

Propagación *in vitro* de plantas de *Pinus cubensis* Griseb.

Raima Cantillo Ardebol*, Janet Igarza Castro, Ana María Ochoa *Autor para correspondencia

Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Carretera del Valle km 5.5. Holguín. Cuba. Apartado Postal 83. CP 80 100. e-mail: rcantillo@cisat.cu

RESUMEN

La micropropagación de plantas del género *Pinus* se ha realizado en varias especies. Sin embargo, no se han informado trabajos sobre micropropagación de *Pinus cubensis* Griseb., especie de gran importancia económica. En consecuencia se propone como objetivo lograr la propagación *in vitro* *Pinus cubensis* Griseb. para contribuir al aumento del número de individuos en su hábitat natural. Para la desinfección de las semillas y el establecimiento de los embriones se determinó la concentración y el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio así como el efecto de la presencia o ausencia de la cubierta seminal. En la fase de multiplicación se ensayaron dos reguladores de crecimiento y tres concentraciones de cada uno para lograr la emisión de brotes axilares. Se realizaron cinco subcultivos cada 21 días. El enraizamiento y la aclimatización se realizaron simultáneamente. Los brotes se individualizaron y se sumergieron en una solución enraizadora. Se logró el establecimiento *in vitro* de embriones cigóticos de *P. cubensis*. Los mayores porcentajes de desinfección y germinación se obtuvieron después de la inmersión de las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 20% durante 15 minutos, seguida de su siembra sin cubierta seminal. Con el uso de 22.5 μM de 6-bencilaminopurina y 5.4 μM de ácido naftalenacético se incrementó el número y la longitud de los brotes axilares en la fase de multiplicación. Fue posible propagar *in vitro* por primera vez *Pinus cubensis* Griseb. a partir embriones cigóticos y se estableció un protocolo de trabajo donde las plantas obtenidas alcanzaron un 50% de supervivencia en la fase de aclimatización.

Palabras clave: aclimatización, brotes axilares, forestales, multiplicación, pino

ABSTRACT

Micropropagation of plants from the genus *Pinus* has been done in several species. However, micropropagation of *Pinus cubensis* Griseb has not been reported. This species has a great economical importance. Then, the aim of the current research was to achieve *in vitro* propagation of *Pinus cubensis* Griseb. to increase the number of individuals in their natural habitat. The concentration of sodium hypochlorite and immersion time were determined for seeds disinfection and embryos establishment. The effect of the presence or absence of the seed coat was also studied. Two growth regulators and three concentrations of each one were tested to achieve the emission of axillary buds in the multiplication phase. Five subcultures every 21 days were done. Rooting and acclimatization were carried out simultaneously. Shoots were individualized and immersed in a rooting solution. Zygotic embryos of *P. cubensis* were developed *in vitro*. The highest percentages of disinfection and germination were obtained by introducing the seeds in a solution of sodium hypochlorite at 20% for 15 minutes, planting them after that without the seed coat. The number and length of axillary buds increased by using 22.5 μM of 6-benzylaminopurine and 5.4 μM naphthaleneacetic acid in the multiplication phase. The *in vitro* propagation of *Pinus cubensis* Griseb. from zygotic embryos was achieved for the first time. A protocol was also established, reaching 50% of survival in the acclimatization phase.

Key words: acclimatization, axillary buds, forestry, multiplication, pinus

INTRODUCCIÓN

La Meseta de Pinares de Mayarí, estuvo densamente poblada por *Pinus cubensis* Griseb., especie importante como fuente renovable para la producción de diversos productos relacionados con la madera. Sin embargo, sus poblaciones, al habitar sobre

suelos con elevado contenido de hierro y níquel, se han reducido debido a la minería intensiva y a la explotación maderera. Por estos motivos el número de individuos decrece continuamente.

A inicios de la década de los 60 del siglo XX, se desarrolló una técnica para la propagación de

plantas por cultivo de tejidos, que con el curso de los años se fue mejorando y modificando para numerosas especies (Gupta y Timmis, 1999). Las técnicas de micropropagación más comunes son la formación directa de brotes, la formación de brotes axilares (ambas por organogénesis) y la embriogénesis somática (Von Aderkas y Bonga, 2000). Según Gupta *et al.* (1999), al iniciar trabajos con alguna nueva especie, la técnica más recomendada es la organogénesis. La inducción del desarrollo de brotes axilares, seguido de su enraizamiento, además de ser la forma más común de regeneración, es la que presenta mayores garantías de estabilidad genética (Toribio y Celestino, 2000).

En el caso de la organogénesis directa, la mayoría de las regeneraciones *in vitro* exitosas en *Pinus* han sido el resultado de la utilización de embriones maduros y cotiledones, como explantes iniciales (Rocha y Niella, 2001).

La micropropagación de plantas del género *Pinus* se ha realizado en varias especies, por ejemplo: *Pinus caribaea* Morelet. (David *et al.*, 1995), *Pinus strobus* L. (Klimaszewuska *et al.*, 2001), *Pinus taeda* L. (Gupta *et al.*, 1999; Niella y Rocha, 2004) y *Pinus radiata* Don. (Schestibratov *et al.*, 2003).

Sin embargo, no se han informado trabajos sobre micropropagación de *Pinus cubensis* Griseb. En consecuencia, se propone como objetivo lograr la propagación *in vitro* *Pinus cubensis* Griseb. para contribuir al aumento del número de individuos en su hábitat natural.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, perteneciente al Centro de Investigaciones y Servicios Ambientales y Tecnológicos (CISAT-CITMA Holguín).

Se emplearon como explantes iniciales semillas de *Pinus cubensis* Griseb., suministradas por la Empresa Forestal del municipio de Mayarí, provenientes de árboles *plus* de las plantaciones de Pinares de Mayarí, Holguín.

Como medio de cultivo basal en todos los experimentos se empleó el propuesto por

Murashige y Skoog (1962), con 30 g l⁻¹ de sacarosa y 7 g l⁻¹ de Agar. El volumen de medio de cultivo por frasco de 250 ml de capacidad fue de 25 ml. El cultivo se mantuvo a 25 ±2°C, bajo una luz blanca artificial suministrada por tubos de luz fluorescente, de 37.5 μmol m⁻² s⁻¹, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

Desinfección

La desinfección se realizó según Saborio *et al.* (1997). Se ensayaron tres concentraciones (10%, 15% y 20%) de hipoclorito de sodio (Cloralex, 6% del ingrediente activo), en dos tiempos (10 min y 15 min) de inmersión en la solución. Se utilizó un control sin tratamiento de desinfección. Finalmente, las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se les eliminó la testa y colocaron en medio de cultivo basal, a razón de tres por frasco. Se emplearon cuatro unidades experimentales de n=25. Se cuantificó el número de semillas contaminadas por microorganismos y el número de semillas germinadas, con estos valores se calculó el porcentaje de contaminación y de germinación, para cada tratamiento, a los 21 días de iniciado el cultivo, ya que a partir de este momento las semillas no son viables (Betancourt, 1987).

Germinación de embriones

Como material vegetal inicial se tomaron semillas sin testa previamente desinfectadas con el mejor tratamiento del experimento anterior y embriones cigóticos. La extracción del embrión cigótico se realizó bajo un microscopio estéreooscópico (XTL-I), con el auxilio de pinza y bisturí, a partir de semillas previamente embebidas en agua estéril durante 72 h y luego desinfectadas con el mejor tratamiento del experimento anterior. Ambos tipos de explantes se establecieron en el mismo medio de cultivo basal. Se utilizaron cuatro unidades experimentales de n = 6. A los 21 días de cultivo se cuantificó el número de embriones germinados y se midió la longitud de los brotes (cm).

Multiplicación

Con el objetivo de multiplicar las plántulas obtenidas del tipo de explante inicial

seleccionado en la fase anterior se emplearon diferentes reguladores del crecimiento. A las plántulas se le separaron los brotes y cada uno constituyó un explante. Se colocaron en medio de cultivo basal, enriquecido con diferentes citoquininas (6-bencilaminopurina (BAP) y Kinetina (Kin)), a distintas concentraciones (0, 18 y 22.5 μM) y una concentración constante para todos los medios de cultivo 5.4 μM de ácido naftalenacético (ANA), según Kalia *et al.* (2000). Se colocaron tres explantes por frasco y se realizaron cinco subcultivos, cada uno de 21 días de duración. Se utilizaron cuatro unidades experimentales de $n=10$, y se calculó el coeficiente de multiplicación (número de explantes final/número de explantes iniciales), se cuantificó el número de brotes por explante y se midió la longitud de los brotes (cm).

Enraizamiento y aclimatización

En estas fases se utilizó el procedimiento para la aclimatización de plantas *in vitro* publicado por Orellana (1998) para lograr la formación de raíces *ex vitro*, directamente en el sustrato. Se emplearon brotes individuales obtenidos al final del quinto subcultivo, de 4.0-5.0 cm de longitud. Durante este proceso se midió la longitud (cm) y el número de fascículos de cada brote para su posterior categorización en cuanto a calidad (Tabla 1), y se separaron en lotes para los próximos manejos. A cada uno se le aplicó una inmersión, durante 24 horas, con una mezcla de 10 μM de ANA y 10 μM de ácido indolbutírico (AIB). Al finalizar fueron colocados en recipientes plásticos individuales (500 ml) con un sustrato compuesto por turba y perlita (2:1). Se mantuvieron en caseta de adaptación con un fotoperíodo natural. La humedad relativa fue de 80-90% los primeros 21 días, luego se

disminuyó a 70-80%. Estos brotes se mantuvieron bajo un cobertor de zaram (50% de sombra), con una iluminación de aproximadamente 87 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Se utilizaron tres unidades experimentales de $n=10$ y se cuantificó el número de plantas vivas (expresado como porcentaje de supervivencia) semanalmente hasta los 42 días en esta fase.

Análisis de los resultados

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el paquete SPSS, versión 11.0 para Windows (SPSS Inc., 1998). Se plantearon las hipótesis y se realizaron las pruebas estadísticas de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Levene para comprobar los supuestos de normalidad en la distribución de los datos y de homogeneidad de varianza. De cumplirse estos supuestos, se utilizaron las pruebas paramétricas de Análisis de Varianza (ANOVA Factorial) y Tukey HSD. En el análisis no paramétrico se realizó la prueba U de Mann-Whitney, así como Kruskal-Wallis y la clasificación de medias por el método de Student-Newman-Keuls.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección

El empleo de hipoclorito de sodio al 20% disminuyó significativamente en un 53.5% el porcentaje de contaminación microbiana en las semillas de *Pinus cubensis* Griseb. (Figura 1).

Además, se constató que el empleo del desinfectante al 20% aumentó el porcentaje de germinación, con valores de 42.2%. La no aplicación de hipoclorito de sodio tuvo un resultado de 0% de germinación, debido a la contaminación de la totalidad de las semillas.

Tabla 1. Categorías establecidas para el análisis de la influencia en la calidad de los brotes en la aclimatización de plántulas de *Pinus cubensis* Griseb.

Calidad	Long. del brote (cm)	Número de fascículos
Escasa	4.0 - 4.3	1 - 2
Regular	4.4 - 4.6	3 - 4
Buena	4.7 - 5.0	5 - 6

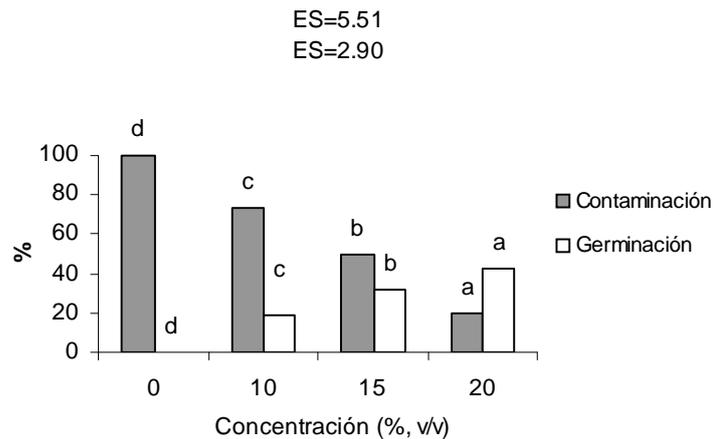


Figura 1. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio sobre la desinfección y germinación de semillas de *Pinus cubensis* Griseb a los 21 días de establecidas *in vitro*. ANOVA Factorial $p \leq 0.05$. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey HSD.

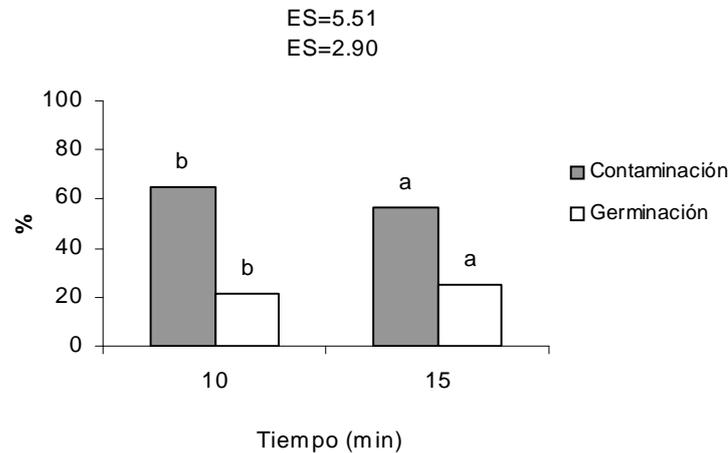


Figura 2. Efecto del tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio sobre la desinfección y la germinación de semillas de *Pinus cubensis* Griseb. a los 21 días de sembradas. ANOVA Factorial para $p \leq 0.05$. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey HSD.

El tiempo de inmersión también influyó en la contaminación. La figura 2 muestra que el porcentaje de contaminación fue menor (56.2%) cuando se empleó hipoclorito de sodio por 15 minutos.

Los porcentajes de germinación también dependieron del tiempo de inmersión en el agente desinfectante. Con la aplicación de hipoclorito de sodio durante 10 minutos se obtuvo un menor porcentaje de germinación (21.2%) que con 15 minutos de inmersión (25.3%).

Existen diferentes tendencias al manejar la interacción entre la concentración y el tiempo de aplicación del agente desinfectante en la

desinfección de semillas de *Pinus*. Algunos autores han utilizado el desinfectante a altas concentraciones y menor tiempo de exposición. Por ejemplo, Saborio *et al.* (1997) lograron la desinfección exitosa en *Pinus ayacahuite* Ehrenb. con la aplicación de hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos. También se han utilizado concentraciones menores a mayor tiempo de exposición. De esta manera, Sull y Korban (2004) utilizaron hipoclorito de sodio al 1.5% (ingrediente activo) durante 30 minutos para *Pinus pinea* L.

El resultado para *Pinus cubensis* Griseb. con el hipoclorito de sodio al 20% durante 15 minutos fue comparable al de Anderson e

levinsh (2002) quienes lograron los mayores porcentajes de desinfección en *Pinus sylvestris* L. con igual tratamiento.

En base a los resultados se seleccionó para los siguientes estudios el tratamiento de desinfección por inmersión de las semillas en una solución de hipoclorito de sodio al 20% durante 15 min.

Germinación de embriones

En la tabla 2 se presenta el comportamiento de la germinación y la longitud de los brotes de los dos tipos de explantes empleados. Se determinó que este factor afectó la germinación, pero no la longitud del brote. El uso del embrión cigótico incrementó el porcentaje de germinación (88.26%) respecto a la semilla sin testa (79.01%).

El porcentaje de germinación de embriones cigóticos resultó aceptable para los objetivos del trabajo y está en correspondencia con resultados previos informados por otros autores (Saborio *et al.*, 1997; Gupta y Timmis, 1999; Rocha y Niella, 2001; Valdez *et al.*, 2001). Por esta razón se seleccionó como explante inicial. Con el material vegetal obtenido se realizaron las siguientes etapas del trabajo.

Multiplicación

Se comprobó que el tipo de regulador del crecimiento y sus concentraciones influyeron significativamente sobre la multiplicación de las plántulas obtenidas (Figura 3).

La adición de 6-BAP a 22.5 μM provocó un incremento en el número de brotes, con este tratamiento se obtuvo el valor más alto (3.05).

Entre los resultados de la aplicación de 6-BAP y Kinetina, no existieron diferencias significativas para el número de brotes (2.05; 1.77 y 2.02 respectivamente), aunque cada factor (tipo de regulador y concentración) por separado sí influyó. El número de brotes en ausencia de 6-BAP y kinetina (tratamiento control) presentó el valor más bajo de número de brotes (0.75).

El efecto de cada factor por separado también presentó diferencias significativas en el número de brotes (resultados no mostrados). Sobre el factor tipo de regulador, 6-BAP produjo mayor número de brotes por explante (1.72) que kinetina (1.29), mientras que el factor concentración 22.5 μM produjo el mayor número de brotes (2.53).

El análisis de la interacción entre el tipo de regulador del crecimiento y su concentración mostró diferencias significativas para la variable longitud del brote. La adición de 6-BAP a una concentración de 22.5 μM , provocó un incremento significativo en la longitud del brote y alcanzó un valor de 4.81cm, con diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos (Figura 4).

La interacción entre el tipo de regulador de crecimiento y las diferentes concentraciones empleadas (Figura 5) mostró que la adición de 6-BAP a 22.5 μM produjo el mayor incremento en el coeficiente de multiplicación de los brotes (4.05).

Una vez que los explantes se transfirieron a los medios de cultivo de multiplicación, se observó formación de brotes axilares en todos los tratamientos empleados, excepto en el control.

Tabla 2. Influencia del tipo de explante inicial sobre la germinación *in vitro* de *Pinus cubensis* Griseb.

Tipo de explante	Germinación (%)	Longitud de los brotes (cm)
Semilla sin testa	79.01 b	4.4
Embrión cigótico	88.26 a	4.6
ES	1.82	0.055
Significación	*	ns

Medias con letras diferentes indican significación según prueba U de Mann-Whitney, para $p < 0.05$. (ES: Error estándar; ns: no significación; *: significación).

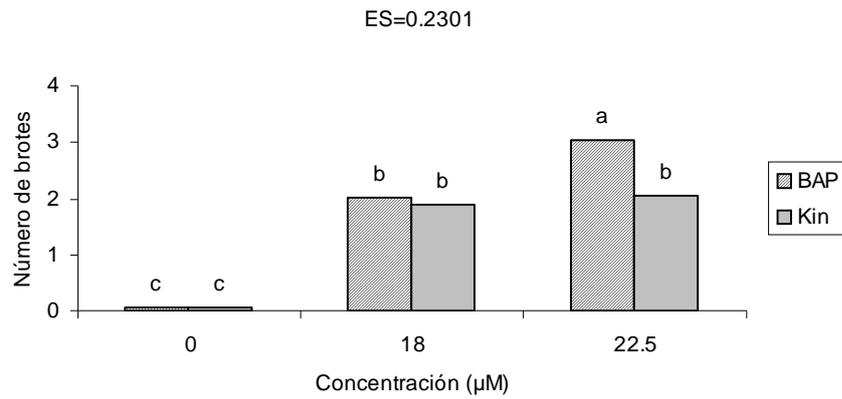


Figura 3. Efecto del tipo de regulador de crecimiento y diferentes concentraciones sobre el número de brotes obtenidos en la fase de multiplicación de *Pinus cubensis* Griseb. ANOVA Factorial para $p < 0.05$. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey HSD.

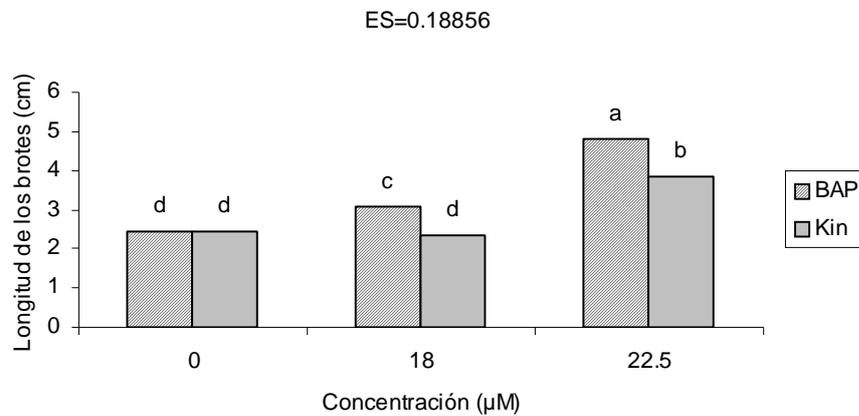


Figura 4. Efecto del tipo de regulador de crecimiento y diferentes concentraciones sobre la longitud de los brotes obtenidos en la fase de multiplicación de *Pinus cubensis* Griseb. ANOVA Factorial para $p \leq 0.05$. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey HSD.

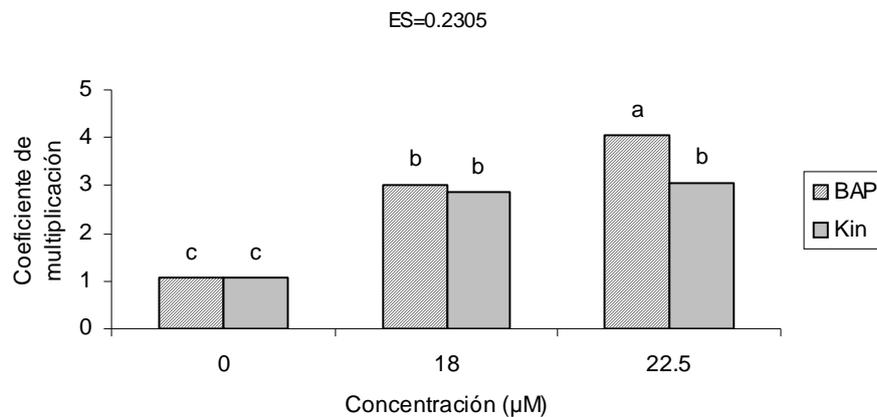


Figura 5. Efecto del tipo de regulador del crecimiento y diferentes concentraciones sobre el coeficiente de multiplicación de brotes de *Pinus cubensis* Griseb. ANOVA Factorial para $p \leq 0.05$. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey HSD.

Independientemente del tipo de regulador del crecimiento y su concentración, todos los explantes de *Pinus cubensis* Griseb. fueron capaces de emitir brotes. Esto pudiera estar dado por el efecto de las citoquininas en general, de romper la dominancia apical y estimular el proceso de división celular y la formación de brotes axilares (Rodríguez *et al.*, 2005).

Para *Pinus cubensis* Griseb. no se han encontrado referencias en la literatura científica consultada, por lo que se puede decir que con este experimento se obtienen por primera vez, brotes *in vitro* de esta especie. Sin embargo, para otras especies de *Pinus* se han informado resultados exitosos, como por ejemplo: *Pinus pinaster* Ait. (Calixto y Salomé, 1997), *Pinus radiata* Don. (Schestibratov *et al.*, 2003), *Pinus heldreichii* Christ. (Stojicic y Budimir, 2004) y *Pinus elliottii* Engelm. (Tang *et al.*, 2006).

Esta influencia entre la variación en el tipo y concentración de los reguladores del crecimiento y el comportamiento de la brotación concuerda con los resultados de otros autores (Valdés *et al.*, 2001; López y Sánchez, 2003) quienes plantean que para la inducción y crecimiento de los brotes se obtienen diferentes respuestas frente a distintos tipos de reguladores del crecimiento y concentraciones.

Más del 85% de los medios de cultivo empleados para la fase de multiplicación *in vitro* de plantas incluyen alguna citoquinina (Orellana, 1998). En el caso de especies de *Pinus* ocurre de igual forma. Por ejemplo: Ojeda (1996) observó un efecto positivo de 6-bencilaminopurina (6-BAP) en el número de brotes de *Pinus cembroides* Zucc. y *Pinus halepensis* Mill. Igualmente, Tang y Guo (2001) emplearon kinetina en la formación de brotes de *Pinus pinea* L. y Kalia *et al.* (2000) emplearon tanto kinetina como 6-BAP para la inducción de brotes en *Pinus roxburghii* Sarg., y obtuvieron los mejores resultados con 6-BAP. De igual forma, Schestibratov *et al.* (2003) emplearon 6-BAP con éxito a una concentración de 22.2 μM en *Pinus radiata* Don. Por su parte, Gupta y Durzan (2004) utilizaron también este regulador de para obtener brotes axilares de *Pinus lambertiana* Dong. Los resultados con *Pinus cubensis* Griseb. en el presente trabajo coinciden con lo señalado con anterioridad.

Al añadir citoquininas exógenas al medio de cultivo, el balance auxina/citoquininas existente se altera (Del Pozo *et al.*, 2005). Ello resulta en la estimulación de la germinación de todas las yemas, no solo la apical, cuyo desarrollo se desacelera teniendo en cuenta que el efecto de la citoquinina sobrepasa al de la auxina endógena. Esto provoca, además de la germinación, el crecimiento de esas yemas axilares, hasta el momento latentes, ya que Caboni *et al.* (2002), demostraron que este era uno de los sitios de mayor acumulación de citoquininas. Estas fitohormonas, según Fosket *et al.* (1981) y Housa *et al.* (1990), estimulan la transición de G2 a la mitosis y aumentan la rapidez de biosíntesis de proteínas, mediante el fomento de la transcripción de ácido ribonucleico mensajero.

Se plantea, además, que participan en la regulación de la metafase de la división celular, estimulando la síntesis de tubulina, principal componente estructural de los microtúbulos, necesarios en la mitosis (Fosket *et al.*, 1981). También está demostrado que las citoquininas, mediante la defosforilación, activan las proteínas quinasa dependiente de ciclina (CDK), las que son inducidas por las auxinas de forma inactiva por la presencia de un grupo fosfato (CDK + PO_4) (Caboni *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta los resultados de esta fase se seleccionó el tratamiento que incluye 22.5 μM de 6-BAP para la multiplicación de *P. cubensis*.

Enraizamiento y aclimatización

En la fase de enraizamiento y aclimatización, con el empleo de turba y perlita (2:1) como sustrato, se logró un 50% de supervivencia de las plantas (Figura 6). También se pudo determinar que a los 28 días de permanencia en el sustrato antes referido, la supervivencia de los brotes se estabilizó.

La influencia de la calidad de los brotes sobre el porcentaje de supervivencia se presenta en la figura 7. Esta fue directamente proporcional, con diferencias significativas entre los tratamientos. El mejor resultado se obtuvo para aquellos brotes de buena calidad, que alcanzaron el mayor porcentaje de supervivencia.

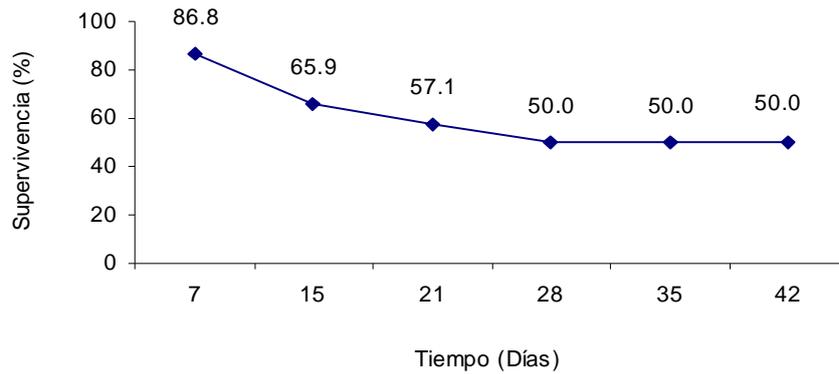


Figura 6. Supervivencia de plántulas de *Pinus cubensis* Griseb. después de 42 días en aclimatización en sustrato compuesto por turba y perlita (2:1).

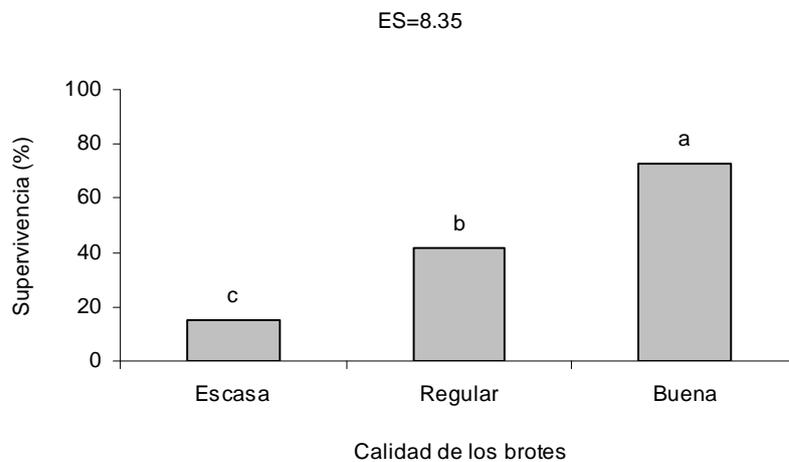


Figura 7. Influencia de la calidad de los brotes sobre el porcentaje de supervivencia de brotes de *P. cubensis* Griseb. durante la aclimatización. Kruskal-Wallis para $p \leq 0.05$. Barras con letras diferentes indican significación según la prueba de Student-Newman-Keuls. Escasa: 4.0-4.3 cm y 1-2 fascículos. Regular: 4.4-4.6 cm y 3-4 fascículos. Buena: 4.7-5.0 cm y 5-6 fascículos.

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. Por ejemplo, Saborio *et al.* (1997) lograron un 40% de enraizamiento, luego de una inmersión en 100 μM de ANA durante ocho horas en brotes de *Pinus ayacahuite* Ehrenb., mientras Stojicic *et al.* (1999) alcanzaron un 20% de enraizamiento en *Pinus heldreichii* Christ. con la inmersión en 100 μM de ácido indolbutírico previo a la siembra. Sin embargo, Sul y Korban (2004) no pudieron lograr el enraizamiento en *Pinus pinea* L. Mejores resultados informaron Tang *et al.* (2006) con un 36.5% de supervivencia en aclimatización, al transferir brotes de *Pinus taeda* L. directamente a una mezcla de sustrato compuesta por perlita, turba y vermiculita (1:1:1).

Lo expuesto anteriormente concuerda con lo expresado por Martínez *et al.* (1994), quienes plantearon que la capacidad de enraizamiento de los brotes está relacionada con su calidad, por lo que existe una asociación entre la reducción de las pérdidas y el aumento del vigor de los explantes iniciales. Por todo ello, se puede señalar que lograr un 50% de supervivencia de los brotes de *Pinus cubensis* Griseb. es un resultado alentador pero no suficiente para establecer una metodología de producción a gran escala de la especie, se requiere continuar los estudios.

A partir de los resultados del trabajo se conformó, por primera vez, un protocolo para la propagación *in vitro* de *Pinus cubensis* Griseb. que se describe brevemente a continuación.

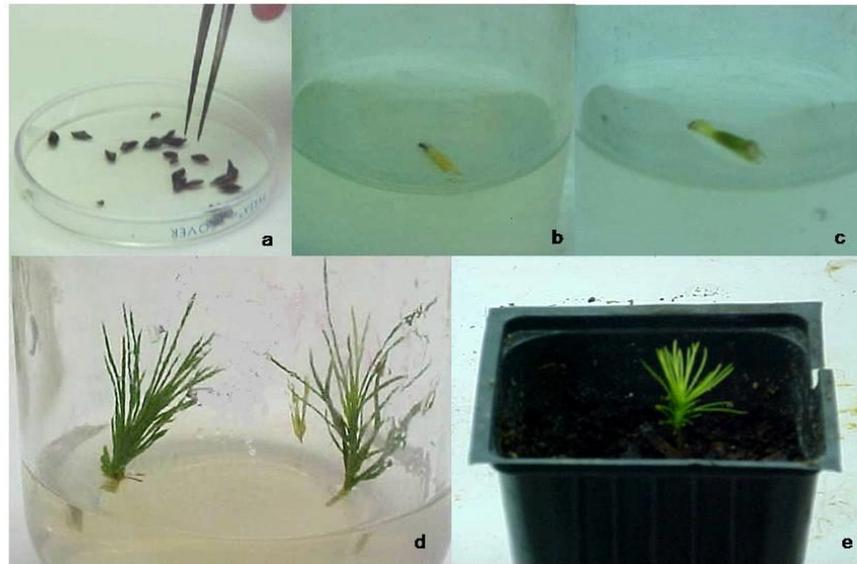


Figura 8. Propagación *in vitro* de *Pinus cubensis* Griseb. a. Semillas de árboles seleccionados, b. Embrión cigótico, c. Embrión cigótico germinado, d. Plantas en fase de multiplicación, e. Plantas aclimatizadas.

El material vegetal de partida deben ser semillas provenientes de árboles seleccionados (Figura 8a). Posteriormente, se deben lavar con detergente comercial más dos gotas de Tween 20, luego sumergir en hipoclorito de sodio al 20% durante 15 minutos y enjuagar tres veces con agua estéril. Se procede a retirar la cubierta seminal y a extraer el embrión cigótico (Figura 8b). Este se coloca en medio de cultivo basal MS durante 21 días para su germinación (Figura 8c). Los brotes formados se transfieren a medio de cultivo MS con $5.4 \mu\text{M}$ de ANA y $22.5 \mu\text{M}$ de 6-BAP para su multiplicación (Figura 8d). Los subcultivos deben realizarse cada 21 días. El enraizamiento de los brotes se realiza *ex vitro* simultáneamente con la aclimatización (Figura 8e). Para ello, los brotes provenientes de la multiplicación se individualizan, se sumergen en una mezcla de $10 \mu\text{M}$ ANA (1.8 mg l^{-1}) y $10 \mu\text{M}$ AIB (2.03 mg l^{-1}) durante 24 horas y se colocan en un sustrato de turba y perlita (2:1). Estos brotes se mantienen bajo un cobertor de zaram (50% de sombra), con una iluminación de aproximadamente $87 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante 42 días.

CONCLUSIONES

Fue posible propagar *in vitro* por primera vez *Pinus cubensis* Griseb. a partir embriones

cigóticos. Se estableció un protocolo de trabajo donde las plantas obtenidas alcanzaron un 50% de supervivencia en fase de aclimatización.

REFERENCIAS

- Andersone, U, Levinsh G (2002) Changes of Morphogenic Competence in Mature *Pinus sylvestris* L. L. buds *in vitro*. *Annals of Botany* 90: 293-298
- Betancourt, A (1987) Silvicultura especial de árboles maderables tropicales. Ed. Científico-técnica, La Habana. Cuba
- Caboni, E, Angeli SD, Chiappetta A, Innocenti AM, Van Onckelen H, Damiano C (2002) Adventitious shoot regeneration from vegetative shoot apices in pear and putative role of cytokinin accumulation in the morphogenetic process. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 70: 199-206
- Calixto, S, Salomé H (1997) Adventitious shoot formation and plant regeneration from *Pinus pinaster* Ait. Sol ex Aiton. *In Vitro Cell. Dev. Biology Plant* 33:119-124
- David, A, Laine E, David E (1995) Somatic Embryogenesis in Woody Plants. En: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (Eds.), pp. 221-242. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Del Pozo, JC, López-Mata MA, Ramírez-Parra E, Gutiérrez C (2005) Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum* 123:173-183

- Fosquet, DE, Morejhon LC, Westerling (1981) Control of growth by cytokinin: An examination of tubuline synthesis during cytokinin-induced growth in cultured cell of Paul's scarlet rose: En: Guern D, Peaud-Leonel C (Eds) Metabolism and molecular activity of cytokinin, pp. 193-211. Springer-Verlag. Dordrecht
- Gupta, P, Durzan D (2004) Shoot multiplication from mature trees of Douglas Fir (*Pseudotsuga menziesii*) and Sugar Pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports 4(4): 177-179
- Gupta, PK, Timmis RT (1999) Conifer somatic embryo production for liquid culture. En: Altman, G (Ed) Plant Biotechnology and *In vitro* Biology in the 21st Century, pp 49-52. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Gupta, PK, Timmis RT, Timmis K, Grob J, Karlson W, Welty E (1999) Advance in conifers technique improvement through somatic embryogenesis. Chapter 29. En: Kazuo Watanabe R, Komamine A (Eds) Proceedings of the 12th Toyota Conference Challenge of Plant and agriculture Science to the crisis of biosphere on the earth in the 21th Century, pp. 33-39. RG Landes Co. Texas
- Housa, C, Jacqmar A, Bernier G (1990) Activation of replicon origins as a possible target for cytokinin in shoot meristems of Sinapis. Planta 181: 324-326
- 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)
- Klimaszewska, K, Park YS, Overton C, Maceacheron I, Bonga JM (2001) Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. *In vitro* Cell. Dev. Biology Plants 37: 392-399
- López, MC, Sánchez I (2003) Micropropagation of conifer species. Acta Horticulturae 289: Proceedings of the ISHS International Symposium on Plant Biotechnology and its Contribution to Plant Development, Multiplication and Improvement. [En línea] En: http://www.actahort.org/books/289/289_29.htm (Consultado el 18 de marzo de 2005)
- Martínez C, Harry I, Thorpe T (1994) Effect of various bud induction treatments on elongation and rooting of Canary Island Pine (*Pinus canariensis*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 39: 225-230
- Murashige, T, Skoog E (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497
- Niella, F, Rocha P (2004) Factores que afectan la formación de brotes adventicios a partir de embriones maduros de *Pinus taeda* L. via organogénesis. Novenas Jornadas Técnicas Forestales. INTA-FCF-MEYRNRYT-Eldorado, Misiones, Argentina. [En línea] En: <http://www.facfor.unam.edu.ar/silvman/organoniella.pdf>. (Consultado el 18 de marzo de 2005)
- 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.
- Orellana, P (1998) Introducción a la propagación masiva. En: Pérez, N. J (Ed) Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología, pp 50 – 51. IBP. Santa. Clara
- 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
- Rocha, P, Niella F (2001) Research and development of vegetative propagation techniques for *Pinus* sp. in the Northeast region of Argentina. En: Jeffrey F D (Ed.) Proceedings of the 26th. Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference. June 26-29, 2001, pp. 32-38. Dean-Georgia University. Athens
- Rodríguez, R, Albuerne M, Fernández B (2005) Morfogénesis y su manipulación en especies leñosas. En: Sánchez-Olate M, Ríos D (Eds) Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal, p. 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
- 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
- Stojicic, D, Budimir S (2004) Cytokinin-mediated axillary shoot formation in *Pinus heldreichii*. Biologia Plantarum 48(3): 477-479
- Stojicic, D, Budimir S, Culafic L (1999) Micropropagación 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, 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
- Toribio, M, Celestino C (2000) El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. Investigaciones agrarias. Fuera de Serie 2: 249-260
- Valdéz, A, Ordas R, Fernández B, Centeno, M (2001) Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* L cotyledons. Plant Physiology and Biochemistry 39:377-384
- von Aderkas, P, Bonga J (2000) Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. Tree Physiology 20: 921-928