz (%)	Brotos con raíz (#)
ANA	IBA (mg l ⁻¹)	AIA				
25				30	0	0
	25			34	0.033	1
	25	25		35	0	0
			5000	30	0	0

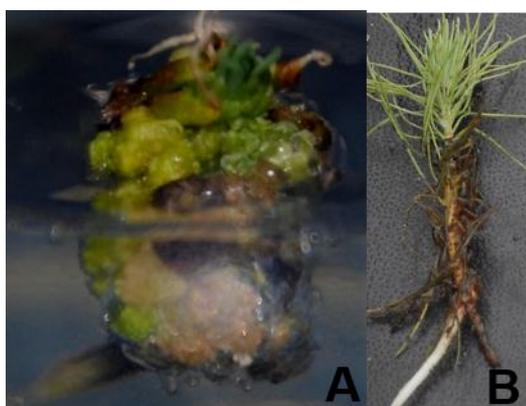


Figura 2. Respuesta de enraizamiento en brote de *P. oocarpa* en medio DCR/2 modificado con IBA (25 mg l⁻¹) y AIA (25 mg l⁻¹). Brote con masa inductora de brotes en la base y presencia de raíz (A); retiro de la masa inductora de brotes (B).

DISCUSIÓN

Inducción *in vitro* de brotes. La inducción de la respuesta organogénica en *P. oocarpa* dependió del balance de la hormona exógena BA, como ocurre en otras especies de *Pinus*, en donde también son factores determinantes la ontogenia del explante y el efecto genético del individuo o familia (Hicks, 1994; Bonga *et al.*, 2010; Ragonezi *et al.*, 2010). El mayor número de brotes por embrión cigótico (2.1 brotes) obtenido en la presente investigación fue en la concentración de 1 mg l⁻¹ de BA, cuyo resultado coincide con la respuesta observada en *P. peuce*, en donde se obtuvieron 2.12 brotes por explante en el medio GD adicionado con 0.5 mg l⁻¹ de BA (Stojičić *et al.*, 1999). Sin embargo, estos valores aún son bajos comparados con los registrados en *Pinus radiata*, en donde es posible regenerar hasta 6.07 brotes por cada embrión cigótico maduro cultivado en medio LP/2 (medio LP con 50% de sales minerales) con 5 mg l⁻¹ de BA (Hargreaves y Menzies, 2007). Otras especies con alta respuesta morfogénica son *P. massoniana* L. (11.6 brotes por explante) (Zhang *et al.*, 2006), *P. maximartinezii* Rzedowski (29.1 brotes por explante) (Robledo-Paz *et al.*, 2009), *P. herldreichii* (9.09 brotes por explante) (Stojičić *et al.*, 2012). Aunque el genotipo es uno de los factores importantes que determinan la respuesta a la formación *in vitro* de órganos, los requerimientos nutrimentales y el balance hormonal juega un papel importante. La regeneración *in vitro* de *P. massoniana* a partir de embriones cigóticos maduros se obtuvo en el medio DCR suplementado con 0.5 mg l⁻¹ de BA y 0.05 mg l⁻¹ de IBA (Zhang *et al.*, 2006), *P. massoniana* a partir de embriones cigóticos maduros en el medio SH adicionado con 16.8 mg l⁻¹ de BA (Robledo-Paz *et al.*, 2009) y *P. herldreichii* en el medio GD adicionado con 0.5 mg l⁻¹ de BA (Stojičić *et al.*, 2012). A diferencia de *P. heldreichii* (Pérez Bermúdez y Summer, 1987) y *P. elliottii* (Burns *et al.*, 1991) ambas especies no presentaron inducción de brotes a partir de embriones cigóticos maduros en ausencia de BA

Elongación de brotes. La reducción de sales minerales del medio DCR y la baja concentración o ausencia de BA incrementó la respuesta de elongación y la supervivencia de los brotes en *Pinus oocarpa*. Aunque el medio DCR fue formulado especialmente para especies forestales (*Pinus* y *Pseudotsuga*) y

consiste en una reducción en la concentración de nitrógeno así como variaciones en la forma de adicionar este elemento, el medio DCR contiene la mitad de la fuerza iónica del medio MS (George *et al.*, 2008), nuestros los resultados indican que *Pinus oocarpa* aún requiere reducir a la mitad de sales minerales del medio DCR. Respuesta similar se registró en *P. radiata*, al reducir el medio LP al 50% de las sales minerales con 5 mg l⁻¹ de BA; para *P. peuce* y *P. heldreichii* se registró la misma respuesta en el medio GD al 50% de sus sales minerales con 0.5% de carbón activado (Stojičić *et al.*, 1999, Stojičić *et al.*, 2012). A diferencia de *P. massoniana* donde la respuesta se registró en medio DCR basal con 0.5 mg l⁻¹ de BA y 0.05 mg l⁻¹ de IBA; de igual forma *P. taeda* registró la misma respuesta de elongación en medio TE basal con 0.5 mg l⁻¹ de IBA y 2 mg l⁻¹ de BA (Tang *et al.*, 1998).

Enraizamiento *in vitro*. Con las concentraciones de auxinas usadas para el enraizamiento de brotes no se registró inducción de raíz, aun cuando se emplearon las más altas concentraciones usadas para dicha respuesta (Patel y Thorpe, 1994). Como se mencionó anteriormente, la ontogenética en pinos, el medio de cultivo, los reguladores del crecimiento exógenos y el genotipo son factores a considerar para tener éxito en la rizogénesis. Lo anterior muestra, que es necesario ampliar los ensayos de prueba, en cada uno de los factores antes mencionados. Se sugiere ampliar el barrido hormonal y la combinación de fitohormonas, incrementar la concentración de agar y reducir las sales minerales, así como utilizar explantes inmaduros.

Se ha reportado respuesta para la formación de raíz a partir de embriones cigóticos maduros en *P. massoniana* en el medio GD/2 con 2 mg l⁻¹ de IBA y 0.05 mg l⁻¹ de BA (70%) (Zhang *et al.*, 2006); en *P. radiata* (50%) en el medio LP/4 (LP con 25% de sales minerales) con 1.5 mg l⁻¹ de ANA y 1.5 mg l⁻¹ de IBA (Montalbán *et al.*, 2011); en *P. peuce* (67.5%) y *P. heldreichii* (0.05%) en el medio GD/2 con 0.2 mg l⁻¹ de IBA (Stojičić *et al.*, 1999, 2012).

CONCLUSIONES

Se concluye que los medios DCR/2 y DCR basal a concentraciones bajas o en ausencia de BA (0 y 0.5 mg l⁻¹), inducen la mayor formación de brotes adventicios formados a partir de embriones cigóticos maduros de *P. oocarpa*. Mientras que la mayor respuesta por explante se obtuvo en los medios DCR/2 con 1 mg l⁻¹ BA y en DCR (0.5 y 1 mg l⁻¹ de BA). Los mayores valores de supervivencia se registraron en el medio DCR/2 en ausencia de BA. Se demostró que *Pinus oocarpa* puede propagarse mediante organogénesis directa, por lo que, puede desarrollarse un protocolo eficiente de propagación.

LITERATURA CITADA

- Aitken-Christie, J., A. P. Singh, K. J. Horgan, and T. A. Thorpe. 1985.** Explant developmental state and shoot formation in *Pinus radiata* cotyledons. *Bot. Gaz.* 146(2):196-203.
- Bergman, B. A., and A. M. Stomp. 1994.** Effect of genotype on *in vitro* adventitious shoot formation in *Pinus radiata* and correlations between pairs of phenotypic traits during *in vitro* shoot development. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39: 185-194.
- Bonga, J. M., K. Klimaszewska, and P. von Aderkas. 2010.** Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 100:241-254.
- Burns, J. A., O. J. Schwars, and S. E. Schlarbaum. 1991.** Multiple shoot production from seedling explants of slash pine (*Pinus elliottii*, Engelm.). *Plant Cell Reports* 10: 439-443.
- Calixto, F., and M. S. Pais. 1997.** Adventitious shoot formation and plant regeneration from *Pinus pinaster* Sol. ex Aiton. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 33(2):119-124.
- Chang, S., S. Sen, C. R. McKinley, J. Aimers-Halliday, and R. J. Newton. 1991.** Clonal propagation of Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill) by organogenesis. *Plant Cell Reports* 10:131-134.
- Dumas, L., and O. Monteuis. 1995.** *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 40:231-235.
- Ellis, D. D., and D. E. Bilderback. 1989.** Temporal competence of embryogenic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 76(3):348-355.
- FAO. 2009.** Situación de los bosques del mundo. Roma. 158 p. Disponible en:<http://www.fao.org/docrep/011/i0350s/i0350s00.htm> (Fecha de consulta en Junio de 2012).
- George, F. E., M. A. Hall, and De Klerk Geert-Jan. 2008.** Plant Propagation by Tissue Culture. 3a Edicion. Springer. The Netherlands. 1 (74-75) pp.

- 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.
- Hargreaves, C., and M. Menzies. 2007.** Organogenesis and cryopreservation of juvenile radiata pine. Jain SM and Häggman H (Ed.) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits.* Springer. Rotorua, New Zealand. C-6, 51-65.
- Hicks, G. S. 1994.** Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30:10-15.
- McCown, B. H. 2000.** Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance. Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: dealing with genetic predeterminism. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 36:149-154.
- Montalbán, I. A., N. De Diego, E. Aguirre-Igartua, A. Setién, and P. Moncaleán. 2011.** A combined pathway of somatic embryogenesis and organogenesis to regenerate radiata pine plants. *Plant Biotechnology Reports* 5:177-186.
- Muriithi, W. T., I. S. Harry, E. C. Yeung, and T. A. Thorpe. 1993.** Plantlet regeneration in chir pine (*Pinus roxburghii* Sarg.): morphogenesis and histology. *Forest Ecology and Management* 57:141-160.
- Noh, E. W., S. C. Minocha, and D. E. Riemenschneider. 1988.** Adventitious shoot formation from embryogenic explants of red pine (*Pinus resinosa*). *Physiologia Plantarum* 74:119-124.
- Patel, K. R., and T. A. Thorpe. 1994.** *In vitro* differentiation of plantlets from embryonic explants of lodge pole pine (*Pinus conforta*) Dougl. ex Loud.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 3:131-142.
- Pérez-Bermudez, P., and H. E. Sommer. 1987.** Factors affecting adventitious bud induction in *Pinus elliotii* (Engelm.) embryos cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 11:25-35.
- Ragonezi, C., K. Klimaszewska, M. R. Castro, M. Lima, P. de Oliveira, and M. A. Zabattieri. 2010.** Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors. *Trees Physiology* 24:975-992.
- Robledo-Paz, A., V. M. Villalobos-Arámbula, and A. Santacruz-Varela. 2009.** Inducción eficiente de brotes adventicios en cotiledones de *Pinus maximartinezii* Rzedowski. *Acta Botánica Mexicana* 89:47-69.

- Saborio, F., W. Dvorak, J. K. Donahue, and T. A. Thorpe. 1997.** *In vitro* regeneration of plantlets from mature embryos of *Pinus ayacahuite*. *Tree Physiology* 17:787-796.
- Stojičić, D., S. Budimir, and L. Čulafić. 1999.** Micropropagation of *Pinus heldreichii*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 59:147-150.
- Stojičić, D., B. Janošević, V. Uzelac, Čokeša, and S. Budimir. 2012.** Micropropagation of *Pinus peuce*. *Biologia Plantarum* 56(2): 362-364.
- Tang, W., F. Ouyang, and Z. Guo. 1998.** Plant regeneration through organogenesis from callus induced from mature zygotic embryos of loblolly pine. *Plant Cell Reports* 17:557- 560.
- Tang, W., and Z. Guo. 2001.** *In vitro* propagation of loblolly pine via direct somatic organogenesis from mature cotyledons and hypocotyls. *Plant Growth Regulation* 33:25-31.
- Valdés, A., R. J. Ordás, B. Fernández, and M. L. Centeno. 2001.** Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. *Plant Physiol. Bioch.* 39(5):377-384.
- Viveros-Viveros, H., C. Sáenz-Romero, and R. R. Guzmán-Reyna. 2005.** Control genético de características de crecimiento en vivero de Plántulas de *Pinus oocarpa*. *Rev. Fitotec. Mex.* 28(4): 333-338.
- Zhang, Y., Z. Wei, M. Xi, and J. Shi. 2006.** Direct organogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of masson pine (*Pinus massoniana* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 84:119-123.

V. DISCUSIÓN GENERAL

En esta investigación se confirma la dificultad de establecer un sistema de propagación para las especies forestales, en particular el género *Pinus*, por lo tanto, igual ocurre con *Pinus oocarpa* lo cual se ha atribuido principalmente a tres factores: la ontogenia del explante, medio de cultivo, y el genotipo de la especie (Bonga y von Aderkas, 1992). Sin embargo, los resultados que se presentan pueden considerarse como un gran avance biotecnológico para la micropropagación de *Pinus oocarpa*, por medio del empleo de técnicas *in vitro*. En la actualidad se han podido regenerar plantas a partir del cultivo de tejidos en muchas de ellas; convirtiéndose la regeneración clonal de árboles adultos vía embriogénesis somática, una realidad para algunas especies (Carneros, 2009), y vía organogénesis (Bonga *et al.*, 2010), con la finalidad de integrar los protocolos establecidos de coníferas a programas de mejoramiento genético forestal. El objetivo de esta investigación, fue evaluar la factibilidad del *Pinus oocarpa* SCHIEDE EX SCHLTDL, empleando dos vías de propagación de cultivos *in vitro*: vía organogénesis y embriogénesis somática. Sin obtener un protocolo completo de regeneración por ambas vías. Los resultados obtenidos, concluyen que el objetivo general, fue parcialmente alcanzado. Sin embargo, los resultados de esta investigación, pueden servir de base para la búsqueda de un protocolo de regeneración completa, que permita la propagación de esta especie, empleando ambas vías de propagación.

Los resultados de organogénesis constituyen el primer reporte de inducción de brotes a partir de embriones cigóticos maduros de *Pinus oocarpa*, obteniéndose 2.1 brotes por embrión, cuya respuesta fue similar en *P. peuce* (Stojičić *et al.*, 1999), pero inferior a las respuestas de inducción de brotes reportados en otras especies donde se han establecido protocolos de propagación eficientes como *Pinus radiata* (Hargreaves y Menzies, 2007), *P. massoniana* (Zhang *et al.*, 2006). La búsqueda de enraizamiento en brotes es un factor importante a considerar, cuando éstos no responden al efecto de auxinas exógenas, se requiere explorar la ontogenia o maduración de los explantes, no solo los regenerantes sino de la inmadurez de las estructuras de donde fueron derivados (Giri *et al.*, 2004), siendo lo anterior una de las

consideraciones importantes a investigar en la organogénesis de *P. oocarpa* para poder culminar los procesos de micropropagación vía organogénesis.

En la actualidad, la biotecnología proporciona nuevas herramientas, añadidas a las convencionales, para la mejora genética de especies forestales. Entre estas herramientas se encuentra la embriogénesis somática, la cual requiere un profundo conocimiento de la biología celular, señales bioquímicas, multiplicación, diferenciación y producción de clones; todo ello a partir de una célula simple o de un grupo de células diferenciadas o indiferenciadas vía cultivo *in vitro* (El-Kassaby 2004).

Las ventajas que proporciona la propagación por embriogénesis somática son la producción de un elevado número de plantas y la posibilidad de criopreservar a largo plazo las líneas embriogénicas (Merkle y Nairn 2005; Nehra *et al.*, 2005). Sin embargo, la embriogénesis somática, presenta ciertas desventajas principalmente la restricción del estadio morfofisiológico específico en los embriones cigóticos en sus fases tempranas del desarrollo. Aunado a lo anterior, la utilización de embriones cigóticos inmaduros en la inducción presenta una serie de inconvenientes: su disponibilidad se restringe a un periodo anual determinado y corto, y la posible heterogeneidad genética en los cultivos embriogénicos causada por la poliembrionía (Klimaszewska *et al.*, 2007).

El estado de desarrollo del embrión cigótico en el género *Pinus* un factor crítico en la iniciación de la embriogénesis somática (Lelu *et al.*, 1999). Keinonen-Mettälä *et al.*, (1996), describieron en *P. sylvestris*, una ventana de respuesta comprendida desde el momento de la fecundación hasta el establecimiento del embrión dominante, aunque las mayores frecuencias de inducción se obtenían en embriones en sus primeras fases del desarrollo (Lelu *et al.*, 1999). Un patrón similar se ha descrito en *P. strobus* (Klimaszewska *et al.*, 2001). En *P. pinaster*, las mayores respuestas de iniciación se obtubieron en embriones cigóticos en estado precotiledonar (Bercetche y Pâques, 1995; Lelu *et al.*, 1999; Miguel *et al.*, 2004).

Por regla general, cuando se utilizan semillas inmaduras se cultivan los megagametofitos completos, sugiriéndose que el megagametofito suministra nutrientes y/o fitohormonas endógenas al embrión cigótico, cuando las concentraciones en el medio de cultivo resultan subóptimas para la inducción. A lo anterior, Becwar y Pullman (1995) describieron en *Pinus taeda* que las frecuencias de inducción eran más bajas cuando se empleaban embriones cigóticos aislados de los megagametofitos frente a completos; resultados similares se obtuvieron en los resultados de embriogénesis somática de este trabajo, en donde se obtuvo un mayor porcentaje de extrusión y desarrollo de callo, así como en la proliferación de callo a partir del megagametofito completo. Además se ha observado que el subcultivo prolongado de los tejidos embriogénicos puede ocasionar la pérdida de su capacidad embriogénica (Breton *et al.*, 2006).

La falta de material vegetal por registrar años productivos y años sin producción, el desconocimiento claro de las etapas ontogenéticas de maduración de los explantes y el incrementar los subcultivos con el propósito de ampliar los barridos de búsqueda de respuesta, pudieron haber sido los factores que limitaron el establecimiento de los primeros pasos de la embriogénesis somática en *P. oocarpa*, sin embargo, las células parenquimatosas de la periferia mostraron potencial regenerativo celular.

VI. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Aitken-Christie, J. 1984.** Clonal propagation: gymnosperms. En: Vasil, I. K. (Ed.) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol 1. Academic Press, Orlando, Fla. USA. 82-95 pp.
- Arya, S., R. K. Kalia, and I. D. Arya. 2000.** Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburghii* Sarg. Plant Cell Rep. 19: 775-780.
- Becwar, M. R., and G. S. Pullman. 1995.** Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) En: Jain, S., P. K. Gupta, R. J. Newton (Ed.) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 287-301 pp.
- Becwar, M. R., R. Nagmani, and S. R. Wann. 1990.** Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). Can. J. For. Res. 20: 810-817.
- Bercetche, J., and M. Pâques. 1995.** Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*) En: Jain, S., P. K. Gupta, y R. J. Newton (Ed.) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 221-242 pp.
- Bergman, B. A., and A. M. Stomp. 1994.** Effect of genotype on *in vitro* adventitious shoot formation in *Pinus radiata* and correlations between pairs of phenotypic traits during *in vitro* shoot development. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39: 185-194.
- Berlyn, G. P., R. C. Beck, and M. H. Renfro. 1986.** Tissue culture and the propagation and genetic improvement of conifers: problems and possibilities. *Tree Physiol.* 1: 227-240.
- Bonga, J. M. and P. von Aderkas. 1992.** In vitro culture of trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 236 pp.
- Bonga, J. M., K. Klimaszewska, and P. von Aderkas. 2010.** Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 100:241-254.
- Bozhkov, P. V., I. S. Ahn, and Y. G. Park. 1997.** Two alternative pathways of somatic embryo origin from polyembryonic mature stored seeds of *Pinus koraiensis* Sieb et Zucc. *Can. J. Bot.* 75: 509-512.
- Breton, D., L. Harvengt, J. F. Trontin, A. Bouvet, and J. M. Favre. 2006.** Long-term subculture randomly affects morphology and subsequent maturation of early somatic embryos in maritime pine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 87: 95-108.

- Breton, D., L. Harvengt, J. F. Trontin, A. Bouvet, and J. M Favre. 2005.** High subculture frequency, maltose-based and hormone-free medium sustained early development of somatic embryos in maritime pine. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 494-503.
- Breton, D., A. Bouvet, J. M. Favre, and L. Harvengt. 2002.** Effect of cultural methods on proliferation and their after-effects on maturation of maritime pine (*Pinus pinaster*) somatic embryos. BIOFOR'02-Sustainable Forestry, Wood Products and Biotechnology. Vitoria-Gasteiz, Spain-November 11-14, Poster 9.
- Carneros E. 2009.** Embriogénesis somática de pino piñonero (*Pinus pinea* L). Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá, España. 274 pp.
- Chalupa, V. 1985.** Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Communi. Inst. For. Cech.* 14:57-63.
- 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.
- Coke, J. E. 1996.** Basal nutrient medium for *in vitro* cultures of loblolly pine. US Patent 6117678.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). 2012.** Situación de los Recursos Genéticos Forestales en México. Informe Final del Proyecto TCP/MEX/3301/MEX (4). México. 121 pp.
- Cyr, D. 2000.** Cryopreservation: roles in clonal propagation and germplasm conservation of conifers. En: Engelmann, F., H. Takagi (Ed.) *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application.* Japan International Research Centre for Agricultural Sciences. Tsukuba/International Plant Genetic Resources Institute. Rome. 261-268 pp.
- Deb, C. R., and P. Tandon. 2002.** Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord.). *J. Plant Biol.* 29: 301-306.
- Dvorak, W.S., K. Potter, V. Hipkins and G. Hodge. 2009.** Genetic diversity and gene exchange in *Pinus oocarpa*, a Mesoamerican pine with resistance to the pitch canker fungus (*Fusarium circinatum*). *Int. J. Plant Sci.* 170:609–626.
- Dvorak, W.S., E.A. Gutierrez, L.F. Osorio, G.R. Hodge and J.T. Brawner. 2000.** *Pinus oocarpa*. In *Conservation and Testing of Tropical and Subtropical Forest*

Tree Species by the CAMCORE Cooperative. Eds. W.S. Dvorak, G.R. Hodge, J.L. Romero and W.C. Woodbridge. College of Natural Resources, NCSU, Raleigh, NC. 128–147 pp.

- Ei-Kassaby, Y. 2004.** Feasibility and proposed outline of a global review of forest biotechnology. Forest Genetic Resources Working Paper FGR/77E: Forest Resources Development Service, Forest Resources Division. FAO, Rome.
- Ellis, D. D., and D. E. Bilderback. 1989.** Temporal competence of embryogenic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds *in vitro*. Amer. J. Bot. 76(3):348-355.
- FAO. 2009.** Situación de los bosques del mundo. Roma. 158 p. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/011/i0350s/i0350s00.htm> (Fecha de consulta en Junio de 2012).
- FAO. 2010.** Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010: informe nacional México. Departamento Forestal-FAO. Roma, Italia. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/013/al567S/al567S.pdf>. (Accesada en Junio de 2010).
- FAO. 2012.** Situación de los bosques del mundo. Roma. <http://www.fao.org/docrep/016/i3010s/i3010s.pdf>. (Accesada en Junio de 2012).
- Fehér, A., T. P. Pasternak, and D. Dudits. 2003.** Transition to somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 74: 201-228.
- Fernández-Guijarro, B., C. Celestino, and M. Toribio. 1994.** Somatic embryogenesis in *Quercus suber* L. En: Pardos, J. A., M. R. Ahuja, R. Elena-Rosell00F3 (Ed.) Biotechnology of Trees. Investigación Agraria, Sistemas y Recursos Forestales, Fuera de serie nº4. INIA, Madrid. 105-110 pp.
- Finer, J. J., H. B. Kriebel, and M. R. Becwar. 1989.** Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). Plant Cell Rep. 8: 203- 206.
- 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.
- Fourré, J. L., P. Berger, L. Niquet, and P. André. 1997.** Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. Theor. Appl. Genet. 94: 159-169.

- Giri, C. C., B. Shyamkumar, and C. Anjaneyulu. 2004.** Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees Struct Funct* 18:115-135.
- Gladfelter, H. J., and G. C Phillips. 1987.** De novo shoot organogenesis of *Pinus elliottii* Medw. *In vitro*. Reproducible regeneration from long-term callus cultures. *Plant Cell Rep.* 6: 163-166.
- Gupta, P. K., and D. J. Durzan. 1987.** Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Bio/Technology* 5: 147-151.
- 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.
- Haberlandt, G. 1902.** Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber, Akad Wiss Wien Math-Naturwiss Kl. Abt J* 11:69-92.
- Hägman, H., T. Aronen, and L. Rynänen. 2000.** Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers. En: Jain, S. M., P. K. Gupta, R. J. Newton (Ed.) *Somatic embryogenesis in Woody plants*. Vol 6. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 707-728 pp.
- Hakman, I., and S. von Arnold. 1985.** Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (white spruce). *Physiol. Plant* 72: 579-587.
- Hargreaves, C., and M. Menzies. 2007.** Organogenesis and cryopreservation of juvenile radiata pine. En: Jain, S. M. y H. Häggman (Ed.) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer. Rotorua, *New Zealand*. C-6, 51-65.
- 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.
- Hartmann, H. T. and D. E. Kester. 1987.** Propagación de plantas. Principios y prácticas C.E.C.S.A. México, D F. 549-551.
- Harvengt, L. 2005.** Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). En: Jain, S., P. K. Gupta (Ed.) *Protocol for somatic embryogenesis in woody plants*. Vol. 77. 107-119 pp.
- Jain, M. S., N. Dong, and R. J. Newton. 1989.** Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii*) from immature embryos cultured *in vitro*. *Plant Sci.* 65: 233-241.

- 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., and J. van Staden. 1995.** Plantlet production from somatic embryos of *Pinus patula*. *J. Plant Physiol*. 145: 519-525.
- Keinonen-Metälä, K., P. Jalonen, P. Eurola, S. von Arnold, and K. von Weissenberg. 1996.** Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris*. *Scand. J. For. Res.* 11: 242-250.
- Kim, Y. W., and H. K. Moon. 2007.** Regeneration of plant by somatic embryogenesis in *Pinus rigida* x *P. taeda*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 43: 335-342.
- Klimaszewska K., J-F Trontin, M. R. Becwar, C. Devillard, Y-S Park, and M. A. Walter. 2007.** Recent Progress in Somatic Embryogenesis of Four *Pinus* spp. *Tree and For. Sci. Biotechnol.* 1:11-25.
- Klimaszewska, K., Y-S Park, C. Overton, I. MacEacheron, and J. M. Bonga. 2001.** Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37: 392-399.
- Klimaszewska, K., and D. Smith. 1997.** Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiol. Plantarum* 100: 949-957.
- Lainé, E., H. David, and A. David. 1988.** Callus formation from cotyledon protoplast of *Pinus oocarpa* and *Pinus patula*. *Physiologia Plantarum* 72:374-378.
- 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.
- Lara-Chávez A., B. Flinn, and U. Egertsdotter. 2011.** Initiation of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of Oocarpa pine (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schlechtendal). *Tree Physiology*. 31: 539-554.
- Lelu, M. A., C. Bastien, A. Drugeault, M. L. Gouez, and K. Klimaszewska. 1999.** Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiol. Plant* 105: 719-728.
- Lelu, M. A., M. Boulay, and Y. Arnaud. 1987.** Obtention de cals embryogènes a partir de cotylédons de *Picea abies* (L.) Karst. Prélevés sur les jeunes plantes âgées de 3 a 7 après germination. *C. R. Acad. Sci. Paris* 305 (III): 105-109.

- Levine, M. 1947.** Differentiation of carrot root tissue grown in culture. Bull. Torrey Bot. Club 74: 321.
- Litvay, J. D., D. C. Verma, and M. A. Johnson. 1985.** Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell Rep. 4: 325 - 328.
- Madrigal, S. X. 1982.** Claves para la identificación de las coníferas silvestres del estado de Michoacán. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Boletín Divulgativo No. 58. México, D. F. 100 pp.
- Magallanes, C. M. E. 1993.** Curso teórico-práctico de micropropagación de especies forestales. Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la F AU.A.N.L.
- Malabadi, R. B., and J. van Staden. 2005.** Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. Tree Physiol. 25: 11-16.
- Malabadi, R. B., H. Choudhury, and P. Tandon. 2004.** Initiation, maintenance and maturation of somatic embryos from thin apical dome sections in *Pinus kesiyana* (Royle ex. Gord) promoted by partial desiccation and Gellan gum. Scientia Horticulturae 102: 449-459.
- Martínez, M. 1953.** Las Pináceas de México. Subsecretaría de Recursos Forestales y de Caza, S.A.G., México, D.F. 361 pp.
- Martínez, M. 1948.** Los pinos mexicanos. Ediciones Botas. México. 366 pp.
- Maruyama, E., Y. Hosoi, and K. Ishii. 2007.** Somatic embryogenesis and plant regeneration in yakutanegoyou, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.)
- Merkle, S. A., and C. J. Nairn. 2005.** Hardwood Tree Biotechnology. In vitro Cell. Dev. Biol.- Plant 41: 602–619.
- Miguel C., S. Gonçalves, S. Tereso, L. Marum, J. Maroco, and M. Oliveira. 2004.** Somatic embryogenesis from 20 open-pollinated families of Portuguese plus trees of maritime pine. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 76: 121-130.
- Menzies, M. I., and J. Aimers-Halliday. 2004.** Propagation options for clonal forestry with conifers. En: Walter, C., M. Carson (Ed.) Plantation forest biotechnology for the 21st century. Research Signpost. Kerala, India. 255-274 pp.
- Mittermeier, R. A., N. Myers, J. B. Thomsen, G. A. B. da Fonseca, and S. Olivieri. 1998.** Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: Approaches to setting conservation priorities. *Conserv. Biol.* 12: 516–520.

- Moncaleán, P., P. Alonso, M. L. Centeno, M. Cortizo, A. Rodríguez, B. Fernández, and R. J. Ordás. 2005.** Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. *Tree Physiol* 25:19.
- Mott, R. L., and Amerson, H. V. 1981.** Tissue Culture Plantlets Produced From *Pinus monticola* Embryonic Materials. *Forest Res.* 27: 299-304.
- Musálem, M. A. 2006.** Silvicultura de Plantaciones Forestales Comerciales. Universidad Autónoma de Chapingo, División de Ciencias Forestales. Departamento de Ecología y Silvicultura. 208 pp.
- Nagmani, R., and J. M. Bonga. 1985.** Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. *Can. J. For. Res.* 15: 1088-1091.
- Nehra, N. S., M. R. Becwar, W. H. Rottman, L. Pearson, K. Chowdhury, S. J. Ghang, H. D. Wilde, R. J. Kodrzycki, C. S. Zhang, K. C. Gause, D. W. Parks, and M. A. Hinchee. 2005.** Forest biotechnology: Innovative methods, emerging opportunities. *In vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 41: 701-717.
- Park, Y-S. 2002.** Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann. For. Sci.* 59: 651-656.
- Park, Y-S., J. M. Bonga, S. I. Cameron, J. D. Barrett, K. Forbes, L. L. DeVerno, and K. Klimaszewska. 1999.** Somatic embryogenesis in Jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.). En: Jain, S., P. K. Gupta, R. J. Newton (Ed.) Somatic embryogenesis in Woody plants. Vol 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 491-504 pp.
- Patel, K. R., and T. A. Thorpe. 1994.** *In vitro* differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus conforta*) Dougl. ex Loud.) *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 3. 131-142.
- Percy R. E., K. Klimaszewska, and D. R. Cyr .2000.** Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine. *Can. J. For. Res.* 30: 1867-1876.
- Pérez-Bermúdez, P. and H. E. Sommer. 1987.** Factors affecting adventitious bud in *Pinus elliotii* (Engelm) embryos cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. II: 25-35.
- Perry, P. J. 1991.** The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland, Oregon. 231 pp.

- Pullman, G. S., R. Chopra, and K. M. Chase. 2006.** Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: Improvements in embryogenic tissue initiation by supplementation of medium with organic acids, vitamins B12 and E. *Plant Sci.* 170: 648-658.
- Pullman, G. S., S. Johnson, S. van Tassel, and Y. Zhang. 2005.** Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MES pH buffer, biotin, and folic acid. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 80: 91-103.
- Pullman, G. S., K. Namjoshi, and Y. Zhang. 2003.** Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): Improving culture initiation with abscisic acid, silver nitrate, and cytokinins adjustments. *Plant Cell Rep.* 22: 85-95.
- Pullman, G. S., and S. Johnson. 2002.** Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation rates. *Ann.For.Sci.* 59: 663-668.
- Ramarosandratana, A., L. Harvengt, A. Bouvet, R. Calvayrac, and M. Pâques. 2001.** Influence of the embryonal-suspensor mass (ESM) sampling on development and proliferation of maritime pine somatic embryos. *Plant Sci.* 160: 473-479.
- Rancé, I. M., W. Tian, H. Mathews, A. de Kochko, R. N. Beachy, and C. Fauquet. 1994.** Partial dessication of mature embryo-derived calli, a simple treatment that dramatically enhances the regeneration ability of indica rice. *Plant Cell Rep.* 13: 647-651.
- Reinert, J. 1958.** Morphogenese und ihre Kontrolle and Gewebekulturen aus Karotten. *Naturwiss.* 45: 344-345.
- Salajová, T., and J. Salaj. 1992.** Somatic embryogenesis in European black pine (*Pinus nigra* Arn.). *Biol. Plant.* 34: 213-218.
- Smith, D. R., A. P. Singh, and L. Wilton. 1985.** Zygotic embryos of *Pinus radiata* *in vivo* and *in vitro*. En: Smith, D. R. (Ed). *Proceedings International Conifer Tissue Culture Work Group*. Forest Research Institute, New Zealand Forest Service, Rotorua, New Zealand. 21 pp.
- Sommer, H. E., C. L. Brown, and P. P. Kormanik. 1975.** Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured *in vitro*. *Botanical Gazette* 136(2): 196-200.

- Stasolla C., and E. C. Yeung. 2003.** Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*. 74: 15-35.
- Stasolla, C., L. Kong, E. C. Yeung, and T. A. Thorpe. 2002.** Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 93-105.
- Steward, F. C. 1958.** Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. *Am. J. Bot.* 45: 709
- Stojičić, D., S. Budimir, and L. Čulafić. 1999.** Micropropagation of *Pinus heldreichii*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 59:147-150.
- Styles, B. T. 1993.** Genus *Pinus*: A Mexican purview. In: *Biological Diversity of Mexico: Origin and distribution*. Ramamoorthy, R. B., A. Lot. y J. Fa (Ed.). Oxford University Press. New York, USA. 420 pp.
- Sul, I. W., and S. S. Korban. 2004.** Effects of salt formulations, carbon sources, cytokinins, and auxin on shoot organogenesis from cotyledons of *Pinus pinea* L. *Plant Growth Regul* 43:197-205.
- Tang, W., and Z. Guo. 2001.** *In vitro* propagation of loblolly pine via direct somatic organogenesis from mature cotyledons and hypocotyls. *Plant Growth Regulation* 33:25-31.
- Taurus, T. E., L. C. Fowke, and D. I. Dunstan. 1991.** Somatic embryogenesis in conifers. *Can. J. Bot.* 69: 1873-1899.
- Teasdale, R. D., P. A. Dawson, and H. W. Woolhouse. 1986.** Mineral nutrient requirements of a loblolly pine (*Pinus taeda*) cell suspension culture. *Plant Physiol.* 82: 942-945.
- Toering, A., and G. S. Pullman. 2005.** Modelling available 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in a tissue culture medium containing activated charcoal. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 82:179-188.
- Toribio, M. 2001.** Application of biotechnological tools in the genetic breeding of forest species. *Melhoramento*. 37: 148-160.
- Tremblay, L., C. Levasseur, and F. M. Tremblay. 1999.** Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, *Pinaceae*) and white spruce (*Picea glauca*, *Pinaceae*) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. *Am. J. Bot.* 86: 1373-1381.

- Villalobos, A., and T. A. Thorpe. 1991.** Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *In: Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones.* Roca, W. M., L. A. Mroginski (Ed). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 127-141 pp.
- Viveros-Viveros, H., C. Sáenz-Romero, and R. R. Guzmán-Reyna. 2005.** Control genético de características de crecimiento en vivero de Plántulas de *Pinus oocarpa*. *Rev. Fitotec. Mex.* 28(4): 333-338.
- von Aderkas, P., P. Label, and M. A. Lelu. 2002.** Charcoal affects early development and hormonal concentrations of somatic embryos of hybrid larch. *Tree Physiol.* 22: 431- 434.
- von Aderkas, P., and J. M. Bonga. 2000.** Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiol.* 20: 921-928.
- von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok, and L. Filonova. 2002.** Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69: 233-249.
- von Arnold, S., and T. Eriksson. 1981.** *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.* 59: 870-874.
- Walter, C., M. Carson, and S. Carso. 2007.** Conifers. *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 60, Transgenic Crops.* Pua, E. C., M. R. Davey (Ed.) Springer-Verlag, Berlin. 447-471 pp.
- Yeung, E. C. 1995.** Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. En: Thorpe, T. A. (Ed.) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 205-249 pp.
- Yildirim, T., Z. Kaya, and K. Işik. 2006.** Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* Ten. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 87: 67-76.
- Zamora, S. 1981.** Algunos aspectos sobre *Pinus oocarpa* en el estado de Chiapas. *Ciencia For.* 6:3–5.
- Zhang, Y., Z. Wei, M. Xi, and J. Shi. 2006.** Direct organogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of masson pine (*Pinus massoniana* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 84:119-123.

ANEXO 1

Medio de cultivo 1250 (Pullman *et al.*, 2006) empleado en el Capítulo I: Morfogenésis *in vitro* de callo a partir de embriones cigóticos inmaduros de *Pinus oocarpa* Schiede Ex Schtdl.

Componentes		
	Sales	Concentración del medio basal (mg l⁻¹)
1	NH ₄ NO ₃	603.8
2	Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	236
3	FeSO ₄ ·7H ₂ O	6.95
4	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O	9.33
Otros		
5	Biotina	0.05
6	Ácido fólico	0.5
7	Mio-inositol	1000
8	Sacarosa	30,000
9	pH ^a	5.7

^a Ajustar pH antes de la autoclave

Concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal utilizado en el medio de cultivo en la etapa de inducción de masas de tejido y proliferación de callo.

Regulador del crecimiento vegetal (^b)	Concentración (mg l⁻¹)	
	Inducción masas de tejido	Proliferación de callo
2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)	4.52	0.55
BA (N ⁶ -benciladenina)	4.4	0.22
KIN (cinetina)	4.65	0.21
ABA (ácido abscísico)	3.78	0.66

^b Esterilizados previo al medio de cultivo

ANEXO 2

Medios de cultivos empleados en el Capítulo II: Inducción *in vitro* de brotes a partir de embriones cigóticos maduros de *Pinus oocarpa* Schiede Ex Schltldl.

Componente (mg l⁻¹)

1	KNO ₃	340
2	NH ₄ NO ₃	400
3	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	556
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	85
5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
6	KH ₂ PO ₄	170
7	FeSO ₄ ·7H ₂ O	37.3
8	Na ₂ EDTA	37.3
9	MnSO ₄ ·7H ₂ O	29.432
10	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
11	H ₃ BO ₃	6.2
12	KI	0.83
13	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
14	CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.25
15	CoCl ₂	0.025
16	NiCl ₃	0.025
17	Thiamine-HCl	1
18	Nicotinic acid	0.5
19	Pyridoxine-HCl	0.5
20	Glycine	2
21	myo-inositol	200
22	Sacarosa	20000
23	Casein hydrolisate	500
24	*L-glutamine	500
25	BA (1 mg/ml)	0.56
26	pH	5.8
27	Agar	8000

* Se agrega después de autoclave.