

INDUCCION Y CRECIMIENTO DE CULTIVOS DE
TEJIDOS DE *ERYSIMUM SCOPARIUS*

por

J. F. PEREZ FRANCES, E. IGLESIAS, N. SAMARIN y A. C. BLESA

Departamento de Fisiología Vegetal. Facultad de Biología.
Universidad de La Laguna. Tenerife.



PUBLICADO EN
ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA
TOMO XLI, NÚMS. 11-12 — MADRID, 1982



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL
(FISIOLOGIA VEGETAL)
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA
38207 TENERIFE - ISLAS CANARIAS - ESPAÑA

JUAN FELIPE PEREZ FRANCES, PROFESOR TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL DE LA UNIVERSIDAD
DE LA LAGUNA

CERTIFICA que: D. EMETERIO IGLESIAS JIMENEZ, estuvo
trabajando en este Departamento en calidad de alumno
interno y bajo mi dirección, desde noviembre de 1981
hasta octubre de 1982, realizando un trabajo de
investigación con cultivos de células y tejidos in
vitro de Erysimum scoparium, planta endémica del
Archipiégo Canario.

Como consecuencia de ello, se publicó un
trabajo con el título: "Inducción y crecimiento de
cultivos de tejidos de Erysimum scoparium" en la
revista ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA, Tomo
XLI, Núms. 11-12: 2303-2313 (1982).

El Sr. Iglesias mostró en todo momento una gran
dedicación e interés, adquiriendo una buena
experiencia en las técnicas de cultivo in vitro.

Y para que conste y surta a los efectos oportunos y
a petición del interesado, firmo el presente
certificado en la Ciudad de La Laguna a cuatro de
marzo de mil novecientos noventa y dos.



INDUCCION Y CRECIMIENTO DE CULTIVOS DE TEJIDOS DE *ERYSIMUM SCOPARIUS*

MATERIAL Y MÉTODO
p o r

J. F. PEREZ FRANCÉS, E. IGLESIAS, N. SAMARIN y A. C. BLESÁ

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología,
Universidad de La Laguna, Tenerife.

SUMMARY

INDUCTION AND GROWN OF *ERYSIMUM SCOPARIUS* (Brouss. ex willd.) Wettst. TISSUE CULTURES

The induction and growth of tissue cultures from young stems and leaves of *E. scoparium* on chemically defined nutrient media has been studied. Callus induction from the initial explants required only a Murashige and Skoog solid medium with sucrose and 10^{-5} M indol-3yl-acetic acid (IAA) or 10^{-5} M 2-4-Dichlorophenoxyacetic acid (2-4-D).

Leaves, stems and roots were observed from callus cultured on the basal medium with 10^{-5} M IAA and 10^{-7} M 2-4-D. High levels of 2-4-D (10^{-5} or 10^{-3}) produced unorganized (undifferentiated) callus. On the other hand, media containing complex natural extracts were better in the maintenance of unorganized callus cultures. Changes in the ratio auxin/kinetin were also important.

INTRODUCCIÓN

A lo largo del presente siglo, los trabajos de numerosos investigadores han conducido a la obtención de cultivos de órganos, tejidos y células en suspensión de numerosas plantas superiores. Estos cultivos han sido empleados, no solo en la Investigación Fundamental (Gautheret, 1959; Street, 1977), sino también para fines Agrícolas Murashige, 1974, 1978) y Farmacológicos (Zenk, 1978).

Han resultado ser factores fundamentales en la iniciación de los cultivos y en su propagación, la composición del medio nutritivo y las condiciones ambientales, pero además, ha sido necesario tener en cuenta las características del explante inicial y las de la planta de la cual procede (Tran Thanh Van, 1981; Murashige, 1974).

El presente trabajo describe las primeras experiencias destinadas a la inducción y establecimiento de cultivos de callos de *E. scoparium* (Brouss. ex Willd.) Wettst. (Eriksson et al., 1979; Mendoza Heuer, 1972), planta endémica del Archipiélago Canario, conocida vulgarmente como Alhelí del Teide y que contiene dos interesantes glucósidos cardíacos: El arguayósido y el taucidósido (González y Luque Escalona, 1975).

Algunas plantas taxonómicamente emparentadas con *E. scoparius* han sido cultivadas *in vitro*: *Cheiranthus cheiri* var. Goliath (Khanna y Staba, 1970); *Armoracia rusticana* y *Brassica oleracea* (Wurm, 1960); *Sinapis alba* L. (Bajaj y Bopp, 1972); etc. Algunos de estos trabajos, al igual que el nuestro, han estado orientados a establecer las condiciones de cultivo *in vitro* necesarias para su utilización en el estudio de la expresión del metabolismo secundario como un proceso de diferenciación celular (Luckner, 1980).

MATERIAL Y MÉTODO

1. Material.

Tallos jóvenes.—Se escogieron tallos jóvenes procedentes de plantas adultas y sanas en periodo de floración (junio, 1981) y que no estaban suberificados.

Hojas.—Las hojas procedían de cultivos *in vitro* obtenidos a partir de los tallos jóvenes y que presentaron regeneración durante el cultivo.

2. Esterilización del material biológico.

Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones asépticas utilizando una cámara de flujo laminar (mod. CRUMA CAPTAIR 2005-HPS), para trabajar en dichas condiciones. Los tallos jóvenes recolectados fueron divididos en segmentos de 10 cm. de longitud, sumergiendo sus extremos en parafina caliente. A continuación se sumergieron en alcohol etílico del 95% durante un segundo y se transfirieron a hipoclorito cálcico (20 g/l) durante 5 minutos. Después de la esterilización, los tallos fueron enjuagados tres veces consecutivas con agua bidestilada estéril.

3. Siembra de los explantes.

Los fragmentos de tallos jóvenes esterilizados, fueron divididos en segmentos de 2 cm. de longitud y sembrados verticalmente respetando su polaridad en tubos de ensayo (30 mm. de diámetro × 160 mm. de longitud) conteniendo el medio nutritivo solidificado y estéril.

Los cultivos se colocaron en cámaras a 25° C, luz continua procedente de tubos fluorescentes (Plant-GRO, 40 W, Westinghouse) y 50% de humedad.

4. Medios nutritivos.

Se empleó como medio basal, el de Murashige y Skoog (1962), añadiendo sacarosa (30 g/l) y agar (10 g/l). Este medio basal fue suplementado con ácido 3-indolacético (AIA), ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2-4-D) y kinetina dependiendo de las experiencias y a las concentraciones descritas en el apartado de resultados. En la propagación de los cultivos se emplearon, además de los medios descritos anteriormente, tres medios complejos utilizados en nuestro laboratorio en otras investigaciones y denominados MB IV, MB V y MB VI. Todos contenían el medio mineral de Murashige y Skoog con los suplementos descritos en la Tabla I. El medio MB IV es un medio definido químicamente conteniendo una mezcla de aminoácidos y vitaminas. Los medios MB V y MB VI contienen además, extractos

T A B L A 1

Medios complejos utilizados en algunas experiencias de cultivo in vitro de E. scoparius

Componentes	MB IV	MB V	MB VI
Solución mineral	MyS(a)	MyS (a)	MyS (a)
Sacarosa	30 g/l	30 g/l	30 g/l
Mesoinositol	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
Aspargagina	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
Piridoxina	5 × 10 ⁻⁷	5 × 10 ⁻⁷	5 × 10 ⁻⁷
Tiamina	5 × 10 ⁻⁷	5 × 10 ⁻⁷	5 × 10 ⁻⁷
Acido nicotínico	5 × 10 ⁻⁶	5 × 10 ⁻⁶	5 × 10 ⁻⁶
Arginina	2 × 10 ⁻⁶	2 × 10 ⁻⁶	2 × 10 ⁻⁶
Glicina	2 × 10 ⁻⁶	2 × 10 ⁻⁶	2 × 10 ⁻⁶
Acido fólico	5 × 10 ⁻⁷	5 × 10 ⁻⁷	5 × 10 ⁻⁷
Biotina	5 × 10 ⁻⁸	5 × 10 ⁻⁸	5 × 10 ⁻⁸
Urea	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
Acido ascórbico	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
Levadura	—	5 × 10 ⁻⁶	—
Hidrolizado de caseína	—	—	2 × 10 ⁻³
Kinetina	5 × 10 ⁻⁷	5 × 10 ⁻⁷	5 × 10 ⁻⁷
2-4-D	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶

(a) MyS = Medio mineral de Murashige y Skoog (1962).

naturales complejos (levadura e hidrolizado de caseína). Todos los medios después de llevarse a pH 5.7-5.8, se autoclavaron a 120° C y 0,5 Kg/cm² de presión durante 20 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Resultados de diferentes tratamientos de esterilización de los explantes iniciales.

El tratamiento de esterilización más idóneo para los tallos jóvenes no suberificados extirpados de las plantas de *E. scoparius* utilizadas en las presentes experiencias, fue la inmersión de éstas en hipoclorito cálcico (20 g/l) durante 5 minutos (Tabla 2). Tiempos inferiores de tratamiento no fueron muy efectivos en la esterilización de la superficie de los tallos, conduciendo a un elevado porcentaje de

T A B L A I I

Esterilización de segmentos de tallos jóvenes de E. scoparius: Comparación de diferentes tratamientos con hipoclorito cálcico a los 38 días de la siembra

Tiempo de esterilización	1 min.	5 min.	10 min.	5 min.	10 min.
Concentración de hipoclorito	20 g/l	20 g/l	20 g/l	60 g/l	60 g/l
% de explantes no necrosados	(a)	83	5	0	0
% de contaminación	38	2	0	0	0

(a) Los explantes no contaminados no presentaron necrosis.

contaminación de los cultivos. Los tratamientos utilizando tiempos superiores de esterilización o mayores concentraciones de hipoclorito, condujeron al necrosamiento de los explantes.

II. Inducción de callos.

1. Inducción de callos a partir de segmentos de tallos jóvenes.

Los explantes crecidos en el medio basal conteniendo AIA 10^{-5} M, formaron callos de color verde claro en la zona del explante en contacto con el medio. Los primeros síntomas de aparición de callos, se detectaron a los 20-22 días de la siembra. Los explantes procedían de plantas en la fase de floración, no pudiendo concluirse si este tiempo es válido, en general, para cualquier explante procedente de la planta en otra fase de desarrollo. Frecuentemente, la duración de la fase de inducción, varía dependiendo del estado fisiológico de las células del explante inicial y de las condiciones de cultivo (Aitchison et al. 1977).

A las seis semanas de la aparición de los callos, éstos habían ocupado totalmente el espacio disponible en el tubo, siendo propagados a medio fresco. Su crecimiento ha sido bastante vigoroso, manteniéndose en general, el color verde inicial después de 10 meses de cultivo.

La sustitución del AIA 10^{-5} M por 2-4-D 10^{-5} M, también provocó el mismo efecto inductivo aunque no disponemos todavía de suficientes datos cuantitativos para establecer comparaciones (Lámina 1A y C).

El 2-4-D 10^{-5} M ha resultado también efectivo en la inducción de callos a partir de plántulas de *E. scoparius*, germinadas en condiciones estériles (según resultados no publicados).

Las experiencias descritas demuestran que *E. scoparius* puede incluirse en el grupo de plantas que requieren únicamente un medio de inducción de callos sencillo y conteniendo una auxina como el AIA o un regulador de crecimiento relacionado como el 2-4-D.

2. Inducción de callos a partir de hojas.

Hojas estériles obtenidas por regeneración a partir de cultivos *in vitro* (Lámina 1B y F), han mostrado ser excelentes para la formación de callos. Estos crecieron en la zona basal de la hoja en contacto con el medio de cultivo, presentando también color verde y no detectándose por ahora, diferencias significativas con respecto a los procedentes de segmentos de tallos jóvenes.

III. Crecimiento y Morfogénesis.

1. Efectos del AIA y Kinetina.

Cuando los callos se cultivaron en un medio con AIA 10^{-5} M, su crecimiento fue bastante aceptable aunque con el tiempo, se detectaron fenómenos de diferenciación y morfogénesis (Lámina 1A).

Al cabo de 26 días de cultivo, se detectaron zonas de color crema en algunos callos que fueron aumentando con la edad del cultivo (fig. 1). Esto es ciertamente un fenómeno de diferenciación entre células que todavía contienen clorofila y otras que influenciadas probablemente por las condiciones de cultivo, han perdido esa capacidad.

Cuando al medio anterior se le añadió kinetina 10^{-7} M, el porcentaje de cultivos que presentaron color crema fue aproximadamente la mitad. Es conocido que diversos factores además de las condiciones de luz, afectan al contenido de clorofila de los cultivos de tejidos, incluyendo las auxinas y citoquininas. La kinetina concretamente, estimula la síntesis de clorofila (Kaul y Sabharwal, 1971).

La presencia de AIA 10^{-5} M y Kinetina 10^{-7} M en el medio, provocó un aumento considerable en el grado de organización, observándose la formación de hojas, tallos y raíces (Lámina 1B). Estos resultados están de acuerdo con los ya clásicos de Skoog y Miller (1957) que demostraron que el balance de auxina/citoquinina en el medio de cultivo, podía controlar la morfogénesis.

La aparición de raíces se detectó a los 26 días de cultivo (fig. 2), aumentando rápidamente el número de cultivos que las presentaron. A los 80 días de la siembra, no se observaron diferencias significativas en relación con la producción de raíces en los dos medios utilizados. Además, no sabemos todavía si todas las raíces son funcionales. Por otro lado, es un hecho conocido que en diversos cultivos, la eliminación de auxinas del medio provoca la formación de raíces y tallos (Bhandary et al., 1969) y podríamos suponer que en un cultivo mantenido largo tiempo en el mismo medio, ha agotado prácticamente su contenido hormonal. La formación de tallos, sin embargo, ocurre ya en las primeras semanas. Experimentos en este sentido se llevan a cabo actualmente en nuestro laboratorio.

La formación de raíces es muy frecuente en cultivo de tejidos pero no tanto la formación de hojas (Reinert et al., 1977). La excelente capacidad de regeneración mostrada por los cultivos de *E. scoparius* se ve reforzada además, por su facilidad para iniciar cultivos de células en suspensión creciendo en medios líquidos químicamente definidos (resultados no publicados).

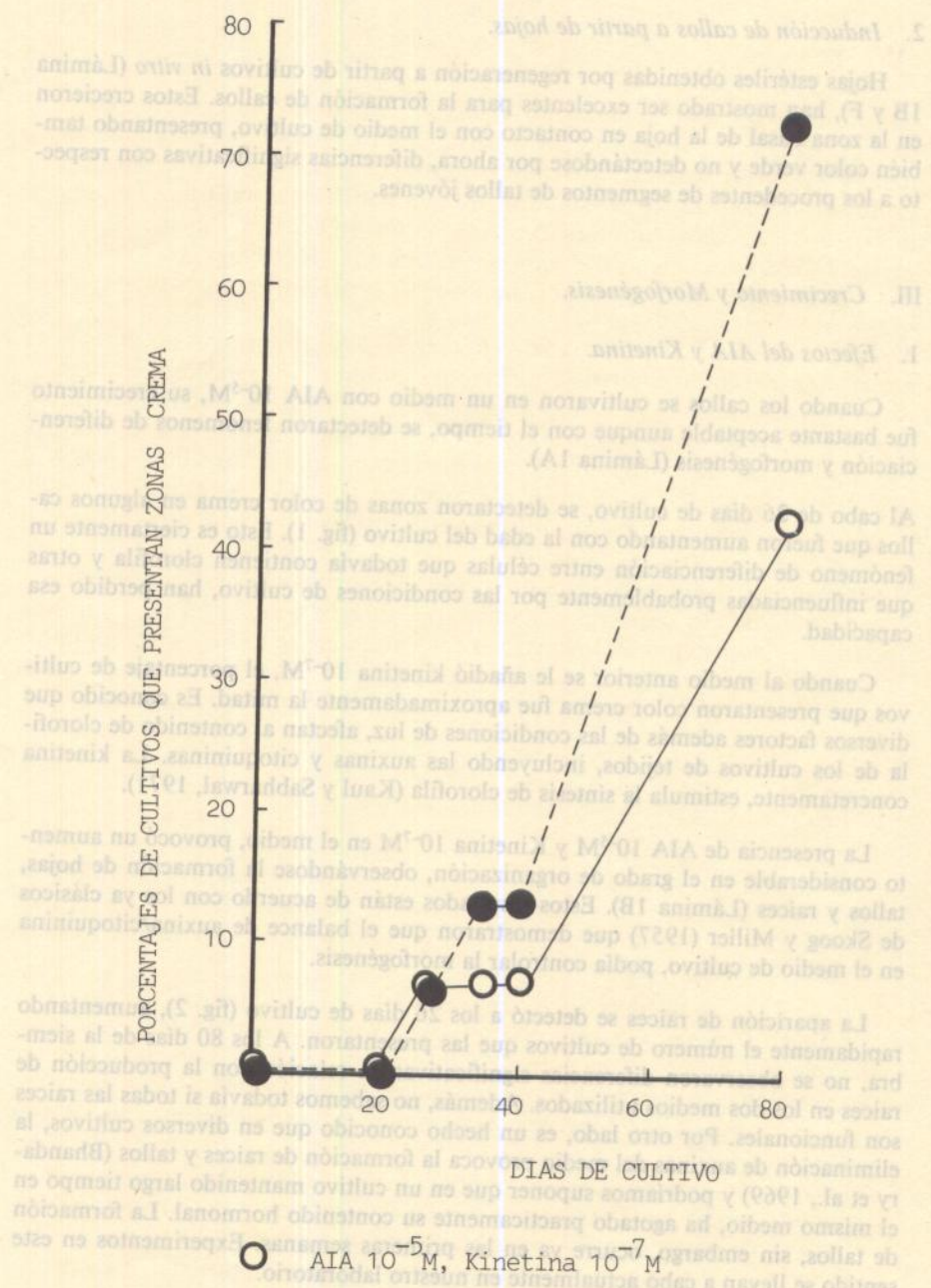


FIG. 1.—Aparición de zonas de color crema en relación con la edad de los cultivos de callos verdes de *E. scoparius* en presencia de dos tratamientos hormonales.

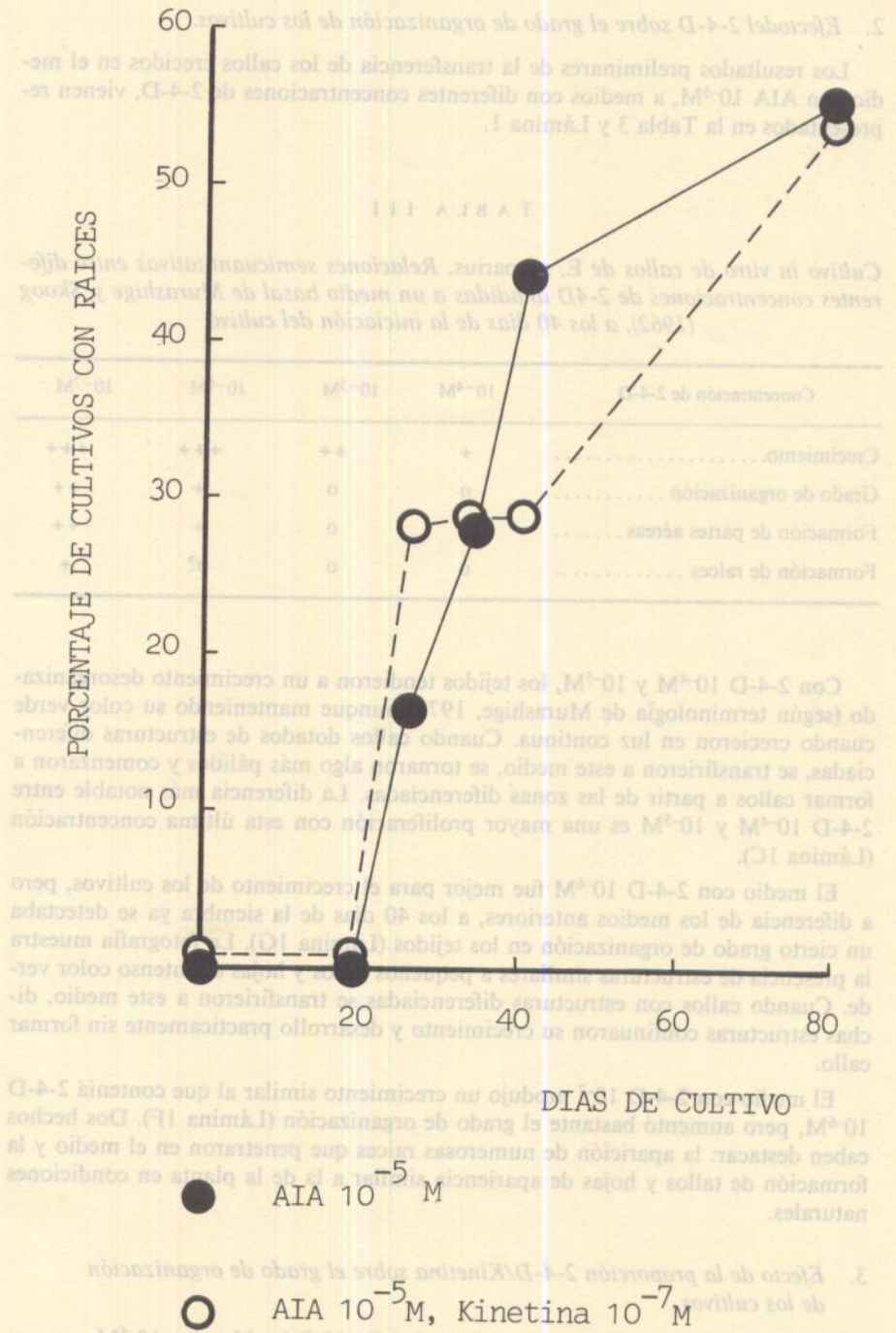


FIG. 2.—Porcentajes de cultivos *in vitro* de *E. scoparius* con raíces, durante 80 días de cultivo.

2. Efecto del 2-4-D sobre el grado de organización de los cultivos.

Los resultados preliminares de la transferencia de los callos crecidos en el medio con AIA 10^{-5} M, a medios con diferentes concentraciones de 2-4-D, vienen representados en la Tabla 3 y Lámina 1.

T A B L A III

Cultivo in vitro de callos de E. scoparius. Relaciones semicuantitativas entre diferentes concentraciones de 2-4D añadidas a un medio basal de Murashige y Skoog (1962), a los 40 días de la iniciación del cultivo

Concentración de 2-4-D	10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M	10^{-7} M
Crecimiento.....	+	++	+++	+++
Grado de organización.....	o	o	+	++
Formación de partes aéreas.....	o	o	+	++
Formación de raíces.....	o	o	o?	+

Con 2-4-D 10^{-4} M y 10^{-5} M, los tejidos tendieron a un crecimiento desorganizado (según terminología de Murashige, 1974) aunque manteniendo su color verde cuando crecieron en luz continua. Cuando callos dotados de estructuras diferenciadas, se transfirieron a este medio, se tornaron algo más pálidos y comenzaron a formar callos a partir de las zonas diferenciadas. La diferencia más notable entre 2-4-D 10^{-4} M y 10^{-5} M es una mayor proliferación con esta última concentración (Lámina 1C).

El medio con 2-4-D 10^{-6} M fue mejor para el crecimiento de los cultivos, pero a diferencia de los medios anteriores, a los 40 días de la siembra ya se detectaba un cierto grado de organización en los tejidos (Lámina 1G). La fotografía muestra la presencia de estructuras similares a pequeños tallos y hojas de intenso color verde. Cuando callos con estructuras diferenciadas se transfirieron a este medio, dichas estructuras continuaron su crecimiento y desarrollo prácticamente sin formar callo.

El medio con 2-4-D 10^{-7} produjo un crecimiento similar al que contenía 2-4-D 10^{-6} M, pero aumentó bastante el grado de organización (Lámina 1F). Dos hechos caben destacar: la aparición de numerosas raíces que penetraron en el medio y la formación de tallos y hojas de apariencia similar a la de la planta en condiciones naturales.

3. Efecto de la proporción 2-4-D/Kinetina sobre el grado de organización de los cultivos.

Los callos cultivados en un medio con 2-4-D- 10^{-5} M y kinetina 10^{-5} M, presentaron un grado de organización menor (Lámina 1D) que en el medio con solo 2-4-D 10^{-5} M (Lámina 1C).

Cuando la concentración de kinetina se bajó a 10^{-7} M (2-4-D 10^{-5} M, kinetina 10^{-7} M), diversas regiones de los callos formaron estructuras diferenciadas similares a pequeños tallos y hojas (Lámina 1J). Estos resultados son similares a los obtenidos empleando AIA en lugar de 2-4-D.

4. Efecto de medios nutritivos complejos.

El medio químicamente definido MB IV (Tabla 1), disminuyó considerablemente el grado de organización de los callos (Lámina 1E) aunque estos presentaron color verde intenso.

Los medios indefinidos MB V (con extracto de levadura) y MB VI (con hidrolizado de caseína, presentaron resultados similares al MB IV (Lámina 1H y I).

Estos primeros resultados nos indican claramente que los mecanismos de control de la expresión genética en cultivos in vitro de tejidos de *E. scoparius*, pueden ser modificados por variaciones en las condiciones nutricionales y balances hormonales. Esta idea puede ser extendida a la expresión del metabolismo de los glucósidos cardíacos que contiene la planta, si establecemos el «lenguaje» adecuado sometiéndola a condiciones ambientales y nutricionales específicas. Posteriores experiencias son necesarias para aproximarnos a los procesos desencadenantes de los programas de diferenciación y morfogénesis en *E. scoparius*.

CONCLUSIONES

- 1.º *Erysimum scoparius* (Brouss. ex Willd.) Wettst. puede incluirse en el grupo de plantas que forman callos a partir de explantes sembrados en un medio mineral (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con una fuente de carbono (sacaroza) y una auxina (AIA o 2-4-D).
- 2.º Los cultivos de callos de la planta mostraron una gran capacidad de regeneración formando hojas, tallos y raíces, por lo que constituyen un excelente sistema para el estudio de procesos de diferenciación celular y morfogénesis en plantas superiores.
- 3.º La concentración de 2-4-D en el medio de cultivo influyó notablemente sobre el grado de organización de los callos. Concentraciones relativamente altas (10^{-4} y 10^{-5} M), impidieron en gran parte, la aparición de procesos de morfogénesis, mientras que concentraciones relativamente bajas (10^{-6} y 10^{-7} M) los estimularon.
- 4.º El balance auxina/kinetina influyó grandemente en el grado de organización, aumentando ésta cuando la concentración de auxina fue 10^{-5} M y de Kinetina 10^{-7} M y disminuyendo cuando ambas clases de hormonas estuvieron presentes a la concentración 10^{-5} M.
- 5.º La utilización de medios más complejos con aminoácidos, vitaminas y extractos naturales, condujo a la formación de callos con alto grado de desorganización.
- 6.º Los presentes resultados contribuyen a apoyar el concepto de que la expresión de la información genética en plantas superiores, puede ser modificada por la aplicación exógena de reguladores de crecimiento y medios nutritivos adecuados.

Lámina 1. Efectos de diferentes tratamientos hormonales y compuestos orgánicos sobre el crecimiento y morfogénesis de cultivos *in vitro* de *E. scoparius* crecidos en luz continua. Todos los cultivos contenían el medio mineral de Murashige y Skoog (1962) con sacarosa (30 g/l) y agar (10 g/l) suplementado con: (A) AIA 10^{-5} M; (B) AIA 10^{-5} M; (BF1) AIA 10^{-5} M y Kinetina 10^{-7} M; (C) 2-4-D 10^{-5} M; (D) 2-4-D 10^{-5} M y Kinetina 10^{-5} ; (E) MB IV, ver tabla 1, (F) 2-4-D 10^{-7} M; (G) 2-4-D 10^{-6} M; (H) MB V, ver Tabla 1; (I) MB VI, ver Tabla 1; (J) 2-4-D 10^{-5} M y Kinetina 10^{-7} M.

RESUMEN

Se estudió la inducción y crecimiento de cultivos tejidos derivados de tallos jóvenes y hojas de *Erysimum scoparius* (Brouss. ex Willd.) Wettst. en medios nutritivos químicamente definidos. La inducción de callos a partir de los explantes iniciales requirió únicamente un medio sólido de Murashige y Skoog con sacarosa y ácido 3-indolacético (AIA) 10^{-5} M o ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2-4-D) 10^{-5} M.

Se observaron hojas, tallos y raíces en callos cultivados en el medio basal con AIA 10^{-5} M y kinetina 10^{-7} M o con 2-4-D 10^{-7} M. Altas concentraciones de 2-4-D (10^{-4} , 10^{-5} M) produjeron tejidos desorganizados. Por otro lado, los medios indefinidos conteniendo extractos naturales complejos, fueron mejores para el mantenimiento de un estado no organizado en los callos. Cambios en la proporción de auxina/kinetina fueron también importantes.

BIBLIOGRAFIA

- AITCHISON, P. A., A. J. MACLEOD y M. M. YEOMAN. 1977. Growth Patterns in Tissue (Callus) Cultures. En: Plant Tissue and Cell Culture. Ed. H. E. Street. Blackwell Scien. Publ. 267-306.
- BAJAJ, Y. P. S. y M. BOPP. 1972. Growth and organ formation in *Sinapis alba* tissue cultures. Z. Pflanzphysiol. 66: 378-381.
- BHANDARY, R., H. A. COLLIN, E. THOMAS y H. E. STREET. 1969. Root, Callus and Cell Suspension Cultures from *Atropa belladonna*, L. and *Atropa belladonna*, Cultivar lutea Doll. Ann. Bot. 33: 647-656.
- ERIKSSON, O., A. HANSEN y P. SUNDING. 1979. Flora of Macaronesia. Checklist of vascular plants. 2^o rev. Ed. Part I. Botanical Garden and Museum. Univ. of Oslo.
- GAUTHERET, R. J. 1959. La culture des Tissus Végétaux, Techniques et Réalisations. Masson Cie. Paris.
- GONZÁLEZ, A. G. y M. LUQUE ESCALONA. 1975. Nuevos glicósidos cardíacos del *Cheiranthus scoparius* Brouss. An. Quím. 71: 97-103.
- KAUL, K. y P. S. SABHARWAL. 1971. Effects of sucrose and Kinetin on grown and chlorophyll synthesis in tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 47: 691-695.
- KHANNA, P. y E. J. STABA. 1970. In vitro Physiology and Morphogenesis of *Cheiranthus cheiri* var. Clott of Gold and *C. cheiri* var. Goliath. Bot. Gaz. 131: 1-5.
- LUCKNER, M. 1980. Expression and Control of Secondary Metabolism. En: Secondary Plant Products. Eds. E. A. Bell y B. V. Charlwood. Encyclopedia of Plant Physiology. Springer-Verlag. 8: 23-63.
- MENDOZA-HEUER, I. 1972. A cerca del Género *Erysimum* (Cruciferae) en la zona Macaronésica. Cuad. Bot. Canar. XIX/XV, 72: 17-26.
- MURASHIGE, T. y F. SKOOG. 1962. A revised Medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant Propagation through Tissue Cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.

- MURASHIGE, T. 1978. The Impact of Plant Tissue Culture on Agriculture. En: Frontiers of Plants Tissue Culture. Ed. T. A. Thorpe. IAPTC 1978. Univ. of Calgary. Canada.
- REINERT, J., P. S. BAJAJ y B. ZBELL. 1977. Aspects of Organization, organogenesis, Embryogenesis, Cytodifferentiation. En Plant Tissue and Cell Culture. Ed. H. E. Street. Blackwell Scien. Publ. p. 393.
- SKOOG, F. y C. O. MILLER. 1957. Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissues Cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-130.
- STREET, H. E. 1977. Plant Tissue and Cell Culture. 2nd ed. Blackwell Sc. Publ. London.
- TRAN THAN VAN, K. M. 1981. Control of Morphogenesis in vitro Cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 32: 291-311.
- WURM, G. 1960 Flora. 149: 43-76.
- ZENK, M. H. 1978. The Impact of Plant Cell Culture on Industry. En: Frontiers of Plant Tissue Culture. Ed. T. A. Thorpe. IAPTC 1978. Univ. of Calgary. Canada.

Recibido para publicación: 13-IV-1982.