



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
Y FORESTALES**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**MICROPROPAGACIÓN CLONAL DE GENOTIPOS SUPERIORES  
DE *Pinus pseudostrobus* LINDL.**

TESIS QUE PRESENTA:

**BIOL. EDUARDO MENDOZA MAYA**

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

ASESOR DE TESIS:

**D.C. ALEJANDRO MARTÍNEZ PALACIOS**

Morelia, Michoacán, Agosto de 2012



**INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS  
Y FORESTALES**

## AGRADECIMIENTOS

A mis papás Josefina Maya Bautista y Venancio Mendoza Pérez por todo el apoyo incondicional brindado y los ánimos para seguir preparándome. A mis hermanos Alberto y Jonathan también por todo el apoyo, el cual fue indispensable para seguir con mis estudios. Gracias por todo familia.

Al D.C. Alejandro Martínez Palacios por la confianza y la oportunidad brindadas para realizar este trabajo de tesis bajo su asesoría en el laboratorio a su cargo. Así como por las acertadas observaciones y los consejos y tips metodológicos, los cuales sin duda sirvieron como guía para el desarrollo del presente trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de estudios otorgada para el curso y obtención de este grado académico.

A la Comisión Forestal del Estado de Michoacán proyecto "Mejoramiento Genético Forestal" incluido en el Presupuesto de Egresos de la Federación 2011 anexo 31 (CONAFOR), así como a la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por el apoyo económico brindado para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A los integrantes de la comisión revisora: D.C. Miguel Martínez Trujillo, D.C. Cuauhtémoc Sáenz Romero, D.C. Nahum M. Sánchez Vargas y D.C. Víctor M. Chávez Ávila, por su accesibilidad, su asesoría y la información bibliográfica facilitada. Así como por los acertados comentarios y observaciones hechas para la mejora del presente manuscrito.

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana por brindarme un lugar y la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría. Con un especial agradecimiento a la Secretaria del Posgrado Lili, por la amabilidad, accesibilidad y todas las facilidades brindadas.

Al Ing. Hugo Castañeda Corona,encargado del Banco de Germoplasma de la Comisión Forestal del Estado de Michoacán, por la amable donación de las semillas de árboles superiores de *Pinus pseudostrobus* Lindl.,y la Ing. Azucena del Rocío Paz Ramírez por las facilidades otorgadas para la donación de dicho material.

A todos los amigos biólogos del laboratorio y de la facultad de Biología por su apoyo y amistad y por hacer más ameno el ambiente de trabajo: Leslie, Eva, Patricia, Erandeni, Dante, Esperanza, Hector, Janet, Carmelo, Adriana. Un agradecimiento especial a la M.C. Lydia y a Lya Olivera por su apoyo para el desarrollo de los experimentos; al tratar de enseñar aprendí, y sin su ayuda hubiera sido imposible realizar este trabajo. Gracias a todos.

## CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL.....	IV
ÍNDICE DE CUADROS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
I. RESUMEN GENERAL.....	8
II. SUMMARY.....	9
III. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	10
3.1. El cultivo de tejidos en el ámbito forestal.....	11
3.1.1. Propagación mediante organogénesis en el género <i>Pinus</i> .....	12
3.1.2. Propagación mediante embriogénesis somática en el género <i>Pinus</i> .....	15
3.2. <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.....	18
3.3. Justificación.....	18
IV. OBJETIVOS.....	21

### INDUCCIÓN DE BROTES A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS MADUROS Y COTILEDONES AISLADOS DE *Pinus pseudostrobus* LINDL.

Resumen.....	23
Abstract.....	23
Introducción.....	24
Materiales y métodos.....	25
Resultados y discusión.....	28
Conclusiones.....	34
Literatura citada.....	35

### RECALCITRANCIA A LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Pinus pseudostrobus* LINDL.

Resumen.....	41
Abstract.....	41
Introducción.....	42
Materiales y métodos.....	43
Resultados y discusión.....	44
Conclusiones.....	49

Literatura citada.....	49
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	52
VI. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.....	55
ANEXO 1. Medios de cultivo utilizados en los diferentes experimentos.....	60
ANEXO 2. Conversiones de peso a concentraciones molares en los reguladores del crecimiento vegetal más utilizados en el cultivo de tejidos.....	61

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies gimnospermas mexicanas en las que se ha investigado la propagación mediante cultivo de tejidos vegetales.....	13
Cuadro 2. Efecto del medio de cultivo y la concentración basal en la inducción de brotes a partir de embriones cigóticos maduros completos de <i>Pinus pseudostrobus</i> .....	31
Cuadro 3. Resultados del análisis de varianza para la inducción de brotes en tres familias de medios hermanos de <i>Pinus pseudostrobus</i> , en el medio DCR a la concentración media y completa de macro y micronutrientos.....	32
Cuadro 4. Inducción de brotes en tres familias de medios hermanos de <i>Pinus pseudostrobus</i> , en el medio DCR a la concentración media y completa de macro y micronutrientos.....	32
Cuadro 5. Supervivencia de cotiledones a la quinta semana de cultivo en el medio de elongación DCR-E sin reguladores del crecimiento y adicionado con 0.5 g L <sup>-1</sup> de carbón activado.....	33
Cuadro 6. Supervivencia de brotes a las 18 semanas de cultivo en el medio DCR-E sin reguladores del crecimiento y adicionado con 0.5 g L <sup>-1</sup> de carbón activado.....	34
Cuadro 7. Inducción de MEs a partir de embriones cigóticos maduros de cinco árboles seleccionados de <i>Pinus pseudostrobus</i> .....	46
Cuadro 8. Tasa de inducción de masas de tejido a partir de embriones cigóticos maduros del árbol 511 de <i>Pinus pseudostrobus</i> .....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Selección y propagación de árboles superiores con embriogénesis somática.....	16
Figura 2. <i>Pinus pseudostrobus</i> Lindl.....	20
Figura 3. Inducción de brotes a partir de embriones cigóticos maduros y cotiledones aislados de <i>Pinus pseudostrobus</i> .....	29
Figura 4. Masas de tejido inducidas a partir de embriones cigóticos maduros de <i>Pinus pseudostrobus</i> .....	45

## I. RESUMEN GENERAL

El presente estudio reporta las fases iniciales de la organogénesis y la embriogénesis somática en *Pinus pseudostrobus* Lindl., una de las especies forestales maderables más importantes en México. Para la inducción de brotes adventicios, en la vía de la organogénesis, se investigó el efecto de la combinación de BA con ANA, a concentraciones de 0.5-8.0 y 0.0-0.5 mg L<sup>-1</sup> respectivamente; el efecto de los medios LP y DCR a la concentración media y completa de macro y micronutrientes; y el efecto de dos explantes diferentes, cotiledones aislados y embriones cigóticos maduros completos, provenientes de tres familias de medios hermanos. Los resultados indicaron que la inducción de brotes se obtiene con BA como único regulador del crecimiento a una concentración de 0.5 mg L<sup>-1</sup> y que la presencia de ANA en el medio de cultivo induce calogénesis. A su vez, la respuesta incrementa utilizando el medio DCR a la concentración media de macro y micronutrientes, utilizando embriones cigóticos completos como explantes, y con una mayor respuesta en la familia 145-S-9. Para la inducción de masas embrionales (MEs), en la vía de la embriogénesis somática, se utilizaron embriones cigóticos maduros como explantes para evaluar la respuesta de cinco familias de medios hermanos en un tratamiento estándar y el efecto de la combinación de 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D con 0.0, 2.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> de BA utilizando explantes de una sola familia. Los resultados mostraron la generación de MEs en los explantes de las cinco familias de medios hermanos evaluadas en el tratamiento estándar, con una mayor respuesta en la familia 524-S-3. Por otra parte, en la evaluación de las 15 combinaciones de 2,4-D con BA, se registró la inducción de MEs sólo en las combinaciones de 2.0 y 10.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D con 2.0 mg L<sup>-1</sup> de BA. Sin embargo, ninguna línea de tejido pudo mantenerse en cultivo durante más de dos meses a causa de la oxidación y muerte del tejido. Los resultados muestran un comportamiento recalcitrante de *Pinus pseudostrobus* a la propagación mediante embriogénesis somática utilizando embriones cigóticos maduros como explantes.

**Palabras clave:** *Pinus pseudostrobus*, árboles superiores, brotes adventicios, embriogénesis somática, familias de medios hermanos, micropropagación, organogénesis, recalcitrancia, silvicultura clonal.

## II. SUMMARY

The present study reports initial phases of organogenesis and somatic embryogenesis in *Pinus pseudostrobus* Lindl., one of the most important timber forest species in Mexico. For direct bud induction, in the organogenesis via, it was investigated the effect of the combination of BA with NAA, at concentrations of 0.5-8.0 and 0.0-0.5 mg L<sup>-1</sup> respectively; the effect of LP and DCR medium with macro and micronutrients at half- and full-strength concentrations; and the effect of two different explants, entire mature zygotic embryos and isolated cotyledons, from three half-sib families. Results indicated that bud induction can be obtained with BA as the only plant growth regulator at a concentration of 0.5 mg L<sup>-1</sup> and that the presence of NAA in the culture medium induces callus formation. In turn, response increases using DCR medium with macro and micronutrients at half-strength concentration, using entire mature zygotic embryos as explants, with a higher response in the 154-S-9 half-sib family. For induction of embryonal masses (EMs), in the somatic embryogenesis via, mature zygotic embryos were used as explants to evaluate response among five half-sib families in a standard treatment and the effect of the combination of 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, and 10.0 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D with 0.0, 2.0, and 4.0 mg L<sup>-1</sup> of BA using explants of one family. Results showed generation EMs in the explants of the five half-sib families evaluated in the standard treatment, with a higher response in 524-S-3 family. On the other hand, in the evaluation of the fifteen combinations of 2,4-D with BA, induction of EMs was obtained only in the combinations of 2.0 and 10.0 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D with 2.0 mg L<sup>-1</sup> of BA. However, none tissue line could be maintained for more than two months in culture due to oxidation and death of tissue. Results show a recalcitrant behavior of *Pinus pseudostrobus* to propagation through somatic embryogenesis using mature zygotic embryos as explants.

**Index words:** *Pinus pseudostrobus*, adventitious buds, superior trees, clonal forestry, half-sib families, micropropagation, organogenesis, somatic embryogenesis, recalcitrance.

### III. INTRODUCCIÓN GENERAL

México es uno de los 12 países con mayor diversidad biológica en el Planeta (Sarukhan y Dirzo 1992). En lo que respecta a riqueza vegetal, el 72 % de la superficie del país (141.7 millones de ha) está cubierta por terrenos forestales, de los que 33.4 millones de ha son bosques (FAO 2000) en los que habitan más del 50 % de las especies conocidas del género *Pinus* (Challenger 1998, Jiménez *et al.* 2001), considerado el género de árboles ecológica y económicamente más importante en el Planeta (Richardson y Rundel 2000). Actualmente la demanda mundial de madera se estima en 2.7 mil millones de m<sup>3</sup> y se calcula que para la mitad de este siglo será de 6 mil millones de m<sup>3</sup>. Esta demanda creará una enorme presión sobre los ecosistemas forestales (Sutton 2000), por lo que en los últimos años se ha incentivado el establecimiento de plantaciones forestales a nivel mundial, con el objetivo de que constituyan una fuente alterna para el abastecimiento de las demandas de productos forestales (FAO 2009). A este respecto, la diversidad de especies de pinos Mexicanos representa una fuente de aprovechamiento con gran potencial económico, particularmente en lo que respecta al aprovechamiento de madera proveniente de plantaciones forestales comerciales (Bermejo y Pontones 2000).

Por otra parte, los recientes reportes de la situación de los bosques del mundo indican que México es el país con mayor pérdida de superficie forestal en la región América del Norte (FAO 2009, FAO 2011). La parte preocupante es que México es el país de mayor diversidad biológica de dicha región y que la mayor parte de su biodiversidad se encuentra en los bosques (Challenger 1998). En 1997 se creó el Programa de Plantaciones Forestales Comerciales (PRODEPLAN), cuyo objetivo es reducir la presión sobre los ecosistemas naturales y las importaciones de productos forestales, así como promover la diversificación productiva del país. A partir de entonces la superficie de bosques plantados en México incrementó de 33,447 ha en 1997 a 758,028 ha en 2010 (SEMARNAT 2012). Aunque las últimas estimaciones indican una reducción en la tasa de deforestación en México, la pérdida de superficie forestal continúa a un ritmo de 274 mil ha/año (FAO 2011), por lo que será necesario, además de mejorar el manejo de los recursos forestales, incrementar la superficie de bosques plantados y su productividad, así como reducir los tiempos de producción, para mejorar la rentabilidad económica y reducir en lo posible la presión sobre las poblaciones naturales.

### 3.1. El cultivo de tejidos en el ámbito forestal

El desarrollo de la tecnología forestal, necesario para el implemento de las plantaciones forestales, se ha centrado en mejorar la productividad mediante mayores tasas de crecimiento, en mejorar la calidad de la madera y la capacidad de los bosques plantados para hacer frente a condiciones ambientales adversas como plagas y enfermedades, a través del mejoramiento genético de los árboles forestales (FAO 2009). Como complemento, 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. A este respecto, la propagación y la silvicultura clonal ofrecen ventajas sobre la propagación sexual y la silvicultura de familias, al reducirse los tiempos de multiplicación, obtenerse mayores ganancias genéticas, mayor uniformidad en la producción y mayor productividad por área (Park 2002, El-Kassaby y Moss 2004), lo cual permite acortar los tiempos para el avance de los programas de mejoramiento genético y el establecimiento de plantaciones forestales, con un subsecuente mayor rendimiento y rentabilidad en las mismas.

En los últimos años las técnicas de micropropagación basadas en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, organogénesis y embriogénesis somática, han sido las tecnologías de propagación clonal más activamente investigadas en especies forestales y se han consolidado como la vía con el potencial para la propagación en la escala que demanda la silvicultura clonal, debido a las ventajas sobre las técnicas de macropropagación, como los injertos y enraizamiento de estacas. Dichas técnicas de micropropagación se basan en el principio de la totipotencialidad celular y la hipótesis del balance hormonal, lo cual implica que cualquier parte de una planta, la cual se denomina explante, tiene el potencial de originar individuos completos e idénticos a la planta madre, de acuerdo al estímulo hormonal que dicho explante reciba durante el cultivo *in vitro* (Villalobos y Thorpe 1991). Estas técnicas han llegado a tener un gran impacto en la agricultura desde la década de los setenta (Murashige 1978). Además, en especies forestales no maderables en peligro de extinción, se han desarrollado sistemas de micropropagación eficientes a partir de diversos explantes, generando estrategias para su recuperación (Rubluo *et al.* 1993, Martínez-Palacios *et al.* 2003). Sin embargo, las especies arbóreas, y particularmente las gimnospermas, han sido más recalcitrantes para la propagación *in vitro* (McCown 2000, Bonga *et al.* 2010).

No obstante, el cultivo de tejidos en especies gimnospermas ha tenido enormes avances en los últimos 37 años y desde el primer reporte de organogénesis en *Pinus*

*palustris* (Sommer *et al.* 1975) y de embriogénesis somática en *Picea abies* (Hackman *et al.* 1985), la micropropagación de varias especies económicamente importantes se ha vuelto rutinaria (Aitken *et al.* 1981, Klimaszewska *et al.* 2007). Sin embargo, de las aproximadamente 102 especies gimnospermas en las que se ha reportado la regeneración mediante cultivo de tejidos a nivel mundial, 12 son originarias o se distribuyen en México y sólo seis pertenecen al género *Pinus* (Cuadro 1), a pesar que este representa más del 80 % del recurso utilizado por la industria forestal nacional (Bermejo y Pontones 2000, SEMARNAT 2012).

### **3.1.1. Propagación mediante organogénesis en el género *Pinus***

La organogénesis se define como la formación de órganos *unipolares*, como brotes o raíces adventicias, que cuentan con un solo polo de crecimiento y tienen conexiones vasculares con el tejido a partir del cual se generan (Litz y Jarret 2001). Esta técnica ha permitido la generación de plántulas en más de 30 especies del género *Pinus* (Mathur 2001), en las que se han descrito dos vías de regeneración: la organogénesis directa, que es la más reportada y en la cual se induce la formación de brotes adventicios directamente de los tejidos del explante (Tang y Guo 2001, Zhang *et al.* 2006); y la organogénesis indirecta, en la que se pasa por una fase de callo organogénico a partir del cual se generan brotes adventicios (Tang *et al.* 1998, Tang *et al.* 2006).

En general la técnica consta de cuatro fases:

1. *Inducción directa o indirecta de brotes.* Se induce la desdiferenciación de las células somáticas del explante y su conversión en células pluripotenciales, las cuales se agrupan para formar meristemoides que finalmente originan brotes (Hicks 1994). Los principales factores que han influido la inducción en especies del género *Pinus* han sido el tipo de explante y su estadio ontogénico, el medio de cultivo, el balance hormonal y las condiciones físicas de cultivo *in vitro* (Aitken-Christie *et al.* 1985, Ellis y Bilderback 1989, Chang *et al.* 1991, Muriithi *et al.* 1993, Calixto y Pais 1997, Valdés *et al.* 2001, Tang y Guo 2001), así como la diferente respuesta entre especies (Bergman y Stomp 1992) y genotipos dentro de especies (Tang *et al.* 2001). Los explantes más utilizados han sido los embriones cigóticos completos y los cotiledones aislados (Mathur y Nadgauda, 1999), aunque también se reporta la organogénesis a partir de acículas jóvenes de árboles adultos de *Pinus brutia* (Abdullah y Grace 1987), brotes apicales de *P. pinea* (Cortizo *et al.* 2009) y ápices de retoños de *P. roxburghii*

**Cuadro 1. Especies gimnospermas mexicanas en las que se ha investigado la propagación mediante cultivo de tejidos vegetales.**

Especie	Explante <sup>†</sup>	M	RCV para inducción (µM)					Via <sup>††</sup>	Resultado	Referencia
			KIN	BA	2,4-D	IBA	ABA			
<i>Ceratozamia mexicana</i>	MEG	B5	0.0-3.0		0.0-2.0			O	Vástagos	Chávez <i>et al.</i> 1992a
	EI	B5	0.0-3.0		0.0-2.0			E	Embriones	Chávez <i>et al.</i> 1992a
<i>C. hildae</i>	MEG	B5	0.0-3.0		0.0-2.0			O	Vástagos	Chávez <i>et al.</i> 1992a
	EI	B5	0.0-2.0		0.0-1.0			E	Embriones	Chávez <i>et al.</i> 1992a
<i>Picea chihuahuana</i>	HJ	B5	0.25, 1.0		1.0			E	Plántulas	Litz <i>et al.</i> 1995
	EM	½ B5	3.0-5.0	3.0-5.0				O	Vástagos	López-Escamilla <i>et al.</i> 2000
<i>Pinus tecunumanii</i>	EI	SH	5.0					O	Plántulas	Mata-Rosas <i>et al.</i> 2001
	EM	½ LP		1.0		0.1		O	Plántulas	Bregmann y Stomp 1992
<i>P. ayacahuite</i>	C	MCM		11.2-22.5				O	Plántulas	Saborio <i>et al.</i> 1997
<i>P. pinceana</i>	EM	MS		3.0 - 4.0				O	Plántulas	Villalobos-Amador <i>et al.</i> 2002
<i>P. maximartinezii</i>	EM	MS		3.0				O	Plántulas	Villalobos-Amador <i>et al.</i> 2002
	C, EM	DCR		2.2				O	Brotes	Ojeda-Sacarias <i>et al.</i> 2006
	C	SH		18.8				O	Plántulas	Robledo-Paz <i>et al.</i> 2009
<i>P. patula*</i>	EI	MSG		10.0	20.0			E	Plántulas	Ford <i>et al.</i> 2005
<i>P. oocarpa</i>	EM	½ LP		5.0				O	Plántulas	Bregmann y Stomp 1992
	EI	1250	0.43	0.45	1.1		1.3	E	Plántulas	Lara-Chavez <i>et al.</i> 2011
<i>Zamia pumila</i>	MEG, EI	B5	1.0-5.0		0.0-2.0			E	Plántulas	Chávez <i>et al.</i> 1992b
	MEG, EI	B5	1.0-5.0		0.0-2.0			O	Vástagos	Chávez <i>et al.</i> 1992b
<i>Z. fischeri</i>	MEG	B5	1.0-2.0		0.5			E	Embriones	Chávez <i>et al.</i> 1992b
	MEG	B5	0.0-3.0		0.0-2.0			O	Vástagos	Chávez <i>et al.</i> 1992b
<i>Z. furfuracea</i>	MEG, EI	B5	0.0-3.0		0.0-2.0			E	Embriones	Chávez <i>et al.</i> 1992b
	MEG	B5	2.0-4.0		0.0-2.0			O	Vástagos	Chávez <i>et al.</i> 1992b

<sup>†</sup>MEG = Megagametofitos, EI = Embriones inmaduros, HJ = Hojas jóvenes, EM = Embriones maduros, C = Cotiledones; M = Medio de cultivo; RCV = Reguladores de crecimiento vegetal (KIN-Cinetina, BA-Benciladenina, 2,4-D-Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, IBA-Ácido indolbutírico, ABA-Ácido abscisico); <sup>††</sup>O = Organogénesis, E = Embriogénesis somática; \*Otros estudios con *Pinus patula* son los de Lainé *et al.* (1998), Jones y Van Staden (2001), Nigro *et al.* (2004), Malabadi y Van Staden (2005a), Malabadi y Van Staden (2005b) y Nigro *et al.* (2008).

(Kalia *et al.* 2007) y *P. sylvestris* (De Diego *et al.* 2010). Los medios de cultivo más utilizados han sido el AE, DCR, GD, LP, MCM y SH, y en especies como *Pinus contorta* (Patel y Thorpe 1984), *P. resinosa* (Noh *et al.* 1988), *P. tecunumanii* (Bergmann y Stomp 1992), *P. roxburghii* (Muriithi *et al.* 1993), *P. wallichiana* (Mathur y Nadgauda 1999) y *P. pinea* (Moncaleán *et al.* 2005, Alonso *et al.* 2006), la mitad de la concentración salina de los medios MCM, DCR o LP ha incrementado la inducción de brotes adventicios. El balance hormonal ha consistido de mayores concentraciones de citocininas que auxinas (Zhang *et al.* 2006), aunque en varias especies se ha requerido sólo de citocininas (Bregmann y Stomp, 1992; Robledo-Paz *et al.* 2009) y en algunos casos mayores concentraciones de auxinas que citocininas (Tang y Guo, 2001). En la mayoría de los sistemas de regeneración reportados, la inducción de brotes se ha realizado en fotoperíodos de 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad, en otros casos en 12 hrs luz y 12 hrs oscuridad (Tandon *et al.* 2007), en luz continua (Jang y Tainter 1991, García-Férriz *et al.* 1994) y en oscuridad total (Tang y Guo 2001).

2. *Desarrollo-elongación de brotes.* Los explantes que generaron brotes se trasplantan a un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento, para permitir el desarrollo de los brotes sobre la superficie de los explantes. Algunos factores que han propiciado el objetivo de esta etapa son la adición de carbón activado al medio de cultivo a concentraciones de 0.5-10.0 g L<sup>-1</sup> (Jang y Tainter 1991, Mathur y Nadgauda 1999) así como la reducción de la concentración de los macro y micronutrientes, generalmente a la mitad de la concentración de la utilizada en la etapa de inducción (Chang *et al.* 1991, Jain y Tainter 1991, Martínez-Pulido *et al.* 1992, Stojičić *et al.* 1999). Cuando los brotes alcanzan tamaños de aproximadamente 5 mm, se separan de los explantes y se mantienen en el mismo medio de cultivo para una elongación individualizada y su desarrollo en retoños o vástagos.
3. *Enraizamiento.* Esta fase es uno de los cuellos de botella de la organogénesis, debido a las dificultades para inducir la formación de raíces (Dumas y Monteouis 1995, Ragonezi *et al.* 2010). Los vástagos o retoños utilizados para esta etapa generalmente tienen longitudes de 10 mm en adelante. Los reguladores del crecimiento más utilizados para la inducción de los meristemas radiculares son el ácido indolbutírico (AIB), ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) y N<sup>6</sup>-benciladenina (BA), los cuales se han utilizado en combinaciones o solos (a excepción de la BA) en el medio de cultivo, a concentraciones de 0.2-3, 8.7, 0.2-2.0, 0.5, 0.05-1 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Cuando se aplican pulsos para la inducción de

- raíces, se han utilizado los reguladores del crecimiento AIB, AIA y ANA, solos o en combinaciones, a concentraciones de 80-203.3, 175.43 y 10-18.6 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, en tiempos de exposición que van de las 2 a las 24 hrs (Saborio *et al.* 1997, Mathur y Nadgauda 1999, Stojičić *et al.* 1999, Tandon *et al.* 2007). Los factores que han propiciado la elongación de las raíces, son la adición de carbón activado al medio de cultivo a una concentración de 0.5-1 g L<sup>-1</sup>, la reducción de la concentración de los macro y micronutrientes, la fuente de carbono y el agente gelificante (Patel y Thorpe 1984, Mathur y Nadgauda 1999).
4. *Aclimatación de plántulas.* Las plántulas se cultivan en condiciones *ex vitro*, manteniendo temperaturas constantes y humedades progresivamente menores. Finalmente se realizan las pruebas de rendimiento en vivero o en campo.

### **3.1.2. Propagación mediante embriogénesis somática en el género *Pinus***

La embriogénesis somática se define como la generación de embriones adventicios *bipolares*, los cuales cuentan con dos polos de crecimiento (radical-apical) y no tienen conexiones vasculares con el tejido a partir del cual se generan (Litz y Jarret 1991). Esta tecnología ha permitido la generación de plántulas en aproximadamente 29 especies de pinos (Mathur 2001, Pullman y Bucallo 2011) y constituye la vía con el mayor potencial para el implemento de la silvicultura clonal a gran escala (Park *et al.* 2002, Klimaszewska *et al.* 2007), debido a la superioridad en la producción de clones mediante la mecanización del proceso en bioreactores (Gupta y Timmis 2005, Durzan 2008), las posibilidades para el desarrollo de semillas artificiales (Aquea *et al.* 2008) y principalmente debido a las ventajas de la criopreservación de los cultivos embriogénicos (Salaj *et al.* 2012) (Fig. 1), aunado a las posibilidades de manipulación genética mediante las tecnologías del ADN recombinante para la generación de árboles modificados genéticamente (Jean-François *et al.* 2007).

La técnica se desarrolla en cinco fases:

1. *Iniciación.* Se induce la desdiferenciación de algunas células somáticas de los explantes y su conversión en células totipotenciales, las cuales tienen la capacidad de formar individuos completos (Durzan 2008). Durante esta misma fase, las células totipotenciales, inician un programa de desarrollo similar al de un cigoto, para dar origen a “embriones somáticos” (von Arnold 2008). Finalmente se forma una “masa embrional” constituida por numerosos embriones somáticos en estadios tempranos del desarrollo. Dichas masas embrionales (ME) (Klimaszewska y Cyr 2002) también son

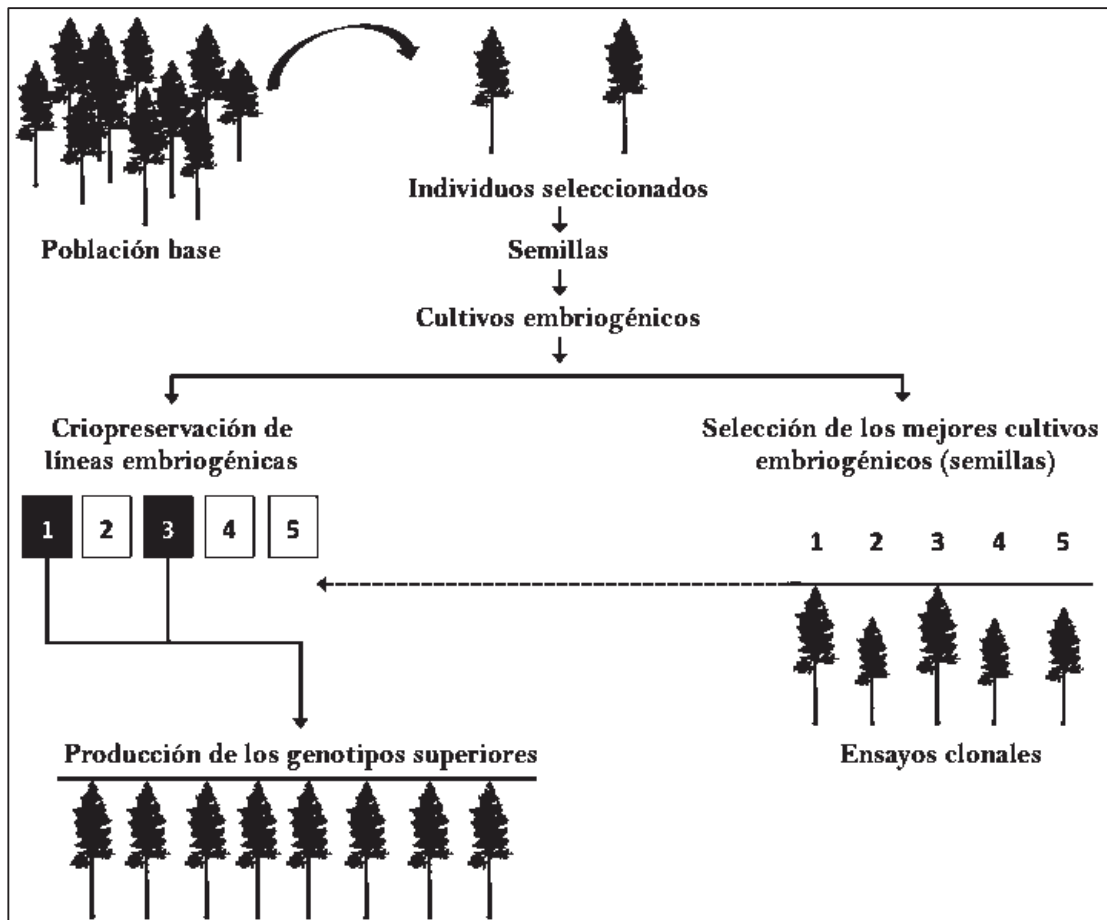


Figura 1. Selección y propagación de árboles superiores con embriogénesis somática. A diferencia de la silvicultura de familias, en donde se recurre a la selección y propagación de familias de medios hermanos de mayor rendimiento, la embriogénesis somática, en combinación con la criopreservación, es la única tecnología de propagación asexual que permite una selección dentro de las familias de mayor rendimiento y el implemento de la silvicultura clonal o silvicultura multivarial a gran escala, con clones o variedades de rendimiento superior. Esta característica reside en la capacidad de los cultivos embriogénicos para criopreservarse en nitrógeno líquido sin perder la capacidad para reiniciar el proceso de embriogénesis somática, lo cual puede permitir la selección-propagación de las líneas clonales (semillas) de mayor rendimiento en los ensayos clonales. En especies de pinos en las que se ha establecido tal sistema de propagación, los tiempos de producción se reducen hasta en 10 años, con ganancias genéticas de hasta el 60 %. (Figura modificada de Pait, 2004).

- referidas como “callos embriogénicos” (Hackman *et al.* 1985), “masas de embriones y suspensores” (MES) (Durzan y Gupta 1987) y “tejido embriogénico” (TE) (Pullman *et al.* 2003). Para esta fase, los explantes de mayor respuesta han sido los embriones cigóticos en estadios tempranos del desarrollo (Pullman y Bucallo 2011), registrándose una drástica disminución en la respuesta cuando se utilizan embriones cigóticos maduros o tejidos de árboles adultos (Bonga *et al.* 2010). El balance hormonal ha consistido de mayores concentraciones de auxinas que de citocininas obteniéndose respuestas variables entre especies y entre genotipos dentro de especies.
2. *Mantenimiento y proliferación* de los cultivos embriogénicos. Se reducen las cantidades de reguladores del crecimiento utilizadas para la iniciación (Stasolla y Yeung 2003) y se realizan subcultivos cada 2-3 semanas a medios de cultivo frescos para mantener el potencial embriogénico de los cultivos (Klimaszewska y Cyr 2002, Jain 2006) y permitir la división de los embriones somáticos jóvenes, en un proceso de poliembriónia *in vitro* (Durzan 2008). En esta etapa el tejido puede utilizarse como diana para la transformación genética. Un aspecto importante a considerar es la pérdida del potencial embriogénico de las masas embrionales conforme avanza el tiempo de cultivo, no obstante el realizar los subcultivos en el tiempo recomendado. Debido a lo anterior, la mejor opción es la toma de muestras de las líneas embriogénicas establecidas y su criopreservación en nitrógeno líquido, para mantener su potencial embriogénico (Salaj *et al.* 2012) (Fig. 1).
  3. *Maduración* de embriones somáticos. Es crucial la remoción de auxinas y citocininas del medio de cultivo así como la adición de ácido abscísico, para impedir la división de los embriones somáticos e inducir la deposición de carbohidratos, lípidos y proteínas de reserva, respectivamente (Attree y Fowke 1993). También es importante la generación de estrés osmótico mediante la adición de polietilenglicol, el incremento de la concentración de la fuente de carbono y/o la concentración del agente gelificante, para permitir la desecación de los embriones somáticos, el término de la maduración morfofisiológica y la preparación para la germinación (Stasolla y Yeung 2003). Los embriones somáticos maduros pueden pasarse directamente a la fase de germinación o encapsularse en alginato de sodio, u otros compuestos, para generar semillas sintéticas (Aquea *et al.* 2008). En la mayoría de las especies de pinos estudiadas, esta fase es otro de los cuellos de botella de la embriogénesis, debido al reducido número de embriones capaces de convertirse en plántulas viables (Park 2002).

4. *Germinación y conversión a plántulas.* Para esta fase los embriones somáticos maduros se transfieren a medios de cultivo sin reguladores del crecimiento para evitar la formación de callo y propiciar el crecimiento de la raíz (Stasolla y Yeung 2003).
5. *Trasplante a invernadero-campo.* Se procede a la aclimatación de las plántulas en invernadero y a realizar las pruebas de rendimiento en campo. Con los resultados de las pruebas de campo se seleccionan las líneas clonales de mayor rendimiento y se procede al descongelamiento de las respectivas líneas embriogénicas, criopreservadas en la fase de proliferación, para reiniciar el proceso de embriogénesis somática y la propagación masiva de dichos genotipos (Klimaszewska *et al.* 2007) (Fig. 1).

### **3.2. *Pinus pseudostrabus* Lindl.**

*P. pseudostrabus* es una de las especies forestales maderables más utilizada en los programas de reforestación en México (Viveros-Viveros 2006). Es un árbol de rápido crecimiento y buena calidad de madera que alcanza 30-40 m de altura y 40-80 cm de diámetro (CONAFOR 2007) (Fig. 2). Se distribuye ampliamente desde el centro de México, en el Eje Neovolcánico Transversal, hasta el centro de Honduras, en altitudes que van de 1600 a 3250 m, temperaturas de -9 a 40 °C y precipitaciones de 600 a 2000 mm anuales (CATIE 1997, López-Upton 2010). Se utiliza para la producción de resina y sus limpios y largos fustes permiten su uso en aserrío, madera terciada, chapa, triplay, en la fabricación de viviendas, muebles, artesanías y ebanistería, además de utilizarse como leña para combustible, entre otros usos (Muños-Flores *et al.* 2011, López-Upton 2010). La Comisión Nacional Forestal recomienda a esta especie para el establecimiento de plantaciones forestales cuyo objetivo sea la producción de pulpa para elaborar papel (CONAFOR 2007).

### **3.3. Justificación**

El Estado de Michoacán cuenta con una superficie forestal de 2.6 millones de ha, de las cuales 1.5 millones de ha están cubiertas por bosques templados (Muños-Flores *et al.* 2011). A nivel nacional, es el quinto Estado con mayor biodiversidad y el tercero con mayor producción de madera, con 914,966 m<sup>3</sup>/año desde 1990 (Muños-Flores *et al.* 2011, SEMARNAT 2012). Por otra parte, se estima una tasa de deforestación de 30 mil ha/año, debido principalmente a la sobreexplotación, el cambio de uso del suelo, los incendios, plagas y enfermedades (COFOM 2003). En 2010, las plantaciones forestales cubrían sólo 1,909 ha de superficie en la entidad (SEMARNAT 2012), las cuales han tenido baja

supervivencia y rendimiento (Muños-Flores *et al.* 2011). Aunado a esto, la propagación clonal en especies forestales locales, mediante injertos o enraizamiento de estacas, sólo ha podido realizarse a pequeña escala (Sáenz-Reyes *et al.* 2011), mientras que las tecnologías de propagación mediante cultivo de tejidos han sido escasamente exploradas y no existen antecedentes para *Pinus pseudostrobus*.

Lo anterior indica la necesidad de investigar las técnicas de micropropagación en especies forestales ecológica y económicamente importantes a nivel local y regional, particularmente *Pinus pseudostrobus*, para determinar si dichas tecnologías pueden utilizarse como herramientas efectivas auxiliares en los programas de mejoramiento genético forestal y el aprovechamiento sustentable de los recursos forestales.



Figura 2. *Pinus pseudostrobus* Lindl. (A). (B) Semillas (barra 1 cm). (C) Conos, cuyas medidas van de los 7-16 x 6-13 cm. (D) Acículas (barra 1 cm). (E) Corteza del tallo.

## IV. OBJETIVOS

### Objetivo general

Establecer un protocolo de regeneración mediante organogénesis y/o embriogénesis somática en árboles seleccionados de *Pinus pseudostrobus* Lindl.

### Objetivos específicos

#### Experimento de organogénesis

- Determinar las concentraciones de reguladores del crecimiento que favorezcan la inducción de brotes a partir de embriones cigóticos maduros completos y cotiledones aislados.
- Comparar la respuesta a la inducción de brotes entre tres árboles seleccionados fenotípicamente; árboles 524-S-3, 5-S-10 y 145-S-9.
- Evaluar el efecto de los medios de cultivo DCR y LP utilizando las concentraciones media y completa de macro y micronutrientes.
- Obtener un índice de capacidad de formación de brotes.

#### Experimento de embriogénesis somática

- Determinar las concentraciones de reguladores del crecimiento vegetal que favorezcan la inducción de masas embrionales con capacidad regenerativa utilizando embriones cigóticos maduros como explantes.
- Evaluar la respuesta entre cinco árboles seleccionados fenotípicamente; árboles 524-S-3, 145-S-9, 79-S-14, 5-S-10 y 184-S-15.
- Determinar el tipo de tejido generado mediante la realización de tinciones.
- Evaluar la capacidad del tejido generado para la proliferación activa en los medios de cultivo 16 y LOB a diferentes intervalos de tiempo entre sub-cultivos, una y dos semanas.

## CAPÍTULO I

### INDUCCIÓN DE BROTES A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS MADUROS Y COTILEDONES AISLADOS DE *Pinus pseudostrobus* LINDL.

### BUD INDUCTION FROM MATURE ZYGOTIC EMBRYOS AND ISOLATED COTYLEDONS OF *Pinus pseudostrobus* LINDL.

**Eduardo Mendoza Maya<sup>1</sup>, Lya M. Olivera Estrada<sup>1</sup>, Alejandro Martínez Palacios<sup>1</sup>,  
Miguel Martínez Trujillo<sup>2</sup>, Cuauhtémoc Sáenz Romero<sup>1</sup>, NahumM. Sánchez Vargas<sup>1</sup>  
y Víctor M. Chávez Ávila<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH). Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México. Tel: +(52)(443) 334-0475 ext. 119, Fax ext. 200.

<sup>2</sup>Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edificio B4. 58066 Morelia, Michoacán, México.

<sup>3</sup>Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Jardín Botánico del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 04510 Distrito Federal, México.

## RESUMEN

Se reporta la inducción de brotes adventicios en *Pinus pseudostrabus* mediante organogénesis directa. Para la inducción de brotes, se investigó el efecto de la combinación de BA con ANA, a concentraciones de 0.5-8.0 y 0.0-0.5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente; el efecto de los medios LP y DCR a la concentración media y completa de macro y micronutrientes; y el efecto de dos explantes diferentes, cotiledones aislados y embriones cigóticos maduros completos, provenientes de tres familias de medios hermanos. Los resultados indicaron que la inducción de brotes se obtiene con BA como único regulador del crecimiento a una concentración de 0.5 mg L<sup>-1</sup> y que la presencia de ANA en el medio de cultivo induce callogénesis. A su vez, la respuesta incrementa utilizando el medio DCR a la concentración media de macro y micronutrientes, utilizando embriones cigóticos completos como explantes, con una mayor respuesta en la familia de medios hermanos 145-S-9.

**Palabras clave:** *Pinus pseudostrabus*, árboles superiores, brotes adventicios, familias de medios hermanos, organogénesis, silvicultura clonal.

## ABSTRACT

We report adventitious bud induction in *Pinus pseudostrabus* through direct organogenesis. For bud induction, we investigated the effect of the combination of BA with NAA, at concentrations of 0.5-8.0 and 0.0-0.5 mg L<sup>-1</sup>, respectively; the effect of LP and DCR medium with macro and micronutrients at half- and full-strength concentrations; and the effect of two different explants, entire mature zygotic embryos and isolated cotyledons, from three half-sib families. Results indicated that bud induction can be obtained with BA as the only plant growth regulator at a concentration of 0.5 mg L<sup>-1</sup> and that the presence of NAA in the culture medium induces callus formation. In turn, response is incremented using DCR medium with macro and micronutrients at half-strength concentration, using entire mature zygotic embryos, with a higher response in the 145-S-9 half-sib family.

**Index words:** *Pinus pseudostrabus*, adventitious buds, superior trees, clonal forestry, half-sib families, organogenesis.

## INTRODUCCIÓN

*Pinus pseudostrobus* Lindl. es una especie forestal maderable de rápido crecimiento, buena calidad de madera y amplia distribución en el centro y sur de México; se utiliza en actividades económicas como la construcción de viviendas, la producción de pulpa para elaborar papel, la elaboración de muebles y artesanías, o la producción de resina (CONAFOR 2007). Sus características e importancia económica la convierten en una especie muy atractiva para el implemento de la silvicultura clonal, lo que a su vez puede reducir la pérdida de sus poblaciones naturales y de otras especies (Gladstone y Ledig 1990). Desde 1976 *P. pseudostrobus* se ha integrado a programas de mejoramiento genético, y a la fecha, en el Estado de Michoacán, se han realizado selecciones fenotípicas, se han establecido cinco áreas semilleras y varios ensayos de progenies y procedencias en diferentes localidades (Sáenz-Reyes *et al.* 2011), lo cual ha permitido seleccionar las familias y procedencias de mayor rendimiento (Viveros-Viveros *et al.* 2006, Sáenz-Romero *et al.* 2012). Además, se han realizado estudios para determinar sitios adecuados para el establecimiento de plantaciones forestales de esta especie en el Estado de Michoacán (Muños-Flores *et al.* 2011). Sin embargo, las técnicas de propagación asexual, principalmente injertos y enraizamiento de estacas, sólo han permitido la silvicultura clonal de *P. pseudostrobus* a pequeña escala (Sáenz-Reyes *et al.* 2011).

La organogénesis es una tecnología de propagación clonal, basada en las técnicas del cultivo de tejidos vegetales y la teoría de la totipotencialidad celular, que ha permitido la regeneración de plántulas completas a partir de las células somáticas de una planta (Villalobos y Thorpe 1991, Hicks 1994). Debido a su potencial para clonar eficientemente los árboles de genotipos seleccionados en los programas de mejoramiento genético forestal, esta tecnología, junto a la embriogénesis somática, ha sido investigada activamente en especies gimnospermas económicamente importantes en varios países. En México la investigación se ha enfocado más a la conservación de especies en peligro de extinción, como *Ceratozamia hildae*, *C. mexicana* (Cháves *et al.* 1992a), *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea*, *Z. pumila* (Chávez *et al.* 1992b), *Picea chihuahuana* (López-Escamilla *et al.* 2000, Mata-Rosas *et al.* 2001) y *Pinus maximartinezii* (Villalobos-Amador *et al.* 2002). En lo que respecta al género *Pinus*, la organogénesis ha permitido la regeneración de plántulas en más de 30 especies (Mathur 2001) desde el primer reporte en *P. palustris* (Sommer *et al.* 1975). Aunque en la mayoría de los casos esta tecnología se encuentra en desarrollo, en especies como *P. radiata* (Aitken *et al.* 1981), *P. pinaster* (Rancillac *et al.* 1982), *P. virginiana* (Chang *et al.* 1991, Jang y Tainter 1991), *P. taeda* (Jang y Tainter 1991), *P.*

*pinea* (Alonso *et al.* 2006), *P. massoniana* (Zhang *et al.* 2006) o *P. kesiya* (Tandom *et al.* 2007), se han reportado protocolos de propagación eficientes.

El objetivo de este estudio fue generar una metodología para la propagación de *Pinus pseudostrobus* mediante organogénesis directa, como una fase inicial para el desarrollo e integración de esta tecnología en los programas de mejoramiento genético de esta importante especie forestal Mexicana. El trabajo se enfocó en identificar un balance hormonal, un medio de cultivo y un explante apropiados para la inducción de brotes adventicios y en comparar la respuesta entre árboles seleccionados fenotípicamente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico y técnica de desinfección

Se utilizaron semillas de *Pinus pseudostrobus* colectadas a granel y semillas de los árboles 524-S-3, 5-S-10 y 145-S-9 seleccionados fenotípicamente en un rodal semillero establecido por la Comisión Forestal del Estado de Michoacán en la localidad de Santa Anna Jeráhuaro, municipio de Zinapécuaro, Mich., México. Las semillas se colectaron en el año 2007 y se almacenaron a 4 °C hasta su uso en 2011. Estas se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 1.8 % con cuatro gotas de Tween 20 por cada 100 ml de solución durante 15 minutos; luego en etanol al 70 % durante 15 min. Después de cada inmersión se hicieron cinco lavados con agua destilada estéril. La desinfección de las semillas y el aislamiento de los embriones se realizaron en condiciones asépticas.

### Inducción de brotes

#### *Experimento 1:*

En una primera prueba se evaluó el efecto de la combinación de la N<sup>6</sup>-benciladenina (BA) con ácido naftalenacético (ANA). Los embriones de las semillas colectadas a granel, se precultivaron en un medio MLV (Klimaszewska *et al.* 2004), sin reguladores del crecimiento. Después de 15 días, se seleccionaron los embriones más desarrollados y se cortaron los cotiledones. Posteriormente los cotiledones se distribuyeron en 15 tratamientos de inducción de brotes, los cuales constaron del medio DCR (Gupta y Durzan 1985) modificado con 0.0, 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 mg L<sup>-1</sup> de BA en combinación con 0.0, 0.1 y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Cada tratamiento constó de cinco repeticiones; la repetición fue una caja de Petri (100 x 15 mm) con 30 ml de medio de cultivo y los cotiledones de un embrión (7 cotiledones/embrión en promedio). Los cultivos se subcultivaron mensualmente y se mantuvieron en oscuridad a 23±1 °C, de acuerdo a la metodología de inducción de brotes

de Tang y Guo (2001). A la quinta semana los explantes se observaron bajo el estereomicroscopio para identificar brotes en desarrollo y estimar el porcentaje de respuesta.

#### *Experimento 2:*

En una segunda prueba, se evaluó el efecto del medio de cultivo sobre la inducción de brotes. Los embriones de las semillas colectadas a granel, se precultivaron en un medio DCR-E, el cual carecía de reguladores del crecimiento vegetal y contenía la mitad de la concentración de macro y micronutrientes. Al tercer día, se seleccionaron los embriones viables, caracterizados por un color blanco y una ligera apertura de los cotiledones, y se distribuyeron en cuatro tratamientos de inducción de brotes, los cuales consistieron de los medios de cultivo LP (von Arnold y Ericksson 1981) y DCR a las concentraciones media (LP- $\frac{1}{2}$  y DCR- $\frac{1}{2}$ ) y completa (LP-1 y DCR-1) de macro y micronutrientes. Los cuatro medios de cultivo fueron adicionados con  $0.56 \text{ mg L}^{-1}$  de N<sup>6</sup>-benciladenina (BA). Cada tratamiento constó de cinco repeticiones; la repetición fue una caja de Petri con 10 embriones. A la novena semana, se determinó el porcentaje de explantes que formaron brotes así como el número de brotes por explante.

#### *Experimento 3:*

En una tercera prueba se evaluó la inducción de brotes en las familias de medios hermanos 524-S-3, 5-S-10 y 145-S-9, en los medios de cultivo DCR a la concentración media (DCR- $\frac{1}{2}$ ) y completa (DCR-1) de macro y micronutrientes, utilizando embriones cigóticos completos y cotiledones aislados como explantes. Para el establecimiento de los dos tipos de explantes *in vitro*, los embriones cigóticos de cada familia se precultivaron en un medio DCR-E. Al tercer día, ambos tipos de explantes se pasaron a los medios de inducción de brotes, los cuales se adicionaron con  $0.56 \text{ mg L}^{-1}$  de BA. Cada tratamiento consistió de cinco repeticiones: cuando se utilizaron embriones cigóticos completos como explantes, la repetición fue una caja de Petri con siete embriones; cuando se utilizaron cotiledones como explantes, la repetición fue una caja de Petri con los cotiledones de cuatro embriones, los cuales constaron de 7 cotiledones en promedio. A la novena semana se registró el número de explantes que formaron brotes así como el número de brotes por explante.

### **Elongación**

Después de cuatro semanas de la siembra en los diferentes tratamientos de inducción, todos los explantes del segundo y tercer experimento se transfirieron al medio de cultivo DCR-E adicionado con  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  de carbón activado. Los cultivos se subcultivaron mensualmente y a la novena semana los brotes se separaron de los explantes y se transfirieron a frascos de cristal (55 x 90 mm) con 40 ml del mismo medio DCR-E adicionado con carbón activado, para una elongación individualizada. Después de 18 semanas, se evaluó el porcentaje de supervivencia.

Todos los medios de cultivo LPy DCRutilizados en la fase de inducción, y el medio DCR-E utilizado en la fase de elongación, se adicionaron con 0.2, 0.5, 0.5 y  $20 \text{ g L}^{-1}$  de myo-inositol, hidrolisado de caseína, L-glutamina y sacarosa, respectivamente; El pH de todos los medios se ajustó a 5.8 y se agregaron  $8 \text{ g L}^{-1}$  de agar antes de esterilizar en autoclave a  $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $1.5 \text{ kg cm}^{-1}$  durante 15 min. Todos los cultivos, excepto los del primer experimento de inducción de brotes, se mantuvieron a  $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

### **Enraizamiento**

El experimento de enraizamiento se inició a las 18 semanas de comenzada la fase de elongación. Se seleccionaron los brotes de más de 20 mm de longitud y se evaluaron cuatro tratamientos: 1) un pulso de seis horas en ácido indolbutírico (IBA) más ácido indolacético (IAA), ambos a una concentración de 1 mM; 2) un pulso de 24 horas en ANA a  $53.76 \text{ } \mu\text{M}$ ; 3) cultivo en un medio DCR-E adicionado con  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  de BA y  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de IBA; y 4) cultivo en un medio DCR-E adicionado sólo con  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  de carbón activado. Después de cada uno de los pulsos de auxinas, y de 4 semanas de cultivo en el tercer y cuarto tratamiento, todos los brotes se transfirieron a un medio DCR-E adicionado con  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  de carbón activado, para el desarrollo de la raíz. Todos los medios de cultivo DCR para la inducción y elongación de raíz se adicionaron con  $10 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa y se solidificaron con  $1.5 \text{ g L}^{-1}$  gellan gum. Cada tratamiento constó de 20 brotes cultivados individualmente en frascos de cristal (55 x 90 mm) con 40 ml del medio de cultivo. Los cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones que para la fase de elongación.

### **Análisis estadísticos**

Para determinar si existía diferencia significativa entre tratamientos de inducción de brotes, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) con los datos previamente

transformados al arcoseno para la variable "tasa de inducción" y sin transformación de datos para la variable "número de brotes por explante". En el segundo experimento se realizaron ANOVAs de una sola vía; para el tercer experimento se utilizó un diseño factorial. Posteriormente se realizaron pruebas de comparación de medias Tukey cuando se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete STATISTICA (StatSoft 2007).

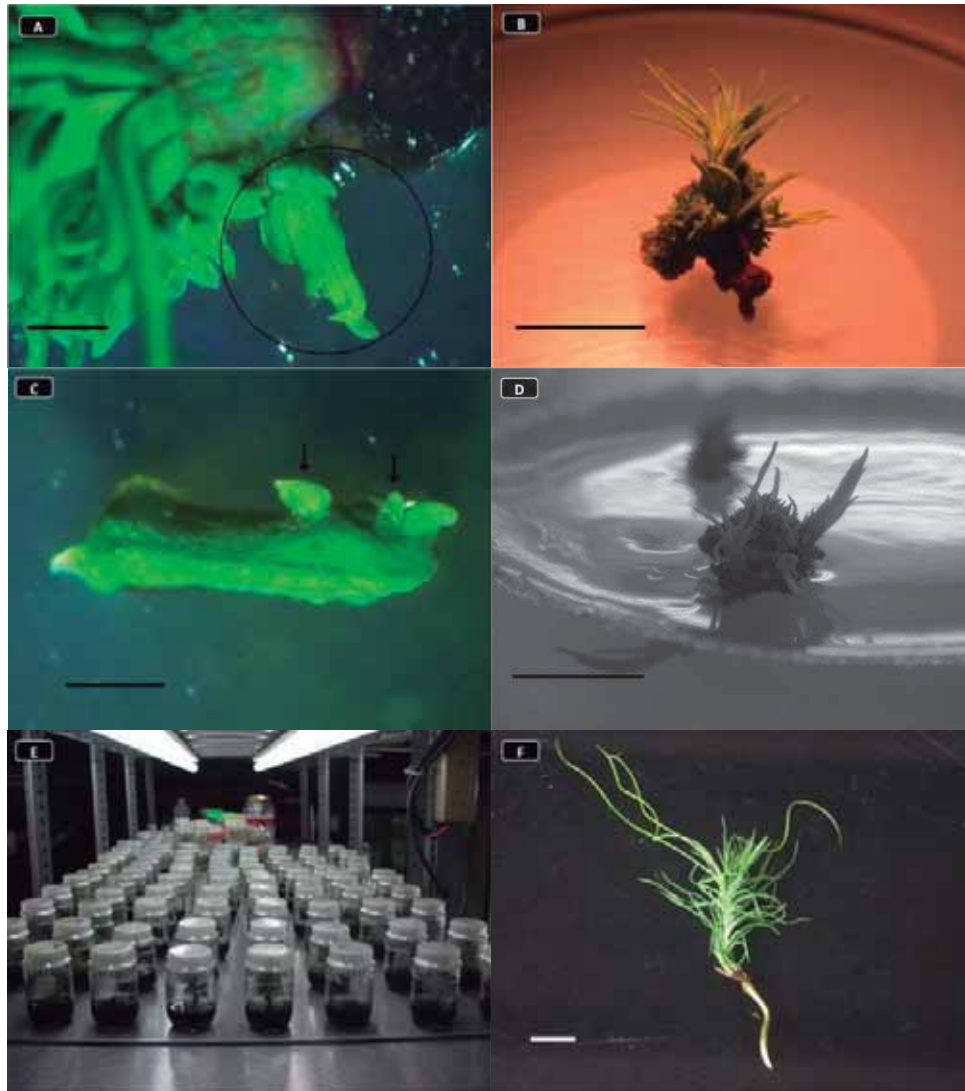
En el segundo y tercer experimento de inducción de brotes se calculó además el "índice de capacidad de formación de brotes" con la siguiente fórmula (Saborio *et al.* 1997):

ICFB = [(% de explantes que formaron brotes) (número promedio de brotes por explante)]/100.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Experimento 1:*

Las observaciones al estereomicroscopio (a 8X) a la cuarta semana de la siembra de los explantes, mostraron que ninguno de los 15 tratamientos indujo la formación de brotes y que aproximadamente el 60 % de los explantes en cultivo formaron callosidad. En especies forestales la BA y ANA han sido los reguladores del crecimiento más investigados para la inducción de brotes adventicios (Tang y Guo 2001), y en *P. palustris* (Sommer *et al.* 1975), *P. virginiana* (Chang *et al.* 1991, Jang y Tainter 1991) y *P. echinata* (Jang y Tainter 1991), esta combinación de reguladores del crecimiento ha inducido la organogénesis directa a concentraciones de 1.0-20.0 mg L<sup>-1</sup> de BA y 0.01-2.0 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Sin embargo, en especies como *Pinus elliotii* (Pérez-Bermúdez y Sommer 1987), *P. eldarica* (Gladfelter y Phillips 1987), *P. resinosa* (Noh *et al.* 1988), *P. pinaster* (Calixto y Pais 1997) y *P. taeda* (Tang *et al.* 1998) la presencia o incremento de ANA en el medio de cultivo a concentraciones de 0.001-10.0 mg L<sup>-1</sup> ha inducido la callogénesis y/o reducido la tasa de inducción de brotes. Por otra parte, en varias especies como *Pinus sylvestris* (Tranvan 1979), *P. radiata* (Yeung *et al.* 1981, Montalbán *et al.* 2011), *P. contorta* (Patel y Thorpe 1984), *P. rigida* (Patel *et al.* 1986), *P. canariensis* (Martínez-Pulido *et al.* 1992), *P. oocarpa* (Bergmann y Stomp 1992), *P. roxburghii* (Muriithi *et al.* 1993), *P. pinea* (García-Férriz *et al.* 1994, Moncaleán *et al.* 2005, Alonso *et al.* 2006), *P. ayacahuite* (Saborio *et al.* 1997), *P. heldreichii* (Stojičić *et al.* 1999) y *P. wallichiana* (Mathur y Nadgauda 1999), la organogénesis directa se ha reportado utilizando BA como el único regulador del crecimiento a concentraciones de 0.5-22.5 mg L<sup>-1</sup>, variando drásticamente la respuesta



**Figura 3. Inducción de brotes a partir de embriones cigóticos maduros y cotiledones aislados de *Pinus pseudostrobus*. A) Brote adventicio emergiendo de la superficie de un embrión a las 4 semanas de cultivo en el medio DCR-1 (barra = 1 mm). B) Embrión con múltiples brotes a las 5 semanas de cultivo en el medio de elongación DCR-E (barra = 1 cm). C) Brote adventicio surgiendo de la superficie de un cotiledón aislado a las 4 semanas de cultivo en el medio DCR-1 (barra = 1 mm). D) Múltiples brotes emergiendo de un cotiledón fraccionado, a las 5 semanas de cultivo en el medio de elongación DCR-E (barra = 1 cm). E) Vástagos en fase de enraizamiento. F) Vástago enraizado a las 17 semanas de cultivo en el medio de elongación DCR-E adicionado con carbón activado(barra = 1 cm).**

entre especies. Mientras que en *Pinus pinea* la tasa de inducción de brotes se mantiene constante de 1.0 a 10.0 mg L<sup>-1</sup> de BA (García-Férriz *et al.* 1994, Moncaleán *et al.* 2005, Alonso *et al.* 2006), en *P. ayacahuite* (Saborio *et al.* 1997) y *P. canariensis* (Martínez-Pulido *et al.* 1992) la mayor tasa de inducción de brotes se obtuvo a 11.26 y 22.5 mg L<sup>-1</sup> de BA, respectivamente. En contraparte, *Pinus rigida* (Patel *et al.* 1986), *P. wallichiana* (Mathur y Nadgauda 1999), *P. heldreichii* (Stojicic *et al.* 1999), *P. massoniana* (Zhang *et al.* 2006) y *P. radiata* (Montalbán *et al.* 2011) generan mayor respuesta en bajas concentraciones de BA, registrando una drástica reducción en la tasa de inducción cuando la concentración excede 1 mg L<sup>-1</sup>. Las concentraciones de BA y ANA utilizadas en este experimento fueron de 2.0-8.0 y 0.1-0.5 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, y un análisis de correlación entre los niveles de cada regulador del crecimiento y la inducción de calogénesis indicó una mayor influencia del ANA ( $r = 0.487$ ;  $P < 0.01$ ) que de la BA ( $r = 0.188$ ;  $P = 0.105$ ). Por lo tanto la calogénesis observada en los explantes se atribuye a la presencia de auxina en el medio de cultivo y la falta de inducción de brotes se atribuye posiblemente a la alta concentración de BA, a la edad avanzada de los explantes y al cultivo en la oscuridad (ver más adelante).

#### *Experimento 2:*

En la evaluación de los medios LP y DCR a la concentración media y completa de macro y micronutrientes, adicionados con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BA, la inducción de brotes se observó a la cuarta semana de la siembra de los explantes (Fig. 3A). Con el ANOVA se determinó que hubo diferencias significativas entre tratamientos para el número de explantes que formaron brotes ( $P < 0.01$ ) y la prueba de Tukey indicó mayor respuesta en los medios basales DCR que en los medios LP (Cuadro 2). Por otra parte, aunque no hubo diferencias significativas entre los medios DCR en la tasa de inducción, si hubo diferencias significativas para el número de brotes por explante ( $P < 0.01$ ), siendo el DCR-½ el medio que generó mayor respuesta (Cuadro 2). El mayor índice de capacidad de formación de brotes (ICFB) de 7.13, obtenido en el medio DCR-½ (Cuadro 2), es superior al obtenido en especies como *Pinus ayacahuite* (ICFB = 3.1) (Saborio *et al.* 1997) y *P. wallichiana* (ICFB = 4.53) (Mathur y Nadgauda 1999), pero inferior a los reportados en especies como *Pinus taeda* (Jang y Tainter 1991), *P. virginiana* (Jang y Tainter 1991), *P. pinea* (Moncaleán *et al.* 2005), *P. massoniana* (Zhang *et al.* 2006) y *P. kesiya* (Tandom *et al.* 2007), con índices de capacidad de formación de brotes de 101, 50, 40, 10.8 y 22.6, respectivamente.

**Cuadro 2. Efecto del medio de cultivo y la concentración basal en la inducción de brotes a partir de embriones cigóticos maduros completos de *Pinus pseudostrobus*.**

Medio <sup>†</sup>	Concentración basal <sup>††</sup>	% explantes que formaron brotes	No. de brotes por explante	ICFB
DCR	½	88 a	8.1 ± 3.1 a	7.13
	1	76 a	3.2 ± 1.1 b	2.46
LP	½	30 b	0.6 ± 0.4 c	0.13
	1	2 b	0.0 ± 0.0 c	0.00

<sup>†</sup>Cada tratamiento constó de 50 embriones y los medios de cultivo se adicionaron con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BA; <sup>††</sup>Macro y micronutrientes a la concentración media y completa; ICFB = Índice de capacidad de formación de brotes.

### Experimento 3:

En esta prueba se determinó que el número de explantes que formaron brotes no fue significativamente diferente entre familias, ni entre las seis interacciones familia x medio de cultivo, pero sí entre medios de cultivo, siendo el medio DCR-½ el que generó mayor respuesta (Cuadro 3 y Cuadro 4). En cuanto al número de brotes por explante, se determinaron diferencias significativas entre familias, medios de cultivo y entre las seis combinaciones familia x medio de cultivo, generándose mayor respuesta en la familia 145-S-9, el medio DCR-½ y en la combinación de la familia 145-S-9 con el medio DCR-½, en donde se obtuvo un ICFB = 6.0 (Cuadro 3 y Cuadro 4). Al igual que en el segundo experimento, el medio DCR-½ indujo mayor respuesta que el DCR-1, lo cual concuerda con el resultado obtenido en especies como *Pinus contorta* (Patel y Thorpe 1984), *P. tecunumanii* (Bergmann y Stomp 1992), *P. roxburghii* (Muriithi *et al.* 1993) y *P. wallichiana* (Mathur y Nadgauda 1999) en las que la mitad de la concentración salina de diferentes medios de cultivo ha propiciado la inducción de brotes adventicios a partir de embriones cigóticos completos y cotiledones aislados. En esta misma prueba también se evaluó la inducción de brotes a partir de cotiledones aislados de tres días de edad. Sin embargo, aproximadamente el 87 % del total de cotiledones cultivados se oxidaron completamente a las 6 semanas de cultivo (Cuadro 5), por lo que no se pudo comparar la inducción de brotes entre este explante y los embriones cigóticos completos. No obstante, se observó la inducción de brotes en los cotiledones que sobrevivieron y actualmente estos cultivos se encuentran en la fase de elongación (Fig. 3C y Fig. 3D).

**Cuadro 3. Resultados del análisis de varianza para la inducción de brotes en tres familias de medios hermanos de *Pinus pseudostrobus*, en el medio DCR a la concentración media y completa de macro y micronutrientos.**

Fuente de variación	Grados de libertad	F	p
Variable % explantes que formaron brotes <sup>†</sup> :			
Familia	2	2.8	0.076
Medio	1	39.1	<0.001
Familia x Medio	2	1.8	0.185
Error	24		
Variable No. de brotes por explante:			
Familia	2	8.7	0.001
Medio	1	44.8	<0.001
Familia x Medio	2	6.1	0.006
Error	24		

<sup>†</sup>Los porcentajes fueron previamente transformados al arcoseno.

**Cuadro 4. Inducción de brotes en tres familias de medios hermanos de *Pinus pseudostrobus*, en el medio DCR a la concentración media y completa de macro y micronutrientos.**

Familia	Medio <sup>†</sup>	% explantes que formaron brotes	No. de brotes por explante <sup>††</sup>	ICFB
5-S-10	DCR-½	74.3	2.9 ± 1.3b	2.2
	DCR-1	42.9	1.0 ± 0.9b	0.4
524-S-3	DCR-½	68.6	2.5 ± 1.7b	1.7
	DCR-1	17.1	0.3 ± 0.3b	0.1
145-S-9	DCR-½	91.4	6.6 ± 1.9a	6.0
	DCR-1	31.4	1.0 ± 1.0b	0.3

<sup>†</sup>Cada tratamiento constó de 35 embriones y los medios de cultivo se adicionaron con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de BA; <sup>††</sup>Los valores representan la media ± la desviación estándar. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ); ICFB = Índice de capacidad de formación de brotes.

En varias especies de pinos se ha determinado que la edad del explante también ejerce una fuerte influencia sobre la inducción de brotes. En *P. pinaster* (Calixto y Pais 1997) se determinó que los cotiledones de 8 días después de la germinación generan mayor respuesta que los cotiledones de 19 días, sin embargo presentaron mayor porcentaje de oxidación, y viceversa. Por otra parte, en especies como *Pinus radiata* (Aitken-Christie *et al.* 1985), *P. ponderosa* (Ellis y Bilderback 1989), *Pinus ayacahuite* (Saborio *et al.* 1997) y *P. pinea* (Valdés *et al.* 2001) se determinó que los explantes de mayor respuesta son los cotiledones de 0-3 días después de la germinación. En este experimento se obtuvo respuesta nula en cotiledones de 15 días de edad y se indujo la formación de brotes en cotiledones de 3 días de edad (Fig. 3C), sin embargo los problemas de oxidación en estos últimos impidieron una evaluación adecuada de los resultados, por lo que será necesario investigar condiciones que permitan mayor supervivencia de estos explantes en cultivo.

**Cuadro 5. Supervivencia de cotiledones a la quinta semana de cultivo en el medio de elongación DCR-E sin reguladores del crecimiento y adicionado con 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado. Los cultivos se mantuvieron a 25±2 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.**

Familia	Medio de inducción	No. de cotiledones sembrados	% supervivencia
5-S-10	DCR-½	152	2.0
	DCR-1	155	0.6
524-S-3	DCR-½	155	0.0
	DCR-1	153	7.1
145-S-9	DCR-½	140	51.4
	DCR-1	91	19.7
Total		846	
Promedio			12.5

### **Elongación y enraizamiento de brotes**

El número total de brotes generados con las semillas colectadas a granel, evaluadas en el segundo experimento, y con las semillas de las familias 5-S-10, 524-S-3 y 145-S-9

fue de 600, 136, 101 y 265 respectivamente. A las 18 semanas del inicio de la fase de elongación, se determinó un 29.5% de supervivencia para los brotes generados con las semillas colectadas a granel (Cuadro 6). Todos los brotes provenientes de las tres familias de medios hermanos se encuentran en la fase de elongación. Actualmente sólo se ha registrado el enraizamiento de dos vástagos (Fig. 3E y Fig. 3F).

En prácticamente todas las especies forestales investigadas, cada una de las fases de la organogénesis requiere de condiciones de cultivo específicas, por lo que será necesario evaluar condiciones de cultivo que permitan una mayor supervivencia de los brotes en la fase de elongación para incrementar el número de vástagos en la fase de enraizamiento y el número de plántulas generadas.

**Cuadro 6. Supervivencia de brotes a las 18 semanas de cultivo en el medio DCR-E sin reguladores del crecimiento y adicionado con 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado. Los cultivos se mantuvieron a 25±2 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.**

Medio de inducción	Explantos cultivados	Explantos que respondieron	No. de brotes generados	% supervivencia
DCR ½	50	44	405	27.1
	1	38	162	41
LP ½	50	15	31	No evaluado
	1	1	2	No evaluado
Total	200	98	600	29.5

### CONCLUSIONES

Se concluye que el ANA a concentraciones de 0.1-0.5 mg L<sup>-1</sup>, induce la callogénesis en cotiledones aislados de *Pinus pseudostrobus* y que la inducción de brotes adventicios directamente de los tejidos del explante se puede obtener utilizando BA como único regulador del crecimiento a una concentración de 0.5 mg L<sup>-1</sup>. Además, el medio DCR a la mitad de la concentración de macro y micronutrientos propicia mayor respuesta que el medioDCR a la concentración completa de macro y micronutrientosy que los medios LP a la concentración media y completa de macro y micronutrientos. Por último, la inducción de brotes fue nula en cotiledones de 15 días de edad pero pudo generarse tanto en embriones completos como en cotiledones aislados, ambos de tres días

de edad. Sin embargo, el problema de oxidación de los cotiledones de tres días de edad vuelve a este explante menos conveniente. La familia 145-S-9 fue la de mayor respuesta a la formación de brotes, generando el mayor índice de capacidad de formación de brotes (ICFB = 6) de las tres familias evaluadas. Se demostró que *Pinus pseudostrabus* puede propagarse mediante organogénesis directa, existiendo muchas posibilidades para el desarrollo de un protocolo de propagación eficiente.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Comisión Forestal del Estado de Michoacán proyecto "Mejoramiento Genético Forestal" incluido en el Presupuesto de Egresos de la Federación 2011 anexo 31 (CONAFOR) y a la Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH proyecto 5.6 por el apoyo económico brindado para el desarrollo de este estudio.

### LITERATURA CITADA

- Aitken J, K J Horgan, T A Thorpe (1981)** Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. Canadian Journal of Forest Research 11:112-117.
- Aitken-Christie J, A P Singh, K J Horgan, T A Thorpe (1985)** Explant developmental state and shoot formation in *Pinus radiata* cotyledons. Botanical Gazette 146(2):196-203.
- Alonso P, P Moncaleán, B Fernández, A Rodríguez, M L Centeno, R J Ordás (2006)** An improved micropropagation protocol for stone pine (*Pinus pinea* L.) Annals of Forest Science 63:870-885.
- Alonso P, P Moncaleán, B. Fernández, A Rodríguez, M L Centeno, R J Ordás (2006)** An improved microropagation protocol for stone pine (*Pinus pinea* L.). Annals of Forest Science 63:879-885.
- Bergman B A, A-M Stomp (1992)** Influence of taxonomic relatedness and medium composition on meristematic nodule and adventitious shoot formation in nine pine species. Canadian Journal of Forest Research 22:750-755.
- Calixto F, Pais M S (1997)** Adventitious shoot formation and plant regeneration from *Pinus pinaster* Sol. ex Aiton. In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant 33(2):119-124.

- Chang S, S Sen, C R McKinley, J Aimers-Halliday, R J Newton (1991)** Clonal propagation of Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) by organogenesis. *Plant Cell Reports* 10:131-134.
- Chávez V M, R E Litz, K Norstog (1992a)** *In vitro* morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30:93-98.
- Chávez V M, R E Litz, K Norstog (1992b)** Somatic embryogenesis and organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea*, and *Z. pumila*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30:99-105.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) (2007)** *Pinus pseudostrabus* Lindl. Ficha técnica. <http://www.conafor.gob.mx/portal/index.php/temasforestales/reforestacion/fichas-tecnicas> (Accesada en junio de 2012).
- Ellis D D, D E Bilderback (1989)** Temporal competence of embryogenic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds *in vitro*. *American Journal of Botany* 76(3):348-355.
- García-Férriz L, L Serrano, J Iberto-Pardos (1994)** *In vitro* shoot organogenesis from excised immature cotyledons and microcuttings production in Stone pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36:135-140.
- Gladfelter H J, G C Phillips (1987)** *De novo* shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. *in vitro* I. Reproducible regeneration from long-term callus cultures. *Plant Cell Reports* 6:163-166.
- Gladstone W T, F T Ledig (1990)** Reducing pressure on natural forest through high-yield forestry. *Forest Ecology and Management* 35:67-78.
- Gupta P K, D J Durzan (1985)** Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports* 4:177-179.
- Hicks G S (1994)** Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 30:10-15.
- Jang J C, Tainter F H (1991)** Micropropagation of shortleaf, Virginia and Loblolly x shortleaf pine hybrids via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25:61-67.
- Klimaszewska K, A G Rutledge, A Séguin (2004)** Genetic transformation of conifers utilizing somatic embryogenesis. *In: Methods in Molecular Biology*, Vol. 286: Transgenic Plants: Methods and Protocols. L Peña (ed). Human Press Inc, Totowa,

NJ. pp:151-163.

- López-Escamilla A N, L P Olguín-Santos, J Márquez, V M Chávez, R Bye (2000)** Adventitious bud formation from mature embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endangered Mexican spruce tree. *Annals of Botany* 86:921-927.
- Martínez-Pulido C, Harry I S, T A Thorpe (1992)** Optimization of bud induction in cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. *Plant Cell Tissue, and Organ Culture* 29:247-255.
- Mata-Rosas M, V M Chávez, R B Boettler (2001)** *In vitro* regeneration of plantlets from immature zygotic embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endemic Mexican endangered species. *In vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 37:73-73.
- Mathur G (2001)** Morphogenetic studies of two indian pines in vitro: *Pinus roxburghii* Sarg. and *Pinus wallichiana* A. B. Jacks. Doctoral Thesis. University of Pune, India. 137 p.
- Mathur G, R Nadgouda (1999)** *In vitro* plantlet regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus wallichiana* A. B. Jacks. *Plant Cell Reports* 19:74:80.
- Moncaleán P, P Alonso, M L Centeno, M Cortizo, A Rodríguez, B Fernández, R J Ordás (2005)** Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledon to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. *Tree Physiology* 25:1-9.
- Montalbán I A, De Diego N, Aguirre-Igartua E, A Setién, P Moncaleán (2011)** A combined pathway of somatic embryogenesis and organogenesis to regenerate radiata pine plants. *Plant Biotechnology Reports* 5:177-186.
- Muños-Flores H J, J T Sánchez-Reyes, J J García-Sánchez, E Hernández-Máximo, J Anguiano-Contreras (2011)** Áreas potenciales para establecer plantaciones forestales comerciales de *Pinus pseudostrobus* Lindl. y *Pinus greggii* Engelm. en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 2(5):29-44.
- Muriithi W T, I S Harry, E C Yeung, 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, D E Riemenschneider (1988)** Adventitious shoot formation from embryogenic explants of red pine (*Pinus resinosa*). *Physiologia Plantarum* 74:119-124.
- Patel K R, H-R Kim, T A Thorpe (1986)** Plantlet formation in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) by tissue culture methods. *Forest Ecology and Management* 15:147-160.
- Patel K R, Thorpe T A (1984)** *In vitro* differentiation of plantlets from embryogenic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud.) *Plant Cell Tissue and*

- Organ Culture 3:131-142.
- Pérez-Bermudez P, H E Sommer (1987)** Factors affectin adventitious bud induction in *Pinus elliottii* (Engelm.) embryos cultured *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 11:25-35.
- Rancillac M, M Faye, A David (1982)***In vitro* rooting of cloned shoots in *Pinus pinaster*. Physiologia Plantarum 56:97-101.
- Saborio F, Dvorak W, K K Donahue J K, T A Thorpe (1997)** *In vitro* regeneration of plantlets from mature embryos of *Pinus ayacahuite*. Tree Physiology 17:787-796.
- Sáenz-Reyes J T, H J Muños-Flores, A Rueda-Sánchez (2011)** Especies promisorias de clima templado para plantaciones forestales comerciales en Michoacán. Libro técnico No. 10. SAGARPA-INIFAP-CIRCAP-Campo Experimental Uruapan. Uruapan, Michoacán, México. 213 p.
- Sáenz-Romero C, G E Rehfeldt, J C Soto-Correa, S Aguilar-Aguilar, V Zamarripa-Morales, J López-Upton (2012)**Altitudinal genetic variation among *Pinus pseudostrobus* populations from Michoacán, Mexico. Two location shadehouse test results. Revista Fitotecnia Mexicana 35(2):111-120.
- Sommer H E, C L Brown, P P Kormanik (1975)** Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured *in vitro*. Botanical Gazette 136(2): 196-200.
- StatSoft Inc. (2007)** STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
- Stojičić D, S Budimir, L Čulafić (1999)** Micropropagation of *Pinus heldreichii*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59:147-150.
- Tandon P, Kumaria S, Choudhury H (2007)** Plantlet regeneration of *Pinus kesiya* Royle ex Gord. from mature mebryos. Indian Journal of Biotechnology 6:262-266.
- Tang W, Ouyang F, 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, Z Guo (2001)***In vitro* propagation of loblolly pine via direct somatic organogenesis from mature cotyledons and hypocotyls. Plant Growth Regulation 33:25-31.
- Tranvan H (1979)** *In vitro* adventitious bud formation on isolated seedlings of *Pinus sylvestris* L. Biologia Plantarum (Praha) 21(3):230-233.
- Valdés A, R J Ordás, B Fernández, M L Centeno (2001)** Relationships between

hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. Plant Physiology and Biochemistry 39(5):377-384.

- Villalobos A, T A Thorpe (1991)** Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. W M Roca, L A Mroginski (eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. pp:127-141.
- Villalobos-Amador E, G Rodrigue-Hernández, E Pérez-Molphe-Balch (2002)** Organogenesis and *Agrobacterium rhizogens*-induced rooting in *Pinus maximartinezii* Rzedowsky and *P. pinceana* Gordon. Plant Cell Reports 20:779-785.
- Viveros-Viveros H, C Sáenz-Romero, J J Vargas-Hernández, J López-Upton (2006)** Variación entre procedencias de *Pinus pseudostrobus* establecidas en dos sitios en Michoacán, México. Revista Fitotecnia Mexicana 29(2):121-126.
- Von Arnold S, T Eriksson (1985)** *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. Canadian Journal of Botany 59(5):870-874.
- Yeung E C, J Aitken, S Biondi, T A Thorpe (1981)** Shoot hystogenesis in cotyledons explants of radiata pine. Botanical Gazette 142(4):494-501.
- Zhang Y, Z Wei, M Xi, J Shi (2006)** Direct organogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of masson pine (*Pinus massoniana* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84:119-123.

## CAPÍTULO II

### RECALCITRANCIA A LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Pinus pseudostrabus* LINDL.

### RECALCITRANCE TO SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Pinus pseudostrabus* LINDL.

**Eduardo Mendoza Maya<sup>1</sup>, Alejandro Martínez Palacios<sup>1</sup>, Miguel Martínez Trujillo<sup>2</sup>,  
Cuauhtémoc Sáenz Romero<sup>1</sup>, Víctor M. Chávez Ávila<sup>3</sup> y Nahum M. Sánchez Vargas<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH). Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México. Tel: +(52)(443) 334-0475 ext. 119, Fax ext. 200.

<sup>2</sup>Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Edificio B4. 58066 Morelia, Michoacán, México.

<sup>3</sup>Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Jardín Botánico del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 04510 Distrito Federal, México.

## RESUMEN

Se reporta la inducción de masas embrionales (MEs) a partir de embriones cigóticos maduros de *Pinus pseudostrobus* Lindl. Para la inducción, se realizaron dos pruebas: en una se evaluó la respuesta entre cinco familias de medios hermanos en un tratamiento estándar; en otra se evaluó el efecto de la combinación de 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D con 0.0, 2.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> de BA utilizando explantes de una sola familia. Las MEs se generaron en las cinco familias de medios hermanos, con una mayor respuesta en la familia 524-S-3. Por otra parte, la inducción de MEs sólo se obtuvo en dos de las 15 combinaciones de 2,4-D con BA: combinaciones de 2.0 y 10.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D con 2.0 mg L<sup>-1</sup> de BA. Las tinciones mostraron MEs con un potencial regenerativo que no se pudo concretar a causa de la oxidación generalizada del tejido a las cuatro semanas de cultivo en la fase de mantenimiento-proliferación. Los resultados mostraron un comportamiento recalcitrante de *Pinus pseudostrobus* la propagación mediante embriogénesis somática utilizando embriones cigóticos maduros como explantes.

**Palabras clave:** *Pinus pseudostrobus*, embriogénesis somática, recalcitrancia.

## ABSTRACT

We report induction of embryonal masses (EMs) from mature zygotic embryos of *Pinus pseudostrobus* Lindl. For induction, we evaluated response among five half-sib families in a standard treatment and the effect of the combination of 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, and 10.0 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D with 0.0, 2.0, and 4.0 mg L<sup>-1</sup> of BA, using explants of one family. Differentiation between non-embryogenic callus and embryonal masses was realized with the double staining technique with acetocarmine and Evan's blue. The EMs was generated in the five half-sib families, with a higher response in 524-S-3 half-sib family. Moreover, the induction of EMs was obtained only in two of the fifteen combinations of 2,4-D with BA: combinations of 2.0 and 10.0 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D with 2.0 mg L<sup>-1</sup> of BA. Staining showed EMs with a regenerative potential that was unable to materialized because a generalized oxidation of tissue at four weeks of culture in the maintenance-proliferation phase. The results show a recalcitrant behavior of *Pinus pseudostrobus* to propagation through somatic embryogenesis using mature zygotic embryos as explants.

**Index words:** *Pinus pseudostrobus*, somatic embryogenesis, recalcitrance.

## INTRODUCCIÓN

*Pinus* se considera el género de árboles ecológica y económicamente más importante en el Planeta (Richardson y Rundel 2000). Sin embargo, se ha caracterizado por ser el grupo de especies más recalcitrantes a la propagación mediante embriogénesis somática (Radojevic *et al.* 1999, Bonga *et al.* 2010), que es la tecnología más promisoría para el implemento de la silvicultura clonal (Klimaszewska *et al.* 2007). A pesar de los avances que se han hecho en los últimos 25 años, esta tecnología no se ha logrado integrar a los programas de mejoramiento genético de muchas especies de pinos de interés comercial, debido a los cuellos de botella de las fases de iniciación, maduración y establecimiento en campo, aunado a la diferente respuesta entre genotipos de la misma especie (Park 2002, Bonga *et al.* 2010). A la fecha son pocos los ejemplos en donde se ha establecido un sistema efectivo de propagación masiva con esta técnica, como en el caso de *P. banksiana*, *P. taeda*, *P. radiata*, *P. strobus* y *P. pinaster* (Hagman *et al.* 2005, Klimaszewska *et al.* 2007).

En la mayoría de las especies de pinos estudiadas el embrión cigótico inmaduro ha sido el explante de mayor respuesta para la fase de iniciación (Arya *et al.* 2000; Bonga *et al.* 2010), la cual se caracteriza por la formación de masas embrionales (MEs) constituidas por numerosos embriones somáticos en estadios tempranos del desarrollo (Gupta y Holmstrom 2005). Sin embargo, este explante presenta la desventaja de que se cuenta con un corto espacio de tiempo o “ventana de respuesta” para inducir la embriogénesis, el cual dura de 2 a 3 semanas (Mathur 2001). No obstante, se ha reportado la iniciación a partir de explantes que se encuentran fuera de la ventana de respuesta, aunque con bajas tasas de regeneración. Tal es el caso de *Pinus elliottii* (Tang y Ouyang 1997), *P. strobus* (Garin *et al.* 1998), *P. nigra* (Radojevic *et al.* 1999) y *P. taeda* (Tang *et al.* 2001), especies en las que se logró la regeneración partiendo de embriones cigóticos maduros; o *P. patula* (Malabadi y van Staden 2005) y *P. roxburghii* (Malabadi y Nataraja 2007) en las que se logró la regeneración a partir de retoños y acículas secundarias, respectivamente.

El objetivo del presente estudio fue inducir la embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos maduros de *Pinus pseudostrabus* Lindl., una especie forestal económicamente importante en México. El trabajo se enfocó en caracterizar el tipo de masas de tejido generadas y en evaluar su capacidad para cultivarse como líneas celulares embriogénicas estables.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y técnica de desinfección

Se utilizaron semillas de los árboles 524-S-3, 145-S-9, 79-S-14, 5-S-10 y 184-S-15, provenientes de una selección fenotípica en un rodal semillero establecido en la localidad de Santa Anna Jeráhuaro, Municipio de Zinapécuaro, Mich., y semillas del árbol 511 de *Pinus pseudostrobus* seleccionado a partir de los resultados de un ensayo de progenies establecido en la Comunidad Indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Mich. Las semillas de los árboles de Santa Anna Jeráhuaro se colectaron en el año 2007, las del árbol 511 se colectaron a principios de 2011. Todas las semillas se almacenaron a 4 °C hasta su uso en 2010-2011. Para la desinfección, estas se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1.8 % con dos gotas de Tween 20 durante 15 minutos; luego en etanol al 70 % durante 15 min. Después de cada inmersión se hicieron cuatro lavados con agua destilada estéril. Los embriones fueron aislados de las semillas y se sembraron en diferentes tratamientos de inducción en condiciones asépticas.

### Inducción de masas de tejido

#### *Experimento 1*

En una primera prueba, las familias provenientes del rodal Santa Anna Jeráhuaro se sometieron a un tratamiento de inducción estándar (Pullman *et al.* 2003), para evaluar la respuesta a la formación de masas embrionales y comparar la respuesta entre familias de medios hermanos de *Pinus pseudostrobus*. El tratamiento de inducción consistió del medio 505 (Pullman *et al.* 2003) adicionado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), N<sup>6</sup>-benciladenina (BA) y cinetina (KIN) a 8.0, 4.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup>, modificado con 1 y 15 g L<sup>-1</sup> de myo-inositol y sacarosa, respectivamente, y solidificado con gellan gum (Gelrite) 0.6 %. Cada tratamiento consistió de cuatro repeticiones; la repetición fue una caja de Petri (100 x 15 mm) con 30 ml del medio de cultivo y 7 explantes (embriones cigóticos maduros).

#### *Experimento 2*

Para la familia 511 proveniente del ensayo de progenies de Nuevo San Juan, se diseñó un experimento factorial en el que se combinaron 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D con 0.0, 2.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> de BA, para un total de 15 tratamientos. Cada tratamiento constó de 12 repeticiones; la repetición fue una caja de Petri (100 x 15 mm) con 5 explantes. Se utilizó el medio de cultivo 505 modificado con myo-inositol, sacarosa,

polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico y ácido cítrico a 1, 15, 2, 0.15 y 0.15 g L<sup>-1</sup> respectivamente y solidificado con gellan gum (Gelrite) 0.6 %.

Todos los cultivos se subcultivaron cada mes y la tasa de inducción se evaluó desde la tercera hasta la octava semana de la siembra de los explantes. Para determinar si existía diferencia significativa entre tratamientos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía para los resultados obtenidos con las cinco familias de Santa Anna Jeráhuaro y un ANOVA con diseño factorial para la familia 511, en ambos casos los datos fueron previamente transformados al arcoseno. Posteriormente, se realizaron pruebas de comparación de medias de Tukey para los resultados de ambos experimentos y un análisis de correlación entre los niveles de cada regulador del crecimiento y la tasa de inducción para los resultados obtenidos en el segundo experimento. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete STATISTICA (StatSoft 2007).

### **Caracterización del tejido**

Se tomaron muestras de aproximadamente 50 mg de tejido y se realizó una tinción diferencial para caracterizar el tejido obtenido de acuerdo a las descripciones de Gupta y Holmstrom (2005).

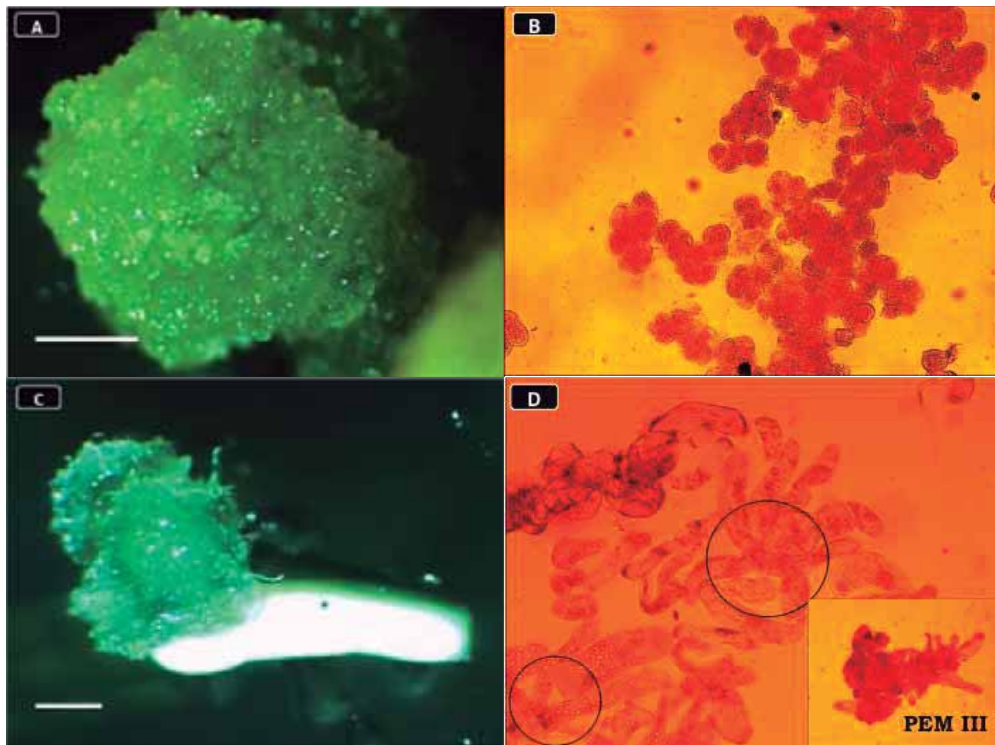
### **Mantenimiento y proliferación**

Las masas de tejido se separaron de los explantes y se transfirieron a dos medios de proliferación, el medio 16 (Pullman *et al.* 2003) y el medio LOB (Tang *et al.* 2001), modificados con 2,4-D, KIN y BA a 1.1, 0.43 y 0.45 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Las MEs obtenidas en el primer experimento, se cultivaron solo en el medio 16; las MEs obtenidas en el segundo experimento se cultivaron en ambos medios, 16 y LOB, adicionados con los antioxidantes PVP, ácido ascórbico y ácido cítrico a 2, 0.15 y 0.15 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Los cultivos se subcultivaron durante dos meses a intervalos bisemanales y semanales para el caso de las MEs generadas en el primer y segundo experimento, respectivamente. Todos los cultivos se mantuvieron en oscuridad a 23±1 °C.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Inducción de masas de tejido**

Las masas de tejido surgieron dentro de la segunda a la octava semana de la siembra de los explantes (Fig. 4A y Fig. 4C). En el primer experimento se determinó que los embriones maduros de *Pinus pseudostrobus* tienen la capacidad de generar MEs y que



**Figura 4. Masas de tejido inducidas a partir de embriones cigóticos maduros de *Pinus pseudostrobus*. (A) Callo no embrionario de aspecto compacto y coloración amarilla (barra = 1 mm). (B) Callo no embrionario visto bajo el microscopio óptico. Estos consistían de células isodiamétricas desorganizadas, sin la presencia de células del suspensor (10X). (C) Masa de tejido de aspecto mucilaginoso y transparente que corresponde a las MEs descritas en la bibliografía (barra = 1 mm). (D) Vista de una ME bajo el microscopio óptico (10X). Estas consistían de masas proembrionales en fase III (PEM III) y “embriones somáticos solares” constituidos por una cabeza embrionaria desorganizada y con el tejido suspensor formando un “halo” alrededor de la cabeza embrionaria (círculos).**

la respuesta es significativamente diferente entre individuos ( $P = 0.007$ ), siendo el árbol 524-S-3 el que generó mayor tasa de inducción (Cuadro 7). Para el segundo experimento el ANOVA indicó un efecto significativo del 2,4-D ( $P < 0.01$ ), de la BA ( $P = 0.00$ ) y la interacción 2,4-D x BA ( $P < 0.01$ ) en la tasa de inducción. La prueba de Tukey indicó que  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D con  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de BA y  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D con  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BA fueron las combinaciones de mayor respuesta (Cuadro 8). Las pruebas de correlación entre los niveles de cada factor y la tasa de inducción indicaron una mayor influencia de la BA ( $r_{BA} = 0.507$ ;  $P < 0.005$ ) que del 2,4-D ( $r_{2,4-D} = -0.087$ ;  $P = 0.244$ ). La tasa de inducción fue similar a la obtenida por Radojevic *et al.* (1999) a partir de embriones cigóticos maduros de *Pinus nigra*.

**Cuadro 7. Inducción de MEs a partir de embriones cigóticos maduros de cinco árboles seleccionados de *Pinus pseudostrobus*. Para la inducción se utilizó el medio 505 adicionado con 8.0, 4.0 y 4.0  $\text{mg L}^{-1}$  de 2,4-D, BA y KIN, respectivamente.**

Árbol <sup>†</sup>	% de inducción <sup>††</sup>
524-S-3	50.0 ± 8.2 a
145-S-9	25.0 ± 13.7 ab
79-S-14	14.3 ± 11.7 b
5-S-10	14.3 ± 11.7 b
184-S-15	7.1 ± 8.2 b

<sup>†</sup>Se utilizaron 28 embriones por árbol; <sup>††</sup>Se registró sólo el porcentaje de inducción de masas de tejido con características de MEs. Los valores representan la media ± la desviación estándar. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

### Caracterización del tejido

Aunque la inducción se obtuvo en todos los tratamientos del barrido hormonal del segundo experimento, la mayoría de las masas de tejido tuvieron las características del “callo no embrionario” (Gupta y Holmstrom 2005) (Fig. 4A y Fig. 4B). En el género *Pinus* la inducción de MEs se ha obtenido en concentraciones de  $2.0\text{-}10.0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D y  $1.0\text{-}4.0 \text{ mg L}^{-1}$  de BA utilizando embriones cigóticos maduros como explantes (Tang y Ouyang 1997, Garin *et al.* 1998, Radojevic *et al.* 1999, Tang *et al.* 2001). En el segundo experimento las masas de tejido con características de MEs (Tang *et al.* 2001) se generaron

**Cuadro 8. Tasa de inducción de masas de tejido a partir de embriones cigóticos maduros del árbol 511 de *Pinus pseudostrobus*.**

Tratamientos		% de respuesta <sup>†</sup>
2,4-D (g L <sup>-1</sup> )	BA (g L <sup>-1</sup> )	
2	4	51.6 ± 33.5 a
2	2	50.0 ± 28.9 a
10	4	35.0 ± 9.0 ab
10	2	23.3 ± 11.5 abc
4	4	26.6 ± 23.1 abcd
8	4	25.0 ± 22.7 abcd
8	2	15.0 ± 12.4 bcde
6	4	16.6 ± 16.7 bcde
6	2	13.3 ± 13.0 bcde
4	0	5.0 ± 9.0 cde
6	0	5.0 ± 9.0 cde
10	0	5.0 ± 12.4 de
4	2	3.3 ± 11.5 e
8	0	1.6 ± 5.7 e
2	0	1.6 ± 5.8 e

<sup>†</sup> Se reportan los dos tipos de masas de tejido generadas: callo no embrionario y MEs. Los valores representan la media ± la desviación estándar. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

sólo en la combinación de 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D con 2 mg L<sup>-1</sup> de BA y 10 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D con 2 mg L<sup>-1</sup> de BA (Fig. 4C y Cuadro 8). De estas combinaciones, la primera se ha reportado para la inducción de MEs a partir de embriones cigóticos maduros de *Pinus elliottii* (Tang y Ouyang 1997), mientras que la segunda coincide más con la respuesta obtenida en *Pinus strobus* (2.2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D con 1.1 mg L<sup>-1</sup> de BA) (Garin *et al.* 2007).

### **Mantenimiento y proliferación**

En total se obtuvieron 78 masas con características de MEs; 34 a partir de los explantes de las cinco familias de Santa Anna Jeráhuaro y 44 en los tratamientos con las combinaciones de 10 y 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D con 2 mg L<sup>-1</sup> de BA. Sin embargo, ninguna logró establecerse como una línea celular embrionaria, debido a que la oxidación del tejido se generalizó a las cuatro semanas de su separación de los explantes, no obstante haber adicionado antioxidantes al medio de cultivo, haber utilizado el medio LOB que propició la proliferación de MEs en *Pinus taeda* (Tang *et al.* 2001) y no obstante que se realizaron los subcultivos a la mitad de tiempo reportado (Klimaszewska y Cyr 2002). Resultados similares de oxidación en la etapa de mantenimiento-proliferación de MEs inducidas a partir de embriones cigóticos maduros se han reportado en *Pinus roxburghii* (Arya *et al.* 2000, Mathur 2001) y *Pinus pinea* (Carneros-García 2009).

La formación de los embriones somáticos *in vitro*, visibles en los cultivos embriogénicos mediante la tinción diferencial, es antecedida por tres fases denominadas masas proembrionales (PEMs) I, II y III (Filonova *et al.* 2000). Aunque las tinciones de las MEs generadas en este experimento no mostraron la presencia de embriones somáticos constituidos por una cabeza embrionaria subtendida por un grupo de células suspensoras (Gupta y Holmstrom 2005), se observaron masas proembrionales en fase III (PEM III), lo cual indica un potencial regenerativo que no se concretó. Las estructuras más avanzadas alcanzadas fueron los “embriones somáticos solares” (Fig. 4D) similares a los reportados en cultivos embriogénicos de *Pinus patula* (Ford *et al.* 2005) y que constituyen un desarrollo anormal. A este respecto, Filonova *et al.* (2000) reportan diferencias entre líneas celulares embriogénicas en cuanto a su capacidad regenerativa: mientras que algunas generan embriones somáticos normales o anormales, otras son incapaces de formarlos en lo absoluto manteniéndose en proliferación constante. Sin embargo, en *Pinus* no existen estudios que aborden los factores que subyacen la incapacidad generalizada de los embriones cigóticos maduros, respecto de los embriones cigóticos inmaduros, para producir tejido con capacidad de proliferar y generar embriones somáticos maduros.

## CONCLUSIONES

Se demostró que los embriones maduros de *Pinus pseudostrobus* tienen la capacidad de generar MEs y se determinaron diferencias en la respuesta entre diferentes individuos, siendo el árbol 524-S-3 el que generó mayor tasa de inducción. Por otra parte, se determinó que las combinaciones de 10 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D con 2 mg L<sup>-1</sup> de BA y 2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D con 2 mg L<sup>-1</sup> de BA generaron la inducción de MEs en los explantes del árbol 511. Sin embargo, la especie mostró un comportamiento recalcitrante en la fase de mantenimiento-proliferación y ninguna masa de tejido pudo cultivarse como una línea celular estable. Posiblemente *Pinus pseudostrobus* sea una especie con una “ventana de respuesta” en la que cierto estadio del desarrollo embrionario temprano es más favorable para generar la embriogénesis somática. Sin embargo, las observaciones bajo el microscopio óptico mostraron un potencial de las masas embrionarias para generar embriones somáticos, por lo que existe la posibilidad de encontrar condiciones de cultivo que permitan el establecimiento-proliferación y la generación de embriones somáticos maduros a partir de estas masas de tejido.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Comisión Forestal del Estado de Michoacán proyecto "Mejoramiento Genético Forestal" incluido en el Presupuesto de Egresos de la Federación 2011 anexo 31 (CONAFOR) y a la Coordinación de la Investigación Científica-UMSNH proyecto 5.6 por el apoyo económico brindado para el desarrollo de este estudio.

## LITERATURA CITADA

- Arya S, R K Kalia, I D Arya (2000)** Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburghii* Sarg. Plant Cell Reports 19:775-780.
- Bonga J M, KK Klimaszewska, P von Aderkas (2010)** Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. Plant Cell Tissue and Organ Culture 100:241-254.
- Carneros-García E (2009)** Embriogénesis somática en pino piñonero (*Pinus pinea* L.). Doctoral Thesis. Universidad de Alcalá, España. 240 p.

- Filonova L H, P V Bozhkov, von Arnold (2000)** Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany* 51(343):249-264.
- Ford C S, L J Fischer, N B Jones, S A Nigro, N P Makunga, J van Staden (2005)** Somatic embryogenesis in *Pinus patula*. *In: Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. S M Jain, P K Gupta (eds). Springer. Netherlands. pp:121-139.
- Garin E, Isabel N, Plourde A (1998)** Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos. *Plant Cell Reports* 18:37-43.
- Gupta P K, D Holmstrom (2005)** Double staining technology for distinguishing embryogenic cultures. *In: Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. S M Jain, P K Gupta (eds). Springer, Netherlands. pp:573-575.
- Hägman H, J Vousku, T Sarjala, A Jokela, K Niemi (2005)** Somatic embryogenesis of pine species: from functional genomics to plantation forestry. *Plant Cell Monographs* 2:119-140.
- Klimaszewska K, DR Cry (2002)** Conifer somatic embryogenesis: I, Development. *Dendrobiology* 48:31-39.
- Klimaszewska K, J F Trontin, M R Becwar, C Devillard, Y S Park, M A Lelu-Walter (2007)** Recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 1(1):11-25.
- Malabadi R B, J van Staden (2005a)** Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. *Tree Physiology* 25:11-16.
- Malabadi R B, K Nataraja (2007)** Plant regeneration via somatic embryogenesis using secondary needles of mature trees of *Pinus roxburghii* Sarg. *International Journal of Botany* 3(1):40-47.
- Mathur G (2001)** Morphogenetic studies of two indian pines in vitro: *Pinus roxburghii* Sarg. and *Pinus wallichiana* A. B. Jacks. Doctoral Thesis. University of Pune, India. 137 p.
- Park Y S (2002)** Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Annals of Forest Science* 59:651-656.
- Pullman G S, S Johnson, G Peter, J Cairney, N Xu (2003)** Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell Reports* 21:747-758.

- Radojevic L, C Álvarez, M F Fraga, R Rodríguez (1999)** Somatic embryogenic tissue establishment from mature *Pinus nigra* Arn. ssp. *salzmannii* embryos. In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant 35:206-209.
- Richardson D M, P W Rundel (2000)** Ecology and biogeography of *Pinus*: an introduction. In: Ecology and Biogeography of *Pinus*. D M Richardson (ed). Cambridge University Press, UK. pp:3-46.
- StatSoft Inc. (2007)** STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
- Tang W, F Ouyang (1997)** Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in callus cultures derived from mature zygotic embryos of slash pine. Journal of Forestry Research 8(2):83-86.
- Tang W, Z Guo, F Ouyang (2001)** Plant regeneration from embryogenic cultures initiated from mature loblolly pine zygotic embryos. In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant 37:558-563.

## V. DISCUSIÓN GENERAL

Para que la propagación clonal, mediante organogénesis o embriogénesis somática, pueda integrarse a los programas de mejoramiento genético forestal, es necesario contar con un sistema de regeneración eficiente que permita el despliegue de genotipos valiosos a gran escala. El objetivo de este trabajo fue evaluar la factibilidad de *Pinus pseudostrobus* Lindl. para la propagación mediante cultivo de tejidos y establecer un protocolo de regeneración mediante organogénesis y/o embriogénesis somática. Por los resultados obtenidos, se concluye que el objetivo principal fue parcialmente alcanzado. Aunque no se describe un protocolo de regeneración completo, se mostró un potencial de *Pinus pseudostrobus* para la propagación mediante organogénesis y embriogénesis somática y los resultados de este trabajo pueden servir de base para la búsqueda de un protocolo de regeneración que permita la propagación de genotipos seleccionados de esta especie, mediante las dos vías de micropropagación.

Por una parte, los resultados del experimento de organogénesis constituyen el primer reporte de inducción de brotes en *Pinus pseudostrobus*, obteniéndose un índice de capacidad de formación de brotes (ICFB) de 7.13, el cual es superior al obtenido para otras especies como *Pinus ayacahuite* (ICFB = 3.1) (Saborio *et al.* 1997) y *P. wallichiana* (ICFB = 4.53) (Mathur y Nadgauda 1999), pero inferior a los índices reportados en especies en las que se han establecido sistemas de propagación eficientes como *Pinus taeda* (Jang y Tainter 1991), *P. virginiana* (Jang y Tainter 1991), *P. pinea* (Moncaleán *et al.* 2005), *P. massoniana* (Zhang *et al.* 2006) y *P. kesiya* (Tandom *et al.* 2007), con índices de capacidad de formación de brotes de 101, 50, 40, 10.8 y 22.6, respectivamente. Sin embargo, existen muchas posibilidades de incrementar la producción de brotes y posteriormente la obtención de plántulas de *Pinus pseudostrobus*, tal como se ha hecho en otras especies de pinos.

Aunque el potencial de la organogénesis para la producción de ramets por ortet es inferior al de la embriogénesis somática (Aitken *et al.* 1981, Gupta y Timmis 2005), el desarrollo de protocolos eficientes de propagación mediante organogénesis directa puede ser muy útil si se aplica en familias de hermanos completos provenientes de cruzas controladas, en cuyo caso se incrementaría el número de plantas por semilla (57 a 180 plantas por semilla, de acuerdo a los protocolos reportados), las cuales podrían utilizarse posteriormente para la propagación mediante enraizamiento de estacas, incrementando así el número de individuos generados a partir de este material valioso y costoso. Además, se ha reportado la criopreservación de cotiledones y embriones cigóticos completos con los cuales se ha logrado reiniciar el proceso de inducción de brotes adventicios (Hargreaves *et*

al. 1999, Hargreaves *et al.* 2004). Si estudios de este tipo se pueden desarrollar en *Pinus pseudostrabus*, principalmente la criopreservación de cotiledones, se abre la posibilidad para reiniciar el proceso de propagación clonal de los genotipos de buen rendimiento después de que se hayan realizado las evaluaciones en campo, de la misma manera que se hace en la embriogénesis somática (Klimazsewska *et al.* 2007) (Fig. 1).

Por otra parte, aunque la embriogénesis somática es la vía de propagación con el mayor potencial para el implemento de la silvicultura clonal a gran escala, es también la vía con más restricciones para el desarrollo de protocolos de propagación, lo cual se observó en este estudio, generándose sólo la organogénesis y no la embriogénesis a partir del mismo explante (embriones cigóticos maduros). Una de las principales restricciones, es la recalcitrancia de algunas especies de pinos para iniciar el proceso de embriogénesis somática. En dichas especies el proceso está restringido a una ventana de respuesta, es decir, un estadio morfofisiológico específico de los embriones cigóticos en fases tempranas del desarrollo en el cual cuentan con la capacidad o el potencial para iniciar el proceso de embriogénesis somática. En especies como *P. roxburghii* (Arya *et al.* 2000, Mathur 2001), *P. pinea* (Carneros-García 2009) y *Pinus banksiana* (Park *et al.* 2010), el inicio de la embriogénesis somática está fuertemente restringido a los estadios del desarrollo conocidos como 16-células y precotiledonar (Arnold 2008), con respuestas reducidas o nulas a partir de estadios anteriores o posteriores. Y aunque en algunas especies se ha reportado la embriogénesis partiendo de explantes en estadios del desarrollo porteros a la ventana de respuesta, como embriones cigóticos cotiledonares (maduros) o tejidos de árboles adultos, la tasa de iniciación disminuye drásticamente. La desventaja de la ventana de respuesta es el estar supeditado a la fenología de la especie, además de que los muestreos de material son más intensivos y costosos y que la siembra *in vitro* debe realizarse lo más pronto posible después de la colecta (dentro de las primeras dos semanas), para evitar perder el potencial embriogénico de los explantes. La razón de utilizar embriones cigóticos maduros para inducir la embriogénesis somática, es que son explantes que están disponibles durante todo el año (Carneros-García 2009), debido a las propiedades de las semillas de las especies de pinos, las cuales se pueden almacenar durante períodos prolongados bajo condiciones idóneas de humedad y temperatura (Attree y Fowke 1993).

Los resultados del experimento de embriogénesis somática mostraron un potencial regenerativo que no pudo concretarse, al formarse masas proembrionales (PEMs) en fase III, las cuales preceden la formación de embriones somáticos (Filinova *et al.* 2000). Y en

los casos en donde la morfodiferenciación pasó de PEMs III a embriones somáticos, el desarrollo fue anormal. Al igual que en la organogénesis, existen muchas posibilidades de encontrar condiciones apropiadas para manteneren cultivo y proliferar dichas masas de tejido, por lo que sería recomendable realizar estudios cuyo objetivo sea el establecimiento-proliferación de masas de tejido generadas a partir de embriones cigóticos maduros de esta especie, poniendo atención al medio de mantenimiento-proliferación y el tipo y concentración de la fuente de carbono, así como en las concentraciones y combinaciones de diferentes antioxidantes y reguladores del crecimiento.

Por último, en ambos experimentos se observaron diferencias entre árboles (familias de medios hermanos) para las respectivas respuestas morfogénicas, lo que da cuenta de la importancia de evaluar diferentes genotipos para identificar aquellos que generen mayor respuesta. En este estudio, los árboles 145-S-9 y 524-S-3 fueron los que generaron mayor respuesta en ambos experimentos, alternando la respuesta entre cada árbol y cada vía de propagación: el árbol 145-S-9 generó mayor producción de brotes adventicios y fue el segundo en la producción de MEs; el árbol 524-S-3 fue el de mayor respuesta para la inducción de MEs y segundo en producción de brotes adventicios.

Es necesario y urgente realizar más investigación para desarrollar protocolos de propagación eficientes, mediante cualquiera de las dos vías de micropropagación, que permitan la propagación clonal de los árboles superiores derivados de los programas de mejoramiento genético forestal de *Pinus pseudostrobus*, y otras especies maderables importantes, para acelerar el establecimiento de plantaciones forestales clonales de alto rendimiento que abastescan las crecientes demandas de productos forestales y disminuir en lo posible las altas tasas de deforestación registradas en México y particularmente en el Estado de Michoacán.

## VI. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Abdullah A, J Grace (1987)** Regeneration of calabrian pine from juvenile needles. *Plant Science* 52:147-155.
- Aquea F, M Josefina-Poupin, J Tomás-Matus, M Gebauer, C Medina, P Arce-Johnson (2008)** Synthetic seed production from somatic embryos of *Pinus radiata*. *Biotechnology Letters* 30:1847-1852.
- Attree S M, L C Fowke (1993)** Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35:1-35.
- Bermejo VB, Pontones JB (2000)** Los pinos mexicanos y su utilización como especies introducidas de alto potencial en varios países del mundo. Simposio sobre Avances en la Producción de Semillas Forestales en América Latina. Santo Domingo (R. Dominicana). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica 309 p.
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) (1997)** Nota técnica sobre manejo de semillas forestales. *Pinus pseudostrabus* Lindl. No. 13. Turrialba, Costa Rica. <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/a0008s/a0008s13.pdf> (Accesada en junio de 2012).
- Challenger A (1998)** Utilización y Conservación de los Ecosistemas Terrestres de México: Pasado, Presente y Futuro. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, Instituto de Biología UNAM y Agrupación Sierra Madre, S. C. México. 847 p.
- Comisión Forestal del Estado de Michoacán (COFOM)(2003)** Ecosistemas forestales de Michoacán. *Revista Forestal XXI*. Vol. 6(2):7-10.
- Cortizo M, N De Diego, P Moncaleán, R J Ordás (2009)** Micropropagation of adult Stone pine (*Pinus pinea* L.). *Trees* 23:835-842.
- De Diego, I A Montalbán, P Moncaleán (2010)** *In vitro* regeneration of adult *Pinus sylvestris* L. trees. *South African Journal of Botany* 76:158-162.
- Dumas L, O Monteuis (1995)** *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40:231-235.
- Durzan D J (2008)** Monozygotic cleavage polyembryogenesis and conifer tree improvement. *Cytology and Genetics* 42(3):159-173.
- Durzan D J, P K Gupta (1987)** Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures. *Plant Science* 52:229-235.

- El-Kassaby Y A, I Moss (2004)** Clonal Forestry: options, deliverables and benefits. Forest Genetics and Tree Breeding in the Age of Genomics: Progress and Future. IUFRO Joint Conference of Division 2. Charleston, South Carolina, USA. 490 p.
- FAO (2000)** Situación de la actividad forestal en México. Nota informativa. 20ª Reunión de la Comisión Forestal para América del Norte. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/meeting/X4702S.htm> (Accesada en Junio de 2012).
- FAO (2009)** Situación de los bosques del mundo. Roma. 158 p. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/011/i0350s/i0350s00.htm> (Accesada en Junio de 2012).
- FAO (2011)** Situación de los bosques del mundo. Roma. 176 p. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/013/i2000s/i2000s00.htm> (Accesada en Junio de 2012).
- Gupta P K, R Timmis (2005)** Mass propagation of conifer trees in liquid cultures-progress towards commercialization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81:339-346.
- Hakman I, L C Fowke, S von Arnold, T Eriksson (1985)** The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway Spruce). *Plant Science* 38:53-59.
- Hargreaves C L, M N Foggo, D R Smith, M E Gordon (1999)** Development of protocols for the cryopreservation of zygotic embryos of *Pinus radiata* and subsequent plant regeneration. *New Zealand Journal of Forestry Science* 29(1):54-63.
- Hargreaves C, L Grace, S van deer Maas, C Reeves, G Holden, M Menzies, S Kumar, M Foggo (2004)** Cryopreservation of *Pinus radiata* zygotic embryo cotyledons: effect of storage duration on adventitious shoot formation and plant growth after 2 years in the field. *Canadian Journal of Forest Research* 34:600-608.
- Jain S M (2006)** An update overview of advances in somatic embryogenesis in forest trees. *In: Plantation Technology in Tropical Forest Science*. K Suzuki, K Ishii, S Sakurai, S Sasaki (eds). Springer-Verlag. Tokyo, Japan. pp:113-122.
- Jiménez J, Aguirre O, Kramer H (2001)** Análisis de la estructura horizontal y vertical en un ecosistema multicohortal de pino-encino en el norte de México. *Investigación Agraria: Sistema y Recursos Forestales* 10(2):355-366.
- Jones N B, J Van Staden (2001)** Improved somatic embryo from embryonic tissue of *Pinus patula*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 37:543-549.
- Kalia R A, S Arya, S Kalia, I D Arya (2007)** Plant regeneration from fascicular buds of seedling shoot apices of *Pinus roxburghii* Sarg. *Biologia Plantarum* 51(4):653-659.

- Lainé E, H David, A David (1988)** Callus formation from cotyledon protoplast of *Pinus oocarpa* and *Pinus patula*. *Physiologia Plantarum* 72:374-378.
- Lara-Chaves A, B S Flinn, U Egertsdotter (2011)** Initiation of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of Oocarpa pine (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schlechtendal). *Tree Physiology* 31:539-554.
- Litz R E, P A Moon, V M Chávez (1995)** Somatic embryogenesis from leaf callus derived from mature trees of the cycad *Ceratozamia hildae* (Gymnospermae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40:25-31.
- Litz R E, R L Jarret (1991)** Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. *In: Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. W M Roca, L A Mroginski (eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. pp:143–171.
- López-Upton J (2010)** *Pinus pseudostrobus*, nota técnica. *In: J A Vozzo (ed) Manual de Semillas de Árboles Tropicales*. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio Forestal. Estados Unidos. 621-622 pp. Disponible en: <http://www.rngr.net/publications/manual-de-semillas-de-arboles-tropicales/completo/> (Accesada en Junio de 2012).
- Malabadi R B, J Van Staden (2005b)** Storability and germination of sodium alginate encapsulated somatic embryos derived from vegetative shoot apices of mature *Pinus patula* trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82:259-265.
- Martínez-Palacios A, P Ortega-Larrocea, V M Chávez, R Bye (2003)** Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74(2):135-142.
- McCown B H (2000)** Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance. Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: dealing with genetic predeterminism. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant* 36:149-154.
- Murashige T (1978)** The impact of plant tissue culture on agriculture. *In: Frontiers of Plant Tissue Culture*. T A Thorpe (ed). IAPC. Calgary, Canada. pp:15-26.
- Nigro S A, N P Makunga, N B Jones, J van Staden (2004)** A biolistic approach towards producing transgenic *Pinus patula* embryonal suspensor masses. *Plant Growth Regulation* 44:187-197.
- Nigro S A, N P Makunga, N B Jones, J Van Staden (2008)** An *Agrobacterium*-mediated system for gene transfer in *Pinus patula*. *South African Journal of Botany* 74:144-148.

- Ojeda-Sacariás, M C, H A Luna-Olvera, L H Morales-Ramos, M J Verde-Star, T E Torres-Cepeda, B Pereyra-Alfárez, L Iracheta-Donjuan, E Olivares-Sáenz, R Salasar-Sáenz, E Cárdenas-Cerda (2006)** Multiplicación *in vitro* del piñón azul *Pinus maximartinezii* (Rzedowski). *Revista Internacional de Botánica Experimental* 75:109-113.
- Pait J A (2004)** Production and deployment of conifer varietal germplasm. *In: Forest Biotechnology in Latin America, proceedings from the Workshop Biotecnología Forestal, Global Biotechnology Forum, Concepción, Chile.* R Kellison, S McCord, K M A Gartland (eds). Institute of Forest Biotechnology, Raleigh, NC, USA. pp:41-47. Disponible en: <http://www.forestbiotech.org/ifb-publications.html>(Accesada en Julio de 2012).
- Pullman G S, K Bucallo (2011)** Pine somatic embryogenesis using zygotic embryos as explants. *In: Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 710.* T a Thorpe, E C Yeung (eds). Springer Science+Business Media. pp:267-291.
- Ragonezi C, K Klimaszewska, M R Castro, M Lima, P de Oliveira, M A Zabattieri (2010)** Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors. *Trees* 24:975-992.
- Robledo-Paz A, Villalobos-Arámbula V M, Santacruz-Varela A (2009)** Inducción eficiente de brotes adventicios en cotiledones de *Pinus maximartinezii* Rzedowski. *Acta Botánica Mexicana* 89:47-69.
- Rubluo A, V M Chávez, A P Martínez, O Martínez-Vázquez (1993)** Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological Conservation*63:163-169.
- Salaj T, I Matušikobá R Swennen, B Panis, J Salaj (2012)** Long-term maintenance of *Pinus nigra* embryogenic cultures through cryopreservation. *Acta Physiologiae Plantarum* 34(1):227-233.
- Sarukhan J, R Dirzo (1992)** México Ante los Retos de la Biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 343 p.
- SEMARNAT (2012).** Sistema Nacional de Indicadores Ambientales, Recursos Forestales. [http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/indicadores11/conjuntob/07\\_forestales/07\\_forestales\\_esquema.html](http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/indicadores11/conjuntob/07_forestales/07_forestales_esquema.html) (Accesada en junio de 2012).
- Stasolla C, E C Yeung (2003)** Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:15-35.

- Sutton W R J (2002)** The future for wood- will there be demand for wood in the future? Documentos y referencias sobre las biotecnologías en el sector forestal, FAO. <http://www.fao.org/forestry/fgr/50368/es/> (Accesada en julio de 2012).
- Tang W, R J Newton (2003)** Genetic transformation of conifers and its application in forest biotechnology. *Plant Cell Reports* 22:1-15.
- Tang W, R J Newton, T M Charles (2006)** Plant regeneration through multiple adventitious shoot differentiation from callus cultures of slash pine (*Pinus elliottii*). *Journal of Plant Physiology* 163:98-101.
- Tang W, R Whetten, R Sederoff (2001)** Genotypic control of high-frequency adventitious shoot regeneration via somatic organogenesis in loblolly pine. *Plant Science* 161:267-272.
- Trontin J F, C Walter, K Klimaszewska, Y S Park, M A Lelu-Walter (2007)** Recent progress in genetic transformation in four *Pinus* spp. *Transgenic Plant Journal* 1(2):314-329.
- Viveros-Viveros H, Sáenz-Romero C, Vargas-Hernández J J, López-Upton J (2006)** Variación entre procedencias de *Pinus pseudostrabus* establecidas en dos sitios en Michoacán, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29(002):121-126.
- Von Arnold S (2008)** Somatic embryogenesis. *In: Plant Propagation by Tissue Culture*, Third Edition. E F George, M A Hall, G J De Klerk (eds). Springer, Netherlands. pp:335-354.
- Walter C, M Carson, S Carson (2007)** Conifers. *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 60, *Transgenic Crops*. E C Pua, M R Davey (eds). Springer-Verlag, Berlin. pp:447-471.

## ANEXO 1

### Medios de cultivo utilizados en los diferentes experimentos

Componente (mg/l)	MLV	DCR	505	16	LOB <sup>80</sup>	LP <sup>§</sup>
1 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	821	400	200	603.8	400	1200
2 KNO <sub>3</sub>	950	340	909.9	909.9	720	1900
3 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	136.1	136.1	170	–
4 Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	–	556	236.2	236.2	1900	–
5 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	925	370	246.5	246.5	369.69	370
6 Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	–	–	256.5	256.5	–	–
7 MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	–	–	101.7	101.7	–	–
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	–	–	–	–	–	340
8 KCl	–	–	–	–	250	–
9 CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	11	85	–	–	440	180
10 KI	4.15	0.83	4.15	4.15	0.83	0.75
11 H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	31	6.2	15.5	15.5	6.2	0.63
12 MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	21	22.3	10.5	10.5	16.9	22
13 ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	43	8.6	14.69	14.4	8.6	–
14 Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.25	0.25	0.125	0.125	0.25	0.025
15 CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.5	0.25	0.1725	0.125	0.025	0.0025
16 CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.13	0.025	0.125	0.125	0.025	0.0025
17 NiCl <sub>2</sub>	–	0.025	–	–	–	–
18 FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	–	27.8	13.9	6.95	27.8	14
19 Na <sub>2</sub> EDTA	–	37.3	18.65	9.33	37.26	19
20 Fe-EDTA	40	–	–	–	–	–
21 Maltosa	–	–	–	–	–	–
22 Sacarosa	20 000	30 000	15 000	30 000	30000	20000
23 PEG 8000	–	–	–	–	–	–
24 Myo-inositol	100	200	20 000	1 000	500	200
25 CH	1000	500	500	500	500	500
26 Tiamina·HCl	0.1	1	1	1	5.05	5
27 Piridoxina·HCl	0.1	0.5	0.5	0.5	1	1
28 Ácido nicotínico	0.5	0.5	0.5	0.5	2	2
29 Glicina	–	2	2	2	1.6	2
30 Reguladores del crecimiento			Se especifican en el texto			
31 Carbón activado	–	–	50	–	–	–
32 pH	5.7	5.7	5.7	5.7	5.8	5.8
33 Gelrite <sup>a</sup>	4000	–	4000	4000	–	–
34 Agar <sup>a</sup>	–	8000	–	–	7000	8000
35 L-glutamina*	500	450	450	450	500	450

<sup>a</sup> Se agrega después de ajustar el pH y antes de autoclave.

\* Se esteriliza por filtración y se agrega después de autoclave.

§ Se adiciona con L-alanina, L-cisteína, L-arginina, L-leucina, L-fenilalanina, L-tirosina a 0.05, 0.02, 0.01, 0.01, 0.01 y 0.01 mg L<sup>-1</sup>.

<sup>o</sup> Se adiciona con lisina, D-xilosa, D-glucosa, D-arabinosa, D-maltosa, D-galactosa, D-fructosa y D-manosa a 100, 150, 180, 150, 360, 180, 180 y 150 mg L<sup>-1</sup>.

## ANEXO 2

### Conversiones de peso a concentraciones molares en los reguladores del crecimiento vegetal más utilizados en cultivo de tejidos.

Regulador del crecimiento	PM	1 $\mu\text{M}^\dagger$	1 $\text{mg L}^{-1}\ddagger$
2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)	221.04	0.221 $\text{mg L}^{-1}$	4.52 $\mu\text{M}$
ABA (ácido abscísico)	264.32	0.264 $\text{mg L}^{-1}$	3.78 $\mu\text{M}$
BA ( $\text{N}^6$ -benciladenina)	225.3	0.225 $\text{mg L}^{-1}$	4.44 $\mu\text{M}$
$\text{GA}_3$ (ácido giberélico)	346.41	0.346 $\text{mg L}^{-1}$	2.89 $\mu\text{M}$
IAA (ácido indolacético)	175.19	0.175 $\text{mg L}^{-1}$	5.70 $\mu\text{M}$
IBA (ácido indolbutírico)	203.24	0.203 $\text{mg L}^{-1}$	4.92 $\mu\text{M}$
KIN (cinetina)	215.2	0.215 $\text{mg L}^{-1}$	4.65 $\mu\text{M}$
NAA (ácido naftalenacético)	186.2	0.816 $\text{mg L}^{-1}$	5.38 $\mu\text{M}$

*PM* = Peso molecular.

$^\dagger$ Valores calculados con la fórmula:

$$\text{mg L}^{-1} = [1 \mu\text{M} (\text{PM} \times 1000)] / 1000000 \mu\text{M}$$

$^\ddagger$ Valores calculados con la fórmula:

$$\mu\text{M} = (1 \text{ mg} \times 1000000 \mu\text{M}) / (\text{PM} \times 1000)$$