

Características morfológicas de plantas *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *caribaea* influenciadas por el empleo de la sacarosa en la fase de multiplicación

Maité Chávez*, Manuel de Feria, Raúl Barbón, Felipe Jiménez-Terry, Mariana La O, Marta Pérez, Elisa Quiala, Daniel Agramonte. *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

El género *Pinus* ha sido clasificado como recalcitrante en relación con la formación de raíces *in vitro*. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia del empleo de la sacarosa en la multiplicación *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *caribaea* sobre las características morfológicas de plantas. Se determinó, además, la respuesta de estas plantas en la fase de enraizamiento con diferentes concentraciones de AIB y diferentes concentraciones de nutrientes inorgánicos (50 y 100%). Con 50 y 60 g l⁻¹ de sacarosa, se obtuvo una menor formación de nuevos brotes y mayores porcentajes de materia seca. Con 60 g l⁻¹ de sacarosa, se observaron acículas más diferenciadas, muy similares a las desarrolladas en condiciones naturales, las plantas presentaron un color verde más intenso y el olor característico de los aceites esenciales que puede percibir al macerar tejidos de árboles adultos. En la fase de enraizamiento, independientemente de la concentración de sacarosa (30-60 g l⁻¹) que dio origen a las plantas *in vitro*, al incrementarse la concentración de AIB, se incrementó la longitud de las plantas. Para el porcentaje de materia seca, la respuesta fue diferente, pues en las plantas obtenidas con 30 g l⁻¹ de sacarosa, cuando se incrementó la concentración de AIB disminuyó el porcentaje de materia seca, mientras que, en las plantas obtenidas con 60 g l⁻¹ ocurrió lo contrario. A las plantas desarrolladas con 60 g l⁻¹ de sacarosa, y colocadas después en medio de cultivo de enraizamiento con reducción del 50% de los nutrientes inorgánicos, se les cuantificó el mayor porcentaje de residuos de la pared celular (47.95%). Estos resultados, evidencian la importancia de estudiar el efecto de la sacarosa y la concentración de nutrientes inorgánicos en función de obtener plantas con una mayor diferenciación celular, mejor preparadas para lograr formar raíces *in vitro*.

Palabras clave: nutrientes inorgánicos, pino, potencial osmótico, reguladores del crecimiento, sacarosa

ABSTRACT

The genus *Pinus* has been classified as recalcitrant in relation to *in vitro* root formation. This work was carried out to evaluate the influence of sucrose on the morphologic characteristics of *Pinus caribaea* var. *caribaea in vitro* plants. The effect of different IBA and inorganic nutrients concentrations was also evaluated in the rooting phase. The best results were obtained using 50 and 60 g l⁻¹ of sucrose. A lower formation of new shoots and higher percentages of dry matter was achieved. More differentiated needles, very similar to those observed in natural conditions, were obtained adding 60 g l⁻¹ of sucrose. Regardless the concentration of sucrose (30-60 g l⁻¹) which allowed obtaining the *in vitro* plants, length of plants increased by increasing the IBA concentration in the rooting phase. For the percentage of dry matter, plants placed in 30 g l⁻¹ of sucrose showed a decrement in dry matter when the IBA concentrations increased. The opposite was observed in plants placed in 60 g l⁻¹ of sucrose. Plantlets coming from a subculture with 60 g l⁻¹ of sucrose and transferred to a rooting culture medium with a 50% reduction of inorganic nutrients showed the highest percentage of cell wall residues (47.95%). These results demonstrate the importance to study the effect of sucrose and inorganic nutrient concentrations to obtain plants with a higher cell differentiation and ready to achieve *in vitro* root formation.

Keywords: growth regulators, inorganic nutrients, osmotic potential, pine, sucrose

INTRODUCCIÓN

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 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), con lo cual, 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 ha descrito por algunos investigadores, que la respuesta *in vitro* de los cultivos a diferentes tipos y concentraciones de carbohidratos parece ser, en cierta medida, genotipo dependiente (Cuenca y Vieitez, 2000) y se han realizado estudios para definir estas posibles dependencias.

Se conoce que los azúcares intervienen en diferentes procesos morfogénéticos; una de las funciones más interesante se ha descrito en el desarrollo de las semillas (Calamar y de Klerk, 2002). Otros estudios han demostrado que la glucosa se ha asociado con la división celular y la sacarosa con la acumulación de sustancias de reservas (Weber *et al.*, 1998) y la inducción de la floración (Hong *et al.*, 2006).

Se conoce que las altas concentraciones de sacarosa (>6.0%) en el medio de cultivo han sido capaces de reducir la capacidad fotosintética de las plantas (Arigita *et al.*, 2002). También se ha descrito que estas que 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).

Diferentes estudios han demostrado que existen efectos opuestos al añadir sacarosa

al medio de cultivo ya que en algunos casos hay una respuesta favorable y en otros se produce una inhibición del crecimiento (Van *et al.*, 2001). A pesar de que se ha examinado el efecto regulador de los azúcares, 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 azúcar influyó en la formación de raíces.

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). Sin embargo, ningún trabajo se refiere a la influencia de la sacarosa, a las características que deben tener las plantas de pino obtenidas *in vitro* por organogénesis y a cómo mejorarlas en función de lograr una mejor respuesta de las plantas en la fase de enraizamiento y aclimatización.

En muchos cultivos propagados por organogénesis, regularmente las plantas obtenidas en la fase de multiplicación se subcultivan a la fase de enraizamiento y el proceso termina de forma satisfactoria con el enraizamiento de las plantas. Sin embargo, en muchas especies coníferas no ocurre así, y ha sido necesario aplicar diversas estrategias para obtener resultados positivos en este sentido (van Staden *et al.*, 2008). Varios resultados preliminares (datos no

mostrados), demostraron que en el caso de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* Barret y Golfari, no se tuvo éxito, al subcultivar las plantas directamente de la fase de multiplicación a la fase de enraizamiento.

Por todos los argumentos expresados anteriormente, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia del empleo de la sacarosa en la multiplicación *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *caribaea* sobre las características morfológicas de plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se emplearon plantas *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *caribaea* con 35 días de cultivo en fase de multiplicación (Figura 1).

El medio de cultivo estuvo compuesto por los nutrientes inorgánicos propuestos por Coke (1996) (conocidos comercialmente como Westvaco (WV5) (Duchefa) que incluyen 1.0 g l⁻¹ de mio-inositol y 0.4 mg l⁻¹ de tiamina. A esta formulación WV5 se le adicionaron, además, 0.6 mg l⁻¹ de tiamina para completar a 1.0 mg l⁻¹ la concentración de este compuesto, 1.5 mg l⁻¹ de 6-BAP, 1.0 g l⁻¹ de L-glutamina, 3.0 g l⁻¹ de carbón activado, 30 g l⁻¹ de sacarosa y 3.5 g l⁻¹ de Gelrite con un pH ajustado a 5.8.

Se dosificaron 30 ml de medio de cultivo por frasco y se esterilizaron durante 20 minutos en autoclave a 1.2 kg cm⁻² de presión y 121°C. Los experimentos fueron repetidos tres veces en el tiempo, se colocaron tres plantas por frasco de cultivo y la temperatura de la cámara de crecimiento fue de 28 ± 2.0°C, con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos que osciló entre 38-47.5 μmol m⁻² s⁻¹.

El procesamiento estadístico se realizó mediante el *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) para Windows versión 18.0. En cada experimento se especificó el tipo de análisis y las pruebas aplicadas.

Fase de multiplicación

Efecto de la sacarosa

Este experimento tuvo como objetivo, determinar en el subcultivo previo a la fase de enraizamiento, la influencia de diferentes concentraciones de sacarosa (30, 40, 50 y 60 g l⁻¹) en las características morfológicas de las plantas obtenidas en un medio de cultivo similar al descrito anteriormente pero sin la adición de 6-BAP.

En cada tratamiento se colocaron inicialmente 60 plantas, a razón de tres por frasco, para un total de 20 frascos por tratamiento.



Figura 1. Plantas *in vitro* de *P. caribaea* var. *caribaea* a los 35 días de cultivo en fase de multiplicación.

Las evaluaciones se realizaron a los 35 días de cultivo y se determinó, en cada tratamiento, el número de plantas que por su longitud (cm), grosor del tallo (cm) y desarrollo de las acículas podían ser subcultivadas a la fase de enraizamiento, el número de nuevos brotes que por no cumplir con las características antes mencionadas no debían ser transferidos a la fase de enraizamiento y se determinó la masa seca (%) a 30 plantas que se colocaron en una estufa a 70 °C hasta que se mantuviera el peso constante (12 horas).

Para el procesamiento estadístico de los resultados, por no existir normalidad de los datos se empleó la prueba de *Kruskal Wallis*. La comparación entre parejas de grupo, se realizó con la prueba de *Student Newman Keuls (SNK)*.

Fase de enraizamiento

Con el objetivo de determinar en la fase de enraizamiento la respuesta *in vitro* de las plantas multiplicadas en medios de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa, se utilizaron plantas obtenidas con 30 g l⁻¹ (Control) y 60 g l⁻¹ de sacarosa. Antes de realizar el subcultivo a la fase de enraizamiento se midió la longitud de las plantas y se determinó la masa seca a 30 plantas con igual procedimiento que el descrito anteriormente.

Para analizar los datos de los porcentajes de masa seca se realizó un análisis de varianza simple, por cumplirse con los supuestos de normalidad y homogeneidad de los datos.

Efecto de diferentes concentraciones de AIB

El medio de cultivo de enraizamiento estuvo compuesto por los nutrientes inorgánicos WV5, se adicionaron 0.6 mg l⁻¹ de tiamina para completar a 1.0 mg l⁻¹ la concentración de este compuesto, 1.0 g l⁻¹ de L-glutamina, 3.0 g l⁻¹ de carbón activado, 30 g l⁻¹ de sacarosa y 3.5 g l⁻¹ de Gelrite con pH ajustado a 5.8.

Los diferentes tratamientos se conformaron al combinar 0.0, 1.0, 2.0, 3.0 mg l⁻¹ de AIB con las plantas obtenidas con 30 y 60 g l⁻¹ de sacarosa.

A los 30 días de cultivo, se determinó, para cada tratamiento, el número de plantas con raíces y el número de raíces por planta. Además, se midió la longitud de las raíces (cm) y la longitud de las plantas (cm).

En el caso de la longitud de las plantas, por existir normalidad, pero no homogeneidad de los datos, se aplicó la prueba de comparación de medias *C de Dunnett* para el análisis de los resultados.

Efecto de la concentración de nutrientes inorgánicos

Este experimento tuvo como objetivo determinar la influencia de dos concentraciones de nutrientes inorgánicos (50 y 100% de WV5) en la respuesta *in vitro* de las plantas en la fase de enraizamiento. Al igual que en el experimento anterior, como material vegetal se emplearon plantas obtenidas con dos concentraciones de sacarosa (30 y 60 g l⁻¹) en el subcultivo previo. El medio de cultivo básicamente fue similar al descrito para el experimento anterior, pero con 2.0 mg l⁻¹ de AIB. En el caso del tratamiento con 50% de WV5, fue necesario adicionar 500 mg l⁻¹ de mio-inositol y 0.8 mg l⁻¹ de tiamina para completar a 1.0 g l⁻¹ y 1.0 mg l⁻¹ respectivamente la concentración de ambos compuestos. De esta forma, ambos tratamientos, solo presentaron diferencias en la concentración de los nutrientes inorgánicos.

A los 30 días de cultivo se determinó, en cada tratamiento, el número de plantas con raíces y el número de raíces por planta. Además, se midió la longitud de las raíces (cm).

Para comprobar la presencia de lignina se empleó la técnica descrita por Southerton y Deverall (1990) que permite visualizar las deposiciones de este compuesto en las paredes celulares. Ante la presencia de lignina se observaron áreas de color rojo/rosado según fue descrito por Gahan (1984). Las observaciones fueron fotografiadas inmediatamente. Además, se cuantificó su contenido en las bases de segmentos de tallos (1.0 cm de longitud) de plantas seleccionadas al azar por el protocolo referido por Kirk y Obst (1988). El contenido de lignina se expresó como porcentaje de residuos de la pared celular respecto al a la masa seca inicial (200 mg).

Por no cumplirse los supuestos de normalidad y homogeneidad de los datos, estos se procesaron directamente al aplicar la prueba de *Mann Whitney*, después de haber generado hasta 10 000 muestras con distribución similar a la real mediante técnicas de Monte Carlo, para estimar de esta forma la significación con el 99.0% de confianza.

RESULTADOS

Fase de multiplicación

Efecto de la sacarosa

Se comprobó que la sacarosa influyó en las características morfológicas de las plantas obtenidas. Con 50 y 60 g l⁻¹ de sacarosa, se obtuvo la menor formación de brotes nuevos, los mayores porcentajes de plantas para enraizar (Tabla 1) y los mayores porcentajes de masa seca por planta (Figura 2).

Con 30 g l⁻¹ de sacarosa las plantas presentaron mayor formación de nuevos brotes (Figura 3A), respuesta típica de las plantas obtenidas en la fase de multiplicación. Al incrementar la concentración de sacarosa a 40 g l⁻¹ se observó una disminución en la formación de nuevos brotes (Figura 3B) y estos alcanzaron un mayor desarrollo en longitud. Todo ello favoreció el número de plantas que por su desarrollo en longitud podían ser subcultivadas a la fase de enraizamiento, pero como se puede observar en la figura 3b fueron

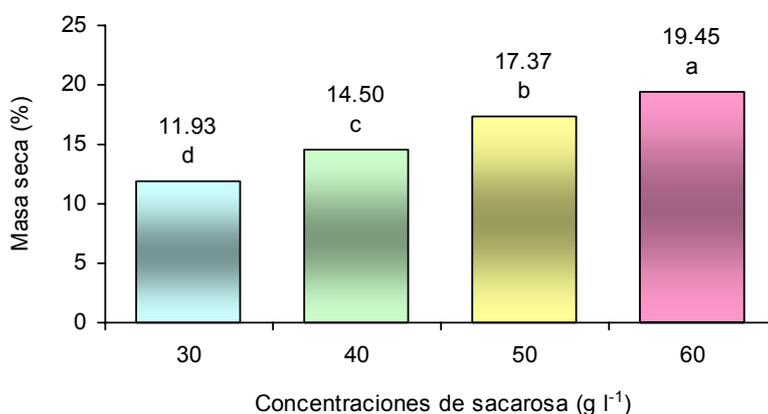
brotes muy similares en sus características morfológicas a los obtenidos con 30 g l⁻¹ de sacarosa.

Con 50 g l⁻¹ de sacarosa, las plantas presentaron un menor número de brotes nuevos, similar desarrollo en longitud y mayor grosor del tallo (Figura 3C), características deseadas para ser subcultivadas a la fase de enraizamiento. No obstante, fue en el medio de cultivo con 60 g l⁻¹ de sacarosa, donde se obtuvieron plantas con acículas más desarrolladas y diferenciadas (Figura 3D), 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.

Tabla 1. Respuesta *in vitro* de plantas de *P. caribaea* var. *caribaea* a los 35 días de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo de multiplicación.

Sacarosa (g l ⁻¹)	No. plantas para enraizar (%)	Medias de rango	No. plantas que no podían ser enraizadas (%)	Medias de rango
30	44.13	21.25 c	55.87	58.80 a
40	56.69	36.05 b	43.31	44.45 b
50	68.18	48.65 a	31.82	32.60 bc
60	75.90	56.05 a	24.10	26.15 c

Porcentajes identificados con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para $p < 0.05$ según la prueba de SNK. (n=60)

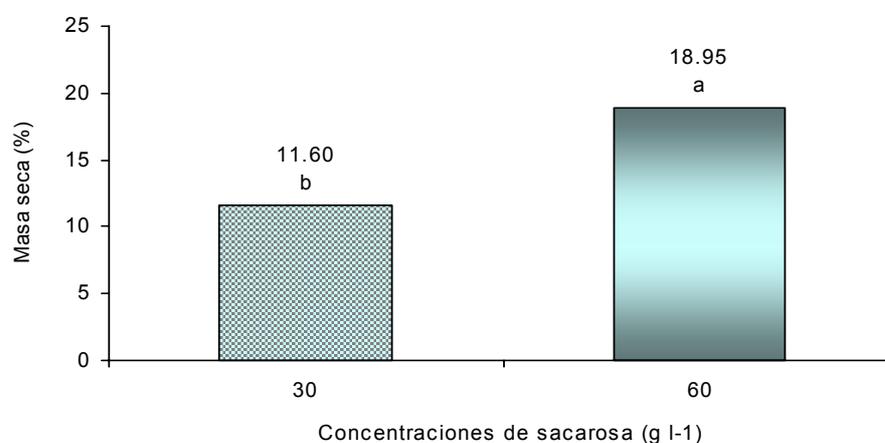


Barras con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según la prueba de SNK. (n=30)

Figura 2. Porcentaje de masa seca de plantas de *P. caribaea* var. *caribaea* obtenidas *in vitro* a los 35 días de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa en fase de multiplicación.



Figura 3. Características morfológicas de las plantas de *P. caribaea* var. *caribaea* obtenidas *in vitro* a los 35 días de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa. A) 30 g l⁻¹, B) 40 g l⁻¹, C) 50 g l⁻¹, D) 60 g l⁻¹.



Barras con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según un análisis de varianza simple ($n=30$)

Figura 4. Porcentaje de masa seca obtenido en plantas de *P. caribaea* var. *caribaea* con diferentes concentraciones de sacarosa en el subcultivo de multiplicación previo a la fase de enraizamiento.

Fase de enraizamiento

Las plantas obtenidas con 30 y 60 g l⁻¹ de sacarosa en el subcultivo previo al enraizamiento presentaron características morfológicas similares a las descritas para estos mismos tratamientos en el experimento anterior.

También con 60 g l⁻¹ las plantas presentaron mayor porcentaje de masa seca (Figura 4) y mayor desarrollo en longitud, 6.12 cm por 5.23 cm de las plantas obtenidas con 30 g l⁻¹.

Efecto de diferentes concentraciones de AIB

A los 30 días de cultivo de las plantas en la fase de enraizamiento, no se observó la formación de raíces. En los medios de cultivo de enraizamiento con diferentes concentraciones

de AIB tampoco se obtuvieron diferencias significativas en la longitud de las plantas que habían sido multiplicadas en el medio de cultivo con 30 g l⁻¹ de sacarosa. Sin embargo, esta variable (longitud de la planta) sí presentó diferencias al combinar plantas que fueron obtenidas con 60 g l⁻¹ de sacarosa con diferentes concentraciones de AIB (Figura 5).

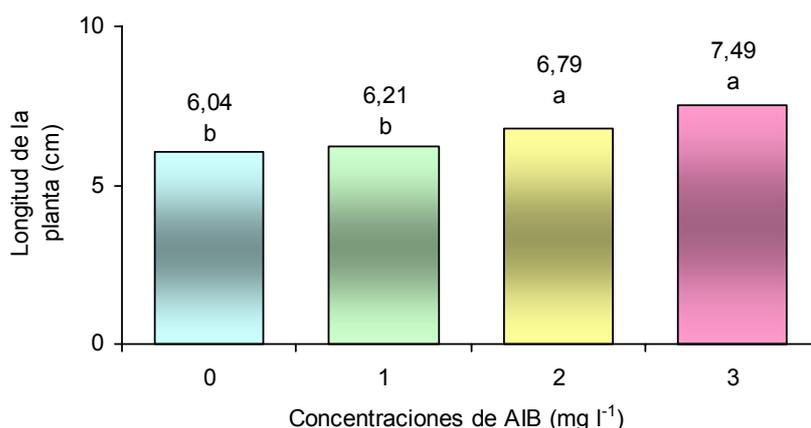
Efecto de la concentración de nutrientes inorgánicos

No se logró la formación de raíces *in vitro* cuando se emplearon diferentes concentraciones de nutrientes inorgánicos para el cultivo de las plantas que se habían multiplicado con 30 y 60 g l⁻¹ de sacarosa en el subcultivo previo a la fase de enraizamiento. Sin embargo, en la figura 6A se puede observar

que las plantas que se obtuvieron con 60 g l⁻¹ de sacarosa, a los 30 días de cultivo en la fase de enraizamiento, presentaron una mayor deposición de lignina teniendo en cuenta la intensidad de la coloración rojo/rosado en la zona de los haces vasculares, según fue descrito por Gahan (1984).

No obstante, al realizar un análisis por separado, se pudo observar que independientemente del origen del material

vegetal (concentración de sacarosa en el subcultivo previo), la concentración de nutrientes inorgánicos en el medio de cultivo de enraizamiento también influyó en la acumulación de lignina en las paredes celulares de los tallos de las plantas de *P. caribaea* var. *caribaea* (Figura 7). En el tratamiento con 50% de nutrientes inorgánicos WV5, se obtuvo el mayor porcentaje de acumulación de residuos en las paredes celulares.



Barras con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según la prueba C de Dunnett.

Figura 5. Longitud promedio de plantas de *P. caribaea* var. *caribaea* a los 30 días de cultivo en la fase de enraizamiento con diferentes concentraciones de AIB.

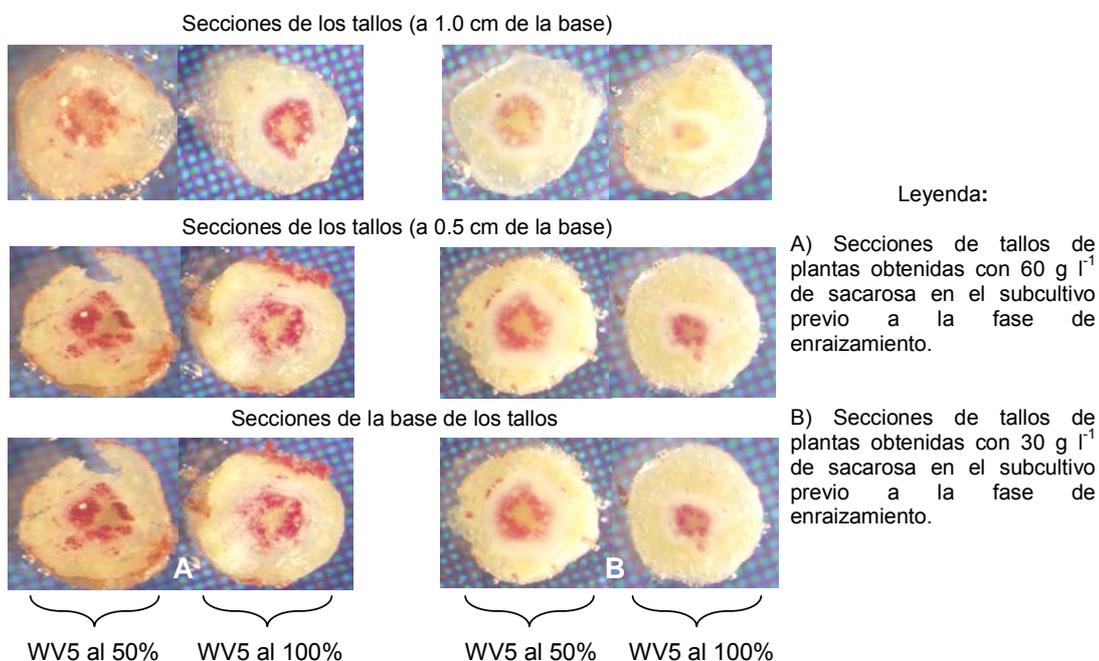


Figura 6. Cortes transversales de tallos de plantas *in vitro* de *P. caribaea* var. *caribaea* después de 30 días de cultivo en la fase de enraizamiento en medios de cultivo con diferentes concentraciones de nutrientes inorgánicos. El tejido teñido de rojo/rosado indica la presencia de deposiciones de lignina en las paredes celulares.

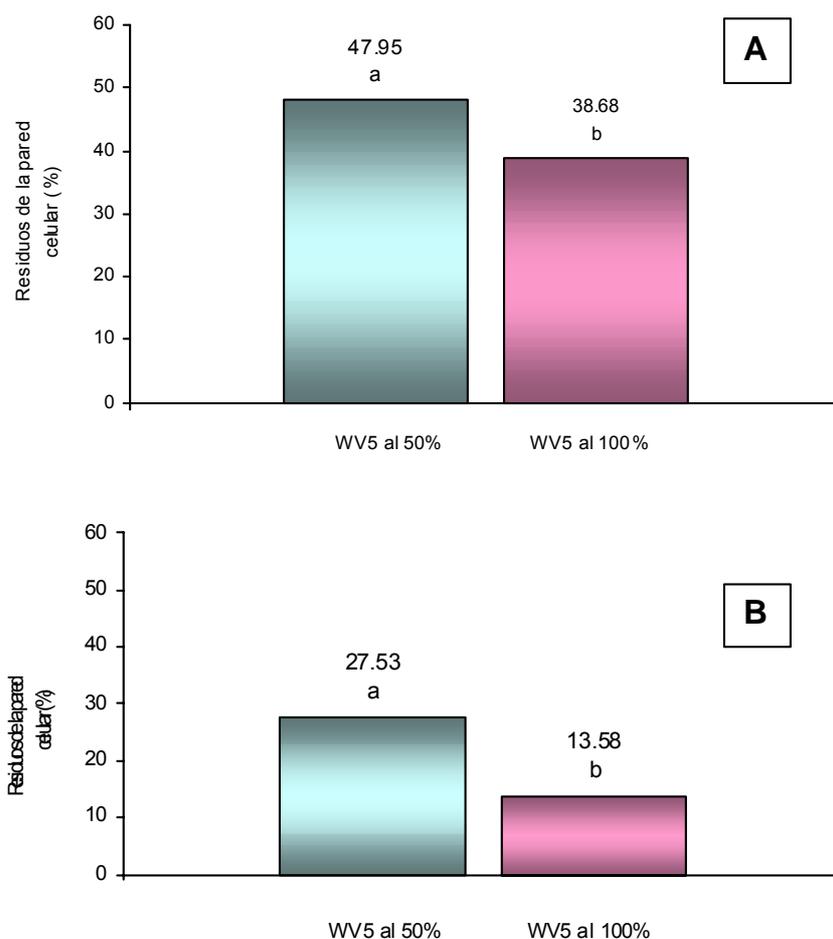


Figura 7. Porcentaje de residuos de la pared celular en plantas *in vitro* de *P. caribaea* var. *caribaea* obtenidas con diferentes concentraciones de nutrientes inorgánicos. A) Plantas obtenidas en el subcultivo previo con 60 g l⁻¹ de sacarosa. B) Plantas obtenidas en el subcultivo previo con 30 g l⁻¹ de sacarosa.

DISCUSIÓN

Varios han sido los estudios encaminados a comprender mejor la respuesta de diferentes especies coníferas para formar raíces *in vitro*. 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).

Según Fuentes *et al.* (2005), la concentración de sacarosa influyó en la calidad funcional de las plantas de *Cocos nucifera* (Cocotero) cuando estas fueron transferidas a condiciones *ex vitro* para su aclimatización. Pues, las plantas obtenidas en ausencia de sacarosa no tenían formado su esqueleto de carbono, ni habían acumulado sustancia de reserva en sus hojas, y aunque tenían hojas y raíces

desarrolladas, el contenido de carotenoides era bajo y eso contribuyó a su alta susceptibilidad cuando fueron transferidas a condiciones *ex vitro* con alta intensidad luminosa.

Mientras que, con altas concentraciones de sacarosa (90 g l⁻¹) obtuvieron un efecto negativo en la actividad fotosintética de las plantas, pues observaron que esta concentración de sacarosa promovió la formación de raíces, así como la supervivencia y crecimiento de las plantas en condiciones *ex vitro*. Resultó significativo que cuando emplearon una concentración intermedia (45 g l⁻¹), las plantas presentaron similares contenidos de clorofila y carotenoides que los retoños de árboles cultivados en campo.

Ha sido descrito que al aumentar la concentración de sacarosa en el medio de cultivo se incrementa el porcentaje de masa

seca en las plantas (Kubota *et al.*, 2002; Shim *et al.*, 2003). En el caso de *Pinus caribaea* var. *caribaea*, la masa seca también se incrementó a medida que se aumentó la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. Lo anterior se debió, 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 el ingreso de sacarosa y con ello el incremento de la masa seca que está asociado al desarrollo de los tejidos vasculares de las plantas, en particular con el proceso de lignificación.

En muchos sistemas de cultivo de tejidos, la formación de lignina, se ha estimulado por un cambio en los reguladores del crecimiento (Pauwels *et al.* 2008), por elicitores fúngicos (Lange *et al.* 1995), por estrés hídrico (Tsutsumi y Sakai 1993) y también, por el empleo de diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo (Nose *et al.* 1995).

En el presente trabajo se comprobó que con la mayor concentración de sacarosa (60 g l⁻¹) se favoreció la mayor acumulación de lignina en las paredes celulares de los tallos de las plantas.

Según Thorpe *et al.* (2008) con el empleo de elevadas concentraciones de sacarosa (>6.0%) en el medio de cultivo se acumularon grandes cantidades de lignina. La presencia de mayor o menor contenido de lignina en plantas cultivadas *in vitro* ha sido un indicador del grado de diferenciación de los tejidos vasculares y madurez de las plantas (Yamamoto, 1998).

La adición al medio de cultivo de auxinas, por lo general, en forma de AIB o 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).

CONCLUSIONES

Se comprobó que la sacarosa influyó en las características morfológicas de las plantas obtenidas. Las plantas obtenidas con 60 g l⁻¹ de sacarosa presentaron un mayor desarrollo en longitud y porcentaje de masa seca, características importantes sobre todo para la supervivencia de las plantas en la fase de aclimatización. Estas plantas presentaron además, acículas más desarrolladas y diferenciadas, con un color verde más intenso y el olor característico de los aceites esenciales que se puede percibir al macerar tejido de árboles adultos, estas características podrían ser un indicador de un mayor grado de diferenciación de los diferentes tejidos y las estructuras vasculares de estas plantas. Se demostró que al reducir la concentración de nutrientes inorgánicos en el medio de cultivo de enraizamiento, se favoreció la acumulación de lignina.

REFERENCIAS

- 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
- 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
- Calamar, A, de Klerk GJ (2002) Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 70: 207-212
- 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

- Coke, JE (1996) Basal nutrient médium for *in vitro* cultures of loblolly pine. U.S. Pat. No. 0,553,4434 patent. Jul. 9, 1996
- 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
- Gibson SI (2000) Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol*. 124: 1532-1539
- Hong, N, Hoang P, Tan D (2006) The role of sucrose and different cytokinins in the *in vitro* floral morphogenesis of rose (hybrid tea) cv. 'First Prize'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87: 315-320
- Kirk TK, Obst JR (1988) Lignin determination. *Methods Enzymol*. 161: 87-101
- 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
- Lange, BM, Lapierre C, Sanderman H (1995) Elicitor-induced spruce stress lignin. Structural similarity to early developmental lignin. *Plant Physiol* 108: 1277-1287
- Nose, M, Bernards MA, Furlan M, Zajicek J, Eberhardt TL, Lewis NG (1995) Towards the specification of consecutive steps in macromolecular lignin assembly. *Phytochemistry* 39: 71-79
- Pauwels, L, Morreel K, De Witte E, Lammertyn F, Van Montagu M, Boerjan W, Inzé D, Goossens A (2008) Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *PNAS* 105: 1380-1385
- 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
- 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
- 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
- Smeeckens S (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 49-81
- Southerton, SG, Deverall BJ (1990) Histochemical and chemical evidence for lignin accumulation during the expression of resistance to leaf rust fungi in wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36: 483-494
- 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. 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
- Tsutsumi Y, Sakai K (1993) Lignin biosynthesis in woody angiosperm tissues. Lignification and peroxidase activity stimulated in water-stressed *Populus* callus cultures. *Mokuzai Gakkaishi* 39: 214-220
- van Staden, J, Zazimalova E, George EF (2008) Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. George, EF, Hall MA y de Klerk GJ (Eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, pp. 205-226. Springer. Dordrecht
- Van, L, Samson G, Desjardins Y (2001) Opposite effects of exogenous sucrose on growth, photosynthesis and carbon metabolism of *in vitro* plantlets of tomato (*L. esculentum* Mill.) grown under two levels of irradiances and CO₂ concentration. *Journal of Plant Physiology* 158: 599-605
- 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
- Weber H, Heim U, Golombek S, Borisjuk L, Manteuffel R, Wobus U (1998) Expression of a yeast-derived invertase in developing cotyledons of *Vicia narbonensis* alters the carbohydrate state and affects storage functions. *Plant J.* 16: 163-172
- Yamamoto H (1998) Generation mechanism of growth stresses in wood cell walls: roles of lignin deposition and cellulose microfibril during cell wall maturation. *Wood Science and Technology* 32: 171-182