

Aspectos básicos de la propagación *in vitro* del género *Pinus* por organogénesis

Maité Chávez*, Manuel de Feria. *Autor para la correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e-mail: maite@ibp.co.cu

RESUMEN

La regeneración de plantas *in vitro* del género *Pinus* por embriogénesis somática ha sido muy estudiada. Sin embargo, el establecimiento *in vitro* de plantas a partir brotes apicales y su multiplicación han sido alternativas menos analizadas y en consecuencia se ha limitado la obtención de plantas regeneradas por organogénesis capaces de lograr con éxito la supervivencia en la fase de aclimatización. El presente trabajo se realizó con el objetivo de presentar una revisión de la literatura científica sobre la propagación *in vitro* por organogénesis del género *Pinus*, incluyendo un análisis de los principales factores que de alguna forma podrían afectar el éxito de la regeneración de plantas por este método, con énfasis en la formación de raíces tanto *in vitro* como *ex vitro*.

Palabras clave: brotes apicales, enraizamiento *ex vitro*, enraizamiento *in vitro*, pino, regeneración de plantas.

Basic aspects of *in vitro* propagation of *Pinus* genus by organogenesis

ABSTRACT

Plant regeneration *in vitro* of *Pinus* genus by somatic embryogenesis has been long studied. However, the *in vitro* establishment of plants from apical shoots and *in vitro* multiplication of these shoots have been an alternative less studied. Therefore the production of plants, regenerated by organogenesis, able to survive in the acclimatization phase, has been limited. This work aims to present a review of the literature about the *in vitro* propagation by organogenesis of the genus *Pinus*, including an analysis of the main factors that could, somehow, affect the success of plant regeneration by this method with emphasis on *in vitro* and *ex vitro* root formation.

Key words: apical shoots, *ex vitro* rooting, *in vitro* rooting, plants regeneration, pine.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*

MULTIPLICACIÓN *IN VITRO*

Etapa de elongación

Tipo de explante inicial

Tipo y concentración de nutrientes inorgánicos

Reguladores del crecimiento

FASE DE ENRAIZAMIENTO

Enraizamiento *in vitro*

Enraizamiento *ex vitro*

Factores que podrían afectar el enraizamiento tanto *in vitro* como *ex vitro*

Tipo y concentración de la auxina

Formas de aplicación de la auxina

Número de subcultivos

Tipo de brote

Concentración de sales

Influencia de la sacarosa

FASE DE ACLIMATIZACIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

INTRODUCCIÓN

La propagación *in vitro* en coníferas se ha logrado tanto por organogénesis, como por embriogénesis somática. Particularmente en el género *Pinus*, la embriogénesis somática ha sido el método de regeneración de plantas más estudiado (Pullman *et al.*, 2005; Salanova *et al.*, 2007; Klimaszewska *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha descrito que en ocasiones se limita la formación del callo y se producen pocos embriones somáticos por gramo de masa fresca (Lelu *et al.*, 2006; Maruyama *et al.*, 2007). Estos autores explicaron, que entre otras razones, estos resultados se deben a la influencia del genotipo, la composición del medio de cultivo y al difícil control del desarrollo uniforme de todas semillas en un lote de conos.

A todo lo anterior se deben añadir algunas observaciones recientes, no publicadas aun en la literatura científica que se refieren a que no se están logrado los mismos niveles de

formación de callos a partir de los embriones cigóticos inmaduros, al parecer relacionado con los cambios climáticos que a nivel global se han venido produciendo en los últimos tiempos y que en alguna medida han afectado los plazos que con anterioridad estaban fijados para la colecta de los conos inmaduros.

Por último, y no menos importante, hay que tener en cuenta que para aplicar, con fines comerciales, la regeneración de plantas de pino por embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos, es necesario haber desarrollado previamente programas de mejoramiento genético a partir de pruebas de progenies, realizar selecciones genéticas y luego establecer huertos para producir las semillas de las plantas mejoradas genéticamente (Klimaszewska *et al.*, 2007) lo cual consume tiempo y requiere de muchos recursos.

En el caso de la regeneración de plantas de pino por organogénesis, aunque menos estudiado, se ha desarrollado a partir de la brotación de yemas axilares y la inducción de yemas adventicias. La primera emplea ápices, yemas laterales y microestacas, mientras que la inducción de yemas adventicias se produce sobre el explante, previa formación de un callo a partir de meristemos preexistentes o tejido no meristemático. Estas yemas se originan de una o varias células cuando se cultivan con concentraciones elevadas de citoquininas. Según Nandwani *et al.* (2001), los estudios realizados sobre la regeneración de especies coníferas a partir de brotes adventicios permitieron obtener importantes progresos.

Cuando se han empleado ápices, se utilizan brotes juveniles de 0.5 a 1.0 cm de longitud que se colocan en medios de cultivo para promover la brotación lateral a partir de yemas preformadas. Estos nuevos brotes pueden multiplicarse y enraizarse para lograr la formación de una planta completa (Niella y Rocha, 2004).

La micropropagación tiene el potencial de multiplicar rápidamente genotipos de alto valor para la reforestación. En pino, la mayoría de los trabajos realizados para su propagación *in vitro*, han utilizado embriones cigóticos inmaduros y maduros como material vegetal inicial (Nehra *et al.*, 2005; Lelu *et al.*, 2006; Pullman y Skryabina, 2007), a partir de los

cuales, se han regenerado plantas por organogénesis (Tang *et al.*, 2004; Tang y Newton, 2005; Cantillo *et al.*, 2011) y embriogénesis somática (Nehra *et al.*, 2005; Vales *et al.*, 2007).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de presentar una revisión de literatura científica sobre la propagación *in vitro* del género *Pinus* por organogénesis. Incluye un análisis de los principales factores que de alguna forma podrían afectar el éxito de la regeneración de plantas por este método, con énfasis en la formación de raíces tanto *in vitro* como *ex vitro*.

ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*

En esta fase del proceso de propagación *in vitro*, el empleo de brotes apicales ha sido una alternativa poco estudiada. Esto ha sido dado fundamentalmente porque la respuesta *in vitro* del material vegetal durante el proceso de propagación *in vitro* no ha sido buena. En muchos casos ha estado condicionada por la influencia del genotipo, la edad en campo y las características de las plantas donantes. Ello ha derivado en que los coeficientes de multiplicación y los porcentajes de formación de raíces *in vitro* que se han obtenidos en muchas especies del género *Pinus*, hayan sido descritos como bajos (Parasharami *et al.*, 2003; Prehn *et al.*, 2003).

La propagación *in vitro* a partir de árboles adultos siempre ha sido difícil debido a problemas tales como el establecimiento de cultivos asépticos (severa contaminación microbiana), la influencia de la época del año en la respuesta *in vitro*, o a la acumulación de determinados metabolitos secundarios que provocan fenolización (Agrawal *et al.*, 2002). Según Korban y Sul (2007), en algunas especies de coníferas las plantas obtenidas de semillas pueden servir como plantas madre en casas de cultivo y ser fuentes de nuevos brotes, si se mantienen y crecen bien, los cuales pueden ser utilizados como material vegetal para establecer *in vitro*.

Por ejemplo, en varias especies e híbridos del género *Larix*, un árbol conífero que se caracteriza por su rápido crecimiento, Ewald (2007) utilizó plantas de semilleros para obtener los brotes que finalmente estableció *in vitro*.

Este mismo autor también demostró que fue posible establecer plantas *in vitro* a partir de árboles adultos pero al final del invierno, ya que por la pérdida de las agujas en esa época del año se facilitó y fue más efectiva la desinfección de los brotes.

Por su parte, de Feria *et al.* (2008), describieron en *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* Barret y Golfari la utilización de plantas de semilleros para el establecimiento de un banco de plantas donantes, a partir de las cuales caracterizaron los tipos de brotes que debían ser empleados para lograr elevados porcentajes (90%) de establecimiento *in vitro* de esta especie. En este mismo estudio, estos autores también lograron obtener buenos resultados en el desarrollo de los brotes apicales establecidos *in vitro* al adicionar al medio de cultivo 6.66 μM de 6-Bencilaminopurina (6-BAP), pues con esa concentración obtuvieron la mayor longitud promedio de los brotes establecidos *in vitro* (2.58 cm) y el mayor porcentajes de brotes con las yemas axilares engrosadas (70%).

MULTIPLICACIÓN *IN VITRO*

La regeneración de plantas por organogénesis, ha sido un método que ha demostrado ser eficiente en la propagación comercial de muchas especies vegetales. Existen investigaciones que refieren la regeneración de plantas de pino por organogénesis, pero a partir de embriones cigóticos (Tang *et al.*, 2004; Tang y Newton, 2005; Alonso *et al.*, 2006; Cantillo *et al.*, 2011). Sin embargo, el empleo de explantes tales como brotes apicales, yemas axilares, acículas, etc., para el establecimiento *in vitro* de plantas de pino han sido alternativas menos estudiadas. Por lo tanto, pocos trabajos describen resultados en la fase de multiplicación a partir de haber establecido *in vitro* estos tipos de explantes.

Según Bonga y Von Aderkas (1992), en algunas coníferas, la regeneración de plantas por organogénesis a partir de yemas axilares, ha sido eficaz y en años más recientes se ha podido desarrollar este proceso incluso a partir de árboles adultos (De Diego *et al.*, 2008).

Sin embargo, en Cuba, con respecto al género *Pinus* existen pocas investigaciones sobre el tema y tampoco se han desarrollado protocolos que se apliquen comercialmente

para la propagación *in vitro* de ninguna de las especies de pino plantadas en el país (Cantillo *et al.*, 2011).

Autores como de Feria *et al.* (2009), desarrollaron un protocolo para el establecimiento *in vitro* de brotes apicales y lograron multiplicar plantas *in vitro* con coeficientes de multiplicación de 2.87 y una longitud promedio de los nuevos brotes de 2.70 cm.

Sin embargo, en general, a lo largo de los años se ha observado que no ha ocurrido así con la mayoría de las especies coníferas y en la práctica, con el empleo de este método de regeneración, no se ha podido llegar a una etapa de aplicación (Bonga *et al.*, 2010).

Desarrollar la propagación *in vitro* por organogénesis a partir de plantas donantes obtenidas de semillas o revigorizadas a partir de estacas de árboles seleccionados, permitiría multiplicar nuevos clones obtenidos mediante trabajos de selección y mejoramiento genético durante muchos años y permitiría mantener la diversidad biológica fruto de muchos de años de evolución, moldeada por los procesos naturales y cada vez más, por la influencia del ser humano.

Respecto a la composición del medio de cultivo, en el caso particular de los reguladores del crecimiento, las citoquininas han sido muy eficaces para estimular la iniciación directa o indirecta de brotes *in vitro* (van Staden *et al.*, 2008). Según estos autores, sus efectos en el cultivo de tejidos y órganos pueden variar en función del tipo de citoquinina, la concentración empleada en el medio de cultivo, si el material vegetal a establecer *in vitro* se obtiene de tejido juvenil o tejido adulto, puede variar además, en función de la especie vegetal y del método empleado para la regeneración de las plantas.

Tang y Guo (2001) emplearon con éxito Kinetina en la formación de brotes de *Pinus pinea* L. Por parte, de Feria *et al.* (2009) observaron cómo la respuesta *in vitro* de las plantas de *Pinus caribaea* var. *caribaea* varió en función de la concentración de 6-BAP adicionada al medio de cultivo. Por ejemplo, la longitud de la planta principal fue mayor en ausencia de este regulador del crecimiento o al adicionar bajas concentraciones.

Según van Staden *et al.* (2008) al utilizar altas concentraciones de citoquininas en la fase de multiplicación, los brotes que se obtienen reducen su desarrollo en longitud, resultado similar al descrito anteriormente.

En este sentido, de Feria *et al.* (2009) informaron que el coeficiente de multiplicación de *P. caribaea* var. *caribaea* multiplicadas *in vitro*, fue mejor al emplear una concentración de 6.66 μM de 6-BAP en detrimento de concentraciones por encima y por debajo del valor mencionado. Autores como Kumar *et al.* (2005) ya habían descrito efectos similares al evaluar diferentes concentraciones de 6-BAP y comprobaron que al igual que en muchas otras especies, las respuestas *in vitro* para la mayoría de las variables evaluadas dependieron de las concentraciones estudiadas.

Por su parte Cantillo *et al.* (2011), describieron mejores resultados en la multiplicación *in vitro* de *Pinus cubensis* Griseb. con el empleo de 6-BAP en detrimento de la Kinetina como citoquinina empleada en este proceso. Sin embargo, se debe resaltar que en todos los parámetros evaluados el mejor resultado se obtuvo con la concentración más elevada de 6-BAP (22.5 μM).

En especies como *P. cembroides* Zucc. y *P. halepensis* Mill. Ojeda (1996) observó un efecto positivo del 6-BAP en el número de brotes. Sin embargo, Kalia *et al.* (2000) emplearon tanto Kinetina como 6-BAP para la inducción de brotes de *P. roxburgii* Sarg. y obtuvieron los mejores resultados con 6-BAP. De igual forma, Schestibratov *et al.* (2003) utilizaron con éxito 6-BAP en una concentración de 22.2 μM en la multiplicación de *P. radiata* Don.

Otro aspecto a tener en cuenta es la concentración a que se utilicen los diferentes agentes gelificantes ya que esta podría ser considerada inadecuada si no ayuda al desarrollo *in vitro* de los brotes o si favorece la aparición de plantas con síntomas de hiperhidricidad (Thorpe *et al.*, 2008). Estos autores plantean que la hiperhidricidad se puede reducir si se eleva la concentración de agentes gelificantes como el Agar en el medio de cultivo, pero este incremento, regularmente está acompañado de una disminución en el desarrollo y crecimiento de las plantas *in vitro*.

Resultados descritos por de Feria *et al.* (2009) demuestran que en la multiplicación de *P. caribaea* var. *caribaea*, los explantes presentaron una mejor respuesta *in vitro* cuando se empleó Gelrite como agente gelificante a cuando se utilizó Agar.

Según Thorpe *et al.* (2008) existen diferencias en la composición y características de cada uno de estos compuestos. Por ejemplo, el Gelrite como producto comercial está libre de impurezas orgánicas que sí se encuentran en el Agar y tiene entre otras ventajas para la propagación *in vitro* de plantas a gran escala, ya que su costo por litro es menor al del Agar y se emplea en menor concentración que este. Además, produce un gel más claro que el Agar y con ello permite detectar más fácil cualquier contaminación microbiana.

Etapas de elongación

Muchos estudios en la propagación *in vitro* por organogénesis del género *Pinus* mencionan la necesidad de desarrollar esta etapa dentro del proceso, y es que para lograr el crecimiento de brotes vigorosos para enraizar y aclimatizar existen tres pasos necesarios:

- a) estimular la división celular,
- b) desarrollar los brotes y
- c) lograr el crecimiento de los brotes.

Esta tricotomía es necesaria mencionarla dado que los tratamientos que estimulan la división celular son antagonistas con los que provocan el crecimiento y desarrollo. Lo mismo sucede durante el enraizamiento; aquí también los tratamientos que estimulan la división celular en la base de los tallos son opuestos a los que producen el crecimiento de las raíces *in vitro* (Amerson *et al.*, 1981).

Existen varios factores que tienen un papel determinante en esta etapa:

Tipo de explante inicial

Con respecto a la longitud del brote que se utiliza para iniciar la etapa de elongación, Coke (1996), Frampton *et al.* (1998) y Mathur *et al.* (2001) coinciden en que es necesario partir de brotes que tengan una longitud mayor a 0.5 cm. Otros autores en trabajos más recientes sugieren utilizar brotes mayores de 2.0 cm para iniciar la etapa de elongación (Prehn *et al.*,

2003; Zhang *et al.*, 2006) y esto permitirá la obtención de brotes con mayor desarrollo en longitud para enraizar, en menor tiempo.

Por su parte, Mathur *et al.* (2001) explicaron que cultivar grupos de brotes en lugar de brotes individuales actúa en detrimento del desarrollo en longitud de los brotes.

Tipo y concentración de nutrientes inorgánicos

Según Gamborg *et al.* (1976) el medio de cultivo basal es uno de los factores más importantes que determina el éxito del cultivo *in vitro*. Muchos de los medios de cultivo utilizados en *Pinus* spp., han sido creados para otras especies, incluso angiospermas, como el MS (Murashige y Skoog, 1962), el SH (Schenk y Hildebrandt, 1972), el DCR (Gupta y Durzan, 1985) y el LP (Aitken Christie *et al.*, 1986). También se ha modificado la concentración de nutrientes; y a partir de experimentos se han seleccionado los que mejores respuestas han dado. Uno de los medios de cultivo más utilizado en pino es el Westvaco (WV5) descrito por Coke (1996), con una mejor combinación de nutrientes inorgánicos, apropiada fuente de carbohidratos, reguladores de crecimiento y carbón activado.

Reguladores del crecimiento

No es común encontrar reguladores del crecimiento en el medio de cultivo para la elongación de los brotes, sin embargo, Tang *et al.* (1998) adicionaron al medio de cultivo 0.5 mg l⁻¹ de Ácido 3-indolbutírico (AIB) y 1.0 mg l⁻¹ de Ácido giberélico (AG₃) y obtuvieron en seis semanas brotes de *Pinus taeda* de 1.0 cm. Con estos brotes lograron un 46% de enraizamiento. La adición de auxinas al medio de cultivo de elongación podría generar un brote con mayor potencial de enraizamiento en la siguiente fase por inducir la formación de raíces adventicias. Además, junto con el AG₃ podría favorecer la elongación de brotes ya que actúan en el alargamiento celular.

FASE DE ENRAIZAMIENTO

Enraizamiento *in vitro*

Según Ríos *et al.* (2005) la rizogénesis o inducción y desarrollo de un sistema radicular funcional constituye una de las barreras

limitantes para la micropropagación en determinadas especies leñosas.

El género *Pinus* ha sido clasificado como recalcitrante en relación con la formación de raíces *in vitro* al regenerar plantas por organogénesis. Muchos trabajos realizados con el objetivo de formar raíces *in vitro* en pino, han descrito el empleo de diversos tratamientos con reguladores del crecimiento, variando la concentración de nutrientes inorgánicos, evaluando la influencia del estado físico del medio de cultivo e incluso la concentración de carbón activado en el medio de cultivo (Thorpe, 2004).

El enraizamiento de brotes de gimnospermas en condiciones *in vitro*, es reconocido como un proceso difícil de lograr (Nandwani *et al.*, 2001; Schestibratov *et al.*, 2003; Parasharami *et al.*, 2003; Prehn *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006). Es un proceso lento debido a que los brotes de la mayoría de las coníferas, especialmente *Pinus* spp. enraizan a partir de un callo o tejido cicatricial o directamente del tejido vascular, después de un tratamiento con auxinas.

El enraizamiento directo pocas veces se produce espontáneamente (Stojicic y Budimir, 2004). Las raíces se generan siempre a partir de tejido meristemático, ya sea por fuera de los conductos resiníferos en el enraizamiento directo, o por el tejido meristemático que rodea el callo, en el indirecto. El cultivo *in vitro* no impide la iniciación radicular en coníferas. Los tratamientos con auxinas usualmente tienen un efecto positivo en el enraizamiento, son más rápidos, más sincronizados y resultan en más raíces por brote, pero la elongación radicular es inhibida severamente. Algunos autores afirman que el desarrollo de raíces *in vitro* usualmente aumenta la supervivencia al trasplante dado que las raíces funcionales generan un balance hídrico favorable. Estas raíces compensarían la pérdida de agua causada por estomas no funcionales y facilitarían la absorción de nutrientes. Una buena respuesta y un aumento en la masa seca de estas plantas enraizadas *in vitro* pueden favorecer una mejor toma de nutrientes. Sin embargo, la presencia de raíces durante el cultivo *in vitro* no siempre mejoraría el éxito al trasplante (Seelye *et al.*, 2003).

Varios han sido los estudios encaminados a comprender mejor la respuesta de diferentes especies coníferas para formar raíces *in vitro*. La adición al medio de cultivo de auxinas, por lo general, en forma de AIB o Ácido naftalenacético (ANA), ha sido una práctica general para inducir la formación de raíces *in vitro* en coníferas (Niemi *et al.*, 2002). Sin embargo, se conoce que el éxito final de esta fase del proceso de propagación *in vitro*, no solo depende de la adición al medio de cultivo de determinadas concentraciones de auxinas. Por ejemplo, es importante tener en cuenta el efecto que pueden ejercer las altas concentraciones de citoquininas (0.5-10 mg l⁻¹) empleadas durante la fase de multiplicación, pues pueden inhibir o retrasar la formación de raíces y también limitar los efectos estimuladores de las auxinas en esta fase del proceso (Ben-Jaacov *et al.*, 1991).

En ocasiones, ha sido necesario realizar más de un subcultivo en medio de cultivo libre de citoquininas, hasta que las concentraciones endógenas de este regulador del crecimiento se han reducido lo suficiente en el tejido de la planta (van Staden *et al.*, 2008).

Por su parte, Zhu *et al.* (2010), describieron la emisión de raíces *in vitro* de *P. massoniana* en un 82% de los brotes en un medio de cultivo con 0.2 mg l⁻¹ de ANA, el desarrollo en longitud de las raíces lo lograron al transferir los brotes a un medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento.

Enraizamiento *ex vitro*

Un rápido enraizamiento mejoraría la calidad de las plantas, incluso es probable que las plantas con un buen sistema radicular y una vigorosa conexión vascular tengan una mayor tasa de crecimiento inicial en la fase de aclimatización. La mayor parte de la bibliografía consultada cita el enraizamiento *ex vitro* de estacas de *P. taeda* vía macropropagación, con distintos porcentajes de éxito en función de la técnica empleada. Todos los trabajos mencionan la aplicación de un tratamiento inductivo corto con auxinas en distintas concentraciones. Por ejemplo, Saborio *et al.* (1997) lograron un 40% de enraizamiento en *P. ayacahuite* Ehrenb. luego de una inmersión de los brotes en 100 µM de ANA durante ocho horas, mientras que, Stojicic *et al.* (1999)

alcanzaron un 20% de enraizamiento en *P. heldreichii* Christ. con la inmersión de los brotes en 100 µM de AIB previo a la siembra. Sin embargo, Sul y Korban (2004) no pudieron lograr el enraizamiento en *P. pinea* L. Según Oliveira *et al.* (2003), una alternativa a las dificultades encontradas para lograr plantas enraizadas *in vitro* de *P. pinea* L. fue la inoculación de algunos hongos aislados de ectomicorrizas con plantas *in vitro*, lo cual demostró ser eficiente y efectivo a la hora de trasplantar las plantas a un sustrato de vermiculita. Por su parte, Tang *et al.* (2006) lograron un 36.5% de supervivencia en la fase de aclimatización, al transferir brotes de *P. taeda* L. directamente a una mezcla de sustrato compuesta por perlita, turba y vermiculita (1:1:1).

Factores que podrían afectar el enraizamiento tanto *in vitro* como *ex vitro*

Tipo y concentración de la auxina

Durante estudios realizados para la formación de raíces *in vitro*, Kalia *et al.* (2007) demostraron que este proceso es fuertemente dependiente del tipo de auxina utilizada y su concentración. Varias combinaciones, concentraciones y duración de tratamientos con auxinas han sido probadas con diferentes porcentajes de éxito. Las auxinas más utilizadas son el AIB y ANA para las distintas especies del género *Pinus* spp.

En los trabajos que utilizan ANA, las concentraciones oscilan desde 0.1 a 20 mg l⁻¹ desde unos pocos minutos de inmersión hasta varias horas (Nandwani *et al.*, 2001) o tratamientos continuos con concentraciones desde 0.01 mg l⁻¹ a 0.5 mg l⁻¹ de ANA pero generalmente combinado con AIB en concentraciones desde 1.0 a 20 mg l⁻¹ (Schestibratov *et al.*, 2003; Prehn *et al.*, 2003), aunque son numerosos los trabajos que utilizan solamente AIB para obtener mejores resultados en concentraciones que varían de 0.1 a 1000 mg l⁻¹ (Tang y Ouyang, 2000; Parasharami *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006).

El Ácido 3-indolacético (AIA) es la auxina menos potente siendo necesaria su adición en concentraciones superiores a 5.0 mg l⁻¹. Esto se debe a su baja actividad y a la degradación que se produce de este regulador del crecimiento por influencia de la luz.

Los resultados son variables, y mayormente se refieren a enraizamiento *in vitro* se han logrado con pulsos de auxinas seguidos de un período de elongación de las raíces *in vitro* sin reguladores del crecimiento, con porcentajes de supervivencia que han oscilado entre 0.0 y 90% en función del tratamiento y la especie. Se observa en muchos de estos trabajos que los porcentajes de enraizamiento pueden ser muy bajos o casi nulos si no se encuentra la concentración óptima del regulador de crecimiento para la especie o variedad con que se trabaja.

Formas de aplicación de la auxina

Al comparar tratamientos de enraizamiento por pulsos o continuos, debe medirse no solo el porcentaje de enraizamiento sino también el tiempo requerido para enraizar. Los resultados con exposición continua varían entre 20% y 47% de enraizamiento en 12 semanas en un medio de cultivo con la mitad de los nutrientes inorgánicos GD o DCR con 0.1 mg l⁻¹ de 6-BAP y 0.1 mg l⁻¹ de ANA o 2.0 mg l⁻¹ de AIB. En contraste, un tratamiento en forma de pulso con el mismo medio de cultivo con 0.1 mg l⁻¹ de 6-BAP y 0.5 mg l⁻¹ de ANA durante seis a trece días hasta el subcultivo en un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento, produjo un 85% de enraizamiento. El enraizamiento posterior a un pulso se completa en cinco o seis semanas, por lo que el proceso completo requiere entre seis y ocho semanas.

En general, los tratamientos por pulso brindan un mayor porcentaje de enraizamiento en un período más corto de tiempo (Mathur *et al.*, 2001). Tratamientos cortos (10-30 minutos) con altas concentraciones de AIB (200 mg l⁻¹) han sido suficientes para inducir la formación de raíces. La respuesta declina rápidamente con un tiempo de exposición más prolongado a la mencionada concentración, causando daños a los tejidos e inhibiendo el enraizamiento.

Una incubación prolongada en un medio de cultivo rico en auxinas puede causar una callosidad excesiva, iniciación radicular retardada o una inhibición de la elongación de las raíces iniciadas (Selby *et al.*, 1991).

Número de subcultivos

Se ha demostrado que la formación de raíces puede disminuir al incrementarse el número

de subcultivos sucesivos que han recibido los brotes antes de su enraizamiento. No obstante, la formación de raíces adventicias también se podría ver afectada y sería más difícil de lograrla a partir de tejidos maduros que de tejidos juveniles; y las condiciones *in vitro* probadas para diferentes especies leñosas serían más favorables para enraizar brotes maduros que las condiciones *ex vitro*. Esto se debe a la posibilidad de rejuvenecer el tejido maduro a través de sucesivos subcultivos en medios de cultivo apropiados, que inducen progresivamente a un aumento del potencial de formación de raíces adventicias (Parasharami *et al.*, 2003).

Tipo de brote

Manteniendo todos los parámetros iguales, la longitud del brote tiene una marcada influencia en el enraizamiento. Los brotes más largos enraizan mejor que los brotes cortos, por lo que se recomiendan los mayores a 1.5 cm para enraizar. Sin embargo, Coke (1996) demostró que para realizar el enraizamiento *ex vitro*, son necesarios brotes con una longitud mayor a 4.0 cm, es decir, de mayor longitud que la recomendada para enraizar en condiciones *in vitro*.

Concentración de las sales

Las etapas de inducción y crecimiento radicular se realizan, según la literatura científica, en medios de cultivo con una concentración de nutrientes inorgánicos reducida a la mitad y cuando las raíces alcanzan 0.5 cm de longitud ya están preparadas para su trasplante a la fase de aclimatización (Mathur *et al.*, 2001; Nandwani *et al.*, 2001; Parasharami *et al.*, 2003).

Influencia de la sacarosa

En las plantas, los carbohidratos tienen varias funciones esenciales. Ellos constituyen sustratos para la respiración, juegan un importante papel en la vía de síntesis de muchos compuestos, son elementos básicos de las macromoléculas y controlan además, otros muchos procesos relacionados con el desarrollo de las plantas (Gibson, 2000; Smeekens, 2000).

La sacarosa probablemente ha sido la fuente de carbohidratos más utilizada en el cultivo *in*

in vitro de tejidos vegetales y numerosos estudios la han señalado como la fuente de carbono óptima (Alkhateeb, 2001). No obstante, no se debe olvidar que existen enzimas invertasas que son liberadas al medio de cultivo por las plantas cultivadas *in vitro* y que actúan en la hidrólisis de la sacarosa dando lugar a la glucosa y la fructosa (Thorpe *et al.*, 2008). Por ello, es importante tener en cuenta que las plantas *in vitro* dispondrán para su desarrollo no sólo de la sacarosa, sino también de sus dos monosacáridos constituyentes.

La capacidad de las plantas para metabolizar los diferentes tipos de carbohidratos es diferente (Alkhateeb, 2008). Se conoce que las altas concentraciones de sacarosa (>6.0%) en el medio de cultivo han reducido la capacidad fotosintética de las plantas (Arigita *et al.*, 2002). También se ha descrito que estas altas concentraciones pueden reprimir la expresión de genes y reducir el contenido de clorofila, afectar el Ciclo de Calvin, así como reducir la actividad y concentración de Rubisco, lo que conlleva a bajas tasas fotosintéticas (Premkumar *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 2002).

A pesar de que se ha examinado el efecto regulador de los carbohidratos, en particular, el papel de la sacarosa en el desarrollo de la latencia, en la formación de órganos de almacenamiento y la maduración de embriones somáticos, su papel como molécula reguladora aun no ha sido totalmente dilucidado (Calamar y De Klerk, 2002).

En relación con la acción de la sacarosa en la formación de órganos adventicios se han realizado pocos estudios (Calamar y De Klerk, 2002). Según Warren *et al.* (1994) la sacarosa incrementó la regeneración de tejido vascular en *Lactuca sativa* (lechuga), mientras que, en *Malus domestica* (manzano), Pawlicki y Welander, (1995) demostraron que el tipo de carbohidrato influyó en la formación de raíces.

Se ha demostrado que la sacarosa puede influir en la calidad funcional de las plantas cuando estas son transferidas a condiciones *ex vitro* para su aclimatización (Fuentes *et al.*, 2005).

Se conoce que los carbohidratos juegan un papel importante en el cultivo *in vitro* como fuentes de energía y carbono, así como agentes osmóticos, pero también, están vinculados con

la diferenciación de los elementos del xilema y floema (Thorpe *et al.*, 2008).

Ha sido descrito que al aumentar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo se incrementa el porcentaje de materia seca en las plantas (Kubota *et al.*, 2002; Shim *et al.*, 2003). Lo anterior se debe, a que al aumentar el contenido de sacarosa, el potencial osmótico del medio de cultivo disminuye (Cárdenas y Villegas, 2002), se limita la absorción de agua, pero se favorece la asimilación de sacarosa y con ello el incremento de materia seca.

Chávez *et al.* (2010), describieron cómo a medida que se incrementó la concentración de sacarosa en un medio de cultivo previo a la fase de enraizamiento *in vitro* de plantas de *P. caribaea* var. *caribaea*, se incrementó también el porcentaje de materia seca desde 11.93% en el tratamiento con 30 g l⁻¹ de sacarosa, hasta 19.45% en el tratamiento con 60 g l⁻¹.

También estos autores observaron que en los tratamientos con mayores concentraciones de sacarosa (50 y 60 g l⁻¹) las plantas obtenidas después de 35 días de cultivo en este subcultivo previo a la fase de enraizamiento *in vitro*, presentaron una reducción considerable en la formación de nuevos brotes y específicamente las plantas que se produjeron en el tratamiento con 60 g l⁻¹ de sacarosa, presentaron acículas más desarrolladas y diferenciadas, muy similares a las acículas que desarrollan las plantas de esta variedad en condiciones naturales. Estas plantas presentaron, además, un color verde más intenso y el olor característico de los aceites esenciales que se puede percibir al macerar tejido de árboles adultos. Esto no ocurrió con las plantas de los restantes tratamientos y puede ser un posible indicador de un mayor grado de diferenciación de los diferentes tejidos y las estructuras vasculares de estas plantas, incluyendo los canales resiníferos.

Este incremento en el porcentaje de materia seca, está asociado al desarrollo de los tejidos vasculares de las plantas, en particular con el proceso de lignificación. Así mismo, cuando se combinaron en un tratamiento ya en la fase de enraizamiento, plantas obtenidas con 60 g l⁻¹ de sacarosa en el subcultivo previo, con una reducción del 50% de los nutrientes inorgánicos

en el medio de cultivo, el resultado fue un incremento en más de 20 puntos porcentuales en la acumulación de los residuos de la pared celular (acumulación de lignina) respecto al tratamiento control.

FASE DE ACLIMATIZACIÓN

Manipulando el ambiente *in vitro* las hojas, con mayor resistencia al estrés hídrico y competentes fotosintéticos, pueden desarrollarse en el laboratorio, en una pre-aclimatización, preparando las plantas para la transferencia fuera del laboratorio. Las raíces formadas *in vitro* pueden favorecer el crecimiento inicial *ex vitro*; aunque la tasa de crecimiento óptima no ocurrirá hasta que las nuevas hojas y raíces se desarrollen en el ambiente *ex vitro* (Seelye *et al.*, 2003).

La aclimatación induce cambios morfológicos, anatómicos y fisiológicos que hacen a la planta parecerse a una planta normal. Esta etapa es casi siempre estresante y suele asociarse a la muerte de las plantas, generalmente por fuerte deshidratación. En angiospermas la principal causa de muerte al transferir las plantas a condiciones no estériles es la cutícula reducida y una pobre regulación estomática ante la pérdida de agua. Sin embargo, en algunas gimnospermas como el género *Pinus* la regulación cuticular y estomática ante la pérdida de agua es relativamente normal.

De esto se desprende que son otros los factores que producen la muerte de las gimnospermas durante la fase de aclimatación. Se le ha prestado atención a la morfología, anatomía interna y fisiología de las plantas obtenidas *in vitro*, concluyendo que para lograr el éxito en la supervivencia y el crecimiento hay características a tener en cuenta, como la longitud del brote; la calidad de los brotes y la morfología del sistema radicular. Lo interesante es determinar la morfología de plántula óptima y su relación con la supervivencia y crecimiento.

Para *P. taeda*, la calidad del brote es mucho más importante en la supervivencia, que el número de raíces. En *P. caribaea* var. *hondurensis* x *P. tecunumanii*, Haines *et al.* (2000), encontraron que porcentaje de enraizamiento y número de raíces por planta estuvo relacionado con el genotipo; mientras

que, dentro de los parámetros morfológicos, la longitud de acículas primarias fue el mejor indicador. Estos autores concluyeron, que los brotes con mayor enraizamiento, fueron aquellos que presentaron acículas primarias mayores a 2.5 cm de longitud, con el ápice activo y un diámetro basal mayor a 0.1 cm.

Existe poca información en relación con el crecimiento en suelo de plántulas de coníferas originadas *in vitro*, dado que con muy pocas especies se ha tenido éxito en este sentido.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta revisión de la literatura científica sobre los avances obtenidos en la propagación *in vitro* por organogénesis del género *Pinus*, abren nuevos debates y puntos de partida en la búsqueda de soluciones a las dificultades que se presentan sobre todo para lograr con éxito la fase de enraizamiento *in vitro* o *ex vitro* en este género de plantas. En esta dirección sería importante lograr cerrar el ciclo *in vitro*, sino con plantas enraizadas, al menos con plantas que reúnan características que les permitan una buena supervivencia y enraizamiento en condiciones *ex vitro*, para poder disponer de plantas madre a partir de las cuales se podrían establecer bancos donantes para el corte de estaquillas y con ello la producción a gran escala por macropropagación de los ejemplares que finalmente serían plantados en condiciones de producción.

REFERENCIAS

- Agrawal, V, Prakash S, Gupta SC (2002) Effective protocol for *in vitro* shoot production through nodal explants of *Simmondsia chinensis*. Biol. Plant 45: 449-453
- Aitken-Christie, J, Singh A, Davies H (1986) Multiplication of meristematic tissue culture system for radiata pine. Biotechnology in Agriculture and Forestry 1: 413-432
- Alkhateeb, AA (2001) Influence of different carbon sources and concentrations on *in vitro* root formation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv Khanezi. Zagazig J. Agric. Res. 28: 597-608
- Alkhateeb, AA (2008) Comparison effects of sucrose and date palm syrup on somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). American Journal of Biotechnology and Biochemistry 4: 19-23

- Alonso, P, Moncaleán P, Fernández B, Rodríguez A, Centeno ML, Ordás RJ (2006) An improved micropropagation protocol for stone pine (*Pinus pinea* L.). *Ann. For. Sci.* 63: 879-885
- Amerson, HV, McKeand SE, Mott RL (1981) Tissue culture and greenhouse practices for the production of loblolly pine plantlets. Proceedings of the 16th Southern Forest Tree Improvement Conference. (Conference Proceedings) pp. 168-175
- Arigita, L, Gonzalez A, Tamés RS (2002) Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 115: 166-173
- Ben-Jaacov, J, Ackerman A, Tal E, Jacobs G (1991) Vegetative propagation of *Alberta magna* by tissue culture and grafting. *HortScience* 26: 74
- Bonga, JM, Klimaszewska KK, von Aderkas P (2010) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 241-254
- Bonga, JM, Von Aderkas P (1992) *In vitro* culture of trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Calamar, A, De Klerk GJ (2002) Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 207-212
- Cantillo, R, Igarza J, Ochoa AM (2011) Propagación *in vitro* de plantas de *Pinus cubensis* Griseb. *Biotecnología Vegetal* 11 (1): 3-13
- Cárdenas, LA, Villegas MA (2002) Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Rev. Fitotec. Mex.* 25: 213-217
- Chávez, M, de Feria, M, Barbón, R, La O, M, Pérez, M, Jiménez-Terry, F, Quiala, E, Agramonte, D (2010) Características morfológicas de plantas *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *caribaea* influenciadas por el empleo de la sacarosa en la fase de multiplicación. *Biotecnología Vegetal* 10 (1): 31-40
- Coke, J (1996) Basal nutrient medium for *in vitro* cultures of loblolly pines. USA Patent 5,534,433 y 5,534,434
- De Diego, N, Montalbán IA, Fernández E, Montcaleán P (2008) *In vitro* regeneration of *Pinus pinaster* adult trees. *Can J For Res.* 38: 2607-2615
- de Feria, M, Chávez, M, Barbón, R, La O, M, Pérez, M, Jiménez-Terry, F, Quiala, E, Agramonte, D (2008) Establecimiento *in vitro* de brotes apicales de *Pinus caribaea* var. *caribaea*. *Biotecnología Vegetal* 8 (1): 15-20
- de Feria, M, Chávez, M, Barbón, R, La O, M, Pérez, M, Jiménez-Terry, F, Quiala, E, Agramonte, D (2009) Multiplicación *in vitro* de plantas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*. *Biotecnología Vegetal* 9 (4): 217-224
- Ewald, D (2007) Micropropagation of *Larix* species via organogenesis. En: Jain, SM y Häggman H (Eds) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, pp. 125-136. Springer, Dordrecht
- Frampton, J, Amerson, H, Leach G (1998) Tissue culture method affects *ex vitro* growth and development of loblolly pine. *New Forests* 16: 125-138
- Fuentes, G, Talavera C, Oropeza C, Desjardins Y, Santamaria JM (2005) Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 41: 69-76
- Gamborg, O, Murashige T, Thorpe T, Vasil I (1976). *Plant Tissue Culture Media. In Vitro* 12: 473-478
- Gibson, SI (2000) Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiology* 124: 1532-1539
- Gupta, PK, Durzan DJ (1985) Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Report* 4: 177-179
- Haines, R, Copley T, Huth J, Nester M (2000) The relationship between morphological features and the rooting of cuttings of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* x *Pinus tecunumanii*. Forestry Research Centre, Queensland, Australia
- Kalia, RK, Arya S, Kalia S, Arya I, Sharma S (2000) Plantlet production in Chir Pine through axillary bud proliferation. Peer Review Meeting. [En línea] En: <http://dr.satishkant.port5.com/pineaxillary.pdf> (Consultado el 12 de diciembre de 2006)
- Kalia, RK, Arya S, Kalia S, Arya ID (2007) Plantlet regeneration from fascicular buds of seedling shoot apices of *Pinus roxburghii* Sarg. *Biol Plant* 51: 653-659
- Klimaszewska, K, Trontin JF, Becwar MR, Devillard C, Park YS, Lelu MA (2007) Recent Progress in Somatic Embryogenesis of Four *Pinus* spp. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 1: 11-25
- Korban, SS, Sul IW (2007) Micropropagation of coast Redwood (*Sequoia sempervirens*) En: Jain, SM y Häggman H (Eds) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, pp. 23-32. Springer, Dordrecht

- Kubota, C, Ezawa M, Kozai T, Wilson SB (2002) *In situ* estimation of carbon balance of *in vitro* sweet potato and tomato plantlets cultured with varying initial sucrose concentrations in the medium. J. Am. Soc. Hort. Sci. 127: 963-970
- Kumar, R, Sharma K y Agrawal V (2005) *In vitro* clonal propagation of *Holarrhena antidysenterica* (L.) Wall. through nodal explants from mature trees. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 41: 137-144
- Lelu, MA, Michele W, Klimaszewska K (2006) Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). *Plant Cell Report* 25: 767-776
- Maruyama, E, Hosoi Y, Ishii K (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration in yakutanegoyou, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, an endemic and endangered species in Japan. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 43: 28-34
- Mathur, G, von Arnold S, Nadgauda RS (2001) Abstract En: 8th Meeting of The conifer Biotechnology Working Group, Douglass College Centre, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, June 7-11
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Nandwani, D, Kumaria S, Tandon P (2001) Micropropagation of *Pinus kesiya* Royle ex Gord (Khasi pine). *Gartenbauwissenschaft* 66: 68-71
- Nehra, NS, Becwar MR, Rottmann WH, Pearson L, Chowdhury K, Chang S, Wilde HD, Kodrzycki RJ, Zhang C, Gause KC, Parks DW, Hinchee MA (2005) Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 41: 701-717
- Niella, F, Rocha P (2004) Biotecnologías aplicadas a los programas de mejoramiento genético de *Pinus* spp. en la región. Jornadas de mejoramiento genético para productores forestales. Julio 15-16, 2004. FCF-UNaM-INTA-BDP Posadas, Misiones-Argentina
- Niemi, K, Vuorinen T, Ernsten A, Häggman H (2002) Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins affect root and mycorrhiza formation on *in vitro* Scots pine hypocotyl cuttings. *Tree Physiology* 22: 1231-1239
- Ojeda, MC (1996) Inducción de organogénesis y embriogénesis somática en *Pinus cembroides* (Zucc) y *Pinus halepensis* Mill. (Mill). Tesis para optar al grado de Maestro en Ciencias en Producción Agrícola. Universidad Autónoma de Nuevo León. Fac. Agronomía. 58 p.
- Oliveira, P, Barriga J, Cavaleiro C, Peixe A, Potes AZ (2003) Sustained *in vitro* root development obtained in *Pinus pinea* L. inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Forestry* 76: 579-587
- Parasharami, V, Poonawala I, Nadgauda R (2003) Bud break and plantlet regeneration *in vitro* from mature trees of *Pinus roxburghii* Sarg. *Current Science* 84: p 25
- Pawlicki, N, Welander M (1995) Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure in adventitious rooting of the apple rootstock Jork 9. *Plant Science* 106: 167-176
- Prehn, D, Serrano C, Mercado A, Stange C, Barrales L, Arce-Johnson P (2003) Regeneration of whole plants from apical meristems of *Pinus radiata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 91-94
- Premkumar, A, Barcelo A, Pliego F, Quesada MA, Mercado JA (2002) Influences of exogenous sucrose on juvenile avocado during *in vitro* cultivation and subsequent *ex vitro* acclimatization. *Trees* 16: 569-575
- Pullman, GS, Johnson S, Van Tassel S, Zhang Y (2005) Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation with MES pH buffer, biotin, and folic acid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 80: 91-103
- Pullman, GS, Skryabina A (2007) Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Report* 26: 873-887
- Ríos, L, Sánchez Olate M, Decarli N, Feito D, Rodríguez F (2005) Bases moleculares del enraizamiento. En: Sánchez-Olate M, Ríos D (Eds) *Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal*, pp 164. Departamento de Silvicultura. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción, Chile
- Saborio, F, Dvorak William S, Donahue Jeffrey K, Thorpe Trevor A (1997) *In vitro* regeneration of plantlets from mature embryos of *Pinus ayacahuite* Ehrenb. *Tree Physiology* 17 (12): 787-796
- Salanova, T, Blehova A, Salaj J (2007) Embryogenic suspension cultures of *Pinus nigra* Arn.: growth parameters and maturation ability. *Acta Physiology Plant* 29: 225-231
- Schestibratov, K, Mikhailov R, Dolgov S (2003) Plantlet regeneration from subculturable nodular callus of *Pinus radiata* Don. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 72 (2): 139-146
- Seelye, J, Burge G, Morgan E (2003) *Acclimatizing Tissue Culture Plants: Reducing the Shock*. New

- Zealand Institute for Crop & Food Research Limited. Combined Proceedings International Plant Propagators Society 53: 85-90
- Selby, C, Kennedy S, Harvey B (1991) Adventitious root formation in hypocotyls cuttings of *Picea sitchensis*, the influence of plant growth regulators. *New phytology* 120: 453-457
- Shenk, R, Hildebrandt A (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204
- Shim, SW, Hahn Ej, Paek Ky (2003) *In vitro* and *ex vitro* growth of grapevine rootstock '5BB' as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in culture media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 57-62
- Sinha, A, Hofmann M, Römer U, Köckenberger EL, Roitsch T (2002) Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. *Plant Physiology* 128: 1480-1489
- Smeekens, S (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology* 51: 49-81
- Stojicic, D, Budimir S (2004) Cytokinin-mediated axillary shoot formation in *Pinus heldreichii*. *Biol Plant* 48: 477-479
- Stojicic, D, Budimir S, Culafic L (1999) Micropropagation of *Pinus heldreichii*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 59: 147-150
- Sul, W, Korban S (2004) Effects of salt formulation, carbon sources, cytokinins, and auxins on shoot organogenesis from cotyledons of *Pinus pinea* L. *Plant Growth Regulation* 43: 197-205
- Tang, W, Guo Z (2001) *In vitro* propagation of loblolly pine via direct somatic organogenesis from mature cotyledons and hypocotyls. *Plant Growth Regulation* 33 (1): 25-31
- Tang, W, Harris LC, Outhavong V, Newton RJ (2004) Antioxidants enhance *in vitro* plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Cell Report* 22: 871-877
- Tang, W, Newton R, Charles TM (2006) Plant regeneration through multiple adventitious shoot differentiation from callus cultures of slash pine (*Pinus elliotii* Engelm.). *Journal of Plant Physiology* 163: 98-101
- Tang, W, Newton RJ (2005) Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Report* 24: 1-9
- Tang, W, Ouyang F (2000) Plant regeneration via organogenesis from six families of loblolly pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 223-226
- Tang, W, Ouyang F, Guo Z (1998) Plant regeneration through organogenesis from callus induced from mature zygotic embryos of loblolly pine. *Plant Cell, Reports* 17: 557-560
- Thorpe, T, Stasolla C, Yeung EC, de Klerk GJ, Roberts A, George EF (2008) The Components of Plant Tissue Culture Media II : Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. En: George, EF, Hall MA y de Klerk GJ (Eds) *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd Edition, pp. 115-173
- Thorpe, TA (2004) Turning point article to root or not to root that is the question: reflections of a developmental plant physiologist. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 40: 128-142
- Vales, T, Feng X, Ge L, Xu N, Cairney J, Pullman GS, Peter GF (2007) Improved somatic embryo maturation in loblolly pine by monitoring ABA-responsive gene expression. *Plant Cell Report* 26: 133-143
- van Staden, J, Zazimalova E, George EF (2008) Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. En: George, EF, Hall MA y de Klerk GJ (Eds) *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd Edition, pp. 205-226. Springer. Dordrech
- Warren, J, Roberts LW, Warren PM, Gresshoff PM (1994) Stimulatory and inhibitory effects of sucrose concentration on xylogenesis in lettuce pith explants; possible mediation by ethylene biosynthesis. *Ann. Bot.* 71: 65-73
- Zhang, Y, Wei ZM, Xi ML, Shi JS (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
- Zhu, LH, Wu XQ, Hong YQ, Jing J, Jian Y (2010) Micropropagation of *Pinus massoniana* and mycorrhiza formation *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 102: 121-128

Recibido: 3-4-2012
Aceptado: 4-6-2012