

Multiplicación *in vitro* de plantas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*

Manuel de Feria*, Maité Chávez, Raúl Barbón, Mariana La O, Marta Pérez, Felipe Jiménez-Terry, 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: mdeferia@ibp.co.cu

RESUMEN

En muchas especies de coníferas lograr la regeneración de plantas vía organogénesis a partir de brotes apicales y yemas axilares ha resultado difícil, y el género *Pinus* no ha sido la excepción, es por ello, que la presente investigación tuvo como objetivo lograr la multiplicación *in vitro* de plantas de *Pinus caribaea* var. *caribaea* a partir de brotes apicales obtenidos de plantas donantes cultivadas en casas de cultivo. Se determinó que en la fase de multiplicación el 6-BAP influyó en el desarrollo de las plantas *in vitro* y que con la concentración de 6.66 μM se obtuvo el mayor número (6.75) y longitud de los brotes por planta (2.70 cm) y un coeficiente de multiplicación de 2.38. Al comparar el efecto de la luz solar y artificial en el desarrollo de las plantas *in vitro* se observó que con luz solar las plantas presentaron una mejor respuesta *in vitro* y un mayor coeficiente de multiplicación. Se demostró que el agente gelificante y su concentración, fueron factores que influyeron en el desarrollo *in vitro* de las plantas en la fase de multiplicación. Con Gelrite se obtuvieron mejores resultados que con Agar. Con 4.0 g l⁻¹ de Gelrite el coeficiente de multiplicación alcanzó su mayor valor (2.87). Estos resultados demostraron que fue posible multiplicar plantas *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *caribaea* a partir de brotes apicales cortados de plantas donantes obtenidas de semillas, lo que permitirá mantener la diversidad biológica de esta variedad y multiplicar nuevos clones.

Palabras clave: agentes gelificantes, pino, reguladores del crecimiento

ABSTRACT

In many species of conifers to achieve plant regeneration via organogenesis from apical shoots and axillary buds had been difficult, and the genus *Pinus* has not been the exception. For this reason, the present research aimed to achieve *in vitro* multiplication of *Pinus caribaea* var. *caribaea* from apical shoots obtained from donor plants. It was determined that in the multiplication phase, the 6-BAP influenced the development of *in vitro* plants and the highest number (6.75) and length of shoots by plants (2.70 cm) and a multiplication rate of 2.38 were obtained with 6.66 μM . When comparing the effect of sun light y artificial light in the development *in vitro* plants it was observed that with sun light the plants showed a better *in vitro* response and improved multiplication rate. It was shown that the gelling agent and concentration were factors that influenced in the *in vitro* development of plants in the multiplication phase. With Gelrite as gelling agent were obtained better results that with Agar. With 4.0 g l⁻¹ Gelrite the multiplication rate reached its highest value (2.87). These results showed that is possible to multiply successfully *in vitro* plants of *Pinus caribaea* var. *caribaea* from apical shoots obtained of donor plants grown from seed and maintain the biological diversity of this variety and multiply new clones.

Key words: gelling agent, growth regulators, pine

INTRODUCCIÓN

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

A nivel mundial, la mayoría de los trabajos realizados para la propagación *in vitro* del género *Pinus*, han utilizado como material vegetal inicial

para la formación de callos, embriones cigóticos de plantas mejoradas genéticamente (Nehra *et al.*, 2005; Lelu *et al.*, 2006; Pullman y Skryabina, 2007).

Para aplicar estas estrategias de propagación con fines comerciales, es necesario haber desarrollado 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). En este sentido, en Cuba se han establecido huertos semilleros de segunda generación a partir de plantas de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* Barret y Golfari, seleccionadas de las mejores combinaciones y de los individuos más sobresalientes en cada familia (Pérez, 2008, comunicación personal).

La regeneración de plantas vía organogénesis, ha sido un método eficiente empleado en la propagación comercial de muchas especies vegetales. Sin embargo, en Cuba, con respecto al género *Pinus* existen pocas investigaciones sobre el tema (Cantillo *et al.*, 2006 a,b) y no se han desarrollado protocolos que se apliquen comercialmente para la propagación *in vitro* de ninguna de las especies de pino plantadas en el país.

Esto se debe fundamentalmente, a que la respuesta *in vitro* del material vegetal durante el proceso de propagación *in vitro*, depende en muchos casos del genotipo, de la edad en campo y las características de las plantas donantes, y a que los coeficientes de multiplicación y los porcentajes de formación de raíces *in vitro* que se han obtenidos para muchas especies, han sido bajos.

Existen numerosos informes que describen la regeneración de plantas de pino vía organogénesis, pero a partir de embriones cigóticos (Tang *et al.*, 2004; Tang y Newton, 2005; Alonso *et al.*, 2006). Sin embargo, el empleo de explantes tales como: brotes apicales, yemas axilares y acículas, para el establecimiento *in vitro* de plantas de pino han sido alternativas menos estudiadas. Por lo tanto, pocos trabajos mencionan resultados en la fase de multiplicación a partir de haber establecido *in vitro* estos tipos de explantes.

Desarrollar la multiplicación *in vitro* por organogénesis en *P. caribaea* var. *caribaea*

permitiría multiplicar los nuevos clones de esta variedad a partir plantas revigorizadas de estacas de árboles obtenidos mediante trabajos de selección y mejoramiento genético durante más de 40 años. Estos presentan incrementos de hasta un 30% en la producción de madera y rinden entre un 20-40% más de oleosinas que los árboles originales (Pérez, 2008, comunicación personal).

Este tipo de multiplicación, permitiría además, mantener la diversidad biológica de *P. caribaea* var. *caribaea* fruto de muchos años de evolución, moldeada por los procesos naturales y cada vez más, por la influencia del ser humano.

Por todo lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo lograr la multiplicación *in vitro* de plantas de *Pinus caribaea* var. *caribaea* a partir de brotes apicales obtenidos de plantas donantes cultivadas en casas de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones generales

Como material vegetal para iniciar los estudios en la fase de multiplicación se emplearon plantas con 30 días de establecidas *in vitro* (Fig. 1) según la metodología descrita por de Fera *et al.* (2008). Estas plantas fueron obtenidas de brotes apicales de diferentes plantas de *P. caribaea* var. *caribaea* cultivadas en un banco de plantas donantes establecido en casa de cultivo a partir de plantas obtenidas de semillas.

El medio de cultivo basal estuvo compuesto por los nutrientes inorgánicas propuestos por Coke (1996) (conocidas comercialmente como Westvaco (WV5) (Duchefa). A este medio de cultivo basal que incluye en su formulación inicial 1.0 g l⁻¹ de mio-inositol y 0.4 mg l⁻¹ de tiamina, le fueron adicionados 0.6 mg l⁻¹ de tiamina para completar 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 3.0 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 osciló en 28 ± 2.0°C, con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos que osciló entre 38-47.5 μmol m⁻²s⁻¹.



Figura 1. Plantas *in vitro* obtenidas de brotes apicales de *P. caribaea* var. *caribaea* a los 30 días de cultivo en la fase de establecimiento *in vitro*.

El medio de cultivo basal estuvo compuesto por los nutrientes inorgánicas propuestos por Coke (1996) (conocidas comercialmente como Westvaco (WV5) (Duchefa). A este medio de cultivo basal que incluye en su formulación inicial 1.0 g l^{-1} de mio-inositol y 0.4 mg l^{-1} de tiamina, le fueron adicionados 0.6 mg l^{-1} de tiamina para completar 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 3.0 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 osciló en $28 \pm 2.0^\circ\text{C}$, con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos que osciló entre $38\text{-}47.5 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

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.

Efecto de 6-bencilaminopurina (6-BAP)

Este experimento se desarrolló para determinar la influencia de 6-BAP en la multiplicación *in vitro* de *P. caribaea* var. *caribaea*. Los tratamientos incluyeron cuatro

concentraciones de este regulador del crecimiento y un control (0.0; 2.22; 4.44; 6.66 y $8.88 \text{ } \mu\text{M}$). Se colocaron 60 plantas por tratamiento y se consideró cada planta como una réplica. Las evaluaciones se realizaron a los 35 días de cultivo y se cuantificó en cada tratamiento, el número de brotes por planta, se midió la longitud de los brotes (cm), la longitud de la planta principal (cm) y se determinó el coeficiente de multiplicación según la fórmula: No. total de brotes subcultivados/ No. brotes iniciales.

Para la comparación de las medias se realizó un análisis de varianza simple y se empleó la prueba de *Tukey*.

Efecto de diferentes agentes gelificantes y su concentración

Con el objetivo de determinar el efecto de dos agentes gelificantes y diferentes concentraciones de estos en el desarrollo y la respuesta *in vitro* de plantas de pino, se incluyeron tres concentraciones de Gelrite (Duchefa Biochemie) (2.5 , 3.0 y 3.5 g l^{-1}) y tres de Agar E (BIOCEN) (4.3 , 4.8 y 5.3 g l^{-1}) para un total de seis tratamientos.

Se colocaron 60 plantas por tratamiento y se consideró cada planta como una réplica. A los 35 días de cultivo se determinó, en cada tratamiento, el número de plantas con necrosis total o parcial y se determinó el coeficiente de multiplicación.

Por no existir normalidad de los datos en el caso del número de plantas necrosadas, se empleó la prueba de *Kruskal Wallis* para el análisis de los resultados. La comparación entre parejas de grupo, se realizó con la prueba de *Student Newman Keuls* (SNK).

Efecto de diferentes concentraciones de Gelrite

A partir de los resultados del experimento anterior se decidió determinar el efecto de otras concentraciones de Gelrite.

Los tratamientos fueron (2.5, 3.0, 3.5, 4.0 y 4.5 g l⁻¹). A los 35 días de cultivo se determinó en cada tratamiento, el número de plantas con necrosis total o parcial, la masa fresca (g) y seca (g) a 30 plantas por tratamiento. Con estos dos últimos valores se calculó el porcentaje de masa seca por tratamiento. Además, se determinó el coeficiente de multiplicación mediante una fórmula similar a la descrita anteriormente.

Por no existir normalidad de los datos en el caso de los porcentajes de masa seca, para el análisis 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).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de 6-bencilaminopurina (6-BAP)

Al evaluar la respuesta *in vitro* de las plantas cultivadas bajo la acción de diferentes concentraciones de 6-BAP en el medio de cultivo, se determinó que con 6.66 µM de este regulador del crecimiento se logró el mayor número y

longitud promedio de brotes por planta (Tabla 1). Además, se alcanzó el mayor coeficiente de multiplicación (Fig. 2) y la menor longitud promedio de la planta principal.

Desde el punto de vista fisiológico, esta respuesta puede estar relacionada con la reducción de la dominancia apical que según van Staden *et al.* (2008), se produce al adicionar determinadas concentraciones de citoquininas al medio de cultivo. Esta concentración de 6.66 µM de 6-BAP estimuló el desarrollo y la activación de un mayor número de yemas axilares (Fig. 3B) y en consecuencia los nutrientes asimilados fueron empleados para el desarrollo de los brotes nuevos, lo cual pudo provocar una disminución en la longitud de la planta principal.

Las citoquininas son reguladores del crecimiento 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 dependencia 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 de regeneración de plantas utilizado.

van Staden *et al.* (2008), informaron que cuando se utilizan altas concentraciones de citoquininas en la fase de multiplicación, los brotes que se producen reducen su desarrollo en longitud. Autores como Kumar *et al.* (2005), estudiaron el efecto de varias citoquininas en la multiplicación *in vitro* de brotes apicales obtenidos de árboles adultos de *Holarrhena antidysenterica* y las mejores respuestas las lograron con 6-BAP.

Tabla 1. Respuesta *in vitro* de brotes de *P. caribaea* var. *caribaea* a los 35 días de cultivo en fase de multiplicación en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de 6-BAP.

Tratamientos (µM de 6-BAP)	Longitud promedio planta principal (cm)	No. promedio de brotes por planta	Longitud promedio brotes por planta (cm)
0.00	6.4 a	2.25 e	1.1 d
2.22	6.2 a	3.00 d	1.3 d
4.44	5.7 b	4.50 c	1.9 c
6.66	5.1 c	6.75 a	2.7 a
8.88	5.4 bc	5.25 b	2.2 b

Medias identificadas con letras distintas en una misma columna difieren significativamente para $p < 0.05$ según la prueba de Tukey ($n=60$)

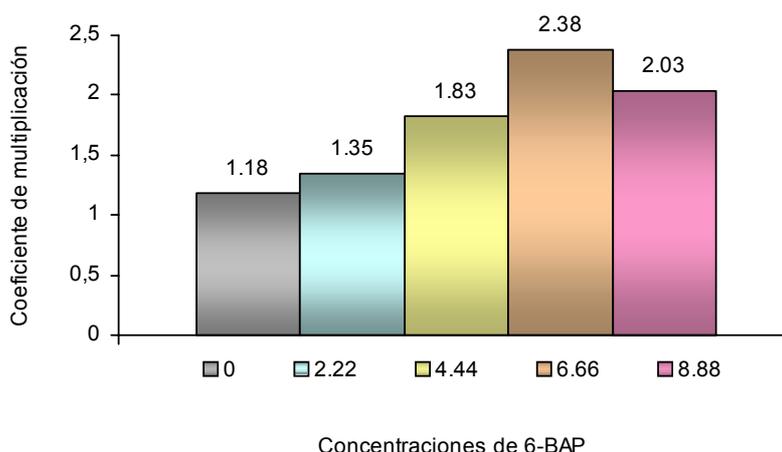


Figura 2. Coeficiente de multiplicación de plantas *in vitro* de *P. caribaea* var. *caribaea* a los 35 días de cultivo en fase de multiplicación con diferentes concentración de 6-BAP.

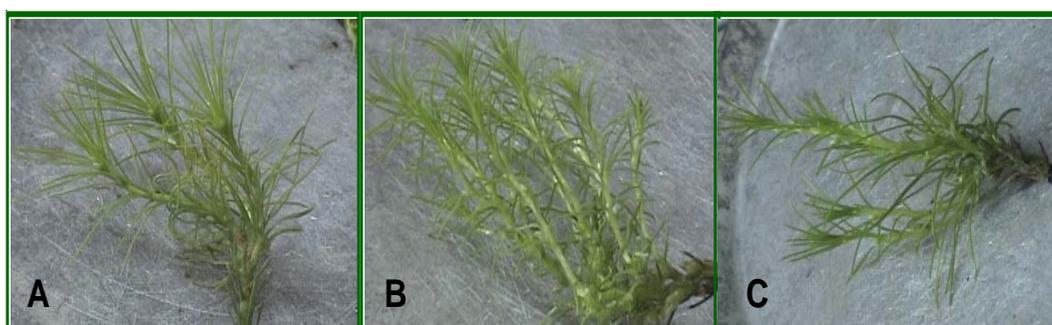


Figura 3. Desarrollo *in vitro* de las plantas de *P. caribaea* var. *caribaea* a los 35 días de cultivo en fase de multiplicación. A) 4.44 µM de 6-BAP, B) 6.66 µM de 6-BAP, C) 8.88 µM de 6-BAP.

Estos autores, al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP, 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.

En el presente estudio, las plantas *in vitro* de pino, tuvieron una respuesta fisiológica acorde con los resultados obtenidos por otros autores y explicados anteriormente, pues en función de la concentración de 6-BAP evaluada, varió el crecimiento en longitud de la planta principal, el número de brotes que se produjeron por planta, la longitud de dichos brotes, que incluso disminuyó al emplear una concentración superior a 6.66 µM de 6-BAP.

Efecto de diferentes agentes gelificantes y su concentración

Se observó que el agente gelificante empleado en el medio de cultivo influyó en la respuesta *in*

vitro de las plantas de pino, pues independientemente de la concentración, con Gelrite fue significativamente menor el número de plantas necrosadas y se lograron los mayores valores en cuanto al coeficiente de multiplicación (Tabla 2).

No obstante, al evaluar la respuesta *in vitro* de las plantas obtenidas con diferentes tratamientos de Gelrite, se observó que con 3.5 g l⁻¹ se lograron los mejores resultados en las variables evaluadas con respecto al resto de los tratamientos y sólo el 6.6% de las plantas sufrieron daños por necrosis. Las diferencias en la respuesta *in vitro* y desarrollo vegetativo de las plantas de pino cultivadas con concentraciones diferentes de Gelrite se pueden observar en la figura 4.

El tratamiento con 2.5 g l⁻¹ de Gelrite, además de presentar 15% de plantas con necrosis total, siete plantas presentaron necrosis parcial, lo que representó el 11.6% del total de plantas evaluadas en el tratamiento.

Tabla 2. Respuesta *in vitro* de brotes de *P. caribaea* var. *caribaea* a los 35 días de cultivo en fase de multiplicación cuando se emplearon diferentes tipos y concentraciones de agentes gelificantes.

Gelificante (g l ⁻¹)	No. de plantas necrosadas	Coefficiente Multiplicación
Gelrite (2.5)	9 c	1.87
Gelrite (3.0)	8 c	1.91
Gelrite (3.5)	4 d	2.28
Agar (4.3)	13 b	1.20
Agar (4.8)	23 a	1.08
Agar (5.3)	23 a	0.86

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



Figura 4. Desarrollo *in vitro* de las plantas de *P. caribaea* var. *caribaea* a los 35 días de cultivo en fase de multiplicación con diferentes concentraciones de Gelrite, A) 2.5 g l⁻¹, B) 3.0 g l⁻¹, C) 3.5 g l⁻¹.

En el caso de los tratamientos con Agar con las mayores concentraciones (4.8 y 5.3 g l⁻¹) se obtuvo un 38.3% de plantas *in vitro* que presentaron afectación por necrosis, daño que se inició en la zona apical de la planta (Fig. 5) y se extendió progresivamente por toda la planta hasta provocar la muerte.

Una determinada concentración de Agar puede 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 plantearon que la hiperhidricidad se puede reducir si se incrementa la concentración de 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*.

Owens y Wozniak (1991) observaron grandes diferencias en el número de brotes obtenidos *in vitro* en dependencia del agente gelificante

empleado. Ellos encontraron que la disponibilidad de agua, determinada por el potencial de la matriz de cada gel, fue el factor que más influyó en ese resultado y demostraron que cuando igualaron los potenciales de la matriz de los diferentes agentes gelificantes al utilizar diferentes concentraciones de cada uno ellos (Bacto agar 0.7%, Agarose 0.46%, Phytagar 0.62% y Gelrite 0.12%), obtuvieron la misma respuesta *in vitro*.

No obstante, se ha demostrado que 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 si se encuentran en el Agar (Thorpe *et al.*, 2008). Entre otras ventajas, el Gelrite es menos costoso que el Agar y se emplea en menor concentración que este. Además, produce un gel más claro y con ello permite detectar más fácil cualquier contaminación microbiana, por lo que sería más factible para la propagación *in vitro* a gran escala.

Resultados similares se obtuvieron en el presente trabajo, pues al incrementarse la concentración de Agar en el medio de cultivo se produjo un incremento en el número de brotes necrosados y una disminución en el coeficiente de multiplicación.

Efecto de diferentes concentraciones de Gelrite

La adición al medio de cultivo de 4.0 g l⁻¹ de Gelrite incrementó el coeficiente de multiplicación. Sin embargo, cuando la concentración de este agente gelificante se incrementó hasta 4.5 g l⁻¹, se determinó que el coeficiente de multiplicación descendió (Figura 6).

Estos resultados pueden estar relacionados con un incremento en el potencial de la matriz

del medio de cultivo, el cual limitó la disponibilidad de agua y nutrientes de las plantas de pino, y en consecuencia afectó el desarrollo de las mismas.

En el tratamiento con 4.0 g l⁻¹ de Gelrite se obtuvo el menor porcentaje de masa seca (Figura 7). Sin embargo, al analizar los resultados en su conjunto, se puede concluir que el contenido de masa seca se incrementó en la medida que disminuyó el coeficiente de multiplicación. Este resultado está relacionado con el hecho de que el incremento del coeficiente de multiplicación se debe a la presencia de un mayor número de brotes nuevos, con un menor desarrollo y diferenciación de sus estructuras y por consiguiente menor contenido de masa seca.



Figura 5. Evolución de las afectaciones por necrosis que sufrieron las plantas *in vitro* de *P. caribaea* var. *caribaea* en fase de multiplicación con Agar como agente gelificante.

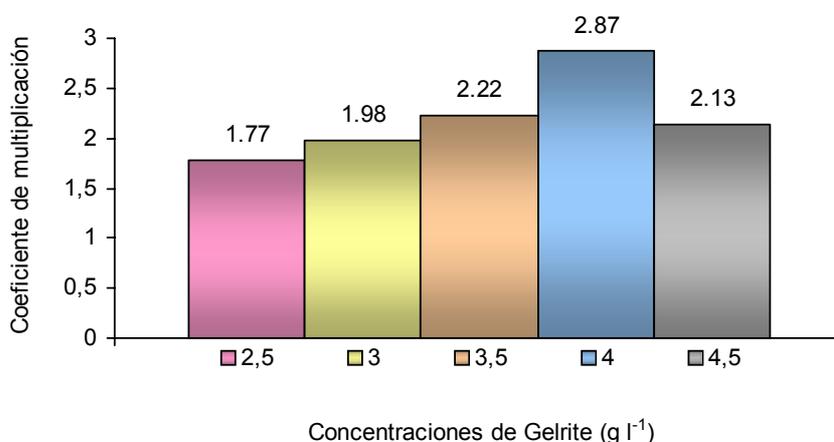
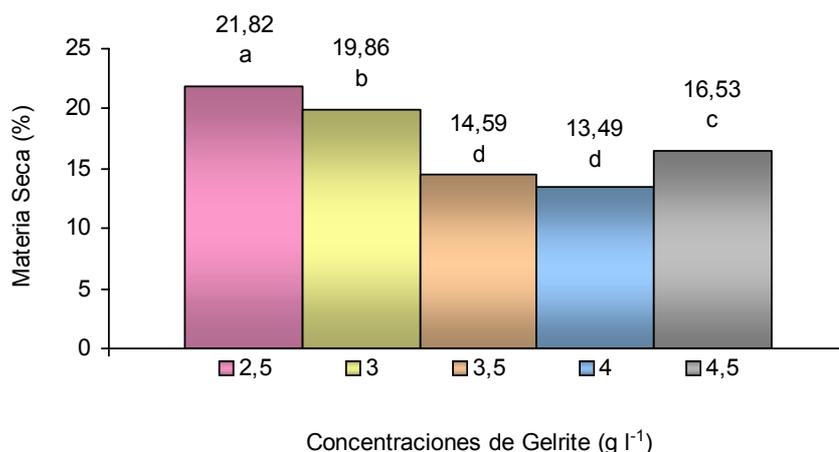


Figura 6. Coeficiente de multiplicación de plantas *in vitro* de *P. caribaea* var. *caribaea* a los 35 días de cultivo en fase de multiplicación con diferentes concentraciones de Gelrite en el medio de cultivo.



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

Figura 7. Porcentaje de masa seca de plantas de *P. caribaea* var. *caribaea* a los 35 días de cultivo en fase de multiplicación con diferentes concentraciones de Gelrite.

Además, del 11.6% de plantas necrosadas en el tratamiento con 2.5 g l⁻¹ de Gelrite, otras tres plantas (5.0%) presentaron necrosis parcial en este tratamiento.

CONCLUSIONES

Se definieron diferentes condiciones de cultivo que permitieron multiplicar *in vitro* plantas de *P. caribaea* var. *caribaea* y lograr coeficientes de multiplicación de hasta 2.87. Se demostró cuan importante resultó en esta fase del proceso de propagación *in vitro* definir el agente gelificante y la concentración a emplear, pues son factores que inciden directamente en el potencial de la matriz del medio de cultivo y con ello favorecen o no que las plantas *in vitro* puedan asimilar los diferentes componentes del medio de cultivo. Los resultados constituyen la base para futuros estudios relacionados con la fase de enraizamiento *in vitro* en pino, que como se conoce, es considerado recalcitrante para formar raíces *in vitro*.

REFERENCIAS

- 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
- Bonga JM, Von Aderkas P (1992) *In vitro* culture of trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- 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
- Cantillo, R, Rodríguez L, Guadalupe O, Rosales C, Igarza J, Pifferrer A, Ochoa AM (2006a) Obtención *in vitro* y aclimatación de brotes axilares de la especie *Pinus cubensis* Griseb. Biotecnología Vegetal 6: 105
- Cantillo, R, Rodríguez L, Rosales Y, Guadalupe O (2006b) Germinación *in vitro* de *Pinus cubensis* Griseb. [en línea]. Disponible en: <http://www.ciencias.holguin.cu/2006/septiembre/articulos/ART13.htm> [Consultado el 27 de Abril del 2009]
- Coke, JE (1996) Basal nutrient médium for *in vitro* cultures of loblolly pine. U.S. Pat. No. 0,553,4434 patent. Jul. 9, 1996
- 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 Fera, 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 1: 15 - 20
- 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
- Kumar, R, Sharma K, 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 y Klimaszewska K (2006) Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). Plant Cell Report 25: 767-776
- 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
- Owens, LD, Wozniak CA (1991) Measurement and effects of gel matrix potential and expressibility on production of morphogenic callus by cultured sugarbeet leaf discs. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 26: 127-133
- Pullman, GS, Skryabina A (2007) Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Report* 26: 873-887
- Tang, W y 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, 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
- 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. Springer. Dordrecht
- 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. Dordrecht