

RESPUESTA DE *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. EN LAS FASES DE ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *in vitro*

RESPONSE OF *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. & Cham. IN THE PHASES OF *in vitro* ESTABLISHMENT AND MULTIPLICATION

González-Jiménez, B.¹; Jasso-Mata, J.¹; Castillo-Martínez, C.R.^{2*}; Jiménez-Casas, M.¹

¹Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. CENID-COMEF. Av. Progreso No. 5, Colonia Barrio de Santa Catarina, Delegación Coyoacán, Ciudad de México.

*Autor de correspondencia: castillo.carlos@inifap.gob.mx

ABSTRACT

Explants of over 28 years old *Pinus leiophylla* trees from a sexual seed orchard obtained to establish and multiply *in vitro*. In the establishment phase branch bud and epicormic shoot explants (ES) tested in a MS medium, both from mature sources. In the multiplication phase, three concentrations of a cytokinin-auxin mixture in 10:1 ratio, as well ES explants from mature trees contrasting their response with same explant type but juvenile sources (2 years old). At 30 days, the 43% *in vitro* establishment from ES shoots was achieved. In the multiplication phase, both explant sources (juvenile and mature) induced 20% adventitious shoots, however, the best response of explant length growth, number and length variables of adventitious shoots was from explants of juvenile explants with 1.4 cm, 4 and 4.4 mm, respectively. Media with PGR induced 15-35% development of adventitious shoots while the medium without PGR did not induce these structures.

Keywords: Epicormic shoots, explants, auxins, cytokinins, adventitious shoots.

RESUMEN

Explantos de árboles de más de 28 años de edad de *Pinus leiophylla* de un huerto semillero sexual fueron colectados para establecerse y multiplicar *in vitro*. En la fase de establecimiento se probaron explantes de yemas de ramas y brotes epicórmicos (BE) en un medio MS, ambos de fuentes maduras. En la fase de multiplicación se probaron tres concentraciones de una mezcla de citocinina-auxina (BA-ANA) en proporción 10:1, así como explantes de BE de árboles maduros, contrastando su respuesta con el mismo tipo de explantes, pero de fuentes juveniles (2 años). A los 30 días, se obtuvo el 43% de establecimiento *in vitro* a partir de BE. En la fase de multiplicación ambas fuentes de explantes (maduro y juvenil), indujeron el 20% de brotes adventicios, sin embargo, la mejor respuesta en las variables de crecimiento en longitud del explante, número y longitud de brotes adventicios fue a partir de explantes de árboles juveniles con 1.4 cm, 4 y 4.4 mm, respectivamente. Los medios con reguladores de crecimiento vegetal (RCV) indujeron el desarrollo de brotes adventicios de 15-35%, mientras que el medio sin RCV no indujo estas estructuras.

Palabras clave: Brotes epicórmicos, explantes, auxinas, citocininas, brotes adventicios.

INTRODUCCIÓN

En coníferas el cultivo de tejidos *in vitro* es una alternativa para la propagación de genotipos seleccionados que poseen alguna característica de alto valor económico o ecológico, al capturar de forma efectiva su ganancia genética (Cortizo *et al.*, 2009). En los últimos años una gran cantidad de especies de coníferas ha sido micropropagada, pero en la mayoría de estas investigaciones que han tenido éxito se utilizaron explantes de fuentes juveniles (Parasharami *et al.*, 2003). Sin embargo, muchas de las características de interés no pueden ser evaluadas hasta que los árboles llegan a la fase de madurez, reduciendo el potencial de propagación del árbol (Greenwood, 1995).

A pesar de los considerables esfuerzos en la investigación, la mayoría de las gimnospermas todavía son consideradas como extremadamente difícil de micropropagar en individuos de más de un año de edad (Selby *et al.*, 2005). El establecimiento y la inducción de brotes adventicios son las primeras etapas en la micropropagación. Sin embargo, para árboles maduros de coníferas han sido pocos los trabajos que han tenido éxito (Cortizo *et al.*, 2009; De-Diego *et al.*, 2008; Parasharami *et al.*, 2003; Selby *et al.*, 2005). De acuerdo con Boniga (1981), la micropropagación en árboles maduros es posible solo cuando tienen rebrotes en el tocón u otras fuentes de tejido juvenil disponibles; por lo tanto, los brotes epicórmicos (BE) proporcionan material vegetal con características juveniles, para establecer un cultivo aséptico de árboles adultos (López *et al.*, 2003). Existen algunas especies de pino que producen BE, como es el caso de *Pinus leiophylla* (Jiménez y Zwiazek, 2014).

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es el establecimiento y multiplicación *in vitro* de explantes de árboles maduros de *P. leiophylla* de un huerto semillero sexual (HSS).

MATERIALES Y MÉTODOS

Fase de establecimiento

Se probaron 2 tipos de explantes: yemas terminales (YT) y brotes epicórmicos (BE). Los árboles donantes, de más de 28 años de edad, se seleccionaron en el HSS de *P. leiophylla* que se estableció en 1991 en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, en Montecillo, Texcoco, Estado de México para generar germoplasma tolerante a factores adversos (Jasso *et al.*, 1993). Las YT se colectaron en marzo, del primer tercio de la copa; presentaron 4 cm de longitud y 5 mm de diámetro en promedio, con las escamas cerradas y sin acículas (Figura 1a y b). Los BE se colectaron de los tallos de los árboles seleccionados, en los primeros 2 m respecto a la base. Estos brotes presentaron 1.5 cm de longitud y 1.3 mm de diámetro, en promedio y con hojas primarias; tallo succulento, sin aparente lignificación y con yema primaria funcional (Figura 1e-g). El cultivo *in vitro* se realizó en el laboratorio de biotecnología del CENID-COMEF del INIFAP, en la Ciudad de México.

En las YT, las escamas se removieron manualmente para evitar daños en el tejido (Figura 1c) y en los BE, las hojas primarias cercanas al tallo principal se recortaron (Figura 1h).

El material vegetal se lavó cuatro veces, tallando con agua y jabón líquido comercial y se enjuagaron con agua corriente; se colocaron en una solución con

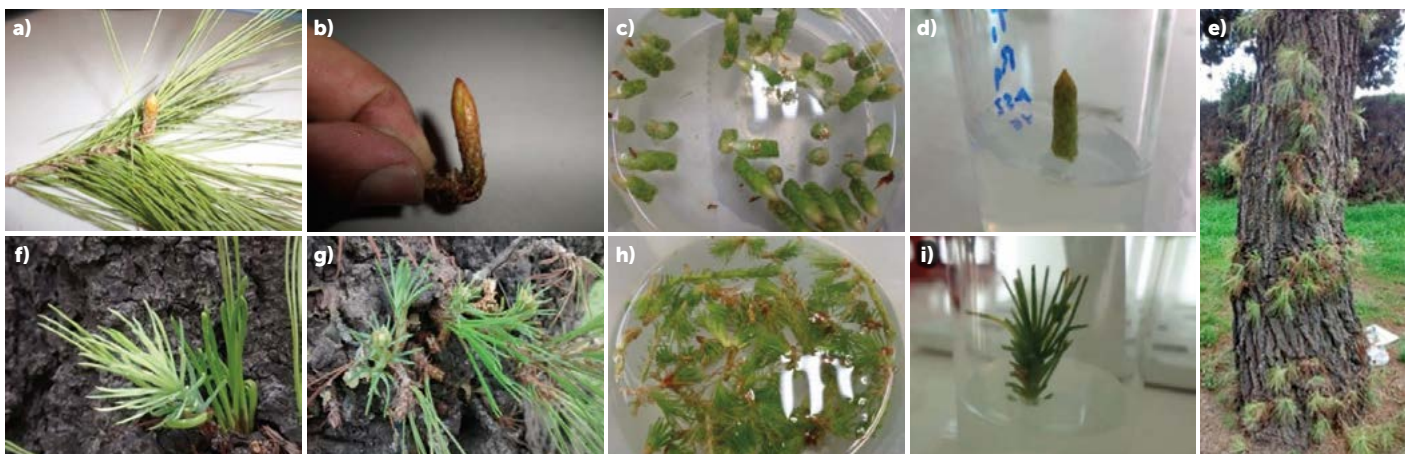


Figura 1. Explantes de árboles adultos de *P. leiophylla*. a) y b) explantes de yema, c) yemas sin escamas, d) yema cultivada *in vitro*, e) árbol donador, f) y g) Brotes epicórmicos, h) preparación de explantes, i) Brote epicórmico cultivado *in vitro*.

Captan® (3 g L⁻¹) durante 90 min y se enjuagaron 2 veces con agua destilada; se trataron con etanol al 70 % durante 1.5 min y se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril; en seguida, se sumergieron durante 10 min en hipoclorito de sodio comercial al 30 %, adicionándole 200 µl L⁻¹ de Tween® 20 de SIGMA®. En la campana de flujo laminar se enjuagaron 5 veces con agua destilada estéril.

El medio base para los explantes fue: 4.43 g L⁻¹ MS (Murashige y Skoog, 1962) con vitaminas (MS), adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa (D-SUCROSE®) y 8 g de agar (Agar Plant®) de Phyto Technology Laboratories®, con pH de 5.7 y esterilizado en autoclave, en tubo de ensayo de 25×100 mm.

Se hizo un corte en la base del explante, tanto para YT como para BE, para ajustar la longitud a 1.5 cm y se colocó en el medio de cultivo; el tubo de ensayo se selló con vitafilm y se etiquetó para llevar el control del experimento. Los cortes se hicieron con instrumentos de disección (bisturí no. 21 y pinzas) sobre cajas Petri.

Los cultivos se incubaron en ambiente controlado, con temperatura de 24±2 °C y fotoperiodo de 16 horas luz, producidas por lámparas de alógeno con una intensidad lumínica de 56.1 µmol m² s⁻¹ y 8 horas de oscuridad. Durante un mes se realizaron evaluaciones, una vez por semana, para determinar el porcentaje de establecimiento *in vitro* (vivos y muertos) y porcentaje de contaminación (hongo o bacteria) y oxidación.

Fase de multiplicación

Esta fase se realizó con BE de árboles del huerto de *P. leiophylla* (árboles maduros) y de árboles de 2 años (juveniles) producidos en vivero. La colecta y desinfección del material vegetal, así como la preparación de los explantes y medios de cultivos se realizaron como se mencionó en la fase anterior. Para la multiplicación se probaron 4 tratamientos: tres medios de cultivo MS con diferentes niveles de citocinina (Benciladenina, BA) y auxina (Ácido naftalenacético, ANA), en proporción 10:1 en volumen y un testigo, sin reguladores de crecimiento vegetal (RCV) (Cuadro 1).

El cultivo de los explantes se realizó con las mismas condiciones de incubación que la fase de establecimiento. Cada semana se evaluó el número

Cuadro 1. Medios de cultivo utilizados en la fase de establecimiento *in vitro* de brotes epicórmicos de árboles maduros y juveniles de *P. leiophylla*.

Medio de cultivo	Nombre	Concentración de BA (µM)	Concentración de ANA (µM)
MS1	Testigo	-	-
MS2	Concentración baja	4.44	0.54
MS3	Concentración media	8.88	1.07
MS4	Concentración alta	17.76	2.15

mero de explantes vivos y muertos, para determinar el porcentaje de contaminación; en los explantes vivos se evaluó: número y longitud de los brotes adventicios (Ba) y % de inducción de Ba.

Diseño experimental

Los experimentos siguieron un diseño completamente al azar. En la fase de establecimiento se utilizaron 120 repeticiones. En la fase de multiplicación el diseño fue factorial 2×4 (dos edades del árbol donador y 4 medios de cultivo), con 10 repeticiones. Se realizó análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey (P≤0.05), en el programa (Statistical Analysis System 9.00 [SAS, 2002]). Las variables de porcentaje y los conteos se transformaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Sampayo et al. (2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase de establecimiento

En la última evaluación se encontró que todos los explantes de yemas terminales (YT) murieron por diversos factores de contaminación, mientras que, para los explantes de brotes epicórmicos (BE) se obtuvo 43 % de establecimiento efectivo (Cuadro 2).

Establecimiento de yemas (YT). Son pocos los estudios que reportan éxito en el establecimiento *in vitro* de árboles adultos de coníferas utilizando yemas apicales o axilares como explantes: De-Diego et al. (2008) en *Pinus pinaster* con árboles de 20 años, Cortizo et al. (2009) en *Pinus pinea* de 20-25 años, Parasharami et al. (2003) en *Pinus roxburghii* de 30 años y Selby et al. (2005) en *Picea sitchensis* de 2-33 años, lo cual contrasta con lo obtenido en este estudio.

Cuadro 2. Respuesta de establecimiento *in vitro* de dos tipos de explantes de árboles maduros de *P. leiophylla* a los 30 días de su cultivo.

Tipo de explante	Explantes no establecidos (%)				Explantes establecidos (%)
	Hongo	Bacteria	Oxidación	Total	
YT	8	29	63	100	0
BE	49	5	3	57	43

De acuerdo con los resultados, el principal factor de mortalidad de explantes de YT fue la oxidación de tejidos. En el medio de cultivo se formó un "halo", en la base del explante (Figura 2 b y c), ocasionado por la liberación de exudados y en los primeros 5 días de su cultivo, la mayoría de los explantes comenzaron a perder su color verde hasta oscurecerse totalmente. Tang y Newton (2004) indican que la oxidación se debe a la producción de exudados que pueden llegar a ser fitotóxicos para el explante. Aunque su naturaleza no es precisa, se conoce que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas. El grado de oxidación depende del contenido de fenoles y estos se presentan en mayor cantidad en leñosas maduras (Pirttilä et al., 2008).

La muerte de YT ocasionada por hongos y bacterias (Figura 2 d y e) se pudo deber a que estos agentes contaminantes se encontraban adheridos al explante a través de la resina, puesto que los árboles donadores crecen directamente en campo y están expuestos a plagas, enfermedades y polvo (Hernández y González, 2010). Las bacterias pueden colonizar el interior del explante, lo que hace difícil detectarlos y eliminarlos, puesto que escapan de la esterilización superficial (Pirttilä et al., 2008).

Los hongos se pudieron presentar porque es común que colonicen hojas, madera y corteza de los árboles donantes (Pirttilä et al., 2003).

Establecimiento de brotes epicórmicos (BE). Los explantes de árboles maduros, a los 7 días presentaban las mismas condiciones que al momento de su cultivo; a los 15 días algunos explantes comenzaron a emitir fascículos; a los 23 días iniciaron la brotación de acículas (Figura 3) y a los 30 días algunos ya habían desarrollado acículas nuevas e incrementado en longitud, como se muestra en la Figura 3f (el color amarillo representa el tamaño inicial y el rojo el crecimiento en 30 días).

Las gimnospermas son consideradas extremadamente difíciles de micro-propagar cuando pasan de un desarrollo vegetativo juvenil a uno reproductivo (Day y Greenwood, 2011), puesto que sus características morfológicas, fisiológicas, anatómicas y bioquímicas son distintas y afectan significativamente la propagación de las plantas (Baccarin et al., 2015). Bonga (2016) determinó que el cultivo *in vitro* de árboles maduros es posible cuando se emplea tejido con características juveniles, como son los BE (Hartmann et al., 2011).

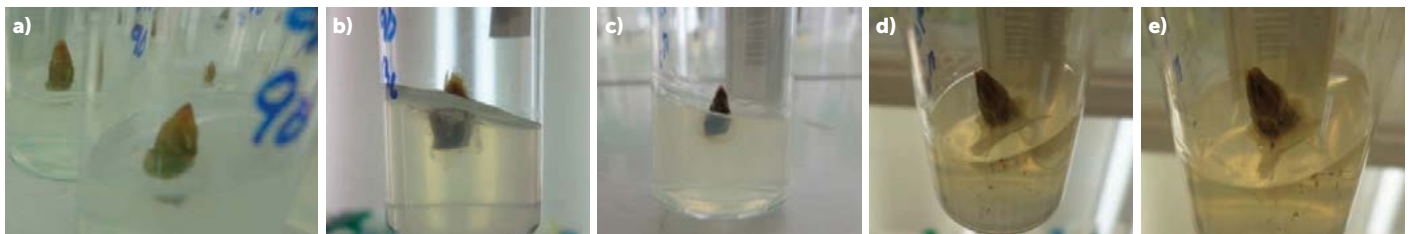


Figura 2. Establecimiento *in vitro* de yemas apicales de árboles adultos de *P. leiophylla*. a) primer día de cultivo, b) y c) oxidación de yemas, d) y e) contaminación por bacteria.

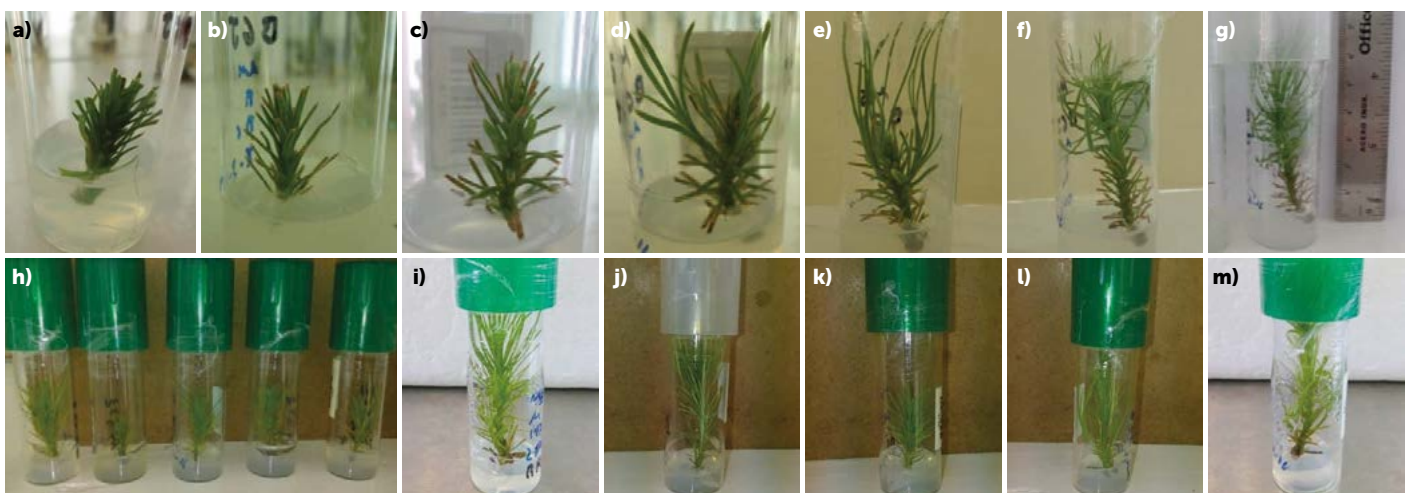


Figura 3. Establecimiento *in vitro* de BE de árboles adultos de *P. leiophylla*. a) Primer día de cultivo, b) 7 días, c) 15 días, d) 23 días, e-m) 30 días.

Son pocas las especies de coníferas que presentan de forma natural BE como *P. leiophylla* (Bonga, 2010; Jiménez y Zwiazek, 2014) y todavía son menos los casos en los que se ha logrado el establecimiento de este tipo de explantes de árboles maduros, tal es el caso de *Araucaria cunninghamii* (Burrows, 1990), *Sequoia sempervirens* (Arnaud et al., 1993), *Picea sitchensis* (Selby et al., 2005).

Fase de multiplicación

El medio de cultivo tuvo un efecto estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$) en la inducción de brotes adventicios, pero no así la edad de la planta donadora del explante (Cuadro 3).

Factor medio de cultivo. La presencia de BA y ANA en el medio de cultivo promovió la inducción de brotes adventicios, en contraste con el medio sin estos RCV (MS1). Aunque no hubo diferencias estadísticas entre las concentraciones de RCV, se observa la tendencia de que a mayor concentración de RCV, mayor inducción de brotes adventicios en los explantes de *P. leiophylla* establecidos *in vitro*, esto se debe a que los nutrientes del medio de cultivo son asimilados y empleados en la producción de brotes nuevos (De-Feria et al., 2009). La diferencia entre la concentración media y alta fue menor con respecto a la concentración baja, esto se puede deber a que la BA es el RCV más usado en organogénesis y su concentración juega un rol importante en la respuesta del explante; a este respecto, las concentraciones utilizadas pudieron ser insuficientes para observar diferencias, como en el caso de multiplicación de árboles adultos de *Pinus brutia* y *Pinus radiata* Zhang et al. (2003) aplicaron hasta 25 μM de BA para obtener respuesta or-

ganogénica y en este estudio, para *P. leiophylla* se aplicó máximo 17.76 μM (MS4).

Las citocininas son efectivas en la promoción directa o indirecta de iniciación de brotes, un balance entre citocininas y auxinas normalmente da una mayor respuesta organogénica (Van-Staden et al., 2008), aunque también se debe considerar que los efectos varían de acuerdo a la concentración y tipo de citocinina y a la respuesta de cada especie en particular (De-Feria et al., 2009).

El medio no tuvo efecto en el número y longitud de brotes adventicios. Sin embargo, Selby et al. (2005) obtuvieron 3 brotes en promedio con 10 μM de BA en arboles de *P. sitchensis* de entre 2-33 años, menor a lo obtenido para *P. leiophylla* con 4-5 brotes adventicios por explante para los tres medios probados (MS2, MS3 y MS4) (Cuadro 3). Por su parte, De-Feria et al. (2009) obtuvieron 7 brotes adventicios por explante de *Pinus caribaea* en un medio con 6.6 μM de BA; De-Diego et al. (2008) obtuvieron mejores resultados, 22 brotes adventicios por explante, en *Pinus pinaster* de más de 20 años al probar una concentración de 25 μM de BA y al probar 50 μM de BA solo indujo 17 brotes, lo que indica que también existe un umbral límite superior en el que a cierta concentración de citocinina va reduciendo su potencial de organogénesis.

A pesar de que las diferencias en el crecimiento del explante no fueron significativas, se observó que en el MS1 el explante tuvo mayor longitud, con 1.9 cm y en los medios MS2, MS3 y MS4 se observó una tendencia inversa entre el crecimiento de los explantes y la concentración

Cuadro 3. Efecto de los tratamientos probados en el crecimiento del explante, inducción, número y longitud de brotes adventicios y contaminación de *P. leiophylla* a los 30 días de su cultivo *in vitro*.

Factor	CE (cm)	Brotes adventicios			Contaminación (%)		
		Inducción (%)	Núm.	Long. (mm)	H	B	O
Explante							
BEAM	0.5±0.1a	20±2.3a	2±1.3a	2.9±0.5a	7.5±1.4	2.5±0.0	25±1.0
BEAJ	1.4±0.5a	20±1.9a	4±1.0a	4.4±0.4a	0.0±0.0	2.5±0.6	12.5±2.6
Medio							
MS1	1.9±1.1a	00±0.0b	-	-	5.0±2.6	0.0±0.0	15±0.5
MS2	0.7±0.4a	15±0.5a	5±1.1a	3.6±1.6a	0.0±0.0	0.0±0.0	20±0.3
MS3	0.6±0.3a	30±0.0a	4±1.8a	3.8±0.1a	0.0±0.0	10±2.6	10±5.3
MS4	0.5±0.2a	35±0.3a	4±1.4a	3.5±0.6a	10±5.3	0.0±0.0	5.0±2.6

Las letras minúsculas diferentes en columnas, indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). BEAM=brote epicórmico de árbol maduro; BEAJ=brote epicórmico de árbol juvenil; CE=crecimiento del explante; Núm.=número; Long.=longitud; H=hongo; B=bacteria; O=oxidación; MS1, MS2, MS3 y MS4=Murashige Skoog (1962) sin hormonas, concentración baja, media y alta, respectivamente.

de RCV en el medio (0.7, 0.6 y 0.5 cm, respectivamente). Esta tendencia se observó en explantes de *Pinus caribaea* cultivados *in vitro*, al aumentar la concentración de BA fue disminuyendo la longitud del explante (De-Feria *et al.*, 2009), ya que Van-Staden *et al.* (2008) mencionan que al utilizar altas concentraciones de citocininas, los brotes producidos, reducen el desarrollo en longitud del explante; debido a que los nutrientes asimilados se emplean principalmente en la producción de brotes nuevos De-Feria *et al.* (2009), mientras que cuando están ausentes los RCV, los nutrientes son utilizados para el crecimiento del explante.

Factor explante. Aunque el explante no mostró efecto significativo en las variables evaluadas durante la fase de multiplicación, los resultados indican que el crecimiento del explante (longitud) de los BEAJ, presentaron 0.9 cm más que los explantes de BEAM, además tuvieron la capacidad de formar brotes adventicios al igual que los BEAJ. Los resultados de inducción de brotes adventicios en BEAM son similares a lo obtenido con árboles adultos de *Sequoia sempervirens* (Arnaud *et al.*, 1993), *Picea sitchensis* (Selby *et al.*, 2005) y *Quercus robur* (Martínez *et al.*, 2012). Chang *et al.* (2001) obtuvieron en *Taxus mairei*, 52 y 49% de inducción de brotes adventicios para árboles maduros y juveniles, respectivamente; sin embargo, Lapp *et al.* (1996) reportan que la tasa de

producción de brotes adventicios de *Pinus monticola* declinó con la edad del árbol donador y obtuvo 19 a 13% de inducción, un resultado por debajo a lo obtenido para *P. leiophylla*.

Los explantes obtenidos de árboles maduros generan bajo porcentaje de inducción de brotes *in vitro*, en comparación a otros explantes tales como: embriones sigóticos maduros o inmaduros, cotiledones o semillas, con lo que se ha obtenido alta respuesta en la inducción de brotes (Parasharami *et al.*, 2003). Alonso *et al.* (2006) reportan 100% de inducción de brotes en *Pinus pinea* a partir de cotiledones; Zhu *et al.* (2010) obtuvieron 93 % con plántulas de 4 semanas de germinación de *Pinus massoniana*, no obstante, muchas de las características de interés no pueden ser evaluadas hasta que los árboles llegan a la fase de madurez (Greenwood, 1995). Los brotes inducidos en *P. leiophylla* presentaron características externas similares en ambas fuentes (maduros y juveniles), con una yema apical para su crecimiento primario y el desarrollo de la parte aérea de una nueva planta, aunque los brotes adventicios de explantes juveniles mostraron más rápidamente el desarrollo de hojas nuevas (Figura 4).

El número de Ba obtenidos para *P. leiophylla* fue de 4 para BEAJ y 2 para BEAM. El número de brotes en

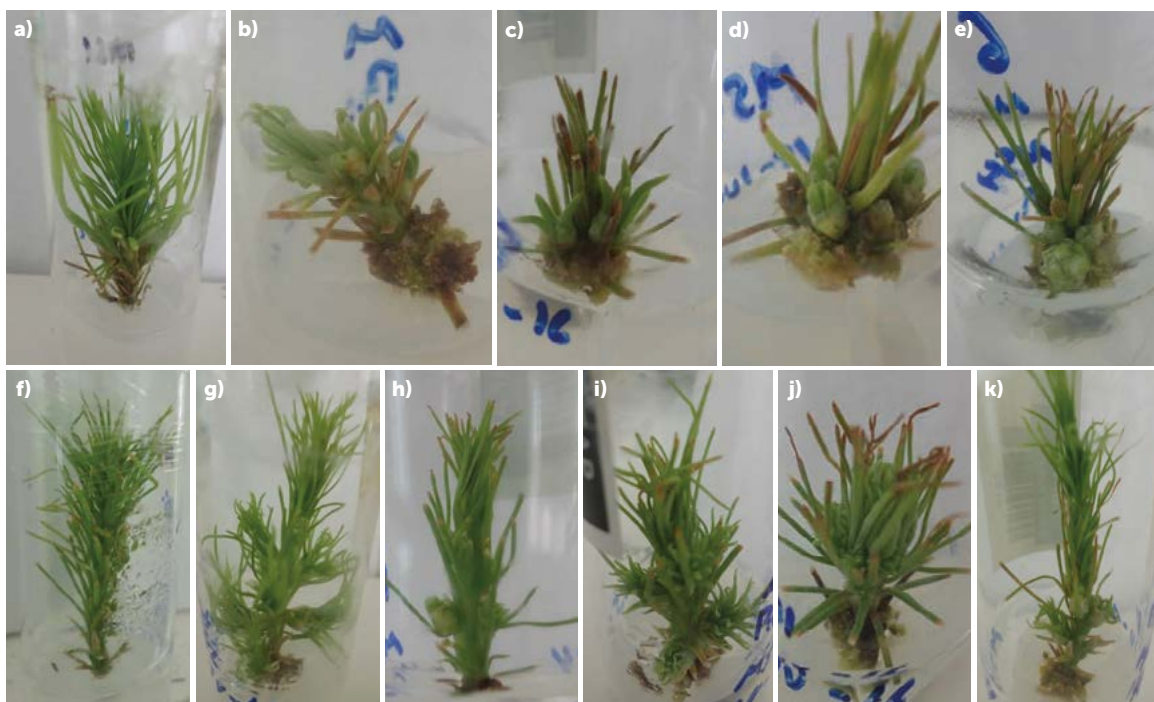


Figura 4. Inducción de brotes adventicios de explantes cultivados *in vitro* de *P. leiophylla*. Las imágenes superiores corresponden a explantes de árboles maduros y las inferiores a juveniles. a) MS1, b) MS2, c) MS3, d) y e) MS4, f) MS1, g) MS2, h) MS3, i-k) MS4.

árboles maduros es similar a lo obtenido por diversos autores: Selby et al. (2005) observó en árboles de *Pinus sitchensis* de 33 años solamente 2 brotes y de 20 años, 5 brotes *in vitro*; Parasharami et al. (2003) en árboles de 30 años de *Pinus roxburghii* obtuvieron 5-6 brotes adventicios. En contraste, Alonso et al. (2006), al utilizar una fuente de explantes ontogénicamente juvenil (cotiledones), obtuvieron 33 brotes de *Pinus pinea* por explante. En cuanto a la longitud de los brotes adventicios, los explantes presentaron mayor longitud cuando se obtuvieron de árboles juveniles (4.4 mm) en comparación con los de árboles maduros (2.9 mm) (Cuadro 3).

CONCLUSIONES

Se logró el establecimiento *in vitro* de BE de árboles de más de 28 años de edad de *Pinus leiophylla* en un medio MS. Estos explantes también presentaron una respuesta similar a los de una fuente juvenil (2 años) en las variables de longitud del explante, inducción, número y longitud de brotes adventicios; sin embargo, los explantes de árboles juveniles, mostraron los mayores valores promedio en su respuesta organogénica. La aplicación de RCV (BA-ANA) en el medio, indujo el desarrollo de brotes adventicios en comparación con los medios sin RCV. El avance obtenido en esta investigación permitirá continuar dicho procedimiento para después de multiplicar el mismo genotipo *in vitro*, establecer muestras para enraizamiento y posterior aclimatación.

LITERATURA CITADA

- Alonso P., Moncaleán P., Fernández B., Rodríguez A., Centeno M.L., Ordás R.J. 2006. An improved micropropagation protocol for stone pine (*Pinus pinea* L.). *Annals of Forest Science* 63: 879-885. doi: 10.1051/forest:2006071.
- Arnaud Y., Franclet A., Tranvan H., Jacques M. 1993. Micropropagation and rejuvenation of *Sequoia sempervirens* (Lamb) Endl: A review. *Annales des sciences forestieres* 50: 273-295.
- Baccarin F.J.B., Brondani G.E., de Almeida L.V., Vieira I.G., de Oliveira L.S., De-Almeida M. 2015. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. *New Forests* 46: 465-483. doi: 10.1007/s11056-015-9472-x.
- Bonga J.M. 1981. Organogenesis *in vitro* of tissues from mature conifers. *In vitro* 17: 511-518. doi: 10.1007/BF02633512.
- Bonga J.M., Klimaszewska K.K., von Aderkas P. 2010. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 241-254. doi: 10.1007/s11240-009-9647-2.
- Bonga J.M. 2016. Can explant choice help resolve recalcitrance problems in *in vitro* propagation, a problem still acute especially for adult conifers? *Trees* 1-9. doi: 10.1007/s00468-016-1509-z.
- Burrows G.E. 1990. Anatomical aspects of root bud development in hoop pine (*Araucaria cunninghamii*). *Australian Journal of Botany* 38: 73-78. doi: 10.1071/BT9900073.
- Cortizo M., de Diego N., Moncaleán P., Ordás R.J. 2009. Micropropagation of adult stone pine (*Pinus pinea* L.). *Trees* 23: 835-842. doi: 10.1007/s00468-009-0325-0.
- Chang S.H., Ho C.K., Chen Z.Z., Tsay J.Y. 2001. Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. *Plant Cell Reports* 20: 496-502. doi: 10.1007/s002990100362.
- Day M.E., Greenwood M.S. 2011. Regulation of ontogeny in temperate conifers. In: Meinzer, F. C., Lachenbruch, B., Dawson T. D. (Eds.), *Size-and age-related changes in tree structure and function* (pp. 91-119). Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-94-007-1242-3_4.
- De-Diego N., Montalbán I.A., Fernández de Larrinoa E., Moncaleán P. 2008. *In vitro* regeneration of *Pinus pinaster* adult trees. *Canadian Journal of Forest Research* 38: 2607-2615. doi: 10.1139/X08-102.
- De-Feria M., Chávez M., Barbón R., La M., Pérez M., Jiménez-Terry F., Agramonte D. 2009. Multiplicación *in vitro* de plantas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*. *Biotechnología Vegetal* 9: 217-224.
- Greenwood M.S. 1995. Juvenility and maturation in conifers: current concepts. *Tree Physiology*, 15: 433-438. doi:10.1093/treephys/15.7-8.433.
- Hartmann T.H., Kester E.D., Davies J.T.F. Geneve L.R. 2011. *Plant propagation principles and practices* (18 Ed.). New Jersey: Prentice Hall. 915 p.
- Hernández Y., González M.E. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales* 31: 58-69.
- Jasso M.J., López U.J., Jiménez C.M., Jacob C.V. 1993. Evaluación fenológica vegetativa de *Pinus leiophylla* en un huerto semillero. In: SOMEFI (Ed.). *Congreso Mexicano Sobre Recursos Forestales* (pp. 97-98). Saltillo, Coahuila, México.
- Jiménez C.M., Zwiazek J.J. 2014. Adventitious sprouting of *Pinus leiophylla* in response to salt stress. *Annals of Forest Science* 71: 811-819.
- Lapp M.S., Malinek J., Coffey M. 1996. Microculture of western white pine (*Pinus monticola*) by induction of shoots on bud explants from 1 to 7-year-old trees. *Tree Physiology* 16: 447-451.
- López M.R.G., Sospedra R.S., Suarez S.G., Jiménez A.L.N. 2003. Utilización de brotes epicórmicos para la propagación clonal *in vitro* de *Eucalyptus saligna*. *Revista del Jardín Botánico Nacional* 24: 239-244.
- Martínez T., Vidal N., Ballester A., Vieitez A.M. 2012. Improved organogenic capacity of shoot cultures from mature pedunculate oak trees through somatic embryogenesis as rejuvenation technique. *Trees* 26: 321-330. doi: 10.1007/s00468-011-0594-2.
- Parasharami V.A., Poonawala I.S., Nadgouda R.S. 2003. Bud break and plantlet regeneration *in vitro* from mature trees of *Pinus roxburghii* Sarg. *Current Science-Bangalore* 84: 203-207.
- Pirttilä A.M., Podolich O., Koskimäki J.J., Hohtola E., Hohtola A. 2008. Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95: 47-55. doi: 10.1007/s11240-008-9413-x.

- Pirttilä A.M., Pospiech H., Laukkanen H., Myllylä R., Hohtola A. 2003. Two endophytic fungi in different tissues of Scots pine buds (*Pinus sylvestris* L.). *Microbial Ecology* 45: 53-62. doi: 10.1007/s00248-002-1038-8.
- Sampayo M.S., Jasso M.J., Jiménez C.M., López U.J., Castillo M.C., Sánchez M.V. 2016. Efecto del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de genotipos de *Cedrela odorata* L. *Agroproductividad* 9: 62-69.
- Selby C., Watson S., Harvey B.M. 2005. Morphogenesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) bud cultures—tree maturation and explants from epicormic shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83: 279-285. doi: 10.1007/s11240-005-7016-3.
- Tang W., Newton R.J. 2004. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science* 167: 621-628. doi:10.1016/j.plantsci.2004.05.024.
- Van-Staden J., Zazimalova E., George E.F. 2008. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. *In: George E.F., Hall M.A., de Klerk G.J (Eds.). Plant propagation by tissue culture.* Dordrecht: Springer. pp. 205-226.
- Wendling I., Trueman S.J., Xavier A. 2014. Maturation and related aspects in clonal forestry. Part II: Reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. *New Forests* 45: 473-486. doi: 10.1007/s11056-014-9421-0.
- Zhang H., Horgan K.J., Reynolds P.H.S., Jameson P.E. 2003. Cytokinins and bud morphology in *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum* 117: 264-269. doi: 10.1034/j.1399-3054.2003.00026.x.

