

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA FORMACION DE BROTES ADVENTICIOS EN EMBRIONES DE *Pinus patula* Schl. et Cham CULTIVADOS *in vitro**

José de Jesús Vargas Hernández**, Héctor González Rosas***

RESUMEN

Embriones maduros de *Pinus patula* Schl. et Cham se cultivaron *in vitro* en un medio nutritivo definido, complementado con diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y 6 bencilaminopurina (BAP). El principal efecto de los reguladores de crecimiento fué el desarrollo de brotes adventicios, sin embargo también se observó la formación de callo y la inducción de raíz en algunos tratamientos. La combinación de 1 ppm de BAP y 0.05 ppm de ANA ofreció la mejor respuesta en el porcentaje de embriones con brotes adventicios y en el promedio de brotes por embrión.

Los brotes adventicios se desarrollaron principalmente en la superficie de los cotiledones en contacto con el medio de cultivo o directamente del meristemo apical; para su elongación fué necesario separarlos y colocarlos en un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento.

SUMMARY

Mature embryos of *Pinus patula* Schl. et Cham were grown in a defined basal medium supplemented with different concentrations of naftalenaetic acid (NAA) and 6 benzylaminopurine (BAP). The induction of adventitious shoots was the main effect of the growth regulator combinations; however, in some treatments the callus growth and root induction on the explants was noted too. Both the percentage of explants with adventitious shoots and the mean number of shoots per explant were the best in the 1 ppm BAP and 0.05 ppm NAA combination.

* Parte del trabajo de tesis profesional del primer autor.

** Ayudante de investigación.-Programa Forestal, C.P.

*** Investigador.-Centro de Genética, C.P.

The adventitious shoots were developed principally on the cotyledons surface in contact with the culture medium or in the apical meristem zone. Their elongation was stimulated in a culture medium without growth regulators.

INTRODUCCION

Recientemente ha aparecido una serie de artículos relacionados con la técnica de cultivo de tejidos y su posible aplicación a la resolución de diversos problemas en la investigación forestal, en especial en el campo del mejoramiento genético de árboles forestales (2, 15, 23, 24, 26, 28, 32, 28); la importancia y las perspectivas que ofrece esta técnica radican principalmente en la propagación vegetativa de individuos superiores en especies leñosas de interés comercial (1, 16, 17, 19).

Los métodos de micropropagación de especies forestales incluyen el cultivo de embriones, el cultivo de tejidos y órganos (meristemas primarios o secundarios) y el cultivo de callos a partir de explantes con diferente grado de madurez.

Sin embargo, hasta ahora en la mayoría de las especies leñosas, particularmente en las coníferas, la organogénesis *in vitro* ha presentado buenos resultados solo cuando se emplean explantes derivados del

embrión o de tejidos y órganos de plántulas (4, 37), con excepción de algunos trabajos realizados en especies de los géneros *Abies*, *Picea*, *Pinus* y *Pseudotsuga* (3, 14, 34) y otros de angiospermas como *Betula*, *Eucalyptus* y *Populus* (13, 22, 25, 35-37), en los que se han utilizado explantes con mayor grado de madurez.

A partir del cultivo de embriones o tejidos derivados de éstos se han obtenido plántulas completas en los géneros *Cryptomeria* (20), *Picea* (5), *Pinus* (27, 29, 30, 33) *Pseudotsuga* (6, 9, 10), *Thuja* (12) y *Tsuga* (7). La formación de yemas adventicias, etapa considerada como anterior a la obtención de plántulas completas se ha logrado en más de 20 especies de coníferas, incluyendo algunas de los géneros *Araucaria* (37), *Cupressus* (11), *Pinus* (8, 21, 33, 37) y *Sequoia* (11, 37).

A pesar de la información existente, hasta ahora no se ha aplicado esta técnica a ninguna de las especies de coníferas nativas de México, muchas de las cuales son de gran importancia económica y social en la producción forestal, como es el caso de *Pinus patula*; su importancia radica tanto en su calidad maderable como en sus características de vigor, velocidad de crecimiento, forma del fuste y adaptabilidad edáfica, por lo que es ampliamente utilizada en diferentes programas de reforestación y plantaciones comerciales que se establecen en el país y en otras regiones del mundo, dentro de los climas templado y subtropical húmedos.

En este trabajo se presentan los resultados preliminares logrados en la inducción de brotes adventicios sobre explantes tomados de embriones maduros de *Pinus patula*, como una etapa anterior a la regeneración de plántulas, con el fin de que dicha información pueda ser útil posteriormente en la propagación masiva de esta especie o de otras similares.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico. Las semillas de *Pinus patula* provenientes de un rodal natural con polinización abierta fueron proporcionados por el Centro de Germoplasma Forestal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. La preparación de este material comprendió una esterilización superficial con cloruro mercurico al 0.1% (peso/vol) durante 5 minutos, lavandolas luego con agua de la llave y colocandolas en agua destilada estéril durante 24 horas; después de este período de imbibición, se repitió el proceso de esterilización, ahora con alcohol etílico al 70% (vol./vol.) durante 1 minuto y cloruro mercurico al 0.1% durante 5 minutos, lavandolas finalmente 3 veces con agua destilada estéril. En condiciones asépticas se disectaron y separaron los embriones del resto de la semilla, y 10 a 13 de ellos se colocaron en cajas de Petri de 90 x 15 mm, conteniendo 40 ml del medio de cultivo; se uso un mínimo de 3 cajas por tratamiento.

Medio de cultivo. Durante esta etapa del experimento se utilizó el medio de cultivo desarrollado por Gresshoff y Doy (18), modificado por Sommer *et al.* (33), con los siguientes componentes (mg/l):

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 200; KNO_3 , 1000; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 150; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 250; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 90; Na_2HPO_4 , 30; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25; KI 0.75; KCl , 300; H_3BO_3 , 3; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 27.8; Na_2EDTA , 37.3; mesoinositol, 10; tiamina-HCl, 1.0; Piridoxina-HCl, 0.1; ácido nicotínico, 0.1; sacarosa, 20,000; agar, 7,000. Este medio fue complementado con ácido naftalenacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (BAP), en diferentes concentraciones. El medio se ajustó a un pH de 5.7 ± 0.1 y posteriormente fue esterilizado en autoclave a 120°C y 1.14 kg/cm^2 de presión durante 15 minutos, para servirse finalmente en cajas de Petri en condiciones de asépsia.

Condiciones de incubación. Las cajas de Petri conteniendo los explantes fueron selladas con película plástica "parafilm" y colocadas en una cámara de cultivo con ambiente controlado. Las condiciones ambientales a que se sujetaron fueron un fotoperíodo de 16 horas luz, proporcionada por lámparas de luz fluorescente blanca con una intensidad de 8400 lux. La temperatura de la cámara se mantuvo constante a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Con intervalos mensuales los explantes fueron transferidos a un medio fresco similar al anterior, hasta obtener las diferentes respuestas en la mayoría de los tratamientos. Una vez que se observó la formación de brotes adventicios éstos fueron separados y colocados en un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento.

RESULTADOS

Desarrollo de los Explantes

Durante la primera semana en cultivo, el desarrollo de los embriones fue muy similar en todos los tratamientos que mostraron una respuesta; los cotiledones crecieron alcanzando un tamaño varias veces mayor al inicial y tomaron una coloración verde brillante, iniciándose en la porción más distal de los mismos, mientras que en la parte radicular se formó un pequeño callo de color oscuro, sin crecimiento, que posteriormente generó la muerte de esta zona (Fig. 1a). Después de la primera semana se empiezan a observar diferencias entre los tratamientos; los cotiledones terminan su proceso de elongación, presentando una apariencia succulenta, especialmente aquellos que están en contacto con el medio nutritivo (Fig. 1b). Los embriones colocados en el medio de cultivo sin reguladores del crecimiento (testigo) mostraron la misma tendencia durante los primeros días de desarrollo, sin embargo, éste fue mucho más lento y la mayoría de las veces no alcanzó a completarse, tornándose necróticos y muriendo posteriormente. A las 3-4 semanas de iniciado el cultivo, se nota una suavización del tejido, aparentemente sólo en las capas superiores de los cotiledones, con la aparición de unas estructuras que posteriormente se distinguirán como primordios de yemas o brotes; en la parte inferior de los cotiledones se tiene una proliferación de tejido desorganizado con la formación posterior del callo (Fig. 1c).

La diferencia más notable en el desarrollo durante este período

de cultivo, entre los explantes que formaron brotes y los que formaron callo, fue la velocidad con que se logró la desorganización del tejido de los cotiledones, siendo más lenta en el primer caso.

A los 30 días de iniciado el cultivo se hicieron notorios los primordios de yemas o brotes en la superficie de los explantes, incluso en algunos ya se observan brotes y hojas bien formadas que al ser transferidos al medio de cultivo sin reguladores del crecimiento, se desarrollaron en múltiples brotes de apariencia normal, los que posteriormente tuvieron que ser separados y colocados individualmente para que continuaran su crecimiento (Fig. 1d). Debido a la superficie tan limitada donde se formaron y desarrollaron los brotes, muchos primordios quedaron inhibidos hasta que aquéllos se separaron, por lo que aún después de 3 transferencias continúan desarrollándose nuevos brotes sobre el explante inicial o lateralmente a los ya separados.

Efecto de los Reguladores del Crecimiento

Como consecuencia de la variación en las concentraciones de ANA en combinación con las de BAP, aplicadas a los embriones, se manifestaron 3 respuestas morfogénicas con diferente intensidad 1) formación de callo; 2) formación de brotes; y 3) formación de raíz, cuyos resultados se presentan en los Cuadros 1 y 2 y en las figuras 2 y 3. Sin embargo, con excepción de los tratamientos con mayor concentración de BAP (5 ppm), en los que sólo se manifestó la formación de callo, en el resto se observaron la formación de callo, la formación de brotes, e incluso la formación de raíz, en un mismo tratamiento.

Cuadro 1. Efecto de la combinación de ANA-BAP sobre los embriones de *Pinus patula* cultivados *in vitro*

TRATAMIENTO	HORMONAS (ppm)		FORMACION DE CALLO (%)*	DESARROLLO DE LOS CALLOS**	FORMACION DE BROTES (%)	\bar{X} DE BROTES POR EMBRION	NO. MAXIMO DE BROTES POR EMBRION	FORMACION DE RAIZ (%)
	BAP	ANA						
1	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0	0
2	0.0	0.001	0	0	0	0.0	0	0
3	0.0	0.005	16	++	0	0.0	0	16
4	0.0	0.01	23	++	13	1.0	1	40
5	0.0	0.05	33	++	13	1.0	1	30
6	0.5	0.0	0	0	7	1.0	1	0
7	0.5	0.001	0	0	7	1.5	2	0
8	0.5	0.005	13	+	13	1.5	2	0
9	0.5	0.01	40	++	17	2.6	4	0
10	0.5	0.05	47	++	20	2.5	3	0
11	1.0	0.0	20	+	20	1.0	1	0
12	1.0	0.001	16	+	60	5.2	10	0
13	1.0	0.005	20	+	63	8.1	13	0
14	1.0	0.01	16	+	84	11.4	19	0
15	1.0	0.05	16	+	84	12.2	21	0
16	3.0	0.0	22	+	22	1.0	1	0
17	3.0	0.001	10	+	66	5.8	12	0
18	3.0	0.005	20	+	47	6.1	10	0
19	3.0	0.01	33	+	47	7.3	13	0
20	3.0	0.05	16	+	77	8.5	16	0
21	5.0	0.0	10	+	0	0.0	0	0
22	5.0	0.001	20	+	0	0.0	0	0
23	5.0	0.005	33	+	0	0.0	0	0
24	5.0	0.01	40	+++	0	0.0	0	0
25	5.0	0.05	53	+++	0	0.0	0	0

* Los valores corresponden a un mínimo de 30 explantes por tratamiento

** El desarrollo de los callos se calificó de la siguiente manera:

0 Nulo
 + Bajo
 ++ Regular
 +++ Bueno
 ++++ Excelente

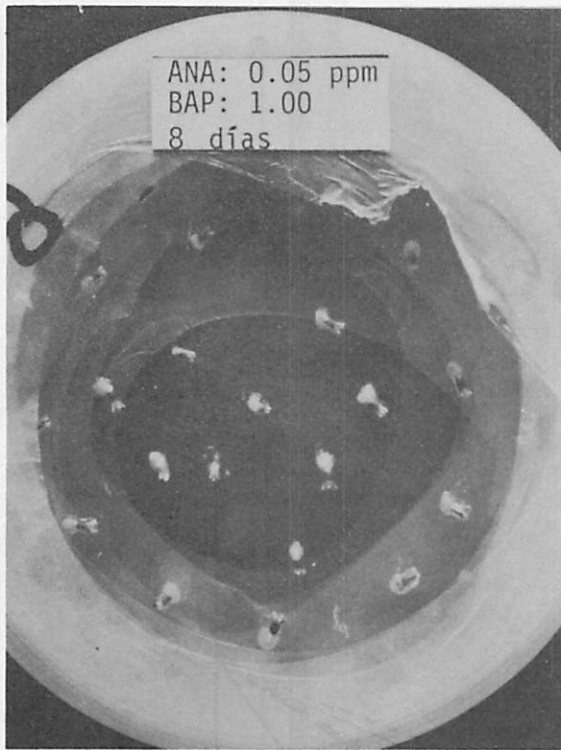
Al agregar al medio de cultivo solamente ANA, en concentración muy baja (0.001 ppm) no se observó ningún efecto morfogénético, pero al aumentar ésta a 0.05 ppm se observó un ligero aumento en la formación de callo y en la aparición de raíz (Cuadro 1), aunque este último efecto no es muy consistente pues solo se observa en una baja proporción de explantes y con un desarrollo limitado, en la base del hipocótilo. A pesar de que en dichos tratamientos también se observaron brotes, estos ocurrieron en un bajo porcentaje de explantes y no se formaron sobre los cotiledones, suponemos que más bien corresponden al desarrollo del meristemo original.

El efecto del BAP, al agregarse por separado, se manifestó en diferentes respuestas: 1) pobre formación de callo en concentraciones de 1 y 3 ppm, (Cuadro 2); 2) desarrollo del meristemo apical, que en transferencias posteriores propició la brotación de yemas axilares y 3) en algunos explantes aislados de los tratamientos anteriores, en la zona del meristemo se formó una roseta de hojas primarias engrosadas, que al ser transferidas a un medio sin reguladores permitió el desarrollo del meristemo apical.

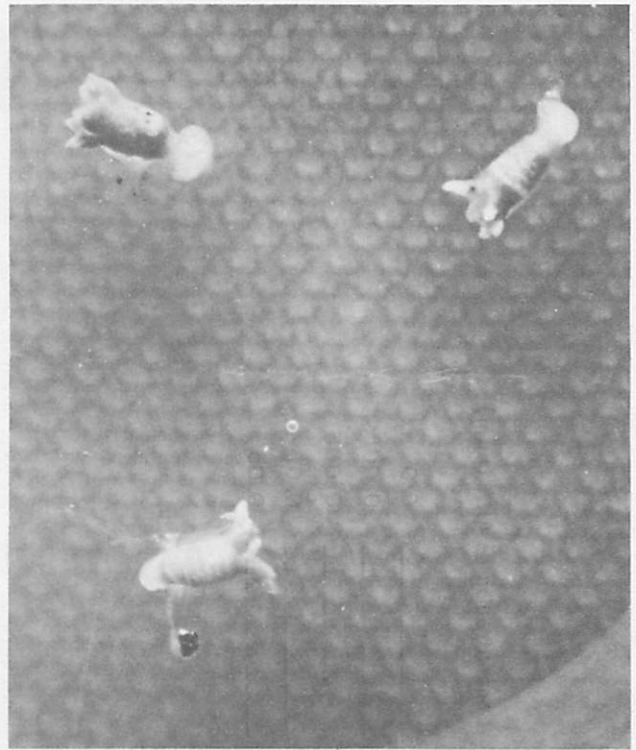
Cuadro 2. Desarrollo de callos en cada uno de los tratamientos indicados

BAP (ppm)	ANA (ppm)	0.0	0.001	0.005	0.01	0.05
0.0		0	0	++	++	++
0.5		0	0	+	++	++
1.0		+	+	+	+	+
3.0		+	+	+	+	+
5.0		+	+	+	+++	+++

0 Nulo + Bajo ++ Regular +++ Bueno ++++ Excelente



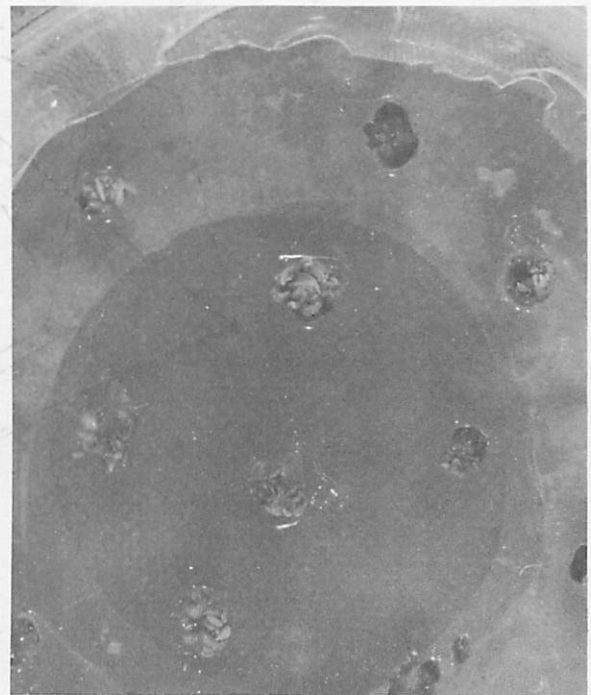
1a



1b



1c



1d

Figura 1. Secuencia en el desarrollo de los embriones de *Pinus patula* cultivados *in vitro*: a) Elongación de los cotiledones después de 8 días en cultivo; b) Desarrollo de los cotiledones con su apariencia succulenta; c) Aparición de zonas de diferenciación en la parte superior de los cotiledones y formación de callo en la parte inferior del explante; d) Formación y crecimiento de los brotes sobre la superficie de los cotiledones.

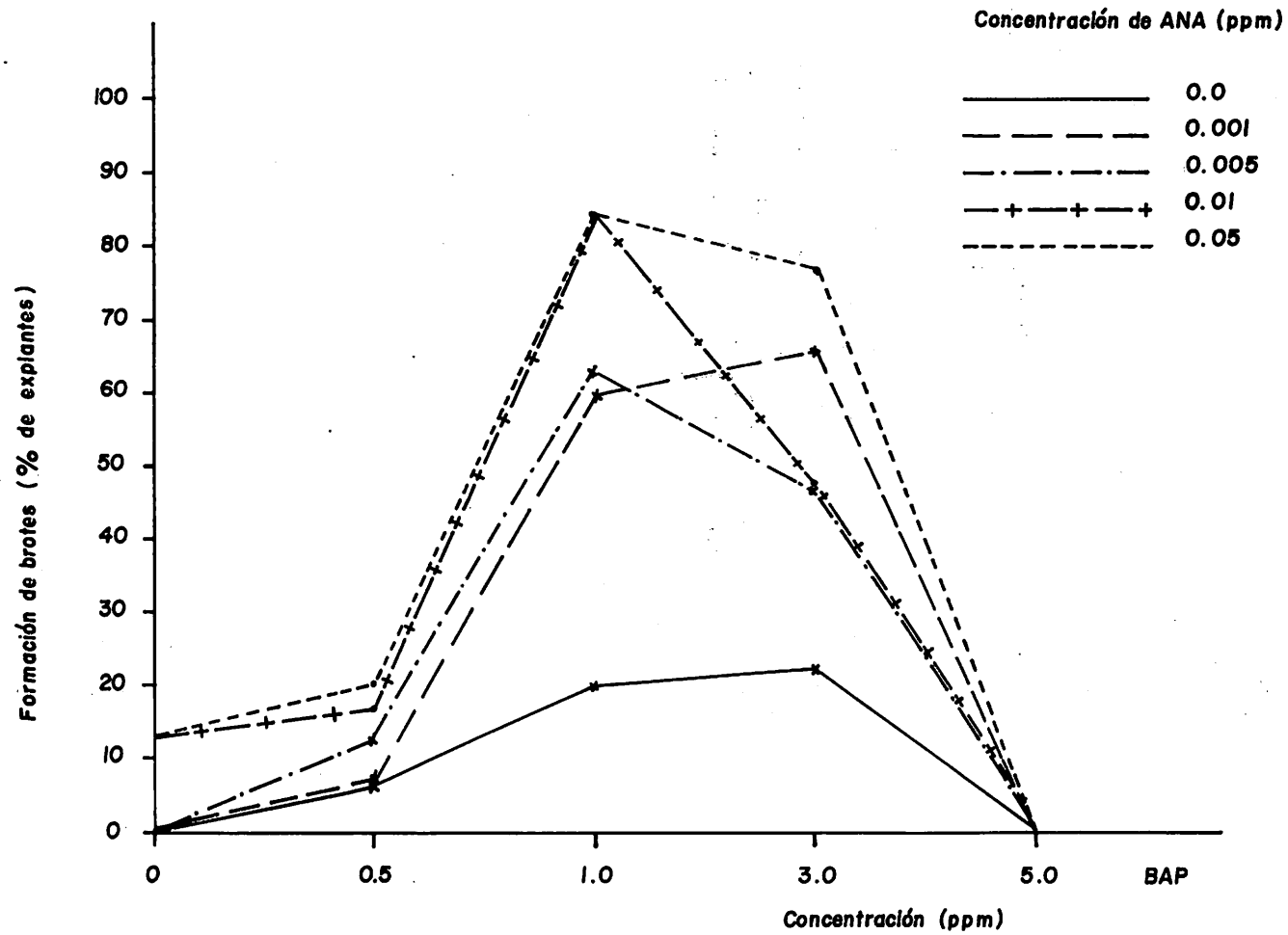


Figura 2. Efecto de la combinación ANA - BAP sobre la formación de brotes.

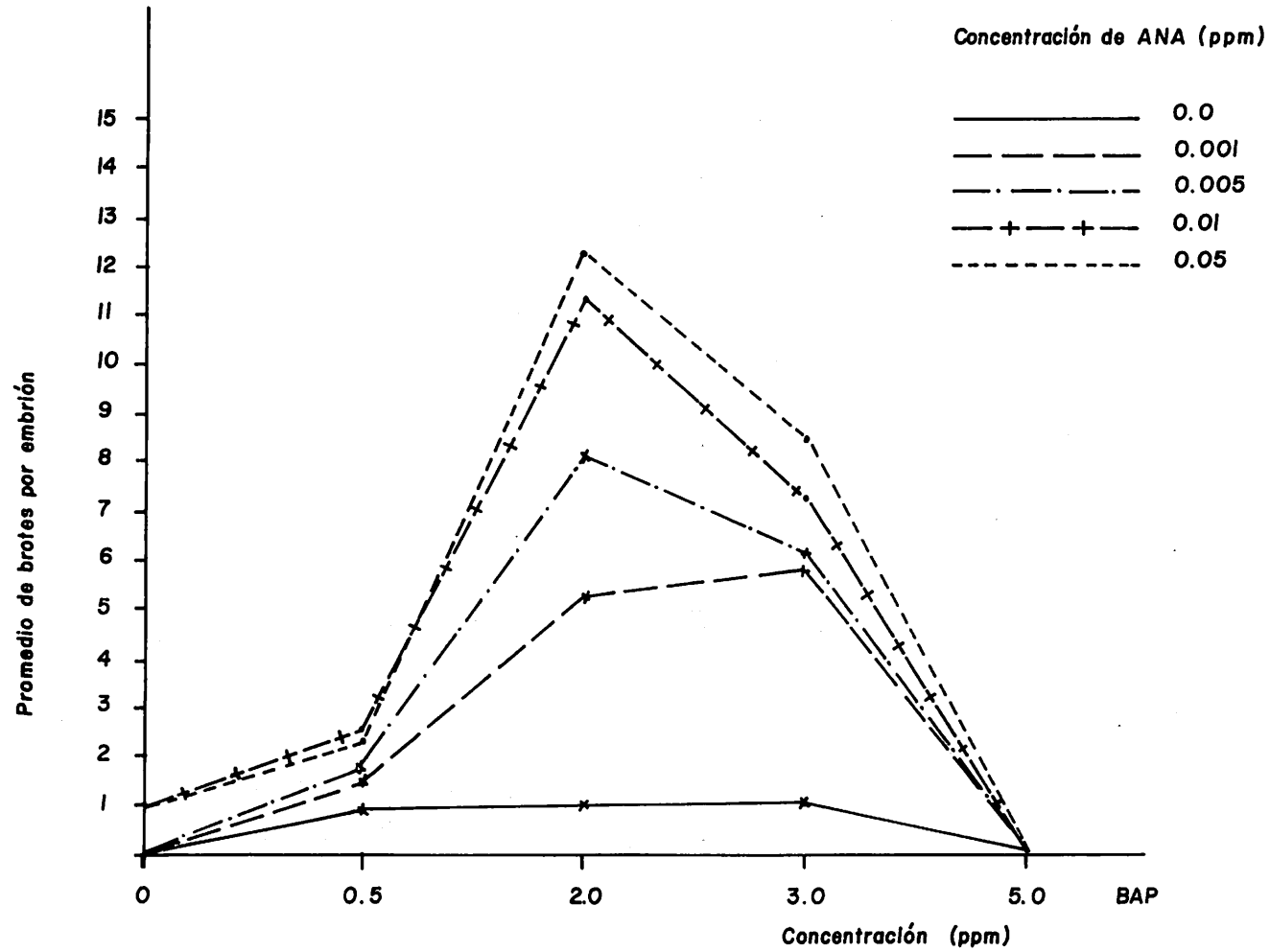


Figura 3. Efecto de la combinación ANA - BAP sobre el número de brotes por embrión.

La combinación de BAP y ANA favoreció la aparición de brotes elevándose tanto el porcentaje de explantes con esta respuesta como el promedio y número máximo de brotes por embrión en cada tratamiento, que cuando se agregaron por separado. Se observa que para una concentración dada de BAP, el aumentar la de ANA, eleva tanto el porcentaje de embriones con brotes como el promedio de éstos por embrión, siendo las mejores combinaciones 1ppm de BAP con 0.01 ó 0.05 ppm de ANA; sin embargo, cuando se eleva a 5ppm la concentración de BAP, se inhibe por completo esta respuesta (Fig. 2 y 3).

La formación de callo sigue un patrón de comportamiento irregular en estos tratamientos: mientras que en las concentraciones extremas de BAP (0.5 y 5ppm) se eleva el porcentaje de explantes con callo al elevar la concentración de ANA, en las concentraciones medias (1 y 3ppm) de BAP, este porcentaje es más uniforme entre las diferentes concentraciones de ANA (Cuadro 1); con respecto al desarrollo de los callos, éste fue bajo en la mayoría de las combinaciones comprendidas en este ensayo, excepto cuando se utilizan 0.01 y 0.05 ppm de ANA, donde se tiene una notable mejoría al incrementar la concentración de BAP. (Cuadro 2). En ensayos realizados con anterioridad utilizando concentraciones mayores de ANA (de 0.1 a 10ppm), la única respuesta que se presenta consistentemente en la formación de callo, con un mejor desarrollo que el descrito aquí.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados presentados aquí nos proporcionan evidencias para

asegurar que es posible inducir la formación de múltiples brotes adventicios en embriones de *Pinus patula*, cuando a estos se les proporciona las condiciones de cultivo adecuadas. Posiblemente los principales centros morfogénicos se localicen en las capas superiores de los cotiledones que están en contacto con el medio de cultivo; sin embargo, en algunas ocasiones los brotes pueden aparecer lateralmente al meristemo apical original o en los ápices de los cotiledones, al variar el tipo y concentración de las hormonas. Estos hechos sugieren la posibilidad de emplear como explante los cotiledones y el meristemo apical de plántulas recién germinadas, con buenos resultados.

Alternativamente, cuando las concentraciones hormonales logran activar la división celular en todas las capas del explante, la respuesta se manifiesta en una proliferación de callosidades de diferente coloración, consistencia y rapidez de crecimiento.

De acuerdo con lo anterior, la formación de brotes adventicios requiere de un balance adecuado de auxinas con respecto a las citocininas, siempre en mayores concentraciones las segundas, lo cual concuerda con algunos resultados obtenidos en otros trabajos (6, 7, 12, 21, 27, 30), aunque las concentraciones absolutas requeridas son diferentes para esta especie; pero difieren de los obtenidos por Sommer *et al.* (33) en donde la formación de brotes se obtienen aplicando dosis mayores de auxinas que de citocininas, y de otros donde se menciona que este proceso se presenta con solo aplicación de citocininas (21, 27).

Así mismo, debe hacerse notar que en este ensayo, la formación de brotes se presenta, aunque con diferente intensidad, en una amplia gama de combinaciones auxina-citocinina; además, dentro de un mismo tratamiento existe cierta variación en la capacidad de formar brotes o callos, y en el número de aquéllos por explante. Estos hechos pueden deberse en cierta medida a la amplitud de concentraciones empleadas, a la relativa facilidad del proceso organogénético, a la variabilidad genética del germoplasma utilizado, a las interacciones con hormonas endógenas presentes en diferentes niveles en cada explante o, incluso, a las diferencias en la superficie de contacto existente entre el explante y el medio nutritivo. De esta manera, se manifiesta la necesidad de realizar otros ensayos con mayor control de estas variables que permitan una mayor comprensión del fenómeno de organogénesis.

Una vez que los brotes se han desarrollado en forma individual lo suficiente, en un medio similar sin hormonas, éstos deben ser sometidos a otras condiciones específicas de cultivo para inducirles la formación de raíces y constituir las plántulas completas, proceso que se está investigando actualmente.

A pesar de las limitaciones prácticas que tiene la obtención de brotes y plántulas en este tipo de explantes para un programa de mejoramiento genético de especies forestales, estos resultados pueden ser aplicados a aumentar la precisión de pruebas de progenie, determinar interacciones genotipo-ambiente o simplemente facilitar y ace-

lerar la propagación de híbridos o cruza de genotipos selectos. Este método también puede ser aplicado directamente a la multiplicación a partir de semillas con bajo porcentaje de viabilidad y/o de germinación o de especies forestales con semillas comestibles, como es el caso de los pinos piñoneros.

LITERATURA CITADA

1. Bonga, J.M. 1974. Vegetative propagation: tissue and organ culture as an alternative to rooting cuttings. N.Z.J. For.Sci. 4 (2): 253-260.
2. _____ 1977a. Applications of tissue culture in forestry En: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture (Reinert, J. y Y.P.S. Bajaj, eds). Springer Verlag, Berlin pp: 93-108.
3. _____ 1977b. Organogenesis in *in vitro* cultures of embryonic shoots of *Abies balsamea* (Balsam-Fir). *In Vitro* 13: 41-47.
4. _____ 1980. Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. En: Plant cell Cultures; Results and perspectives (Sala, F., B. Parisi, R. cella y O. Ciferri, eds). Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp: 253-264.
5. Campbell, R.A. y D.J. Durzan. 1976. Vegetative propagation of *Picea glauca* by tissue culture. Can. J. For. Res. 6(2): 240-243.
6. Cheng, T.Y. 1975. Adventitious bud formation in culture of Douglas fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. Plant Science Letters 5: 97-102.
7. _____ 1976a. Vegetative propagation of western hemlock (*Tsuga heterophylla*) through tissue culture. Plant and Cell Physiol. 17: 1347-1350.
8. _____ 1976b. Regeneration of plants from somatic cells of coniferous tree species. *In Vitro* 12 (4): 288.

9. Cheng, T.Y. 1979. Recent advances in development of *in vitro* techniques for Douglas-Fir. En: Plant cell and tissue culture principles and applications (Sharp, W.R., P.O. Larsen, E.F. Paddock y V. Raghaven, eds). Ohio State University Press. pp: 493-508.
10. _____ y T.H. Voqui. 1977. Regeneration of Douglas-Fir plantlets through tissue culture. Science 198: 306-307.
11. Coleman, W.K y T.A. Thorpe. 1976. Induction of buds in tissue cultures of four different conifers. Plant Physiol. Suppl. 57:67.
12. _____ y _____ 1977. *In vitro* culture of western redcedar (*Thuja plicata* Donn) 1. Plantlet formation. Bot. Gaz. 138 (3): 298-304.
13. De Fossard, R.A., P.A. Barker y R.A. Bourne. 1978. The organ culture of nodes of four species of eucalyptus. Acta Hortic. 78: 157-165.
14. Durzan, D.J. 1980. Prospects for the mass propagation of economically important conifers by cell and tissue culture. En: Plant cell cultures; Results and perspectives (Sala, F., B. Parisi, R. Cella y O. Ciferri, eds.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp: 283-288.
15. _____ y R.A. Cambell. 1974a. Prospects for the introduction of traits in forest trees by cell and tissue culture. N. Z.J. For. Sci. 4 (2): 261-266.
16. _____ y _____ 1974b. Prospects for the mass production of improved stock of forest trees by cell and tissue culture Can J. For. Res. 4(2): 151-174.
17. Eriksson, T., G. Fridborg y S. Von Arnold. 1977. Tissue and cell culture of forest trees as a tool of vegetative propagation. En: Vegetative propagation of forest trees: Physiology and practice. Lectures from a symposium in Uppsala Sweden, 16-17 february 1977. The Institute for Forest ---- Improvement and the Department of Forest Genetics. College of Forestry, the Swedish University of Agricultural Sciences. pp: 17-26.
18. Greshoff, P.M. y C.H. Doy. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta (Berlin) 107: 161-170.
19. Haissig, B. 1965. Organ formation *in vitro* as applicable to forest tree propagation. Bot. Rev. 31 (4): 607-626.

20. Isikawa, H. 1974. *In vitro* formation of adventitious buds and roots on the hypocotyl of *Cryptomeria japonica*. Bot. Mag. Tokyo. 87: 73-77.
21. Konar, R.N. y M.N. Singh. 1980. Induction of shoot buds form tissue cultures of *Pinus wallichiana*. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 99. S. 173-177.
22. Lester, D.T. y J.G. Berbee. 1977. Within-clone variation among black poplar trees derived from callus culture. Forest Science 23 (1): 122-131.
23. Mathes, M.C. 1964. The use of isolated plant tissues in studies related to forest genetics. TAPPI 47(11): 710-713.
24. McKeand, S.E. 1981. Loblolly pine tissue culture: present and future uses in Southern Forestry. Special project on tissue culture. School of Forest Resources; N.C. State University. Raleigh, N.C. 50 p.
25. Minocha, S.C. 1980. Cell and tissue culture in the propagation of forest trees. En: Plant cell cultures; Results and perspectives (Sala, F., B. Parisi, R. Cella y O. Ciferri, eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press pp: 295-300.
26. Mott, R.L. 1981. Trees. En: Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques (Conger, B.U. ed). C.R.C. Press. Inc. Boca Raton Florida. pp: 217-254.
27. _____, R.H. Smeltzer, A. Mehra-Palta y B.J. Zobel. 1977. Production of forest trees by tissue culture. TAPPI 60(6): 62-64.
28. Murashige, T. 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture En: Frontiers of plant tissue culture. Proc. of the 4th International Congress of Plant tissue and cell culture (Thorpe, T.A. ed). Calgary, Can. pp: 15-26, 518-524.
29. Noerhadi, E. 1981. Vegetative propagation of *Tectona grandis* L. and *Pinus merkussi* Jung et de Vries, Using tissue culture techniques. En: Newsletter, International Association for Plant Tissue Culture (Yamada, Y., ed), Kioto University, Japan, No. 33 pp: 16.
30. Reilly, K y J. Washer. 1977. Vegetative propagation of radiata pine by tissue culture: plantlet formation from embryonic tissue. N.Z.J. For. Sci. 7(2): 199-206.
31. Smith, D.R., K.Horgan y J. Aitken. 1980. Micropropagation - A new aid in tree improvement? What's new in forest research No. 87. 4pp.

32. Sommer, H.E. y C.L. Brown. 1979. Application of tissue culture to forest tree improvement. En: Plant cell and tissue culture, principles and applications (Sharp, W.R., P.O. Larsen E.F. Paddock y V. Raghaven, eds). Ohio State Univ. Press pp: 461-491.
33. Sommer, H.E., C.L. Brown y P.P. Kormanik. 1975. Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured *in vitro*. Bot. Gaz. 136: 196-200.
34. Von Arnold, S. y T. Eriksson. 1979. Induction of buds on buds of Norway spruce (*Picea abies*) grown *in vitro*. Physiol. Plant. 45: 29-36.
35. Winton, L.L. 1970. Shoot and tree production from aspen tissue cultures. Am. J. Bot. 57: 904-909.
36. _____ 1971. Tissue culture propagation of european aspen. Forest Science 17: 348-350.
37. _____ 1978. Morphogenesis in clonal propagation of woody plants. En: Frontiers of plant tissue culture. Proc. of the 4th International Congress of Plant tissue and cell culture. (Thorpe, T.A. ed). Calgary, Can pp: 419-426.
38. _____ y O. Huhtinen. 1976. Tissue culture of trees. En: Modern methods in forest genetics (Miksche, J.P., ed). Springer Verlag Berlin pp: 243-264.