

## INDUCCION DE ORGANOGENESIS EN COTILEDONES DE PINUS CANARIENSIS

C. Martínez-Pulido

*Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Farmacia.  
Univ. de La Laguna. 38207. LA LAGUNA.*

### RESUMEN

Se hicieron germinar embriones maduros de *Pinus canariensis*, durante 3 días. Un tercio de ellos conservaban el megagametofito completo, otro tercio sólo la mitad del megagametofito, y los últimos sin tejidos del megagametofito. Se observó la capacidad de formar yemas de los cotiledones escindidos de estos embriones al cultivarlos en el medio de Bornman, MCM, con  $N^6$  Benziladenina  $10^{-5}$  M durante 14 días.

También se estudió la capacidad caulogénica de los cotiledones procedentes de embriones germinados con medio megagametofito, al ser cultivados durante un período de tiempo constante (14 días) en el medio de inducción con distintas concentraciones de BA, y al ser cultivados durante diversos tiempos en el medio de inducción con una concentración constante de BA ( $10^{-5}$  M).

Los resultados demuestran que la presencia de los tejidos del megagametofito durante la germinación del embrión, influyen sobre la capacidad de formar yemas de sus cotiledones. Las respuestas óptimas se observaron en los cotiledones procedentes de embriones germinados en presencia de la mitad inferior del megagametofito. Se confirmó, además, la influencia del tiempo de exposición y de la concentración de BA en la formación y elongación de las yemas adventicias. Los mejores resultados se obtuvieron al cultivar los explantos en un medio de inducción con BA  $10^{-5}$  M durante 14 días.

Finalmente, se describe un modelo de diferenciación *in vitro* de las yemas en los cotiledones de pino canario.

Palabras clave: *Pinus canariensis*. Cultivo de embriones; Cultivo de cotiledones. Desarrollo de yemas adventicias.

### SUMMARY

Mature *Pinus canariensis* embryos were germinated for 3 days. One third inside the whole megagametophyte; one third with only half megagametophyte, and one third without the megagametophyte. Bud forming capacity (BFC) of cotyledons dissected from those embryos was observed, when cultured on Bornman's MCM medium supplemented with  $10^{-5}$  M  $N^6$  Benzyladenine for 14 days.

The BFC capacity of cotyledons, from embryos germinated with half megagametophyte, cultured during 14 days on a medium supplemented with different concentrations of BA, was studied, as well as the BFC of cotyledons cultured during different periods of time on a medium with BA  $10^{-5}$  M.

The results showed that the megagametophyte tissues affected the BFC of the cotyledons. The best responses were obtained on cotyledons from embryos germinated with half megagametophyte. The concentration and exposure time to BA influenced the adventitious bud formation and elongation. The best results were obtained when explants were cultured on bud induction medium with BA  $10^{-5}$  M during 14 days.

Finally, a pattern of bud differentiation *in vitro* is described for *Pinus canariensis* cotyledons.

Key words: *Pinus canariensis*. *In vitro* tissue culture embryo culture. Cotyledon culture. Adventitious bud development.

## INTRODUCCION

La inducción de organogénesis en explantos juveniles de coníferas constituye, actualmente, un método rutinario para numerosas especies (Bornman, 1983; Thorpe y Biondi, 1984; Dunstan y Thorpe, 1986; Bonga, 1987; Thorpe *et al.*, 1991).

En lo que respecta al pino canario, *Pinus canariensis*, recientemente se ha publicado un protocolo para la regeneración de plantas mediante la inducción de yemas adventicias en cotiledones de tres días de edad. Estas yemas se desarrollan en brotes en un medio desprovisto de citoquinina. Los brotes se pueden mantener y multiplicar *in vitro* por un período de tiempo indefinido. Además, la capacidad de enraizamiento de esta especie es muy buena (80-90%), y las plantas regeneradas presentan un crecimiento vigoroso después de dos años en el invernadero (Martínez Pulido *et al.*, 1990; Martínez Pulido, 1990).

Al igual que sucede en la mayor parte de las coníferas, factores como las condiciones del explanto inicial, la concentración y el tiempo de aplicación de los reguladores del crecimiento, ocupan un lugar destacado para conseguir una respuesta organogénica óptima.

El presente trabajo consta de dos experiencias llevadas a cabo con el fin de optimizar la respuesta organogénica *in vitro* de los cotiledones del pino canario. En la primera se hace referencia a las condiciones del explanto inicial, y en la segunda se considera la relación entre concentración de la citoquinina y el tiempo de exposición a la misma.

### *Primera experiencia*

En la inducción de órganos *in vitro*, la elección del explanto inicial es de suma importancia, ya que son muchos los factores que influyen sobre el comportamiento de éstos en cultivo. Entre dichos factores figuran: las condiciones de la planta madre que ha servido como donante de órganos o tejidos; la edad fisiológica y ontogénica de los órganos o tejidos; el tamaño y calidad general del explanto; etc. (Sommer y Caldas, 1981).

Para la inducción de organogénesis *in vitro* en coníferas se han usado diversas clases de explantos (David, 1982; Thorpe y Biondi, 1984). Sin embargo, la mayoría de los resultados con éxito se han logrado cuando éstos son juveniles. Así, en el caso concreto del pino canario, los ex-

plantos usados en trabajos previos (Martínez Pulido *et al.*, 1990) han sido cotiledones de tres días de edad procedentes de embriones germinados asepticamente y desprovistos del megagametofito.

El objetivo central de esta experiencia fué estudiar la influencia que ejercen los tejidos del megagametofito durante la germinación del embrión sobre la capacidad organogénica de los cotiledones.

### *Segunda experiencia*

Generalmente, las coníferas pro-

ducen yemas adventicias en respuesta a citoquininas exógenas; su concentración y tiempo de exposición son de gran importancia, tanto para el número de yemas inducidas, como para la calidad y subsiguiente crecimiento y desarrollo de los brotes producidos (Biondi y Thorpe, 1982).

El objetivo de este apartado fue la confirmación de la concentración y tiempo de exposición óptimos requeridos por *Pinus canariensis*, y la observación del modelo de desarrollo *in vitro*.

## MATERIAL Y METODOS

### *Material vegetal*

Las semillas del pino canario fueron recolectadas en la isla de Gran Canaria por el Instituto para la Conservación de la Naturaleza en condiciones naturales. Estas fueron esterilizadas con lejía comercial 50% (6% NaOCl) durante 30 minutos, y con peróxido de hidrógeno 10%, durante 10 minutos. Las cubiertas seminales se eliminaron según se describe en Martínez Pulido *et al.* (1990).

Para la germinación de los embriones se utilizaron placas de Petri con sacarosa 10 g L<sup>-1</sup>, solidificada con Difco-Bacto Agar 8 g L<sup>-1</sup>.

### *Explanto inicial*

En la primera experiencia, se hicieron germinar durante tres días embriones asépticos que conservaban el megagametofito completo; asimismo, se emplearon embriones asépticos sin la mitad superior del megagametofito, y además, embriones

desprovistos completamente de los tejidos de éste. Por lo tanto fueron tres los tipos de explantos usados:

a.— Cotiledones procedentes de embriones que habían germinado directamente sobre la superficie del agar.

b.— Cotiledones procedentes de embriones que habían germinado sobre la mitad inferior del megagametofito (después de abrir la semilla se cortó longitudinalmente la mitad superior del gametofito que se eliminó).

c.—Cotiledones procedentes de embriones que durante su germinación se habían mantenido en el interior del megagametofito completo.

En la segunda experiencia sólo se usó un tipo de explantos: cotiledones de tres días de edad procedentes de embriones que habían germinado conservando la mitad inferior del megagametofito.

### *Medio de cultivo*

Para todas las experiencias se usaron las sales minerales del Medio para la Micropropagación de Coníferas descrito por Bornman (1983), tanto a concentración completa (MCM) como diluidas a la mitad (1/2 MCM). Estas formulaciones se suplementaron con sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>, myo-inositol 100 mg L<sup>-1</sup>, asparagina 100 mg L<sup>-1</sup>, ácido nicotínico 5 mg L<sup>-1</sup>, y tiamina-HCl 5 mg L<sup>-1</sup>. Se añadió Difco-Bacto agar a la concentración de 8 g L<sup>-1</sup>, ajustándose el pH del medio a 5.7-5.8 antes de autoclavar. También previamente al autoclavado, se añadió en los casos necesarios, carbón activo 0.5 g L<sup>-1</sup> (Sigma N.° C4386).

La 6-Benzylaminopurina (BA) se añadió al medio antes de ajustar el pH a concentraciones de 10<sup>-5</sup> M, en la primera experiencia, y de 10<sup>-6</sup> M, 5 × 10<sup>-6</sup> M, 10<sup>-5</sup> M y 5 × 10<sup>-5</sup> M, en la segunda experiencia.

Las sales minerales MCM con BA se utilizaron para la inducción de yemas; 1/2 MCM, sin BA, se usó para el desarrollo de la yemas; y 1/2 MCM, con 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activo, se usó para la elongación de las yemas. En las dos primeras etapas se emplearon placas de Petri estandar de 100 mm de diámetro, y para la elongación se usaron placas profundas (100 × 25 mm).

### *Inducción y desarrollo de las yemas*

En las dos experiencias, los coti-

ledones se escindieron y cultivaron en el medio de inducción de yemas, durante 14 días en la primera experiencia; y durante 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días, en la segunda experiencia. Después de este tiempo, se transfirieron al medio de desarrollo de las yemas, y al cabo de un mes al medio de elongación. Seguidamente, los explantos se transfirieron mensualmente a medio fresco.

### *Evolución de los resultados*

En ambas experiencias, después de 8 semanas de iniciado el cultivo, se contabilizó el número de cotiledones que formaron yemas (porcentaje de reactividad) mediante el exámen de los explantos bajo un microscopio estereoscópico, el número medio de yemas adventicias por cotiledón reactivo y el coeficiente de formación de yemas (C. F. Y.), definido de la siguiente manera:

$$\text{C.F.Y.} = (\text{número medio de yemas por cotiledon}) \times (\% \text{ de cotiledones que forman yemas}) / 100.$$

Este coeficiente da una determinación bastante realista sobre la eficacia del tratamiento.

El porcentaje de brotes elongados, se calculó contando el número de brotes > 5 mm después de 12 o 16 semanas, y relacionándolo con el número total de yemas inducidas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### *Condición del explanto inicial*

En las Tablas 1, 2, y 3, se observa que las respuestas obtenidas en el

cultivo de cotiledones procedentes de distintos embriones, e incluso en cotiledones de un mismo embrión,

son muy variables, tal como evidencian los rangos obtenidos. No obstante, los mejores resultados se alcanzaron al cultivar cotiledones escindidos de embriones que germinaron conservando la mitad inferior del megagametofito. En este caso se obtuvo una media de 16 yemas por cotiledón y un CFY de 15.8 (Tabla 2).

Contrariamente, la media más baja de yemas por cotiledón se produjo al cultivar cotiledones procedentes de embriones mantenidos durante tres días en el interior del megagametofito completo; sólo se contabilizó una media de 10 yemas por cotiledón (Tabla 3). En parte, esta respuesta es probablemente debida a la

imposibilidad de seleccionar los embriones más vigorosos. Estos se detectan por la morfología y por el color que adquieren los cotiledones bajo el efecto de la luz, pero sí se encuentran dentro de los tejidos del megagametofito, todos los cotiledones son blancos y presentan un aspecto muy similar.

Las Tablas 1, 2 y 3 evidencian que los resultados más homogéneos, es decir, aquéllos en los que el rango es menor, se produjeron al cultivar cotiledones procedentes de embriones que permanecieron en el interior del megagametofito completo. El rango no pasó de 13 (Tabla 3), debido quizás a la presencia de un entor-

TABLA 1

*Inducción y elongación de yemas formadas en cotiledones de Pinus canariensis escindidos de embriones que germinaron durante tres días desprovistos de megagametofitos.*

En	% Reactividad	N ± ES	Rango	CFY	% Brotes > 5 mm
E <sub>1</sub>	100	18.4 ± 1.7	10 - 27	18.4	35.7
E <sub>2</sub>	90	16 ± 2.7	8 - 30	14.4	56.9
E <sub>3</sub>	100	23.9 ± 1.9	12 - 31	23.9	23.2
E <sub>4</sub>	100	9.7 ± 1	5 - 12	9.7	30.8
E <sub>5</sub>	91	23.6 ± 1.2	19 - 30	21.4	10.6
E <sub>6</sub>	89	8.7 ± 1.4	3 - 15	7.7	44.3
E <sub>7</sub>	100	7.6 ± 0.9	5 - 14	7.6	39.5
E <sub>8</sub>	100	10.4 ± 0.6	8 - 13	10.4	18.1
E <sub>9</sub>	100	6.9 ± 0.1	2 - 12	6.9	7.3
E <sub>10</sub>	100	8.4 ± 1.5	4 - 18	8.4	17.9
Media	97	13.4	2 - 31	12.9	28.4

En = embriones individuales empleados.

% de Reactividad = número de cotiledones que forman yemas.

N = número medio de yemas/cotiledón después de 8 semanas.

ES = error estándar.

Rango = número mínimo y número máximo de yemas/cotiledón.

CFY (Coeficiente de formación de yemas) =  $N \times \% \text{ react.} / 100$ .

Tiempo de cultivo total: cuatro meses.

TABLA 2

*Inducción y elongación de yemas formadas en cotiledones de Pinus canariensis escindidos de embriones que germinaron durante tres días, conservando la mitad inferior del megagametofito.*

En	% Reactividad	N ± ES	Rango	CFY	% Brotes > 5 mm
E <sub>1</sub>	100	22.3 ± 1.4	16 - 28	22.3	28.2
E <sub>2</sub>	100	22.4 ± 2.5	10 - 36	22.4	54.2
E <sub>3</sub>	100	20.5 ± 2	11 - 30	20.5	37.2
E <sub>4</sub>	100	13.4 ± 1	10 - 19	13.4	9.7
E <sub>5</sub>	100	15.2 ± 2	6 - 23	15.2	48.2
E <sub>6</sub>	100	14.7 ± 0.8	11 - 19	14.7	31.8
E <sub>7</sub>	100	13.2 ± 1.6	4 - 18	13.2	37.7
E <sub>8</sub>	80	19 ± 2	10 - 26	15.2	25
E <sub>9</sub>	100	15.8 ± 1.2	10 - 21	15.8	26
E <sub>10</sub>	100	16.3 ± 1.5	11 - 24	16.3	28.1
E <sub>11</sub>	100	9.1 ± 0.7	7 - 15	9.1	16.4
E <sub>12</sub>	100	10.9 ± 1.1	6 - 18	10.9	16.1
Media	98,3	16.1	6 - 36	15.8	29.9

Nomenclatura como en Tabla 1.

no más homogéneo en todo el embrión. No obstante, es necesario destacar la existencia de un rango de hasta 8 yemas en cotiledones de un mismo embrión y por lo tanto con igual genotipo. Semejante hecho podría ser un indicador de la importancia que tiene la posición de los cotiledones en el embrión con respecto a su capacidad organogénica.

Los rangos máximos se obtuvieron en cotiledones procedentes de embriones cultivados en ausencia total de tejidos del megagametofito. La muestra aportaba diferencias de hasta 29 yemas entre un cotiledón y otro (Tabla 1). Una explicación plausible de este fenómeno podría ser la acumulación de diferencias provocadas en la capacidad organogénica de los cotiledones debidas a

su posición en el embrión, y también derivadas del entorno, ya que durante los tres días de germinación los cotiledones del embrión no contactan por igual con la superficie del agar, incluso algunos ni la tocan.

En los tres modos de germinación, el porcentaje de cotiledones que formaron yemas fue superior al 95%, alcanzándose un porcentaje máximo del 98,3 % cuando los cotiledones procedían de embriones germinados conservando la mitad inferior del megagametofito (Tabla 2).

Igualmente, en todos los casos se observó un buen crecimiento de los brotes inducidos, con un porcentaje entre el 28 y el 30% de los brotes elongados, al cabo de 12 o 15 semanas de iniciado el cultivo.

TABLA 3

*Inducción y elongación de yemas formadas en cotiledones de Pinus canariensis escindidos de embriones que germinaron durante tres días en el interior del megagametofito completo.*

En	% Reactividad	N ± ES	Rango	CFY	% Brotes > 5 mm
E <sub>1</sub>	100	11.9 ± 0.8	9 - 16	11.9	43
E <sub>2</sub>	63.6	13.1 ± 1.4	9 - 17	8.3	32.6
E <sub>3</sub>	85.7	6.7 ± 1.1	4 - 11	5.7	30
E <sub>4</sub>	100	11 ± 0.7	8 - 14	11	40.2
E <sub>5</sub>	100	12.4 ± 0.6	9 - 15	12.4	48.4
E <sub>6</sub>	100	11 ± 0.7	8 - 16	11	38.3
E <sub>7</sub>	100	14.3 ± 0.8	12 - 17	14.3	15.1
E <sub>8</sub>	100	7.2 ± 0.4	6 - 10	7.2	29.2
E <sub>9</sub>	100	5.3 ± 0.3	4 - 7	5.2	14.3
E <sub>10</sub>	100	9.4 ± 0.6	7 - 11	9.4	12
E <sub>11</sub>	100	8.3 ± 0.5	6 - 11	8.3	15.7
Media	95.4	10	4 - 17	9.5	29

Nomenclatura como en Tabla 1.

De los resultados expresados en las Tablas 1, 2 y 3, se desprende que para obtener una inducción óptima de yemas por cotiledón, resulta conveniente mantener durante tres días los embriones, antes de escindir cotiledones, sobre la mitad inferior del megagametofito y no directamente sobre la superficie del agar; esto probablemente se debe a que el tejido del megagametofito proporciona sustancias adicionales estimulantes del crecimiento. En consecuencia, este ha sido el tipo de explanto usado en experimentos posteriores.

*Efecto de la concentración y tiempo de exposición a la citoquinina N<sup>6</sup> Benziladenina*

En la Tabla 4 se expresan los resultados conseguidos en cultivos

realizados en el medio de inducción con distintas concentraciones de BA. Los mejores resultados se obtuvieron, en general, cuando el medio de inducción contenía BA 10<sup>-5</sup>M, alcanzándose una media de 14 yemas por cotiledón. Aunque el mayor número de yemas se observó al usar BA 5 × 10<sup>-5</sup>M, en este caso el porcentaje de elongación de los brotes, después de 12 semanas, no superó el 1.1. Por otra parte, la mejor elongación fue obtenida con 5 × 10<sup>-6</sup>M pero en este caso el número de yemas fue sólo de 9.1. Estos resultados confirman los previamente obtenidos por Martínez Pulido *et al.* (1990).

En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos al cultivar los cotiledones en un medio de inducción con BA 10<sup>-5</sup>M, durante distintos períodos de tiempo.

Los cotiledones cultivados directamente en el medio de elongación sin pasar por el medio de inducción (0 días en el medio de inducción), se alargaron considerablemente y no formaron ninguna yema al cabo de 8 semanas de cul-

tivo. Los cultivados durante 1 día en el medio de inducción y 8 semanas en el medio de elongación, se encontraban ligeramente hinchados y algo más cortos que los de 0 días. Aproximadamente el 25 % presentó pequeñas nodulaciones, pero no se

TABLA 4 (\*)

*Efecto de la concentración de la citoquinina N<sup>6</sup> Benziladenina incluida en el medio de inducción, en la formación y elongación de yemas adventicias en cotiledones de tres días de edad de Pinus canariensis. Tiempo total de cultivo: tres meses.*

Concentr. de BA (M)	% Reactividad	N ± ES	Rango	CFY	% Brotes > 5 mm
10 <sup>-6</sup>	70.8	3.1 ± 0.5	1 - 9	2.2	15.1
5 × 10 <sup>-6</sup>	91.7	9.1 ± 0.8	3 - 18	8.3	21.5
10 <sup>-5</sup>	95.6	14.1 ± 1.1	5 - 28	13.5	12.2
5 × 10 <sup>-5</sup>	91.7	24.5 ± 1.2	16 - 36	22.5	1.1

TABLA 5 (\*)

*Resultados obtenidos al cultivar cotiledones escindidos de embriones de tres días de edad de Pinus canariensis, en un medio solidificado con agar y conteniendo BA 10<sup>-5</sup>M, durante varios periodos de tiempo.*

Tiempo de Inducción (días)	% Reactividad	N ± ES	Rango	CFY
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	32.5	1.9 ± 0.2	1 - 5	0.6
3	54.5	3 ± 0.3	1 - 10	1.6
4	70.5	4 ± 0.3	1 - 11	2.8
6	83.3	5.2 ± 0.5	1 - 17	4.3
8	86.2	6.9 ± 0.5	1 - 14	5.9
10	92.1	8.9 ± 0.6	1 - 18	8.1
12	94	11.8 ± 0.6	2 - 18	11.1
14	97.7	13.4 ± 0.6	3 - 21	13.1

(\*) Las experiencias de las Tablas 4 y 5 se repitieron tres veces, con 12-15 cotiledones cada vez.



observó ninguna yema. A partir de dos días de cultivo en el medio inductor, ya hay respuesta morfológica, incrementándose el número medio de yemas según aumenta el período de cultivo en el medio de inducción, llegando a un máximo a los 14 días. Con este tratamiento se formó una media de más de 13 yemas adventicias por cotiledón.

Además, se ha podido observar que, en tiempos de exposición cortos, las pocas yemas inducidas surgen en los extremos de los cotiledones. Cuando este tiempo es más largo y el número de yemas aumenta, su distribución se hace más homo-

génea por todo el explanto. Con el tiempo de exposición óptimo, la inducción tiene lugar a lo largo de toda la superficie del cotiledón.

Un modelo similar de diferenciación *in vitro* ha sido publicado para otras coníferas, como *Pseudotsuga menziesii* (Winton y Verhagen, 1977), *Picea abies* (Janson y Bornman, 1981) y *Pinus ponderosa* (Ellis y Bilderback, 1989). Este fenómeno se ha interpretado como la prueba de que existe un gradiente endógeno de citoquinina a lo largo del explanto y, en consecuencia, las distintas zonas del cotiledón requerirán tiempos de expansión diferentes a la citoquinina exógena.

## CONCLUSIONES

En las experiencias llevadas a cabo se observa que *Pinus canariensis* presenta un elevado grado de variabilidad organogénica entre diferentes embriones e incluso entre los cotiledones de un mismo embrión.

De los resultados presentados puede concluirse que si los embriones germinan durante tres días conservando la mitad del megagametofito, el número de las yemas adventicias inducidas es mayor, y su calidad es mejor.

Se confirma que la concentración óptima de BA incorporado al medio de cultivo es de  $10^{-5}$  M durante 14 días, aunque puedan obtenerse brotes más elongados disminuyendo esta concentración.

Se observa, asimismo, que existe un modelo de diferenciación de yemas adventicias a lo largo de la superficie del explanto; una exposición corta a la citoquinina sólo activará la inducción de yemas en los extremos de los cotiledones.

## AGRADECIMIENTOS

La autora agradece las sugerencias y puntualizaciones realizadas por la Dra. A. M. Vieitez, del C.S.I.C. de Santiago de Compostela, y de los Doctores T. A. Thorpe e I. Harry, de la Universidad de Calgary.

Asimismo, expresa su gratitud a

la Comunidad Autónoma Canaria por la concesión de una beca para la realización de un proyecto, del que este trabajo forma parte, llevado a cabo durante los cursos 1988-1989 y 1989-1990, en la Universidad de Calgary, Canadá.

## BIBLIOGRAFIA

- BIONDI, S. and THORPE, T. A., 1982. Growth regulator effects metabolite changes and respiration during initiation in cultured cotyledones explants of *Pinus radiata*. Bot. Gaz., 143: 20-25.
- BONGA, J. M., 1987. Clonal propagation of mature trees: Problems and possible solutions. In: Cell and Tissue Culture in Forestry, 1: 249-271. Bonga & Durzan (Eds.). Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- BORNMAN, CH., 1983. Possibilities and constraints in the *in vitro* regeneration of trees from cotyledonary needles of *Picea abies in vitro*. Physiol. Plant., 57: 5-16.
- DAVID, A., 1982. *In vitro* propagation of gymnosperms. In: Tissue Culture in Forestry: 72-108. Bonga & Durzan (Eds.). Martinus Nijhoff, London.
- DUNSTAN, D. I. and THORPE, T. A., 1986. Regeneration in forest trees. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vasil (Ed.). 3: 223-241.
- ELLIS, D. and BILDERBACK, D., 1989. Temporal competence of embryonic *Pinus ponderosa* cotyledons. Plant Cell Reports, 10: 156-160.
- JANSON, E. and BORNMAN, Ch., 1981. *In vitro* initiation of adventitious structures in relation to the abscission zone in needle explants of *Picea abies*: Anatomical considerations. Physiol. Plant., 53: 191-197.
- MARTINEZ PULIDO, C., HARRY, I. and THORPE, T. A., 1990. *In vitro* regeneration of plantlets of Canary Island pine (*Pinus canariensis*). Can. J. For. Res., 20: 1200-1211.
- MARTINEZ PULIDO, C., 1990. Cultivo de tejidos vegetales. Multiplicación vegetativa por cultivo *in vitro* del pino canario. Servicio de Publicaciones de la Universidad de La Laguna. Serie Informes núm. 28.
- SOMMER, H. E. and CALDAS, L. S., 1981. *In vitro* methods applied to forest trees. In: Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture. Thorpe (Ed.). Academic Press, New York: 349-358.
- THORPE, T. A. and BIONDI, S., 1984. Fiber and Wood. In: Handbook of Plant Cell Culture. Sharp & Yamada (Eds.): 435-470.
- THORPE, T. A., HARRY, I. and KUMAR, P. 1991. Application of Micropropagation to Forestry. In: Micropropagation. Technology and Application. Debergh & Zimmerman (Eds.): 311-336. Kluwer Academic Publishers.
- VIEITEZ, A. M., BALLESTER, A., VIEITEZ, L., SAN JOSE, M. C., VIEITEZ, F. y VIEITEZ, E., 1987. Propagación de especies leñosas por cultivo *in vitro*. Ed. Excma. Diputación de Pontevedra.
- VON ARNOLD, S., ALSTERBORG, E. and WALLEES. B., 1988. Micromorphological studies of adventitious bud formation on *Picea abies* embryos treated with cytokinin. Physiol. Plant., 72: 248-256.
- WINTON, L. and VERHAGEN, S., 1977. Shoots from Douglas-fir cultures. Can. J. Bot., 55: 1246-1250.

Recibido: 18-12-91.

Aceptado: 9-4-92.