

20/1/85

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
B I O L O G I A

ANALISIS DE LA RESPUESTA MORFOGENETICA IN VITRO
DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA (LAM.) DE WIT CV. PERU

T E S I S P R O F E S I O N A L

ALICIA MAZARI HIRIART

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN

1.	INTRODUCCION	1
2.	ANTECEDENTES	3
2.1.	<u>Leucaena leucocephala</u>	3
2.1.1.	Descripción	3
2.1.2.	Clasificación	4
2.1.3.	Habitat	6
2.1.4.	Usos	7
2.1.5.	Aspectos Citológicos	8
2.2.	Cultivo de Tejidos Vegetales	8
2.2.1.	Generalidades	8
2.2.2.	Potencialidad	15
2.2.3.	Cultivo de Tejidos Vegetales de Leguminosas	16
2.2.4.	Cultivo de Tejidos Vegetales de <u>Leucaena</u> <u>leucocephala</u>	18
3.	MATERIALES Y METODOS	20
3.1.	Medio de Cultivo	20
3.2.	Material Biológico (Explantos)	22
3.3.	Siembra	24
3.4.	Condiciones Ambientales	24
3.5.	Cultivos en Suspensión	25
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	27
5.	CONCLUSIONES	60
	BIBLIOGRAFIA	61

ABREVIATURAS

AIA	= ácido indolacético
AIB	= ácido indolbutírico
ANA	= ácido naftalenacético
BA	= benciladenina
CTV	= cultivo de tejidos vegetales
2,4-D	= ácido 2,4-diclorofenoxiacético
K	= kinetina
Z	= zeatina

RESUMEN

En el presente trabajo se analizó la respuesta morfogénica in vitro de Leucaena leucocephala Cv. PERU.

Este análisis se realizó cultivando distintos explantes: folíolos maduros, folíolos inmaduros, raíces con cofia, raíces sin cofia, hipocótilo, cotiledón, tallo joven, embrión y meristemas apicales, así como células en suspensión.

El medio utilizado fue el MS adicionado con las vitaminas del B5.

Se estudió el efecto de los reguladores de crecimiento BA, ANA y 2,4-D sólo o en combinación a diferentes concentraciones.

Al agregar agua de coco al medio de cultivo, no se observó ningún efecto benéfico.

En todos los explantes analizados se indujo la formación de callo, los folíolos maduros fueron los que dieron los mejores resultados. Se observó una respuesta morfogénica en los embriones, meristemas apicales, cotiledones y folíolos maduros.

Al cultivar embriones y cotiledones, éstos difundieron una sustancia anaranjada al medio que pareció inhibir el crecimiento.

La oxidación se presentó en todos los tejidos y fue un grave problema que ocasionó necrosis, lo que limitó el crecimiento y probablemente la respuesta morfogénica.

Al intentar desarrollar cultivos en suspensión se detectó una alta mortalidad ocasionada probablemente por sustancias tóxicas liberadas por las células al medio, los procedimientos realizados para controlar esta toxicidad, no dieron resultado.

La conclusión principal de este trabajo es la demostración de la capacidad de respuesta morfogénica de algunos de los explantes de esta leguminosa, que si bien se presentaron en baja frecuencia, implican una potencialidad que debe continuar explorándose en estudios futuros.

1. INTRODUCCION

El cultivo de tejidos vegetales consiste de una serie de técnicas para crecimiento in vitro de órganos y tejidos vegetales (Gamborg y Wetter, 1975) y el éxito de la tecnología y aplicación de los métodos in vitro es debido en gran parte a un mejor entendimiento de los requerimientos nutricionales de las células y los tejidos cultivados (Gamborg, 1982).

Las aplicaciones de esta metodología cubren una amplia gama, como por ejemplo en agricultura; hibridación, desarrollo de variedades y otras modificaciones genéticas, establecimiento de plantas libres de patógenos y propagación clonal (Murashige, 1978). Además, se intentan resolver problemas relacionados con fisiología, bioquímica, citología, establecimiento de bancos de germoplasma, fitomejoramiento, etc.

El cultivo de tejidos vegetales se basa en la teoría de la totipotencialidad celular, es decir, cada célula de un individuo contiene toda la información genética requerida para generar un individuo idéntico al progenitor (Luckwill, 1979). Así, la técnica se ha dirigido al proceso de morfogénesis de novo de estructuras y funciones (Tran Thanh Van, 1981).

En la actualidad se ha experimentado con gran número de especies, no obstante hay muchas en las cuales el éxito no se ha conseguido (Mroginiski y Kartha, 1984).

El mecanismo de fertilización o de fecundación controlada como sistema de mejoramiento, determina el enfoque que los fitomejoradores deben adoptar para el mejoramiento genético y debe ser siempre una consideración básica en los métodos de manipulación y recolección de semillas, así como de muestreo. La estabilidad genética con este sistema, requerirá de muchas generaciones y de la producción de grandes poblaciones para selección de especies (Brewbaker, 1982).

En este caso, se puede utilizar la técnica de cultivo de tejidos vegetales como una herramienta para la obtención de híbridos y selección

de variantes de las especies, utilizando técnicas como el cultivo de meristemos que proporciona material clonado, la embriogénesis somática, el cultivo de protoplastos y la obtención de híbridos somáticos, el cultivo de embriones in vitro para superar la incompatibilidad post-cigótica y evitar la mortalidad, el cultivo de anteras para la producción de haploides, etc.; pudiéndose lograr ésto en un período de tiempo menor que el necesario en condiciones convencionales.

La estabilidad genética es importante en el material experimental, sin embargo un incremento en la variabilidad genética disponible puede tener un enorme potencial desde el punto de vista de mejoramiento de cultivos.

La aplicación del cultivo de tejidos vegetales para el mejoramiento de cultivos sólo se justifica si el proyecto no puede llevarse a cabo por técnicas convencionales o si puede llevarse a cabo en un período de tiempo menor.

La respuesta morfogenética, que se entiende como el desarrollo de plántulas, brotes, raíces, etc., que conduzca a obtener plántulas viables, es el primer requisito para aplicar posteriormente la metodología del cultivo de tejidos vegetales a estudios de fitomejoramiento, propagación masiva, obtención de híbridos intra e interespecíficos, etc. Por esta razón es importante establecer el cultivo tanto de células como de tejidos de aquellas especies que tienen una amplia aplicación potencial.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene por objeto analizar la respuesta in vitro de células y tejidos de Leucaena leucocephala Cv. PERU.

2. ANTECEDENTES

2.1. Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit

2.1.1. Descripción

El género Leucaena o guaje comprende plantas arbóreas o arbustivas sin espinas, que incluye especies de crecimiento rápido (L. leucocephala y L. esculenta), que alcanzan su estado reproductivo y de producción en 1 ó 2 años; de 1 a 18 metros de altura, con tallos y ramas de corteza lisa o ligeramente fisurada, de sabor amargo. Las ramas poseen abundantes lenticelas elípticas, de color amarillento. Las hojas son bipinnadas y pecioladas, cuyo tamaño varía de 5 a 30 cm; el número de pinnas varía de 2 hasta más de 60. Los folíolos de la sección Leucaena (Zárate, 1982) son en general oblongos, pudiendo ser lineares o elípticos, miden de 2 a 12 mm de largo y menos de 1 cm de ancho. En la sección Macrophylla (Zárate, 1982), son mayores, 1 a 7 cm de largo y más de un cm de ancho, excepto L. shannonii en su forma de folíolos angostos (Zárate, 1982). Las inflorescencias son capítulos más o menos esféricos, a veces ligeramente en sentido longitudinal. La disposición de las inflorescencias es en fascículos axilares. Los frutos son vainas aplanadas, dehiscentes, de tamaño y textura variable entre especies. El color varía desde moreno claro o amarillento a rojo escarlata, la textura va desde papirácea o cartácea hasta subcoriácea. El interior del fruto presenta con frecuencia falsos septos. Pueden haber varios o muchos frutos en una inflorescencia, en L. leucocephala suelen ser más de 20 frutos en una inflorescencia. Las semillas son casi planas, ligeramente biconvexas, su contorno es oval a orbicular siempre apiculadas hacia el extremo del micrópilo. Miden de 0.5 a 1 cm de largo y alrededor de 0.5 cm de ancho. La testa es dura, a veces muy endurecida y gruesa, con aspecto seroso. Se producen una gran cantidad de semillas viables por varios años, que cuando maduran son de color oscuro (Pérez Guerrero, 1979). No se conoce latencia.

las semillas pueden germinar en cualquier momento siempre que se imbiban con agua. Para que germinen rápidamente es necesario remover parcialmente la testa escarificándola de alguna manera (Zárate, 1982). Se han descrito métodos de escarificación con agua caliente y fría, a diferentes tiempos (Olvera y West, 1980), así como tratamientos con ácido sulfúrico, con calor, o bien de escarificación mecánica utilizando una lija (Kretschmer, 1979).

Todas las especies presentan mimosina en cantidades variables, un alcaloide tóxico con efecto antimitótico. La mayor concentración de este compuesto se encuentra en las hojas tiernas (Pérez Guerrero, 1979), se encuentra también en niveles altos en otros tejidos. Se ha reportado que las hojas contienen más de 4 % de mimosina en peso seco, un nivel que induce síntomas tóxicos que limitan el uso de estas plantas como forraje, provoca la depilación severa de caballos y borregos y una reducción en la producción de huevos de aves de corral (González et al., 1967).

Por otra lado, las raíces de Leucaena viven en simbiosis con una bacteria del género Rhizobium, la cual tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico del suelo y hacerlo así aprovechable para la planta.

La Leucaena leucocephala por lo general se propaga por semillas. Los porcentajes de germinación reportados para semillas no escarificadas varían de 2 a 12 %. Algunos árboles de menos de un año producen semillas viables. Estas pueden permanecer viables desde varios meses hasta algunos años. También es posible la propagación vegetativa, sin embargo al propagar por estacas la sobrevivencia es muy baja y el crecimiento muy lento (Pérez Guerrero, 1979).

2.1.2. Clasificación

Se han publicado 51 nombres específicos en Leucaena, sin embargo, por estudios de herbario y de campo se sugiere que se agrupen en once, de los cuales, nueve son nativos de México (L. leucocephala, L. diversifolia, L. esculenta, L. macrophylla, L. pulverulenta, L. lanceolata, L. retusa, L. greggii y L. cuspidata), uno originario de Sudamérica (L. trichodes) y uno probablemente nativo de Centroamérica (L. shannonii) (Zárate

te, 1982).

La especie Leucaena leucocephala (lam.) de Wit, de la familia Leguminosae y subfamilia Mimosoideae, es probablemente nativa de México, Norte de Centroamérica y Sudamérica, naturalizada desde Bahamas y Cuba hasta Trinidad Tobago, en algunas zonas de Estados Unidos de América así como Brasil y Chile. Además ha sido introducida en Hawaii, Islas del Pacífico y los trópicos del Viejo Mundo (Duke, 1981).

La clasificación taxonómica del material utilizado en el presente trabajo es la siguiente :

Reino Vegetal

División Embryophyta

Subdivisión Angiospermae

Clase Dicotyledonae

Orden Rosales

Familia Leguminosae

Subfamilia Mimosoideae

Tribu Eumimosae

Género Leucaena Benth.

Sección Leucaena Zárate

Especie L. leucocephala (Lam.) de Wit

Subespecie glabrata (Rose) Zárate

Cultivar PERU

Los nombres comunes que recibe L. leucocephala son por ejemplo, "leucaena", "Koa haole" (Hawái), "Ekoa", "Hediondilla", "Zarcilla", "Tanta", "Ipil-Ipil" (Filipinas), "Frijol Jumbie" (Sur de E.U.A.) (Duke, 1981), "Subabul" (India), "Liliaque" en Totonaca.

L. leucocephala subespecie glabrata, conocida como "guaje blanco", en Oaxaca, "ahoaxin", guaje de agua (mexicano), en Guerrero y Puebla, "guaje verde", en Morelos. En Oaxaca se conoce como "da-g-oh" (chatino), Región de Llano Grande, Juquila; "duwa-ba" (mixteco de la costa) Huaxpaltepec, Jamiltepec; "ejote", Región de Pochutla, Pochutla; "guaje", "guaje verde", "guaje blanco", Sola de Vega; "guaje casero" Pochutla; "guajal de Castilla", Pochutla; "li'bad ya-a" (mixteco de la costa). San Felipe Aquiste, Tehuantepec; "ndwa-cuí-i" (mixteco), guaje verde, Mixteca

Alta; "yuanda ta ba-a" (mixteco de la costa) guaje de casa, Jamiltepec (en la costa) (Zárate, 1982).

Leucaena leucocephala es la especie que más se ha estudiado. Se ha reportado gran variación de ecotipos en relación al tamaño de la planta, semillas, inflorescencias y vainas; el número de folíolos, vainas y semillas por vaina; o la longitud de la hoja y de los folíolos; es también la única en la que se han realizado trabajos de selección y mejoramiento; estos trabajos han demostrado la existencia de varias formas de crecimiento clasificadas en tres grupos :

- i. Tipo hawaiano. Arbustos pequeños de floración precoz y bajo rendimiento, típico de la subespecie leucocephala en su área de distribución nativa en la Península de Yucatán.
- ii. Tipo salvadoreño. Árboles de floración tardía, alto rendimiento y con ramas muy esparcidas en la base.
- iii. Tipo peruano. Árboles de floración tardía, alto rendimiento y ramificación abundante desde la base (Zárate, 1982; Pérez Guerrero, 1979).

2.1.3. Habitat

Para su crecimiento Leucaena leucocephala requiere de estaciones largas y calientes. Tolera la sequía. Crece en un amplio intervalo de suelos, pero prospera en suelos arcillosos profundos que son fértiles y húmedos. Tolera el aluminio y suelos bajos en hierro y fósforo. Crece mejor en suelos neutros o alcalinos y pobremente en suelos áridos, a menos que se añada Mo, Ca, S y P. No resiste inundaciones. Sus raíces profundas le permiten soportar muchos tipos de suelos, desde pesados hasta coral poroso. Crece en climas con un intervalo de Caliente Moderado Seco a Húmedo hasta Tropical muy Seco a Húmedo. Se ha reportado una tolerancia de precipitación anual de 1.8 a 41 dm³, temperatura anual de 14.7 a 27.4 °C y pH de 4.3 a 8.7 (Duke, 1981).

En México, Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit subespecie glabrata tiene una amplia distribución, sin duda favorecida por el hombre. Se distribuye en los estados de Sonora, Coahuila, Tamaulipas, San Luis Potosí, Yucatán, Jalisco, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Michoacán, D.F., actualmente

casi desaparecida de esta localidad o muy rara, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Quintana Roo y en Centroamérica, en Nicaragua (Zárate, 1982).

No existe competencia entre plantas en lotes compactos o en lotes donde está asociada con otros cultivos, ya que no compite por nutrientes gracias a su raíz profunda (Pérez Guerrero, 1979).

La tasa de crecimiento está influenciada por la temperatura y la humedad, así como por la fertilidad, textura y pH del suelo. Crece en latitudes diversas y en alturas desde 0 a 1,500 msnm. La tasa de crecimiento y el tamaño de la planta se correlacionan negativamente con la altura sobre el nivel del mar y con la latitud (Pérez Guerrero, 1979).

2.1.4. Usos

Los usos de L. leucocephala son muy diversos. En Agricultura se puede utilizar como mejoradora del suelo, como sombra de cultivos y para control de la erosión. Como mejoradora del suelo, debido a que se puede utilizar como fuente renovable de nitrógeno y por producir un incremento de la materia orgánica y la fertilidad del suelo por la caída de las hojas, puede sustituir así a ciertos fertilizantes químicos. Se ha reportado que los suelos que se encuentran directamente debajo de árboles de leguminosas, muestran un contenido orgánico y de nitrógeno varias veces mayor que suelos próximos (Felker y Bandurski, 1979).

Como sombra de cultivos, tales como café, té, cacao y fibras, ya que no compite por nutrientes. En control de la erosión, debido a las características de la raíz y a su adaptación a terrenos accidentados y rocosos, y por el humus formado gracias a la defoliación de la planta, contribuyendo a reducir la erosión.

Se utiliza en la producción animal, debido al alto valor nutritivo de su follaje; su contenido proteico varía de 4 a 23% en base natural y del 5 al 30 % en base seca. En condiciones de precipitación adecuada o riego se puede considerar una producción de 10.6 y 24 toneladas de materia seca por hectárea.

En reforestación y en la producción de madera, se utiliza con éxito gracias a su rápido crecimiento y a su facilidad para crecer en terrenos

difíciles; además de resistir condiciones naturales adversas. Es una de las fuentes más importantes de combustible, a menudo como carbón vegetal, en América Latina y el Sureste de Asia (Brewbaker, 1975).

Entre otros usos, como fertilizante, como alimento humano, en la producción de pulpa de papel y carbón duro, etc. Al tratar la madera con ácido sulfúrico diluido, se puede producir hasta 50 % de su peso en azúcares que contiene 50 % de proteína adecuado para la alimentación humana y animal (Ortega, 1980).

2.1.5. Aspectos Citológicos

Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit es un árbol interesante desde el punto de vista del fitomejorador, porque es altamente autocompatible y tetraploide ($2n = 104$) (Brewbaker y Hutton, 1979 citado por Brewbaker, 1982). Se ha demostrado que las especies de Leucaena distintas de L. leucocephala y L. diversifolia subespecie diversifolia son autoincompatibles y por tanto de alta frecuencia de polinización cruzada (Brewbaker, 1982), con dos niveles de ploidía y un nivel aneuploide. El número diploide $2n = 52$ para todas las especies con número básico $x = 13$, con la excepción de L. leucocephala y L. pulverulenta ($2n = 56$). Estas dos últimas especies forman híbridos cuya F1 tiene 60 cromosomas con 26 bivalentes y 28 univalentes, parcialmente estériles, cuya F2 tiene números entre 56 y 88 con promedio de 69.3 cromosomas (González et al., 1967). Estos hallazgos indican que la autoincompatibilidad y el nivel cromosómico están vinculados en Leucaena como lo están en muchas otras leguminosas.

2.2. Cultivo de Tejidos Vegetales

2.2.1. Generalidades

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) se inicia en 1902 con los trabajos del fisiólogo alemán Gottlieb Haberlandt (Gautheret, 1982), quien hizo los primeros intentos de cultivar células vegetales aisladas in vitro en un medio nutritivo.

Más tarde, en 1934, White demuestra que el CTV puede ser continuo y teóricamente por tiempo ilimitado al cultivar in vitro ápices de raíz de jitomate (Gautheret, 1982). Ocurren avances subsecuentes en 1939, cuando Gautheret, Nobecourt y White simultáneamente, describen el primer cultivo de tejidos en sentido estricto, al obtener callo con crecimiento potencialmente ilimitado de zanahoria y tejidos tumorales de un híbrido del tabaco (Gautheret, 1982). A partir de este momento, la técnica se empieza a difundir y hay gran progreso en los medios de cultivo permitiendo el cultivo de órganos y callos. Desde 1960 los métodos han mejorado y se ha llegado a técnicas altamente especializadas para cultivar células aisladas, células en suspensión, protoplastos, anteras, etc.

La composición del medio de cultivo es un factor determinante para el crecimiento, así como lo son la edad y tipo de explante, la luz, temperatura, humedad y fotoperíodo. Las células de muchas especies vegetales pueden ser cultivadas en un medio definido, además debe considerarse en algunos casos el uso de un suplemento de aminoácidos o de un extracto vegetal (Dodds y Roberts, 1982).

El medio desarrollado por Murashige y Skoog (MS) (1962) para cultivo de tejidos de tabaco ha sido ampliamente utilizado para el cultivo de callos en agar así como para cultivos de células en suspensión en medio líquido (Gamborg, 1982).

El medio para casi todos los cultivos comprende cinco grupos de componentes : sales inorgánicas, fuentes de carbono, vitaminas, reguladores de crecimiento y suplementos orgánicos (Gamborg et al., 1976; Gamborg, 1982).

Los nutrientes inorgánicos consisten de sales minerales que cubren los requerimientos de macro y micronutrientes, los cuales son N, K, Mg, S, P, Ca, I, B, Mn, Zn, Mo, Cu, Co y Fe.

Como fuente de carbono en general se utiliza sacarosa, que se puede reemplazar por glucosa, fructosa, dextrosa o algunos otros carbohidratos. El myo-inositol puede no ser esencial, pero es añadido rutinariamente ya que ha mostrado que ayuda al crecimiento de callo (Gamborg et al., 1976).

Las vitaminas tienen funciones de cofactor en sistemas enzimáticos y se requieren en pequeñas cantidades. Algunos autores consideran que la tiamina (vitamina B1) puede ser la única vitamina esencial de casi todos

los cultivos; el ácido nicotínico (niacina) y la piridoxina (vitamina B6) puede estimular el crecimiento (Dodds y Roberts, 1982).

Se han probado gran cantidad de complejos orgánicos como suplementos del medio de cultivo. Estos incluyen hidrolizados de proteínas, extractos de levadura, extractos de malta y endospermo de grano, jugos de naranja y jitomate, estos extractos pueden proveer compuestos que mejoran la tasa de crecimiento de las células (Gamborg, 1982).

Los requerimientos de reguladores de crecimiento para la mayoría de los cultivos son auxinas y citocininas. Las auxinas son una clase de compuestos que estimulan la elongación de las células. Las citocininas son compuestos que promueven la división de tejidos vegetales bajo ciertas condiciones, regulando el crecimiento y desarrollo de las células (Dodds y Roberts, 1982).

Las auxinas más frecuentemente usadas son AIA, ANA y 2,4-D. El AIA es una auxina natural, pero desafortunadamente se degrada por oxidación en presencia de luz o por acción enzimática. El ANA es un compuesto sintético, no está sujeto a oxidación. El herbicida 2,4-D es una auxina sintética más potente que el AIA ó ANA y generalmente se puede iniciar la formación de callo en algunos explantes a bajas concentraciones de éste. Una característica poco usual del 2,4-D es que puede actuar, hasta cierto punto, con funciones de auxinas y citocininas. Esto es, los cultivos que requieren tanto auxinas como citocininas exógenas para el crecimiento, frecuentemente responderán al añadir 2,4-D como el único regulador de crecimiento (Dodds y Roberts, 1982).

Entre las citocininas más usadas en el medio de cultivo están la K, BA y Z. Las dos primeras son sintéticas, mientras que el último es natural.

En 1957, Skoog y Miller (Dodds y Roberts, 1982), establecieron la teoría del balance hormonal, según la cual el inicio de plántulas y raíces en el cultivo de callos podía ser regulada por una relación particular de auxinas y citocininas; sin embargo no todas las especies responden igual a este balance hormonal, por lo que se sugiere un barrido previo de los reguladores de crecimiento que disparan determinados procesos, para

determinar las mejores concentraciones y combinaciones hormonales, ya que se desconocen las concentraciones internas de hormonas. Los reguladores de crecimiento juegan un papel importante en el control de la división celular en células vegetales. Sin embargo falta mucho por entender cómo actúan a nivel molecular (Street, 1977b).

A menos que el medio sea líquido para cultivos en suspensión, se prefiere para un medio semisólido o sólido. La mayoría de los cultivos se desarrollan en una base de agar (Dodds y Roberts, 1982).

El crecimiento está relacionado con la temperatura. Sólo en pocos casos se ha estudiado la temperatura óptima; la información existente indica que la temperatura óptima para el crecimiento de callo para muchas especies es de 28 °C (Caldas et al., 1975).

Las células en cultivo requieren de una oxigenación adecuada, debe tenerse especial atención en los cultivos en suspensión donde el medio debe ocupar 20 % del volumen total del matraz. La agitación puede variar entre 100 y 150 RPM.

La luz generalmente no es esencial para el crecimiento de callo o cultivos celulares. El crecimiento del callo en obscuridad a menudo es mayor que en la luz (Caldas et al., 1975). Sin embargo la luz puede tener un profundo efecto en el metabolismo de las células (Gamborg y Shyluk, 1981); además, puede estimular la producción de fenoles, incrementar la actividad enzimática y la producción de pigmentos como carotenoides, antocianinas y clorofila (Caldas et al., 1975).

Además de estos factores, el origen del explante determina el éxito de los cultivos celulares. La mayoría de las células vegetales viables pueden dividirse por mitosis in vitro. La regeneración ha tenido éxito en explantes de cotiledón, hipocótilo, tallo, hoja, meristemas apical, raíz, inflorescencias jóvenes, pétalos, pecíolos, tejido ovular, embriones, etc. (Evans et al., 1981).

En muchos cultivos la primera respuesta es la formación de callo. Este, de acuerdo a los tratamientos, al tipo de explante y especie, puede variar en su textura, friabilidad y coloración. Puede ser blanco o amarillo pálido, clorofílico o pigmentado con antocianinas. Sólo un peque-

no porcentaje de las células de un explante dado, contribuye a la formación de callo. El lugar de inicio del callo generalmente está situado en la superficie del inóculo o en la superficie de corte (Narayanaswamy, 1977).

El promedio del tamaño de las células se incrementa conforme aumenta el tiempo de cultivo. La concentración de reguladores de crecimiento y factores nutricionales también regulan el tamaño de las células. La friabilidad, que es la tendencia a separar una célula de otra, es una propiedad de la pared celular que puede ser incrementada con altas concentraciones de auxinas en el medio de cultivo. También se puede incrementar, disminuyendo la concentración de citocininas y/o añadiendo giberelinas al medio. Un callo friable es esencial para establecer un cultivo en suspensión (Evans et al., 1981).

Una de las dificultades en el cultivo de tejidos de algunas especies de leguminosas es la liberación de polifenoles y productos de oxidación como melanina que pueden ser tóxicos. Además, puede haber un incremento de lignina, suberina o cutina alrededor de la superficie de corte, que puede modificar tanto la composición del medio como la producción de metabolitos (Tran Thanh Van, 1981).

Cuando se cultiva una parte de la planta que tenga un alto contenido de fenoles, puede ser necesario tomar precauciones para prevenir la acumulación de productos tóxicos de oxidación por éstas. Tales precauciones incluyen la adición de antioxidantes en el medio por ejemplo, carbón activado, cisteína, ditiotreitól, glutión, ácido ascórbico, etc. (Caldas et al., 1975).

Los fenoles y las oxidasas fenólicas de tejido intacto del cafeto están situados aparentemente por separado, en compartimentos aislados uno de otro por una célula. Después del corte o senectud del tejido, estos compartimentos se integran y se inicia el proceso de oxidación (Mónaco et al., 1977).

Un requisito fundamental para el establecimiento del CTV es la asepsia, pues de ocurrir contaminación por microorganismos, los cultivos serían destruidos en pocos días; los tejidos pueden obtenerse de plántulas germinadas en condiciones asépticas ya que proveen el material biológico estéril para el inicio del cultivo, o bien se toman los tejidos de plan

tas cultivadas en condiciones ambientales, esterilizándolos antes de la siembra.

El desarrollo del cultivo de tejidos se ha basado en un desarrollo empírico y muchas de las observaciones que se encuentran en la literatura no han sido de células vegetales típicas. Las diferencias del medio de cultivo, el medio ambiente, edad, origen celular y tasas de crecimiento pueden explicar el comportamiento de una línea particular y no las características generales de las células vegetales en cultivo.

Cultivos en Suspensión

Se inician generalmente a partir de callo, introduciéndolos en medio líquido en agitación. Tanto el origen del tejido en cultivo, la composición del medio de cultivo y la especie, determinan la separación óptima de las células. A menudo la separación celular es afectada críticamente por los niveles de reguladores de crecimiento del medio. Se ha reportado que niveles relativamente altos de auxinas incrementan la separación y niveles bajos, la disminuyen (King y Street, 1977).

El grado de agregación depende de las condiciones del cultivo, de la especie o de la línea celular de la especie, que siempre muestran un patrón de cambio similar durante el ciclo de crecimiento (Street, 1977c). Los agregados resultan de la división celular y éstos generalmente se incrementan durante el período de máxima división. La liberación de células de los agregados que puede ocurrir en el ciclo de crecimiento, está asociada con la tasa de reducción de división celular y el incremento significativo del volumen celular (King y Street, 1977).

En cualquier cultivo en suspensión es importante probar la viabilidad celular durante la incubación, antes del inicio de la fase estacionaria. Si la viabilidad se mantiene por varios días, el cultivo está disponible para los subcultivos secuenciales.

En general, las suspensiones se mantienen usando un inóculo que establece una densidad celular inicial relativamente alta de 0.5 a 2.5×10^5 células/ml y esta densidad se incrementa durante la incubación a menudo con un rango de 1 a 4×10^6 células/ml (Street, 1977a). Para cada cultivo celular existe una densidad inicial con la cual el cultivo no crece.

La densidad crítica o densidad efectiva mínima, el inóculo más pequeño por el cual un cultivo en suspensión nuevo puede crecer, es una función del cultivo, de la duración y condiciones de incubación y de la composición del medio de cultivo (Street, 1977a).

El crecimiento de un cultivo en un período de tiempo, se caracteriza por un incremento en el número celular, incremento de volumen y cambios de complejidad bioquímica y celular. Existen diversas técnicas para cuantificar el crecimiento y la diferenciación en cultivo de tejidos, como el peso fresco, peso seco, conteo celular, etc. (Dodds y Roberts, 1982).

Las células en suspensión no sólo absorben nutrientes del medio de cultivo, sino que liberan al medio productos de su propia actividad biosintética. Estos metabolitos liberados al medio, lo alteran de tal manera que afectan el crecimiento de todo el cultivo (Street, 1977a). Se ha reportado el uso de carbón activado para la absorción de metabolitos tóxicos liberados por los tejidos vegetales, añadiéndolo al medio en una concentración de 0.5 y 3 g/l (Wang y Huang, 1976).

En la fase de división celular existen cambios como el incremento de volumen celular, que coinciden con la máxima producción de fenoles totales en el cultivo, así como la síntesis de productos secundarios. Durante el progreso del cultivo, las células pasan a través de una serie de estados fisiológicos que las llevan a expresar cierta actividad meristemática, a volverse metabólicamente quiescentes o a enfatizar ciertas actividades metabólicas (Street, 1977c).

Entre los cambios fisiológicos de las células en suspensión, se encuentra el desarrollo de células del callo que dan lugar a estructuras semejantes a embriones, sobrepasando el proceso sexual (Butcher e Ingram, 1979), denominados embriones somáticos, que involucran un alargamiento y segmentación regular en una masa de células subsféricas por paredes de superficie mínima (Street, 1977c). Sin embargo no todos los cultivos en suspensión se diferencian a embrioides. Se ha visto que más bien las células pequeñas tienden a formar embrioides que las largas (Staba, 1969).

2.2.2. Potencialidad

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han llegado a ser muy importantes debido al amplio intervalo de problemas fundamentales y aplicaciones, así como por su uso en investigación básica, en la agricultura y en la industria.

El crecimiento de masas de células desorganizadas o callo en agar o en suspensión, se utiliza ampliamente en estudios bioquímicos y de crecimiento. El cultivo de segmentos de tallo, raíz, hoja o callo proveen sistemas para estudiar la diferenciación, morfogénesis o regeneración. Los métodos de cultivo de meristemos para la regeneración han sido adoptados a la propagación masiva y producción de plantas libres de virus (Kantha y Gamborg, 1978). La eliminación de virus por meristemos apicales, aparentemente ocurre debido a que la proliferación celular tiene lugar a una tasa mayor que la duplicación viral. La infección viral puede ser eliminada completamente por subcultivo (Evans et al., 1981). El cultivo de polen y anteras provee la formación de plantas haploides (Gamborg et al., 1976; Chen et al., 1982).

El progreso en el conocimiento del control de la organogénesis y embriogénesis, demanda un estudio más intenso de los procesos de "desdiferenciación" que ocurren durante el inicio de la formación del callo y como estas células pueden restaurar células diferenciadas y tener la habilidad de poder expresar otra vez su totipotencialidad.

La propagación in vitro puede tener ciertas ventajas sobre los métodos convencionales. La mayoría de estas ventajas dependen de la velocidad de la propagación del cultivo, la cantidad, la calidad homogénea del producto por efecto de la clonación y la ausencia de patógenos de las plantas in vitro.

El cultivo de tejidos vegetales puede ser usado para plantas que normalmente se propagan lento, para reducir el tiempo de propagación de especies con alta demanda comercial, o para la obtención de nuevas variedades cuando hay pocas plantas iniciales disponibles.

Se puede inducir una variación genotípica de plantas regeneradas in vitro. Tal variabilidad genética puede ser usada en agricultura cuando

se aplica a programas de hibridización.

El progreso en cultivos de protoplastos y de la tecnología de cultivo de tejidos, demuestra que es posible producir células híbridas intergenéricas (Chien et al., 1982). Las barreras naturales que restringen el entrecruzamiento sexual entre géneros y familias, no existen en la fusión y el crecimiento subsecuente de las células somáticas (Gamborg et al., 1974).

Los métodos de producción de cruza intergenéricas deben ser llevados a puntos específicos, como ayuda en el entrecruzamiento vegetal y el mejoramiento de cultivos, contenido de proteínas, resistencia efectiva a enfermedades, tolerancia a la sequía y a otras condiciones medioambientales extremas, etc.

Otros objetivos incluyen planes en el desarrollo de plantas con gran eficacia de fijación de nitrógeno y mayor capacidad fotosintética, y de dar a plantas no-leguminosas, la capacidad de fijar nitrógeno del aire (Gamborg et al., 1974). Existe urgencia en obtener una producción mayor de nuevos cultivos, de líneas celulares genéticamente estables, de eficiencia de crecimiento y calidad de productos (Sharp et al., 1982; Mroginski y Kartha, 1984).

2.2.3. Cultivo de Tejidos Vegetales de Leguminosas

Las leguminosas constituyen una familia económicamente muy importante, tanto por su valor alimenticio para humanos como fuente de forraje, por su papel en la fijación biológica del nitrógeno y como materia prima en la industria.

Las leguminosas ocupan el tercer lugar en la producción total global de cultivos alimenticios con 156 millones de toneladas (F.A.O., 1980, citado por Mroginski y Kartha, 1984).

La regeneración vegetal in vitro es el elemento más crítico en resultados de aplicación práctica. Se han publicado aspectos de cultivo in vitro de leguminosas en especies de frijol, cacahuete, soya, así como de fijación simbiótica de nitrógeno y de variación extraespecífica.

Los protoplastos de hojas, raíces y los cultivos de células de legu

minosas, han sido usados ampliamente en experimentos diseñados para obtener híbridos somáticos, a partir de fusión de protoplastos entre leguminosas y no leguminosas y entre diferentes géneros de leguminosas. La hibridización somática fue concebida originalmente como una herramienta para superar barreras de incompatibilidad interespecífica e intergenérica. Sin embargo, hasta la fecha, sólo se han obtenido pocos híbridos y algunos sólo por hibridización sexual. Hay que mencionar que los protoplastos de leguminosas fusionados, no han permitido ninguna regeneración vegetal, sólo se ha logrado la fusión. En la mayoría de los casos, los híbridos se dividían por mitosis al menos una vez y en pocos casos se obtenían agregados de más de cien células (Mroginski y Kartha, 1984).

A pesar de los esfuerzos que se han hecho con el CTV en diferentes especies de leguminosas, son relativamente pocos los sistemas de cultivo que pueden ser considerados como una aplicación directa al mejoramiento de cultivares. Algunos de los sistemas de cultivo de tejidos pueden ser aplicados en el área de propagación, por ejemplo en el caso del género Stylosanthes (Mroginski y Kartha, 1981a). La importancia práctica de esto puede ser disminuida si se considera que la mayoría de las leguminosas económicamente importantes son autopolinizadas y propagadas por semillas. Pero éste no es un caso general, algunas leguminosas y sus parientes naturales son propagados vegetativamente y un buen número de ellos son autopolinizados. Sin embargo, el mantenimiento de líneas celulares seleccionadas, así como su evaluación en condiciones de campo puede ser una dificultad si se utilizan los métodos convencionales de propagación vegetativa. Aquí el CTV puede dar otras alternativas y ser la respuesta.

El uso de CTV de leguminosas en estudios dirigidos a la inducción y selección de mutantes está severamente restringido, principalmente, porque la mayoría de los sistemas disponibles no llevan a la regeneración de plantas de cultivos de callo a largo plazo, o a células en suspensión o derivadas de protoplastos. Las plantas libres de virus se han obtenido de meristemos apicales, al menos de dos géneros, Pisum (Kartha et al., 1974) y Trifolium (Phillips y Collins, 1979). Estos resultados demuestran que el cultivo de meristemos apicales es una herramienta importante para recobrar plantas sanas de plantas infectadas en leguminosas. Otra

área que involucra el cultivo de meristemas, es la criopreservación de germoplasma, especialmente de aquellas especies que son rutinariamente propagadas en forma vegetativa o de aquellas con alta frecuencia de polinización cruzada (Mroginski y Kartha, 1984).

El cultivo de anteras de leguminosas, con algunas excepciones no confirmadas, no ha logrado el objetivo de generar plantas haploides para usarse en programas de entrecruzamiento o en el desarrollo de nuevas variedades de cultivos. El cultivo de embriones para superar barreras post-cigóticas en la hibridización interespecífica ha sido empleado con éxito en algunos casos. A pesar de esto, la técnica no ha sido explotada en toda su potencialidad. Ya que la hibridización somática no ha llegado a lo esperado en términos de superar barreras con límites de hibridización, el cultivo de embriones debe recibir más atención en el futuro.

2.2.4. Cultivo de Tejidos Vegetales de Leucaena leucocephala

La técnica de CTV se ha aplicado poco a Leucaena. Algunos reportes mencionan únicamente la obtención de callo abundante en un medio de cultivo en concentraciones óptimas de reguladores de crecimiento, así como el aislamiento exitoso de protoplastos (Venketeswaran y Gandhi, 1982; Venketeswaran y Romano, 1982).

En otro trabajo (Peasley y Collins, 1980), mencionan los medios de Linsmaier y Skoog y el de Phillips y Collins (1979) con combinaciones hormonales de BA (1.0 mg/l), 2,4-D (0.5 mg/l) y Picloram (0.06 mg/l) como productor de callo. Así mismo se observan problemas de oxidación lo que sugiere ciertos problemas de toxicidad.

También se menciona, toxicidad por microelementos. Al comparar BA con K, se observa proliferación de callo con BA (10 mg/l) y, en comparación con la K, el BA es más efectivo para promover el crecimiento de callo (Peasley y Collins, 1980).

Recientemente (Hernández, 1984) intentó el establecimiento de CTV de L. leucocephala Cv. HAWAII, con 2,4-D (2 mg/l) + K (0.1 mg/l), lográndose con estas combinaciones la inducción de callo y el mantenimiento del mismo con 2,4-D (1 mg/l) + K (0.01 mg/l). Utilizando AIA + K se observó la

diferenciación de raicillas y con ANA + K, diferenciación de tallos y hojas.

En trabajos efectuados en la India (Anon, 1983), se menciona regeneración de plántulas a partir de tallos de plantas de 1 o 2 años de edad. se encontró el mayor número de brotes en un medio que contenía K + BA. Utilizando 2,4-D individualmente existe un retardo de brotación y sólo se produce poco callo en el lugar de corte. Además se estaban haciendo estudios para transferir las plántulas al campo, así como para estudiar los cultivos en suspensión.

Este método puede encontrar una aplicación inmediata en la multiplicación masiva de variantes naturales, caracterizadas por resistencia a la gümosis o con un contenido relativo más bajo de mimosina (Anon, 1983).

Ravishankar et al. (1983), utilizando ápices de plántulas, a pesar de la producción de compuestos fenólicos, obtienen primordios foliares con K, 5 ppm, sin lograr el enraizamiento. Al añadir ácido ascórbico al medio basal se redujo el efecto inhibitor de los fenoles, con este tratamiento, logran el desarrollo de plántulas completas, pero no saludables. Este es el primer trabajo en el cual se tiene éxito en la formación de plántulas de Leucaena por CTV.

Nagmani y Venkateswaran (1983), al trabajar con hipocótilo y cotiledón, obtuvieron, además de proliferación de callo, regeneración de primordios foliares en L. leucocephala, utilizaron medio MS ó B5 + BA (2.0 mg/l), no obstante no lograron la inducción de raíz en estos primordios foliares.

Con base en estos estudios y a los problemas específicos que se tienen con esta familia, la investigación con Leucaena se puede considerar como un reto, ya que su cultivo presenta gran número de problemas que aún quedan por resolver.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado (MSB5) fue el propuesto por Murashige y Skoog (MS) (1962), adicionado con las vitaminas del medio de Gamborg y colaboradores (B5) (1968). En algunos experimentos, el medio se enriqueció con agua de coco (MSB5 + AC).

Para la preparación del medio de cultivo se utilizaron soluciones concentradas de sus diferentes componentes, macro y micronutrientes, solución de Fe con EDTA, inositol y vitaminas, preparados para 10 ó 20 litros de medio de cultivo y conservados en refrigeración a 6 °C hasta su utilización. En el Apéndice 1 se describe la composición del medio así como la preparación de las soluciones concentradas utilizadas. Dependiendo de la cantidad de medio requerida, se tomaron alícuotas de las soluciones concentradas originales.

Los medios de cultivo fueron adicionados con diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento. Se utilizaron ANA (ICN, Pharmaceuticals, Inc.), BA (ICN, Pharmaceuticals, Inc.) y 2,4-D (Merck-Schhardt) (tabla 1), los cuales fueron preparados en soluciones $10^{-3}M$ y de éstos se tomaron alícuotas para ajustar las concentraciones requeridas en cada experimento en particular.

Con base en un barrido hormonal previo (Chávez et al., 1983), se eligieron las combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento (tabla 1).

El agua de coco, es decir el endospermo líquido utilizado, se extrajo de un coco maduro, se filtró con gasa y posteriormente se calentó en una parrilla hasta su ebullición, durante 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta observar la precipitación de las proteínas. Finalmente se filtró con papel Whatman 1 (Dodds y Roberts, 1982).

El agua de coco ya preparada, se agregó al medio en una concentración de 15 % (v/v).

TABLA 1. COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES (μM) DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS EN LOS DIFERENTES EXPERIMENTOS.

BA	ANA	2,4-D
5	-	-
5	0.1	-
5	1	-
10	-	-
10	0.1	-
10	1	-
-	-	5
-	-	10
5	-	0.1
5	-	1
5	-	5
5	-	10
10	-	0.1
10	-	1
10	-	5
10	-	10

Se utilizaron medios sólidos, en cuyo caso se agregaron 8 g/l de agar (Agar Bacteriológico, Bioxon de México, S.A.) y medios líquidos para cultivos en suspensión.

El medio se preparó en vasos de precipitado, el volumen final fue aforado en matraces volumétricos o probetas, agitando y calentando en una parrilla con agitación magnética. El pH se ajustó a 5.8 con un potenciómetro digital CORNING, con soluciones de HCl y NaOH de 0.1 y 0.5 N. En el caso de medios sólidos, se calentó el medio, agregándole el agar, en agitación constante hasta obtener un medio perfectamente homogéneo. Finalmente fue repartido en frascos de vidrio de 7 cm de altura por 6 cm de diámetro, se utilizaron 20 ml de medio de cultivo por frasco en el caso del medio sólido. En el caso de meristemas apicales y embriones, se utilizaron tubos de ensayo de 13 X 100 mm con 2 ml de medio sólido. Los frascos y tubos de ensayo, se taparon con papel aluminio grueso sujeto con ligas de hule. El medio líquido fue repartido en un volumen de 25 ml en matraces de 125 ml, tapándolos con algodón y papel aluminio, también sujetos con ligas.

Finalmente el medio se esterilizó en autoclave a una presión de 20 lb/pulg² y a una temperatura de 126 °C durante 15 minutos.

3.2. Material Biológico (Explantos)

Se utilizaron semillas de Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit Cv. PERU, las cuales fueron obtenidas del FIRA (Fondo Internacional de Recursos Agrícolas).

Las semillas fueron puestas a germinar en condiciones asépticas, previamente escarificadas.

La escarificación se llevó a cabo de dos maneras, con H₂SO₄ concentrado a diferentes tiempos y mecánicamente, con lija, removiendo parte de la testa del lado opuesto al embrión. La germinación se cuantificó al cuarto día de haber sido sembradas, con 10 minutos de escarificación con ácido fue de 3.3 %, con 15 minutos, 20 %, con 20 minutos, 24 % y con 30 minutos, 32 %. Sin embargo, con 30 minutos las semillas se dañaban mucho, por lo cual con este sistema se prefirió un tiempo de 20 minutos.

La escarificación mecánica dio mejores resultados, observándose al tercer día, un promedio de germinación de 67 % y al octavo día, 79 %; por esta razón este método de escarificación fue el más utilizado.

Los explantes empleados fueron los siguientes :

- a. Folíolos Maduros
- b. Folíolos Inmaduros
- c. Raíces con Cofia
- d. Raíces sin Cofia
- e. Hipocótilo
- f. Cotiledón
- g. Tallo Joven
- h. Embrión
- i. Meristemos Apicales

Los nueve tipos de explantes se sembraron en diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento. De cada siembra se hicieron al menos dos repeticiones y el número de explantes por repetición varió de acuerdo al experimento.

Para la obtención de folíolos maduros se utilizaron plantas de un mes obtenidas a partir de semilla y puestas a germinar en tierra o en perlita en condiciones de invernadero.

Para la obtención de meristemos apicales, folíolos inmaduros, raíces con y sin cofia, hipocótilo y tallo joven, se germinaron semillas en condiciones asépticas.

Para obtener los embriones y cotiledones se utilizaron semillas escarificadas mecánicamente y remojadas 12 horas en agua destilada para poder remover la testa y disectar los explantes.

Para determinar el tamaño de la cofia, se hicieron cortes de raíz, tiñéndolos con Safranina y Verde Rápido. En éstos se localizó la zona de mayor división celular, aproximadamente a 1 mm de la punta, con base a estas observaciones, se eliminó la cofia de la raíz al hacer un corte de 1 mm de la punta.

3.3. Siembra

Para llevar a cabo esta técnica se requiere un ambiente en condiciones de esterilidad ya que el medio de cultivo contiene nutrientes que favorecen el crecimiento de bacterias y hongos, los cuales atacan y destruyen el cultivo, además de que pueden llegar a producir toxinas o estimulantes que afectan el crecimiento celular.

Por estas razones es necesario que la manipulación se lleve a cabo en un área estéril, y que todo el material en el área de sembrado, incluyendo el instrumental estén esterilizados.

La siembra se realizó en una campana de flujo laminar (VECO). Para extremar precauciones, se utilizaron mecheros Bunsen. El instrumental fue sumergido en alcohol etílico industrial, flameado y enfriado en agua destilada esterilizada cada vez que se utilizaba. Los frascos fueron limpiados exteriormente con alcohol etílico.

Los explantes fueron esterilizados utilizando una concentración de cloro activo al 3 % (Cloralex comercial 50 % v/v) durante 15 minutos, después se enjuagaron cuatro veces con agua destilada previamente esterilizada. Para la siembra de meristemas apicales y folíolos inmaduros se empleó un microscopio estereoscópico. Al final de la siembra se pusieron ligas de hule para cerrar herméticamente los frascos. Todas estas operaciones se efectuaron dentro de la campana de flujo laminar.

Para folíolos maduros, folíolos inmaduros, raíces con cofia, raíces sin cofia, hipocótilo, cotiledón y tallo joven, se colocaron 5 explantes por frasco. Para embriones y meristemas apicales, se colocó un explante por tubo de ensayo.

3.4. Condiciones Ambientales

Después de la siembra, los cultivos se incubaron en tres condiciones ambientales diferentes :

1. Oscuridad y 28 °C constantes.
2. Fotoperíodo de 16 horas luz, 28 °C, 1,700 lux/ 8 horas oscuridad, 20 °C.

3. Fotoperíodo de 16 horas luz, 33 °C, 1,300 lux/ 8 horas oscuridad, 21 °C.

Las observaciones fueron efectuadas a los 60 días de la siembra, pero los cultivos fueron dejados por más tiempo en las condiciones mencionadas.

3.5. Cultivos en Suspensión

Para el inicio de los cultivos en suspensión, se sembraron de 500 a 750 mg de callo obtenido a partir de folíolos maduros, por matraz con 25 ml de medio de cultivo líquido. La combinación hormonal de éste fue la misma de los cultivos en medio sólido de los cuales provenían los callos. Estos cultivos se mantuvieron en una plataforma de agitación a 100 RPM, con una temperatura promedio de 24.6 a 29.6 °C, con luz continua y una intensidad luminosa de 1,650 lux.

A los ocho días, cuando el cultivo se observaba turbio, se filtró con gasa estéril con una porosidad de 250 μm para eliminar los grumos y del filtrado se tomaron diferentes alícuotas, de 2, 5 y 7.5 ml en diferentes experimentos para determinar el número inicial de células, ya que se ha recomendado una densidad celular inicial relativamente alta de 0.5 a 2.5×10^5 células/ml (Street, 1977a).

Cuando se tomaron 2 y 7.5 ml, el cultivo contenía una combinación hormonal de 10 μM BA + 5 μM 1,4-D. En tanto que la alícuota de 5 ml provenía de un medio con 10 μM BA + 0.1 μM ANA.

Con el objeto de determinar el crecimiento de las poblaciones celulares en suspensión, se realizaron lecturas a los 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días, considerando tres parámetros, peso fresco, peso seco y conteo celular. Para los dos primeros se tomaron alícuotas de 5 ml cada una y se centrifugaban a 2,000 g durante 20 minutos (Centrifuga BECKMAN, Modelo TJ-6). Después de desechar el sobrenadante se pesaron los tubos cuyo peso era conocido; para determinar el peso seco, se dejaban durante tres horas a 60 °C, volviendo entonces a pesar los tubos después de 10 minutos de enfriamiento en un desecador. Los tubos se pesaron en una balanza ana

lítica (Sauter).

El conteo celular se efectuó en una cámara de Fuchs Rosenthal, cuyo volumen era de 3.2 mm^3 .

Se hicieron pruebas de viabilidad celular usando azul de tripano (SIGMA de México, S.A.) al 0.4 % en solución salina 0.15 M NaCl; añadiendo una gota de colorante por ml de cultivo en suspensión y observando 500 células al azar.

Para intentar mantener la viabilidad de las células se agregó carbón activado a los cultivos en suspensión en una concentración de 0.5 % (Wang y Huang, 1976).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

a. Folíolos Maduros

La respuesta in vitro de los folíolos maduros obtenidos de plantas de Leucaena leucocephala Cv. PERU de un mes germinadas en condiciones de invernadero, se resume en las tablas 2, 3 y 4 para las diferentes condiciones ambientales estudiadas.

Se observa que el número de individuos en la muestra en cada caso es variable, lo que se debió tanto a la disponibilidad de material biológico como a la contaminación, debido a la cual algunos frascos fueron desechados.

En oscuridad a 28 °C constantes (tabla 2), se observó un porcentaje de formación de callo con un intervalo de 24 a 28 %. En general el callo desarrollado bajo estas condiciones ambientales no fue friable, la mayoría presentó un color blanco o amarillento; se observó además la formación de raíces a partir del callo en algunas de las combinaciones probadas, como en la número 6, siendo éstas de pobre desarrollo y baja frecuencia.

En la combinación número 6, se observó el mayor rendimiento de callo. Otras combinaciones hormonales con buena respuesta fueron la número 2 aunque el callo fue pequeño y no friable y la número 8, en la cual los callos formados fueron en general de 3 a 15 mm, no friables y de color blanco.

De acuerdo con Neumann y colaboradores (1992), existe una interacción entre el sistema regulador de los cultivos y la actividad fotosintética que en presencia de luz estimula la formación de cloroplastos. Al incubar los cultivos en condiciones de oscuridad (tabla 2), este estímulo se eliminó y los callos se formaron de color blanco o amarillento, sin embargo, en algunos casos se desarrollaron en bajo porcentaje callos de color verde, lo que sugiere que tal vez el proceso de desarrollo de cloroplastos se estimuló durante la manipulación de los cultivos.

En cuanto a la consistencia, la mayor cantidad de callo friable se observó en las combinaciones 4 y 5. Al utilizar 3A + 2,4-D, éste fue en

general no friable.

Se ha mencionado (Child, 1974; Gamborg y Shyluk, 1981) que el agua de coco tiene un efecto benéfico sobre el desarrollo de los cultivos in vitro particularmente en tejidos de difícil respuesta, sin embargo, este efecto no se observó en los resultados (tabla 2), al agregar agua de coco, experimentos 9 al 14, los callos formados en general fueron más pobres y no friables. Rubluo et al. (1984), al trabajar con hojas inmaduras de chícharo encontraron, de una manera semejante, que el agua de coco no beneficiaba a los cultivos en términos de respuesta morfogénica.

El efecto de la temperatura y el fotoperíodo tuvieron un efecto notable en la producción de callo, lo que se observa en las tablas 3 y 4, con un amplio intervalo de respuesta. En condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz, 18 °C, 1,700 lux/ 8 horas oscuridad, 20 °C, el intervalo de respuesta fue de 0 a 93 % (tabla 3) y bajo las condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz, 33 °C, 1,300 lux/ 8 horas oscuridad, 21 °C fue de 0 a 100 % (tabla 4).

En condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz, 28 °C, 1,700 lux/ 8 horas oscuridad, 20 °C (tabla 3), en el medio basal (MSB5) suplementado con reguladores de crecimiento, se observó en general un callo de color blanco a verde, notándose un incremento en la frecuencia de este último, pudiéndose observar así mismo algunos callos amarillentos y pardos. La respuesta fue buena al utilizar una combinación de BA + ANA ó de BA + 2,4-D o bien EA sola. Con respecto a esta última, Evans et al. (1981) mencionan que la frecuencia con la cual se ha utilizado para la formación de callo en especies capaces de organogénesis somática es muy baja (11.1 %); en el presente trabajo, al utilizar únicamente BA, la respuesta fue menor que con las combinaciones de BA + ANA ó de BA + 2,4-D, por lo que se recomienda utilizar una de estas combinaciones.

La frecuencia con la cual se ha utilizado la combinación BA + ANA para inducción de callo en especies capaces de organogénesis somática es de 7.4 % (Evans et al., 1981), esta combinación se ha utilizado más bien para el proceso de morfogénesis. No obstante, en Leucaena leucocephala, hubo formación de callo con dichos reguladores de crecimiento (tabla 3).

El mayor porcentaje de respuesta se observó en la combinación número

TABLA 2. RESPUESTA IN VITRO DE FOLIOLOS MADUROS DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADOS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN OSCURIDAD A 28 °C (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60 DIAS).

MEDIO	COMBINACION HORMONAL (µM)	BA ANA 2,4-D	FORMACION DE CALLO										COLOR %			
			Número de explantes con respuesta/ explantes cultivados	TAMANO (I) %				CONSISTENCIA %		BLANCO	AMARILLO	VERDE	PARDO			
				+	++	+++	++++	FRIABLE	NO FRIABLE							
1 MSB5	5	-	-	10 / 40	45	33	-	12	-	12	33	12	33	-	-	
2 "	5	0.1	-	42 / 65	65	39	14	12	-	8	57	25	40	-	-	
3 "	5	1	-	20 / 40	50	35	10	-	5	5	45	10	40	-	-	
4 "	10	-	-	15 / 35	43	17	3	23	-	23	20	29	14	-	-	
5 "	10	0.1	-	48 / 110	44	20	6	18	-	23	21	26	17	-	-	
6 "	10	1	-	38 / 45	84	24	29	31	-	11	73	18	67	-	-	
7 "	5	-	10	19 / 80	24	14	-	5	5	5	19	11	8	5	-	
8 "	10	-	5	104 / 165	63	11	29	16	7	8	55	47	5	2	10	
9 MSB5+ACI	5	-	-	22 / 45	49	33	16	-	-	-	49	49	-	-	-	
10 "	5	0.1	-	16 / 40	40	20	20	-	-	-	40	40	-	-	-	
11 "	5	1	-	21 / 40	53	33	13	5	2	-	53	27	-	26	-	
12 "	10	-	-	13 / 35	37	14	23	-	-	-	37	26	-	11	-	
13 "	10	0.1	-	11 / 35	31	23	8	-	-	-	31	16	-	14	-	
14 "	10	1	-	16 / 35	45	26	14	6	-	6	40	46	-	-	-	

(1) + = menor de 3 mm; ++ = de 3 a 10 mm; +++ = de 10 a 15 mm; ++++ = de 15 a 20 mm.

12, obteniéndose un callo friable y de color blanco. Sin embargo, al utilizar sólo 2,4-D, no hubo respuesta, en contraste con lo que ha sido reportado para esta hormona (Gamborg et al., 1976), lo cual indica que se requiere un balance hormonal auxinas / citocininas adecuado para inducir la división celular in vitro en los tejidos de esta leguminosa.

Al comparar el medio basal y el medio suplementado con agua de coco, se observó que la respuesta fue mayor en el medio basal. En este caso el agua de coco no tuvo efectos favorables, contrario a lo que se esperaba, dados los informes existentes en la literatura sobre sus aspectos benéficos, por ejemplo, la actividad de citocinina y el mio-inositol que contiene, que estimula el crecimiento del callo (Caldas et al., 1975), así como la actividad similar a auxinas y giberelinas (Dix y Staden, 1982). En general los callos formados en medio suplementado con agua de coco fueron pequeños, menores de 3 mm, no friables y de color verde. Con agua de coco se observó además en algunas de las combinaciones hormonales, que poco tiempo después de la siembra, los folíolos adquirirían un color blanco y no hubo desarrollo de éstos.

Para el caso de MSB5 + AC, el mayor porcentaje de respuesta fue en la combinación 17 y el menor, en la 15, siendo los porcentajes de respuesta mayores en las combinaciones 14, 17 y 18, aunque el callo formado casi siempre resultó menor de 3 mm, es decir, muy pobre.

Para las condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz, 33 °C, 1,300 lux/ 8 horas oscuridad, 21 °C (tabla 4), al utilizar sólo 2,4-D, la respuesta fue muy baja o nula, igual que bajo las condiciones ambientales anteriores, contrario a la frecuencia relativamente alta (44.4 %) de formación de callo, en especies con capacidad organogénica (Evans et al., 1981).

Al comparar las combinaciones de BA + ANA y BA + 2,4-D, el intervalo de respuesta fue mayor con BA + ANA (de 73 a 100 %) que con BA + 2,4-D (45 a 92 %), sin embargo, en esta última combinación, se obtuvo mayor cantidad de callo friable y mejor rendimiento de éste, siendo la mejor combinación la número 13, igual que en las condiciones ambientales anteriores. En esta combinación también se formaron algunas raíces a partir del callo.

TABLA 3. RESPUESTA IN VITRO DE FOLIOLOS MADUROS DE LEUCALNA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADOS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN FOTOPERIODO DE 16 HORAS LUZ, 28 °C, 1,700 LUX / 8 HORAS OSCURIDAD, 20 °C (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60 DIAS).

MEDIO	COMBINACION HORMONAL(µM) BA ANA 2,4-D	FORMACION DE CALLO										COLOR %				
		Número de explantes con respuesta/ ex-plantas cultivados	%	TAMAÑO (1) %				CONSISTENCIA %		COLOR %						
				+	++	+++	++++	FRIABLE	NO FRIABLE	BLANCO	AMARILLO	VERDE	PARDO			
1	MSB5	5	-	-	28 / 96	29	9	1	1	18	18	11	21	-	8	-
2	"	5	0.1	-	43 / 110	39	17	5	1	16	17	22	22	-	10	5
3	"	5	1	-	56 / 105	53	19	26	1	8	8	46	9	4	41	-
4	"	10	-	-	39 / 95	41	31	1	9	-	3	38	3	-	38	-
5	"	10	0.1	-	65 / 131	50	12	20	1	17	29	21	18	8	24	-
6	"	10	1	-	42 / 93	45	19	12	-	14	14	31	23	-	22	-
7	"	-	-	5	0 / 20	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	"	-	-	10	0 / 20	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	"	5	-	5	11 / 20	55	10	15	25	5	55	-	55	-	-	-
10	"	5	-	10	13 / 20	65	-	10	55	-	65	-	65	-	-	-
11	"	10	-	5	7 / 20	35	-	10	15	35	-	35	-	-	-	-
12	"	10	-	10	14 / 15	93	-	13	80	-	93	-	93	-	-	-
13	MSB5+AC	5	-	-	10 / 50	20	20	-	-	-	-	20	-	-	20	-
14	"	5	0.1	-	17 / 50	34	30	4	-	-	-	34	-	-	34	-
15	"	5	1	-	7 / 50	14	10	4	-	-	-	14	-	-	14	-
16	"	10	-	-	12 / 45	27	22	5	-	-	-	27	-	-	27	-
17	"	10	0.1	-	19 / 50	38	36	2	-	-	-	38	-	-	38	-
18	"	10	1	-	18 / 50	36	32	4	-	-	-	36	-	-	36	-

El color varió de blanco a verde.

Al comparar los resultados obtenidos para la respuesta in vitro de folíolos maduros en las tres condiciones ambientales probadas (tablas 2, 3 y 4), se encontró que la mejor respuesta se presentó en las condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz, 33 °C, 1.300 lux/ 8 horas oscuridad, 21 °C, en el medio basal (MSB5) suplementado con 10 µM BA + 10 µM 2,4-D, sin embargo un callo más friable y de mayor tamaño se obtuvo con la misma combinación hormonal en condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz, 28 °C, 1,700 lux/ 8 horas oscuridad, 20 °C. Para el caso del medio MSB5 + AC, en general el porcentaje de respuesta fue mayor en oscuridad a 28 °C.

Los resultados obtenidos para folíolos maduros de Leucaena leucocephala coinciden con aquellos reportados por Mroginski et al. (1981) quienes trabajando con la leguminosa Arachis hypogaea (cacahuete) sólo lograron la formación de un callo color pardo, pero no obtuvieron regeneración de plantas; en contraste con estos resultados, Mroginski y Kartha (1981a), reportan la formación de callo, regeneración de plántulas y enraizamiento a partir de folíolos maduros de la leguminosa Stylosanthes guianensis, observando una brotación múltiple con ANA (0.01, 0.1 y 1 mg/l) + BA (1, 3 y 6 mg/l). Para esta especie, de igual manera que para cualquier otra, el requerimiento hormonal se establece con cambios en la relación de auxinas y citocininas exógenas. Con este procedimiento se puede decir que sí es factible la regeneración de leguminosas a partir de folíolos maduros.

La edad de las hojas utilizadas como explantes no parece ser un factor crítico en Stylosanthes, sin embargo para Arachis, sí afecta a la respuesta. Esto no puede afirmarse aún para Leucaena leucocephala, y es necesario experimentar con hojas de distinta edad fisiológica.

b. Folíolos Inmaduros

En las tablas 5 y 6 se presenta la respuesta in vitro de folíolos inmaduros obtenidos de plántulas de 15 días, germinadas en condiciones asépticas.

En general el porcentaje de respuesta fue menor que para el caso de los folíolos maduros.

Se observa una diferencia notable al utilizar BA + ANA (tabla 5) en

TABLA 4. RESPUESTA IN VITRO DE FOLIOLOS MADUROS DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADOS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN FOTOPERIODO DE 16 HORAS LUZ, 33 °C, 1,300 LUX / 8 HORAS OSCURIDAD, 21 °C (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60 DIAS).

MEDIO	COMBINACION HORMONAL (µM)		FORMACION DE CALLO									
	BA	ANA 2,4-D	Número de explantes con respuesta/ explantes cultivados	%	TAMANO (1) %				CONSISTENCIA %		COLOR %	
					+	++	+++	++++	FRIABLE	NO FRIABLE	BLANCO	VERDE
1	MSB5	5	-	9 / 20	45	25	20	-	-	45	20	25
2	"	5	0.1	15 / 20	75	50	25	-	-	75	25	50
3	"	5	1	10 / 10	100	-	30	20	50	100	-	-
4	"	10	-	7 / 15	47	47	-	-	-	47	47	-
5	"	10	0.1	15 / 20	75	25	35	15	-	75	60	15
6	"	10	1	22 / 30	73	73	-	-	-	73	16	57
7	"	-	-	5	1 / 35	3	3	-	-	3	-	-
8	"	-	-	10	0 / 35	0	-	-	-	-	-	-
9	"	5	-	0.1	9 / 20	45	-	35	5	45	-	-
10	"	5	-	5	21 / 30	70	27	10	17	37	33	20
11	"	5	-	10	26 / 35	74	14	3	57	37	37	37
12	"	10	-	5	16 / 30	53	10	23	7	23	30	-
13	"	10	-	10	23 / 25	92	-	12	68	12	56	-

(1) + = menor de 3 mm; ++ = de 3 a 10 mm; +++ = de 10 a 15 mm; ++++ = de 15 a 20 mm.

comparación con BA + 2,4-D (tabla 6), en el primer caso el intervalo varió de 14 a 32 % en condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz, 28 °C, 1,700 lux/ 8 horas oscuridad, 20 °C (tabla 5) y la combinación BA + 2,4-D varió con un intervalo de 36 a 53 % en condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz, 33 °C, 1,300 lux/ 8 horas oscuridad, 21 °C (tabla 6). Además, el tamaño de los callos fue en general pequeño y no friable, se observaron tanto de color blanco como de color verde. Bajo estas condiciones, al utilizar únicamente 2,4-D, igual que para los folíolos maduros, no hubo respuesta.

Mroginski y Kartha (1981b), han reportado regeneración a partir de folíolos inmaduros de chícharo (Pisum sativum) y de cacahuate (Arachis hypogaea). Sin embargo, con hojas inmaduras de otras leguminosas como garbanzo (Cicer arietinum), frijol blanco (Vigna unguiculata), frijol (Phaseolus vulgaris) y soya (Glycine max), no se ha logrado la regeneración de plántulas in vitro. La capacidad morfogénica de las hojas inmaduras puede estar restringida a ciertas leguminosas, por lo que no puede ser aplicable de manera generalizada. A estas especies se podría sumar Leucaena leucocephala, ya que se probó, igual que se ha hecho con cacahuate, Stylosanthes guianensis y chícharo, el tratamiento con BA + ANA sin lograr inducir una respuesta morfogénica; a pesar de que las combinaciones hormonales probadas representan una mínima cantidad de todas las posibles combinaciones que se pueden aplicar, estos resultados demuestran que tendrán que realizarse muchos intentos antes de lograr la regeneración de plantas completas.

c. Raíces con Cofia

En las tablas 7 y 8 se observa que la formación de callo in vitro para raíces con cofia, fue en general muy pobre. Para las condiciones ambientales de fotoperíodo de 16 horas luz, 28 °C, 1,700 lux/ 8 horas oscuridad, 20 °C (tabla 7), el intervalo de respuesta fue notablemente más pequeño, de 0 % (combinación 6) a 12 % (combinaciones 2 y 4), el callo formado no fue friable y comúnmente de color blanco.

Para fotoperíodo de 16 horas luz, 33 °C, 1,300 lux/ 8 horas oscuridad, 21 °C (tabla 8), el intervalo varió de 0 % (combinaciones 4 y 5) a 27 % (combinación 2).

TABLA 5. RESPUESTA IN VITRO DE FOLIOLOS INMADUROS DE LEUCAEMA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADOS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN FOTOPERIODO DE 16 HORAS LUZ, 28 °C, 1,700 LUX / 8 HORAS OSCURIDAD, 20 °C (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60 DIAS).

MEDIO	COMBINACION HORMONAL (µM)		FORMACION DE CALLO					CONSISTENCIA %		COLOR %	
	BA	ANA	Número de explantes con respuesta/ explantes cultivados	%	TAMANO (1) %		FRIABLE	NO FRIABLE	BLANCO	VERDE	
						+	++				
1	MSB5	5 -	7 / 31	23	-	23	-	23	23	-	
2	"	5 0.1	10 / 41	24	7	17	-	24	12	12	
3	"	5 1	5 / 31	16	3	13	-	16	-	16	
4	"	10 -	1 / 22	5	5	-	-	5	-	5	
5	"	10 0.1	5 / 37	14	6	8	-	14	-	14	
6	"	10 1	11 / 34	32	12	20	-	32	17	15	

(1) + = menor de 3 mm; ++ = de 3 a 10 mm.

TABLA 6. RESPUESTA IN VITRO DE FOLIOLOS INMADUROS DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADOS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN FOTOPERIODO DE 16 HORAS LUZ, 33 °C, 1,300 LUX / 8 HORAS OBSCURIDAD, 21 °C (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60 DIAS).

MEDIO	COMBINACION HORMONAL(µM) BA 2,4-D		Número de explantes con respuesta/ explantes cultivados	%	FORMACION DE CALLO		CONSISTENCIA %		COLOR %	
					TAMAÑO (1) %	TAMAÑO (1) %	FRIABLE	NO FRIABLE	BLANCO	VERDE
					+	++				
1	MSB5	- 5	0 / 15	0	-	-	-	-	-	-
2	"	- 10	0 / 15	0	-	-	-	-	-	-
3	"	5 -	5 / 15	33	20	13	-	33	33	-
4	"	5 1	8 / 15	53	20	33	-	53	53	-
5	"	10 5	9 / 25	36	16	20	-	36	18	18

(1) + = menor de 3 mm; ++ = de 3 a 10 mm.

Es notable en este caso una mejor respuesta utilizando 5 μ M BA. El callo formado en este explante, fue en todos los casos en el lugar de corte y no en la zona meristemática, se observó un alargamiento de la raíz en to dos los casos; este alargamiento se ha reportado desde el inicio de la técnica de cultivo de órganos por White en 1934 (Butcher e Ingram, 1979), en raíces de jitomate.

Al comparar las dos condiciones ambientales, se puede decir que al utilizar BA 5 μ M con un fotoperíodo de 16 horas luz, 33 °C, 1,300 lux/ 8 horas oscuridad, 21 °C, la respuesta fue mayor, sin embargo, la respues ta fue más homogénea en fotoperíodo de 16 horas luz, 28 °C, 1,700 lux/ 8 horas oscuridad, 20 °C.

d. Raíces sin Cofia

Para raíces sin cofia, únicamente se estudiaron las condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz, 33 °C, 1,300 lux/8 horas oscuridad, 21 °C (tabla 9), la respuesta en cuanto a porcentaje de callos producidos en este caso fue notable al hacer una comparación con las raíces con cofia, éste se debió probablemente a que en este caso se hacían del explante, a 1 mm de la punta aproximadamente, para quitar la cofia y otro para separarla del resto de la raíz, se observó en ambos cortes la formación de callo. Se pueden observar dos incrementos notables de porcentaje de res puesta, en las combinaciones 2 y 6, es decir, se presenta un incremento de los reguladores de crecimiento, aunque no en la misma relación.

En raíces sin cofia, el alargamiento se dio en pocos casos a diferen cia de las raíces con cofia, debido tal vez a que en el momento del corte, se incluía la región meristemática. El callo obtenido no fue fria ble y el color varió de blanco a pardo debido a la oxidación.

Existen pocas publicaciones sobre el cultivo de raíces de leguminosas in vitro. Kameya y Widholm (1981), reportan para seis especies de Glycine, que no hubo formación de plántulas a partir de raíces. En gene ral se requieren para formar callo bajos niveles de auxinas y niveles re lativamente altos de citocininas, aún cuando se sabe que éstas son abundantes en las raíces y son sintetizadas ahí mismo (Salisbury y Ross, 1978).

Este tipo de explante ha sido poco trabajado para leguminosas y en

TABLA 7. RESPUESTA IN VITRO DE RAICES CON COFIA DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADAS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN FOTOPERIODO DE 16 HORAS LUZ, 28 °C, 1,700 LUX / 8 HORAS OSCURIDAD, 20 °C (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60 DIAS).

MEDIO	COMBINACION HORMONAL (µM)		FORMACION DE CALLO					CONSISTENCIA %		COLOR %	
	BA	ANA	Número de explantes con respuesta/ex-plantas cultivados	%	TAMARO (1) %	+	++	FRIABLE	NO FRIABLE	BLANCO	PARDO
1	MSB5	5	-	1 / 16	6	-	6	-	6	6	-
2	"	5	0.1	4 / 32	12	6	6	-	12	6	6
3	"	5	1	1 / 22	5	5	-	-	5	5	-
4	"	10	-	2 / 16	12	-	12	-	12	12	-
5	"	10	0.1	1 / 34	3	3	-	-	3	3	-
6	"	10	1	0 / 23	0	-	-	-	-	-	-

(1) + = menor de 3 mm; ++ = de 3 a 10 mm.

TABLA 8. RESPUESTA IN VITRO DE RAICES CON COFIA DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADAS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN FOTOPERIODO DE 16 HORAS LUZ, 33 °C, 1,300 LUX / 8 HORAS OSCURIDAD, 21 °C (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60 DIAS).

	MEDIO	COMBINACION HORMONAL (µM)		FORMACION		DE CALLO		CONSISTENCIA %		COLOR %
		BA	ABA	Número de explantes con respuesta/ explantes cultivados	°/°	TAMANO (1) %		FRIABLE	NO FRIABLE	FARDO
						+	++			
1	MSB5	5	-	3 / 15	20	20	-	-	20	20
2	"	5	0.1	4 / 15	27	27	-	-	27	27
3	"	5	1	4 / 20	20	20	-	-	20	20
4	"	10	-	0 / 10	0	-	-	-	-	-
5	"	10	0.1	0 / 15	0	-	-	-	-	-
6	"	10	1	1 / 20	5	5	-	-	5	5

(1) + = menor de 3 mm; ++ = de 3 a 10 mm.

TABLA 9. RESPUESTA IN VITRO DE RAICES SIN COFIA DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADAS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN FOTOPERIODO DE 16 HORAS LUZ, 33 °C, 1,300 LUX / 8 HORAS OSCURIDAD, 21 °C (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60 DIAS).

	MEDIO	COMBINACION HORMONAL (µM)		FORMACION DE CALLO										
				Número de explantes con respuesta/ explantes cultivados	%	TAMAÑO (1) %				CONSISTENCIA %		COLOR %		
						+	++	+++	++++	FRIABLE	NO FRIABLE	BLANCO	VERDE	PARDO
1	MSB5	5	-	9 / 25	36	28	8	-	-	-	36	8	-	28
2	"	5	0.1	12 / 25	48	16	28	4	-	-	48	16	-	32
3	"	5	1	7 / 25	28	12	16	-	-	-	28	16	-	12
4	"	10	-	6 / 25	24	8	12	4	-	-	24	12	6	6
5	"	10	0.1	6 / 25	24	16	-	-	8	-	24	8	-	16
6	"	10	1	10 / 20	50	45	5	-	-	-	50	25	-	25

(1) + = menor de 3 mm; ++ = de 3 a 10 mm; +++ = de 10 a 15 mm; ++++ = de 15 a 20 mm.

general para otras familias, siendo pocas las especies que han respondido favorablemente; por ejemplo, en el caso de Oncidium varicosum (Orchidaceae), las puntas de las raíces cultivadas in vitro con concentraciones relativamente altas de ANA, favorecieron la inducción de callo, presentaron una baja capacidad de regeneración de brotes, lo que se debe tal vez a una desdiferenciación incompleta de sus células, que retuvieron hasta cierto punto, su naturaleza de raíz (Kerbauy, 1984).

e. Hipocótilo

Los resultados para hipocótilo se pueden observar en las tablas 10 y 11. En obscuridad a 28 °C, utilizando BA + 2,4-D, la respuesta de formación de callo fue mayor que en fotoperíodo de 16 horas luz, 28 °C, 1,700 lux/ 8 horas obscuridad, 20 °C con BA + ANA o únicamente BA; los intervalos bajo las dos condiciones ambientales son notablemente diferentes, de 27 a 80 % y de 0 a 18 % respectivamente.

Para BA + 2,4-D y 2,4-D solo (tabla 10), además de la respuesta más alta, se lograron obtener callos más grandes, así como de consistencia friable, siendo la mayoría de color blanco, debido en parte a la ausencia de luz.

Para BA + ANA, la respuesta fue mayor que al utilizar únicamente BA (tabla 11), aunque el callo para ambos no fue friable, presentó la mayor parte de ellos un color pardo.

En raíz con y sin cofia y en hipocótilo, a pesar de haber sido obtenidos de plántulas germinadas en condiciones asépticas y de su posterior esterilización, la contaminación por bacterias fue muy alta. Con hipocótilo, se hicieron algunas pruebas con diferentes tiempos y concentraciones de cloro activo para esterilizar, sin lograr el control de la contaminación.

Igual que con otros tipos de explantes, a partir de hipocótilo se han regenerado plantas de sólo algunas especies de leguminosas. Al trabajar con Leucaena leucocephala, Nagmani y Venketeswaran (1983) reportan un incremento en la proliferación de callo a partir de hipocótilo, al utilizar medio basal (MS ó B5) con 2,4-D (0.5, 1, 2, 5 y 10 mg/l) + ANA (0.5, 1, 2, 5 y 10 mg/l) y con ANA (0.5 mg/l) + BA (0.5, 1, 2, 5 y 10 mg/l).

TABLA 10. RESPUESTA IN VITRO DE SECCIONES DE HIPOCOTILO DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADOS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN OSCURIDAD A 28 °C (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60 DIAS).

	MEDIO	COMBINACION HORMONAL (µM)		FORMACION DE CALLO									
				Número de explantes con respuesta/ explantes cultivados	%	TAMANO (1) %				CONSISTENCIA %		COLOR %	
						+	++	+++	++++	FRIABLE	NO FRIABLE	BLANCO	PARDO
1	MSB5	-	5	7 / 15	47	47	-	-	-	-	47	47	-
2	"	-	10	7 / 15	47	47	-	-	-	-	47	-	47
3	"	5	5	12 / 15	80	53	20	7	-	80	-	80	-
4	"	5	10	11 / 20	55	30	-	-	25	55	-	55	-
5	"	10	5	11 / 25	44	-	44	-	-	-	44	22	22
6	"	10	10	4 / 15	27	27	-	-	-	-	27	27	-

(1) + = menor de 3 mm; ++ = de 3 a 10 mm; +++ = de 10 a 15 mm; ++++ = de 15 a 20 mm.

TABLA 11. RESPUESTA IN VITRO DE SECCIONES DE HIPOCOTILO DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADOS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN FOTOPERIODO DE 16 HORAS LUZ, 28 °C, 1,700 LUX / 8 HORAS OSCURIDAD, 20 °C (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60 DIAS).

	MEDIO	COMBINACION HORMONAL(µM)		FORMACION DE CALLO									
		BA	ANA	Número de explantes con respuesta/ explantes cultivados	%	TAMANO (1) %		CONSISTENCIA %		COLOR %			
						+	++	FRIABLE	NO FRIABLE	BLANCO	AMARILLO	PARDO	
1	MSB5	5	-	0 / 30	0	-	-	-	-	-	-	-	-
2	"	5	0.1	2 / 30	7	7	-	-	7	-	-	-	7
3	"	5	1	6 / 45	13	13	-	-	13	-	-	-	13
4	"	10	-	1 / 30	3	3	-	-	3	-	-	-	3
5	"	10	0.1	8 / 50	16	14	2	-	16	-	8	-	8
6	"	10	1	9 / 50	18	14	4	-	18	-	9	-	9

(1) + = menor de 3 mm; ++ = de 3 a 10 mm.

Estos datos coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, en el que debe hacerse notar el hecho de que al utilizar únicamente 2,4-D, el porcentaje de repuesta fue de 47 %, a diferencia de los demás tratamientos donde la respuesta era muy baja o nula; respecto a las condiciones ambientales utilizadas por Nagmani y Venketeswaran (1983), fueron 12 horas luz, 7,000 lux y 25 °C, y a partir del callo formado, al resembrar en un medio con BA (2.0 mg/l), lograron la formación de primordios foliares, pero no la formación de plántulas.

Para otras especies de leguminosas, como Trifolium (trébol), Phillips y Collins (1979) reportan la generación de callo a partir de hipocótilo y al probar tejido meristemático, logran una cantidad mayor de callo que en tejidos no meristemáticos como los de hipocótilo.

Kameya y Widholm (1981) reportan para seis especies de Glycine, la formación de callo de hipocótilo, pero no el desarrollo de plántulas. Los mismos autores, refiriéndose a trabajos anteriores con las mismas especies, en las cuales a partir de hipocótilo se obtuvieron plántulas, sugieren que éstas surgieron del meristemo preexistente en los explantes. Para la especie estudiada, Leucaena leucocephala, al igual que para el género Glycine, hubo formación de callo, pero no se logró la regeneración de plantas.

Con base en los trabajos mencionados, en la mayoría de los cuales se logra regeneración, este explante parece ser de gran potencialidad, por lo que es recomendable seguir trabajando con él.

f. Cotiledón

En la tabla 12 se presentan los resultados para cotiledón, se puede observar que no se logró la proliferación de callo al utilizar una combinación de BA + ANA ó BA solo y que al utilizar BA + 2,4-D, la formación de callo fue pobre.

Cabe mencionar que unos minutos después de sembrar el cotiledón en el medio, éste adquiría una tinción anaranjada; cuando este color era más oscuro, los cotiledones no generaban callo.

Las respuestas variaron de 0 % (combinaciones 1 a la 6, 8 y 11) hasta 20 % (combinación 10), lográndose obtener con la combinación 12 un callo friable.

La potencialidad de las células de cotiledón en cuanto a la respuesta morfogénica quedó manifiesta debido a que después de tres meses de incubación, un callo en la combinación 10, desarrolló una plántula. La tinción de este medio no era tan oscura, por lo que se piensa que al evitar la tinción del medio, se evite también la inhibición del crecimiento y se logre la regeneración.

Nagmani y Venketeswaran (1983), al trabajar con Leucaena leucocephala, utilizaron cotiledón y obtuvieron proliferación de callo y generación de primordios foliares con las mismas combinaciones y concentraciones hormonales que citan para hipocótilo.

En seis especies de Glycine (Kameya y Widholm, 1981), no lograron la formación de plántulas a partir de cotiledón, en Glycine canescens, menos del 5 % del callo a partir de cotiledón formó yemas. Esto coincide con los callos de Leucaena leucocephala, en cuanto a baja capacidad morfogénica.

g. Tallo Joven

En la tabla 13, se presentan los resultados de secciones de tallo joven.

Las secciones de tallo se tomaron de plántulas de 15 días, germinadas en condiciones asépticas. La respuesta fue formación de callo, el cual en la mayoría de los casos resultó ser muy pequeño, no friable y de color pardo, excepto en la combinación 1, en donde éste fue friable, de color blanco y con buen rendimiento.

El porcentaje de respuesta varió de 7 % (combinación 6) a 53 % (combinación número 5).

De este tipo de explante, no existen citas bibliográficas anteriores. Para Leucaena leucocephala (Anon, 1983), se menciona la regeneración a partir de segmentos nodales de tallo de plantas de 1 a 2 años de edad. Al incubar en medio MS adicionado con K + BA, se obtuvieron brotes que al subcultivar regeneraron plántulas, sin lograr que se establecieran en tierra. Posiblemente en este caso, la regeneración ocurrió a partir de los meristemas presentes en los nodos. Pero este trabajo, no es comparable con nuestros resultados obtenidos para tallos jóvenes.

TABLA 12. RESPUESTA IN VITRO DE COTILEDONES DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADOS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN FOTOPERIODO DE 16 HORAS LUZ, 33 °C, 1,300 LUX / 8 HORAS OSCURIDAD, 21 °C (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60 DIAS).

MEDIO	COMBINACION HORMONAL (µM)			FORMACION DE CALLO												
	BA	ANA	2,4-D	Número de explantes con respuesta/ explantes cultivados	%	TAMARO (1) %				CONSISTENCIA %		COLOR %				
						+	++	+++	++++	FRIABLE	NO FRIABLE	BLANCO	VERDE	FARDO		
1 MSB5	5	-	-	0 / 20	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 "	5	0.1	-	0 / 20	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 "	5	1	-	0 / 20	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 "	10	-	-	0 / 20	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 "	10	0.1	-	0 / 20	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 "	10	1	-	0 / 20	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7 "	-	-	5	3 / 20	15	15	-	-	-	-	15	-	-	-	15	-
8 "	-	-	10	0 / 15	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 "	5	-	5	2 / 20	10	10	-	-	-	-	10	-	-	-	10	-
10 "	5	-	10	4 / 20	20	-	10	10	-	-	20	10	10	-	-	-
11 "	10	-	5	0 / 20	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12 "	10	-	10	2 / 20	10	5	-	-	5	10	-	5	-	-	5	-

(1) + = menor de 3 mm; ++ = de 3 a 10 mm; +++ = de 10 a 15 mm; ++++ = de 15 a 20 mm.

TABLA 13. RESPUESTA IN VITRO DE SECCIONES DE TALLO JOVEN DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADOS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN FOTOPERIODO DE 16 HORAS LUZ, 33 °C, 1,300 LUX / 8 HORAS OSCURIDAD, 21 °C (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60 DIAS).

	MEDIO	COMBINACION HORMONAL(µM)		FORMACION DE CALLO								
				Número de explantes con respuesta/ explantes cultivados	%	TAMANO (1) %			CONSISTENCIA %		COLOR %	
						+	++	+++	FRIABLE	NO FRIABLE	BLANCO	PARDO
1	MSB5	5	-	3 / 30	10	-	-	10	10	-	10	-
2	"	5	0.1	2 / 15	13	13	-	-	-	13	-	13
3	"	5	1	3 / 15	20	20	-	-	-	20	-	20
4	"	10	-	8 / 25	32	32	-	-	-	32	20	12
5	"	10	0.1	8 / 15	53	53	-	-	-	53	-	53
6	"	10	1	1 / 15	7	7	-	-	-	7	-	7

(1) + = menor de 3 mm; ++ = de 3 a 10 mm; +++ = de 10 a 15 mm.

h. Embrión

La respuesta morfogénica de los embriones se presenta en la tabla 14. En cuanto a formación de callo puede decirse que éste se observó en un solo caso (combinación 6) y en un porcentaje reducido (7 %). El callo fue muy pobre, no friable y de color verde.

Las principales respuestas fueron la formación de raíces en cuatro de las seis diferentes combinaciones hormonales pero la mayoría de las veces resultaron deformes. El mayor número de raíces se logró en la combinación 5. El desarrollo de plántulas ocurrió sólo en dos medios, con las combinaciones 2 y 3 de reguladores de crecimiento.

Fue notable la baja respuesta morfogénica observada, se puede suponer que esto se debió principalmente a la presencia de alguna sustancia o sustancias contenidas en el embrión y el cotiledón que fueron liberadas al medio, observándose una tinción de color anaranjado. Cuando el medio se coloreaba, el embrión no se desarrollaba, sólo cuando el color era más tenue, se observaba cierta respuesta.

La técnica de cultivo de embriones tiene varias aplicaciones, entre éstas, se pueden obtener los embriones libres de patógenos, ya que se encuentran en el ambiente estéril del óvulo y se pueden desarrollar plantas sanas, en caso de que la semilla se encuentre infestada (Yeung et al., 1981); o bien, se utiliza para obtener embriones que son cortados del fruto en una etapa temprana de desarrollo y que pudieron ser abortados si se dejan crecer de manera natural en el fruto, como serían embriones producidos por hibridización interespecífica y que pueden tener algún defecto o una nutrición inadecuada (Hartman y Kester, 1975).

Hernández (1984), considera al embrión de Leucaena leucocephala Cv. HAWAII como la mejor estructura, en comparación con el cotiledón, para la inducción y mantenimiento de callo al utilizar 2,4-D (2 mg/l) + K (0.01 mg/l), logra la diferenciación de tallo y hojas con una combinación de ANA + K y de raicillas con AIA + K, formados a partir de callo.

Con esto se puede decir que la combinación BA + ANA utilizada con Leucaena leucocephala Cv. PERU, no tuvo un efecto como el de ANA + K utilizada con el Cv. HAWAII, ya que no se obtuvo formación de callo, sino que las plántulas se formaron directamente del embrión. En ambos culti

TABLA 14. RESPUESTA MORFOGENETICA IN VITRO DE EMBRIONES DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADOS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN FOTOPERIODO DE 16 HORAS LUZ, 33 °C, 1,300 LUX / 8 HORAS OSCURIDAD, 21 °C. (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60 DIAS).

	MEDIO	COMBINACION HORMONAL (µM)		RESPUESTA			FORMACION DE CALLO			RESPUESTA MORFOGENETICA			
		BA	ABA	Número de explantes/ explantes cultivados	e/o	o/o	TAMANO	CONSISTENCIA	COLOR	RAIZ		PLANTULA	
							(1) %	%	%	%	TAMANO	%	TAMANO
						+ RO FRIABLE		VERDE		(cm)		(cm)	
1	MSB5	5	-	1 / 10	10	0	-	-	-	10	1.5	-	-
2	"	5	0.1	1 / 7	14	0	-	-	-	-	-	14	2
3	"	5	1	2 / 9	22	0	-	-	-	11	1	11	4.3
4	"	10	-	3 / 15	20	0	-	-	-	20	2	-	-
5	"	10	0.1	0 / 7	0	0	-	-	-	-	-	-	-
6	"	10	1	5 / 14	36	7	7	7	7	36	2	-	-

(1) + = menor de 3 mm.

vares, se podría utilizar 2,4-D en combinación con una citocinina, ya sea esta K o BA, para la obtención de callo.

Venketeswaran y Romano (1982), también reportan que el embrión de Leucaena leucocephala produce gran cantidad de callo, así como regeneración de plántulas. Sin embargo, este trabajo no se puede tomar en consideración ya que únicamente señalan que se utilizó un medio de cultivo que contenía concentraciones óptimas de reguladores de crecimiento, sin especificar cuáles. Lo mismo sucede con el trabajo de Venketeswaran y Gandhi (1982), donde se menciona la regeneración vegetativa de embriones que se transfirieron a un medio con factores específicos de crecimiento, del que tampoco se brinda información.

Resultaba lógico suponer que el embrión de Leucaena leucocephala sería un explante con mayores posibilidades morfogénicas in vitro que otros, como por ejemplo, el tallo joven, pero su respuesta fue pobre, y para incrementarla, es necesario trabajar más con él, sobre todo para llegar a controlar la substancia o substancias que intervienen en la tinción del medio de cultivo y cuyo efecto parece ser responsable de la inhibición del desarrollo.

i. Meristemas Apicales

El material biológico que presentó una mayor capacidad morfogénica en el presente trabajo fueron los meristemas apicales (tablas 15 y 16). De las dos condiciones probadas, la respuesta morfogénica se expresó en ambas, obteniéndose en fotoperíodo de 16 horas luz, 28 °C, 1,700 lux / 8 horas obscuridad, 20 °C, yemas, brotes y plántulas.

El porcentaje de respuesta para estas condiciones (tabla 15), varió con un intervalo de 45 % (combinación 6) a 81% (combinación 5). En general, se observó la formación en la mayoría de los casos, de un callo pardo debido a la oxidación, éste era pequeño y no friable. Sin embargo, aproximadamente a los 2 meses, se formaban yemas, brotes o una plántula por meristemo de este callo. En todas las combinaciones probadas hubo formación de brotes, sin embargo, utilizando BA 5 μ M, no se formaron yemas.

Las mejores combinaciones hormonales para obtención de plántulas fueron la 1 y 2, aunque el porcentaje de formación de éstas fue muy bajo

(15 %).

Al utilizar combinaciones de BA + 2,4-D, en condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz, 33 °C, 1,300 lux/ 8 horas oscuridad, 21 °C (tabla 16), la respuesta morfogénica y la respuesta de formación de callo fueron menores que en las condiciones anteriores al utilizar BA + ANA.

Para el género Leucaena específicamente, no se ha trabajado con este explante. Para otras leguminosas ha sido posible regenerar plantas completas a partir de meristemas apicales, aunque no todas han tenido igual respuesta. Kartha y Gamborg (1978), reportan para chícharo y garbanzo el 100 % de regeneración de plantas a partir de meristemas, y al utilizar soya y frijol blanco, la frecuencia disminuye notablemente a una cifra menor del 50 %.

En trébol, Phillips y Collins (1979) reportan la formación de un callo pequeño así como la proliferación de éste con una frecuencia de regeneración de 30 a 80 %, al utilizar 0.006 mg/l de picloram + BA (0.1 a 10 mg/l) incubados de 2 a 3 meses. Al substituir picloram por ANA (1 a 2 mg/l), obtuvieron resultados similares. Al utilizar solamente 2,4-D, no se logró la producción de callos derivados de meristemas, ni en combinación con otras auxinas. En los diferentes cultivares se ha visto una variable importante en la regeneración de plántulas de trébol a partir de callo.

En otras leguminosas, Bajaj y Dhanju (1979) reportan la regeneración de plantas completas a partir de meristemas de Cicer arietinum, Lens esculentum, Pisum sativum, Phaseolus aureus y P. mungo. El porcentaje de regeneración fue directamente proporcional al tamaño del meristemo, mientras más grande (2 mm) mayor regeneración, se encontró la mejor respuesta de crecimiento y desarrollo de plantas en medio MS + AIA (2 mg/l) + K (0.5 mg/l), en una semana, ya se observaba crecimiento. Al utilizar 2,4-D (1 a 2 mg/l), había gran proliferación de callo, mientras que la formación de raíces y plántulas fue fuertemente inhibida, por lo cual, la relación auxina/citosinina, influyó considerablemente en la respuesta. Un incremento de K (2 mg/l) inhibió la formación de raíz mientras que el AIA (2 mg/l) produjo plantas.

Kartha et al. (1981), han obtenido regeneración a partir de meriste

TABLA 15. RESPUESTA MORFOGENETICA IN VITRO DE MERISTEMOS APICALES DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADOS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN FOTOPERIODO DE 16 HORAS LUZ, 28 °C, 1,700 LUX / 8 HORAS OSCURIDAD, 20 °C (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60 DIAS).

	MEDIO	COMBINACION HORMONAL (uM)		RESPUESTA		FORMACION DE CALLO								RESPUESTA MORFOGENETICA			
		BA	ANA	Número de explantes/explantos cultivados	v/v		TAMAÑO (1) %		CONSISTENCIA %	HO TRIABLE	COLOR %				YEMAS %	BROTOS %	PLANTULAS %
					+	++	BLANCO	AMARILLO			VERDE	PARDO					
1	MSB5	5	-	13 / 20	65	50	50	-	50	-	-	-	50	-	40	15	
2	"	5	0.1	12 / 20	60	45	45	-	45	-	25	-	20	15	20	15	
3	"	5	1	16 / 20	80	80	80	-	80	-	-	-	80	25	30	-	
4	"	10	-	15 / 20	75	75	75	-	75	-	38	-	37	40	30	-	
5	"	10	0.1	17 / 21	81	76	76	-	76	-	-	-	76	40	25	5	
6	"	10	1	9 / 20	45	45	45	-	45	-	-	-	45	15	20	-	

(1) + = menor de 3 mm; ++ = de 3 a 10 mm.

TABLA 16. RESPUESTA MORFOGENETICA IN VITRO DE MERISTEMOS APICALES DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA CV. FERU
INCUBADOS CON DIFERENTES COMBINACIONES Y CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN FOTOPERIO
DO DE 16 HORAS LUZ, 33 °C, 1,300 LUZ / 8 HORAS OSCURIDAD, 21 °C (OBSERVACIONES EFECTUADAS A LOS 60
DIAS).

	MEDIO	COMBINACION HORMONAL(µM)		RESPUESTA		FORMACION DE CALLO								RESPUESTA MORFOGENETICA			
						Número de explantes/cultivados	%	%	TAMANO (1) %	CONSISTEN CIA %	COLOR %				YEMAS %	BROTES %	PLANTULAS %
											+	++	NO FRIABLE	BLANCO			
1	MSB5	5	-	3 / 10	30	20	-	20	20	-	20	-	-	-	30	-	
2	"	5	0.1	4 / 8	50	50	50	-	50	-	-	-	50	-	13	-	
3	"	5	1	4 / 10	40	30	30	-	30	-	-	15	15	-	40	-	
4	"	10	-	2 / 7	29	0	-	-	-	-	-	-	-	-	29	-	
5	"	10	0.1	2 / 11	18	18	18	-	18	9	-	-	9	-	-	-	
6	"	10	1	1 / 9	11	11	11	-	11	-	-	-	11	-	-	-	

(1) + = menor de 3 mm; ++ = de 3 a 10 mm.

mos apicales de soya, frijol blanco, cacahuate, garbanzo y frijol en medio MS solidificado con agar y suplementado con BA y ANA, sólo o en combinación. En todas estas especies, las respuestas fueron diferentes. Las plántulas de soya regeneraron sólo con BA (0.05 a 0.1 μM) + ANA (1 μM). Los meristemos de garbanzo en el 100 % de los casos no requirieron hormonas exógenas para regeneración, niveles muy bajos de BA (0.1 a 0.005 μM) asociados con niveles bajos de ANA (0.05 μM) también indujeron regeneración a muy baja frecuencia. Los meristemos de frijol también se diferenciaron en plántulas en un medio libre de hormonas o en un medio que contenía sólo BA. Una brotación múltiple de 15 a 30 brotes por meristemo, se indujo en meristemos de frijol con un incremento en la concentración de citocininas (10 μM BA). El enraizamiento de las plántulas de frijol se logró en medio MS a la mitad de la concentración de los nutrientes, con AIA (1 μM). Aunque la mayoría de las combinaciones de BA ó BA + ANA indujo regeneración de plántulas de meristemos de cacahuate y garbanzo, la regeneración de plantas completas fue más frecuente (75 %) sólo con 0.1 μM BA en combinación con 10 μM ANA. En garbanzo se formaron muchas ramas de las plántulas principales y el enraizamiento sólo se logró al cultivar en medio con AIB (1 μM). Las plántulas regeneradas de todos los meristemos de estas leguminosas fueron exitosamente transferidas a tierra, llegando hasta la madurez.

Con ésto, se puede decir que existe una amplia gama de respuestas entre leguminosas; la capacidad de regeneración varía mucho entre tejidos, en algunas especies se induce, mientras que en otras el proceso morfogenético no se dispara (Gamborg y Shyluk, 1981).

No obstante, los meristemos exhiben un amplio intervalo de respuesta morfogenética en cultivo. El proceso de diferenciación de meristemos para la formación de plántulas, raíces, callo, brotes múltiples o plantas completas, depende de muchos factores: 1) el tamaño de los meristemos, 2) el tipo de medio de cultivo, 3) la clase y concentración de hormonas de crecimiento, 4) las condiciones ambientales -luz, temperatura y fotoperíodo-, etc. (Kantha, 1981).

Las condiciones ambientales en las cuales ha sido satisfactoria la respuesta de meristemos de garbanzo, soya, frijol blanco, cacahuate, camo

te, café, cassava y jitomate, han sido a una temperatura constante de 25 °C, fotoperíodo de 16 horas luz a 3,000 ó 4,000 lux (Kantha, 1981), por lo que probablemente, para L. Leucocephala sea necesario incrementar también la iluminación y mantener una temperatura constante, sin embargo, ésto incrementaría el problema de oxidación de fenoles estimulada por la luz.

En Leucaena, la frecuencia de regeneración fue menor en comparación con otras leguminosas, sin embargo, si hubo desarrollo de plántulas pero el potencial morfogénético se expresó después de mucho tiempo. Es necesario seguir probando con este tipo de explante, con el cual se obtuvo la mejor respuesta morfogénética.

En meristemas apicales dejados más tiempo en incubación, se observó, por ejemplo, en la combinación 10 µM BA + 0.1 µM 2,4-D, la formación de plántulas a partir de un meristemo, después de 6 meses de incubación. Con ésto se reafirma que la potencialidad de estos explantes tarda en manifestarse in vitro.

Es pues necesario, probar más con estos explantes, así como probar con diferentes tamaños de la región apical y más medios de cultivo.

La oxidación de los tejidos fue un factor limitante del crecimiento, común para los nueve explantes analizados, provocó una necrosis que inhibía la respuesta de los tejidos.

La oxidación es característica de muchas especies tropicales (Caldas et al., 1975) que contienen una gran cantidad de fenoles y de oxidasas fenólicas, que se unen al seccionar los tejidos, provocando la oxidación de los compuestos fenólicos (Mónaco et al., 1977).

Sóloamente en un caso, con folíolos maduros, en condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz, 33 °C, 1,300 lux/ 8 horas oscuridad, 21 °C, se utilizó como antioxidante una solución de 100 mg/l de ácido ascórbico + 150 mg/l de ácido cítrico, sumergiéndose los explantes antes de la siembra en esta solución previamente esterilizada por filtración en membrana Millipore de poro 0.45 µm. Con este tratamiento, disminuyó la oxidación, pero no se obtuvo una mejor respuesta, por lo cual no se utilizó para otros explantes.

También se presentó oxidación independientemente de las condiciones ambientales incluyendo obscuridad, en contraste con lo que se ha informado por Mónico et al. (1977), que para cultivos mantenidos en obscuridad, hay una disminución de la producción de fenoles, ya que ésta es estimulada por la luz.

Se han probado diferentes sustancias como antioxidantes, por ejemplo, cisteína, ditiotreitól, glutión, ácido ascórbico, dietilditiocarbamato (Caldas et al., 1975) y carbón activado, el cual, para hojas cultivadas de Coffea, al añadirlo al medio de cultivo, no influye en el crecimiento o desarrollo (Mónico et al., 1977). Antes de lograr un crecimiento óptimo in vitro será necesario encontrar un antioxidante efectivo que, como el carbón activado para Coffea, no influya en el crecimiento.

Cultivos en Suspensión

Los cultivos en suspensión se iniciaron a partir de callo obtenidos de folíolos maduros y mantenidos en medio con las mismas combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento con los cuales se obtuvo el callo.

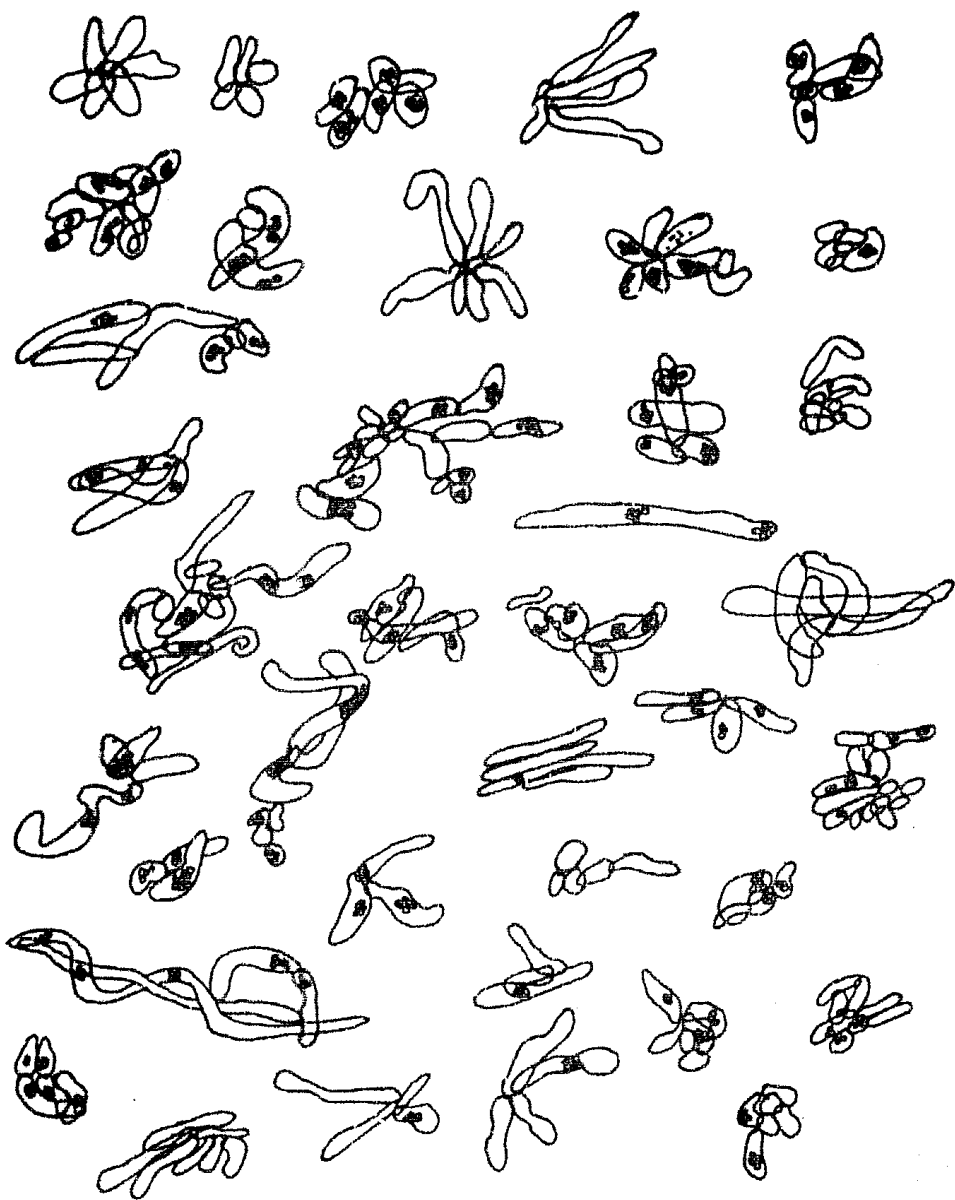
En la tabla 17 se presentan algunas pruebas de viabilidad realizadas para estos cultivos. En ésta, se puede observar el gran porcentaje de células no viables tanto en el medio con carbón activado como en el medio que carece de éste. Para los casos 2 y 6, es notable un efecto inicial del carbón activado, en donde se detecta un incremento de células viables, por lo que probablemente, éste haya actuado en la absorción de metabolitos tóxicos al principio de la incubación. No obstante, esto no se puede generalizar, ya que en el caso 4 con carbón activado, no se observó el mismo efecto. De cualquier forma, la viabilidad celular es muy baja y esto fue un factor limitante en los cultivos en suspensión en los cuales se intentó cuantificar el crecimiento celular a diferentes tiempos con base en el peso fresco, peso seco y conteo celular. Esto no se logró debido a que la viabilidad celular era muy baja o nula al inicio de los cultivos, por lo que los cultivos mostraron un comportamiento anormal, sin seguir las fases de crecimiento celular que se han publicado para cultivos en suspensión in vitro (King y Street, 1977).

TABLA 17. VIABILIDAD CELULAR EN CULTIVOS EN SUSPENSION OBTENIDOS DE CALLO DE FOLIOLOS MADUROS DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA CV. PERU INCUBADOS EN LUZ CONTINUA, 24.6 A 29.6 °C, 1,650 LUX, 100 RPM.

	COMBINACION HORMONAL (uM)			CARBON ACTIVADO	DIA	CELULAS VIABLES %	CELULAS NO VIABLES %
	BA	ANA	2,4-D				
1	5	1	-	-	1	3.6	99.4
					2	0.8	99.2
					6	4.9	99.2
					8	0.1	99.9
					10	0.3	99.7
2	5	1	-	+	2	5	95
					6	30.6	69.4
					10	0	100
3	5	-	5	-	1	0.4	99.6
					2	0.8	99.2
					6	2.9	97.1
					10	0.3	99.7
4	5	-	5	+	1	0.4	99.6
					2	0	100
					6	0.8	99.2
					10	0.1	99.9
5	10	-	5	-	1	0.2	99.8
					6	0.6	99.4
					10	0	100
6	10	-	5	+	1	0	100
					6	4.4	95.6
					10	0	100

No obstante, se logró obtener un cultivo en suspensión con células libres y agregados celulares (figura 1), a diferencia de otras especies, en las cuales es necesario añadir una solución de CrO_3 o CrO_3 con ácido clorhídrico, EDTA ó pectinasa para lograr la separación de las células (Dodds y Roberts, 1982), o bien utilizar algún método como el de alginate de calcio reportado para la obtención de células finas en suspensión para las especies Catharanthus roseus, Nicotiana tabacum y Daucus carota (Morris y Fowler, 1981).

Es necesario determinar el factor limitante del crecimiento en estos cultivos, para poder desarrollarlos y lograr posteriormente la inducción de embriogénesis somática.



250 μ m

FIGURA 1. AGREGADOS CELULARES. CULTIVOS EN SUSPENSION.
MEDIO MSB5 + 10 μ M BA + 5 μ M 2,4-D.

5. CONCLUSIONES

De los explantes tratados en el presente trabajo, la mejor respuesta morfogénética se presentó en meristemos apicales y la mejor respuesta de formación de callo, en folíolos maduros.

La respuesta morfogénética en meristemos apicales fue mayor en la combinación 2, tabla 15.

La mejor consistencia de callo en folíolos maduros se obtuvo en las combinaciones hormonales 5 y 12, tabla 3. Al utilizar únicamente 2,4-D, hubo formación de callo sólo en secciones de hipocótilo. El agua de coco no tuvo efectos benéficos para folíolos maduros.

Las condiciones ambientales en que se obtuvieron las mejores respuestas tanto para folíolos maduros como para meristemos apicales fueron foto período de 16 horas luz, 28 °C, 1,700 lux/ 8 horas oscuridad, 20 °C.

En cultivos en suspensión es necesario determinar el factor limitante de la viabilidad celular. Estos cultivos, así como el callo, ofrecen herramientas para lograr líneas celulares de las cuales, al controlar las condiciones, se pueda inducir la morfogénesis o embriogénesis y pueda tenerse la posibilidad de regenerar plantas con características deseables, habiendo eliminado aquellas por las cuales el uso de esta especie no se ha hecho extensivo en distintos campos.

Para lograr que la capacidad morfogénética de Leucaena leucocephala se exprese en los distintos explantes cultivados in vitro, deberán realizarse múltiples experimentos, con un intervalo mucho mayor que el probado bajo variadas condiciones ambientales y nutricionales, deberá así mismo controlarse la oxidación así como el contenido de la sustancia o sustancias inhibitoras que liberan los embriones y cotiledones al medio de cultivo.

BIBLIOGRAFIA

- ANON, 1983. Tree Improvement, Tissue Culture. Subabul (Leucaena leucocephala) Newsletter, 1 : 67.
- BAJAJ, Y.P.S. y M.S. DHANJU. 1979. Regeneration of Plants from Apical Meristem Tips of some Legumes. Curr. Sci. 48 : 906-907.
- BREWBAKER, J.L. 1975. 'Hawaiian Giant' Koa Haole. College of Tropical Agriculture. Hawaii Agricultural Experiment Station. Miscellaneous. Pub. 125.
- BREWBAKER, J.L. 1982. Systematics, Self-Incompatibility. Breeding Systems and Genetic Improvement of Leucaena Species. In: "Leucaena Research in the Asian Pacific Region". Ottawa, Canada : 17-22.
- BUTCHER, D.N. y D.S. INGRAM. 1979. Plant Tissue Culture. Arnold Publ., London : 68.
- CALDAS, I., O.J. CROCCOMO y W.R. SHARP. 1975. Handbook of Plant Tissue Culture. Part I. Application of Nuclear Energy for the Study of Cellular and Developmental Biology. CENA, Piracicaba. Ed. W.R. Sharp y O.J. Crococomo : 1, 13-25, 44, 78-79.
- CHAVEZ, V., A. MAZARI, C. LOYOLA y A. RUBLUO. 1983. Regeneración in vitro de Leucaena leucocephala. Resúmenes 4a. Reunión Académica, Instituto de Biología, UNAM : 17.
- CHEN, Z., C. QUIAN, X. XU y Z. DENG. 1982. Anther Culture Techniques of Rubber Tree and Sugarcane. In: Plant Tissue Culture. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue Culture. Ed. A. Fujiwara. Japanese Assoc. of Plant Tissue and Cell Culture, Tokyo : 533-534.
- CHIEN, Y.C., K.N. KAO y L.R. WETTER. 1982. Chromosomal and Isozyme Studies of Nicotiana tabacum - Glycine max Hybrid Cell Lines. In: Plant Tissue Culture. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue Culture. Ed. A. Fujiwara. Japanese Assoc. of Plant Tissue and Cell Culture, Tokyo : 633-634.
- CHILD, R. 1974. Coconuts. Tropical Agricultural Series, Longman, London : 310-313.
- DIX, L. y J. VAN STADEN. 1982. Auxin and gibberellin-like substances in coconut milk and malt extract. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1 : 239-245.
- DODDS, J.H. y L.W. ROBERTS. 1982. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge Univ. Press, Cambridge : 1-9, 21-35, 149-161.

- DUKE, J.A. 1981. Handbook of Legumes of World Economic Importance. Plenum Press, New York : 120-122.
- EVANS, D.A., W.R. SHARP y C.F. FLICK. 1981. Growth Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis. In : Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture. Ed. T.A. Thorpe. Academic Press, New York : 45-113.
- FELKER, P. y R.S. BANDURSKI. 1979. Uses and potential uses of leguminous trees for minimal energy input agriculture. Econ. Bot. 33 : 172-184.
- GAMBORG, O.L., R.A. MILLER y K. OJIMA. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50 : 151-158.
- GAMBORG, O.L., F. CONSTABEL, L. FOWKE, K.N. KAO, K. OHYAMA, K. KARTHA y L. PELCHER. 1974. Protoplast and Cell Culture Methods in Somatic Hybridization in Higher Plants. Can J. Genet. Cytol. 16 : 737-750.
- GAMBORG, O.L. y L.R. WETTER. 1975. Plant Tissue Culture Methods. National Research Council, Canada : 1-2.
- GAMBORG, O.L., T. MURASHIGE, T.A. THORPE y I.K. VASIL. 1976. Plant Tissue Culture Media. In Vitro 12 : 473-478.
- GAMBORG, O.L. y J.P. SHYLUK. 1981. Nutrition Media and Characteristics of Plant Cell and Tissue Cultures. In : Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Ed. T.A. Thorpe. Academic Press, New York : 21-42.
- GAMBORG, O.L. 1982. Callus and Cell Culture. In : Plant Tissue Culture Methods. Ed. L.R. Wetter y F. Constabel. National Research Council, Canada : 1-9.
- GAUTHERET, R.J. 1982. Plant Tissue Culture : The History. In : Plant Tissue Culture. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Ed. A. Fujiwara, Japanese Assoc. of Plant Tissue Culture, Tokyo : 7-12.
- GONZALEZ, V., J.L. BREWBAKER y D.E. HAMILL. 1967. Leucaena Cytogenetics in Relation to the Breeding of Low Mimosine Lines. Crop. Sci. 7 : 146-148.
- HARTMAN, H.T. y D.E. KESLER. 1975. Aseptic Methods of Micro-Propagation. In: Plant Propagation Principles and Practices. Prentice Hall, New Jersey : 543-545.
- HERNANDEZ, A.B.C. 1984. Establecimiento de cultivo de tejidos in vitro de Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit. Tesis Profesional, Fac. Ciencias, UNAM : 87.
- KAMEYA, T. y J. WIDHOLM. 1981. Plant Regeneration from Hypocotyl Sections of Glycine Species. Plant Sci Lett. 21 : 289-294.

- KARTHA, K.K., O.L. GAMBORG y F. CONSTABEL. 1974. Regeneration of Pea (*Pisum sativum* L.) Plants from Shoot Apical Meristems. *Z. Pflanzenphysiol* 72 : 172-176.
- KARTHA, K.K. y O.L. GAMBORG. 1978. Meristem Culture Techniques in the Production of Disease-Free Plants and Freeze-Preservation of Germplasm of Tropical Tuber Crops and Grain Legumes. In: *Diseases of Tropical Food Crops*. Ed. H. Haraite y J.A. Meyer, Proc. Intl. Symp. Université Catholique, Louvain-La Neuve, Belgium : 267-283.
- KARTHA, K.K. 1981. Meristem Culture and Cryopreservation. Methods and Applications. In: *Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture*. Ed. T.A. Thorpe. Academic Press, New York : 181-211.
- KARTHA, K.K., K. PAHL, N.L. LEUNG y L.A. MROGINSKI. 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes : soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean. *Can J Bot* 59 : 1671-1679.
- KERBAUY, G.B. 1984. Plant regeneration of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. *Plant Cell Rep* 3 : 27-29.
- KING, P.J. y H.E. STREET. 1977. Growth Patterns in Cell Cultures. In: *Plant Tissue and Cell Culture*. Ed. H.E. Street, Blackwell Scientific Publ., Oxford : 307-387.
- KRETSCHMER, A.E. 1979. Characterization and Preliminary Evaluation. In : *Handbook for the Collection, Preservation and Characterization of Tropical Forage Germplasm Resources*. CIAT, Colombia : 33-34.
- LUCKWILL, L.C. 1979. *Growth Regulators in Crop Production*. Ed. Arnold Publ., London : 25-27.
- MONACO, L.C., R.R. SONDAHL, A. CARVAHLO, O.J. CROCOMO y W.R. SHARP. 1977. Applications of Tissue Culture in the Improvement of Coffee. In : *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Ed. J. Reinert y Y.P.S. Bajaj. Springer Verlag, Berlin : 117-118.
- MORRIS, P. y M.W. FOWLER. 1981. A new method for the production of fine plant cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1 : 15-24.
- MROGINSKI, L.A. y K.K. KARTHA. 1981a. Regeneration of Plants from Callus Tissue of the Forage Legume *Stylosanthes guianensis*. *Plant Sci Lett.* 23 : 345-351.
- MROGINSKI, L.A. y K.K. KARTHA. 1981b. Regeneration of Pea (*Pisum sativum* L. cv. Century) Plants by *in vitro* Culture of Immature Leaflets. *Plant Cell Rep.* 1 : 64-66.
- MROGINSKI, L.A., K.K. KARTHA y J.F. SHYLUK. 1981. Regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plantlets by *in vitro* culture of immature leaves. *Can J. Bot.* 59 : 826-830.

- MROGINSKI, L.A. y K.K. KARTHA. 1984. Tissue Culture of Legumes for Crop Improvement. Plant Breeding Reviews 2 (en prensa).
- MURASHIGE, T. y F. SKOOG. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol Plant. 15 : 473-494.
- MURASHIGE, T. 1978. The Impact of Plant Tissue Culture on Agriculture. In: Frontiers of Plant Tissue Culture. Ed. T.A. Thorpe, IAPTC, Calgary : 15-26.
- MAGHANI, R. y S. VENKETESWARAN. 1983. In vitro culture of hypocotyl and cotyledon segments of Leucaena. Leucaena Research Reports 4 : 88-89.
- NARAYANASWAMY, S. 1977. Regeneration of Plants from Tissue Cultures. In : Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Ed. J. Reinert y Y.P.S. Bajaj. Springer Verlag, Berlin : 117-118.
- NEUMANN, K.H., L. BENDER, A. KUNAR y M. SZEGOE. 1982. Photosynthesis and Pathways of Carbon in Tissue Culture of Daucus and Arachis. In : Plant Tissue Culture, Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Ed. A. Fujiwara, Japanese Assoc. for Plant Tissue Culture, Tokyo : 251-252.
- OLVERA, E. y S.H. WEST. 1980. Leucaena Seed Scarification I and II. Leucaena Newsletter. 1 : 52.
- ORTEGA, C.M. 1980. Potencial de la Leucaena (Leucaena leucocephala) (Lam.) de Wit en Panamá. Carta Informativa Peruana. Inst. Inv. Peruanas de Panamá. 8 : 6-8.
- PEASLEY, E.L. y G.B. COLLINS. 1980. Development of an in vitro culture system for Leucaena. Leucaena Newsletter. 1 : 54.
- PEREZ GUERRERO, Z.J. 1979. Leucaena Leguminosa Tropical Mexicana, Usos y Potencial. Tesis Profesional, Universidad Autónoma de Chapingo, México : 80.
- PHILLIPS, G.C. y G.E. COLLINS. 1979. In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Sci. 19 : 59-64.
- RAVISHANKAR, G.A., AMRITA WALI y S. GREWAL. 1983. Plantlet formation through tissue culture of Leucaena leucocephala. Leucaena Research Reports. 4 : 37.
- RUBLUO, A., K.K. KARTHA, L.A. MROGINSKI y J. DICK. 1984. Plant Regeneration from Pea Leaflets Cultures in vitro and Genetic Stability of Regenerants. Z. Pflanzenphysiol. (en prensa).
- SALISBURY, F.B. y C.W. ROSS. 1978. Plant Physiology. Wadsworth Publ. Co., California : 422.
- SHARP, W.R., D.A. EVANS y M.R. SONDAHL. 1982. Application of Somatic Embryo genesis to Crop Improvement. In: Plant Tissue and Cell Culture, Proc. 5th Intl. Cong. Ed. A. Fujiwara, Japanese Assoc. for Plant Tissue Culture, Tokyo : 759-762.

STABA, E.J. 1969. Plant Tissue Culture as a Technique for the Phytochemist. Recent Advances in Phytochemistry. 2 : 75-76.

STREET, H.E. 1977a. Cell (Suspension) Culture Techniques. In: Plant Tissue and Cell Culture. Ed. H.E. Street, Blackwell Scientific Publ., Oxford : 85-102.

STREET, H.E. 1977b. Old Problems and New Perspectives. In: Plant Tissue and Cell Culture. Ed. H.E. Street, Blackwell Scientific Publ., Oxford : 501-511.

STREET, H.E. 1977c. Plant Cell Culture. In: The Molecular Biology of Plant Cells. Ed. H.E. Smith, Blackwell Scientific Publ., Oxford : 393-417.

TRAN THANH VAN, K.M. 1981. Control of Morphogenesis in In Vitro Cultures. Ann Rev Plant Physiol. 32 : 291-311.

VENKETESWARAN, S. y V. GANDHI. 1982. Mass Propagation and Genetic Improvement of Forest Trees for Biomass Production by Tissue Culture. Biomass 2 : 5-15.

VENKETESWARAN, S. y E.J. ROMANO. 1982. Tissue Culture of Forest Trees for Biomass Energy Production through in vitro Propagation. In: Plant Tissue Culture, Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Ed. A. Fujiwara, Japanese Assoc. for Plant Tissue Culture, Tokyo : 725-726.

WANG, P.C. y L.C. HUANG. 1976. Beneficial Effects of Activated Charcoal on Plant Tissue and Organ Cultures. In Vitro 12 : 260-262.

YEUNG, E.C., T.A. THORPE y C.J. JEHNSSEN. 1981. In vitro Fertilization and Embryo Culture. In: Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Academic Press, New York : 253-271.

ZARATE, P.S. 1982. Las especies de Leucaena Benth. de Oaxaca con notas sobre la sistemática del género para México. Tesis Profesional, Fac. Ciencias, UNAM : XI + 167.

APENDICE 1. MEDIO DE CULTIVO MSB5.

MACRONUTRIENTES

10 X

SOLUCION CONCENTRADA 1.	NH_4NO_3 _____	1,650 mg/l	_____	16,500 mg/10 l.
20 litros X 400 ml	KNO_3 _____	1,900 mg/l	_____	19,000 mg/10 l.
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ _____	370 mg/l	_____	3,700 mg/10 l.
	KH_2PO_4 _____	170 mg/l	_____	1,700 mg/10 l.
SOLUCION CONCENTRADA 2.	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ _____	440 mg/l	_____	4,400 mg/10 l.
10 litros X 100 ml				

MICRONUTRIENTES

SOLUCION CONCENTRADA 3.	KI _____	0.83 mg/l	_____	8.3 mg/10 l.
20 litros X 200 ml	H_3BO_3 _____	6.2 mg/l	_____	62.0 mg/10 l.
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ _____	22.3 mg/l	_____	223.0 mg/10 l.
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ _____	8.3 mg/l	_____	83.0 mg/10 l.
	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ _____	0.25 mg/l	_____	2.5 mg/10 l.
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ _____	0.025 mg/l	_____	0.25 mg/10 l.
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ _____	0.025 mg/l	_____	0.25 mg/10 l.
SOLUCION CONCENTRADA 4.	Na_2EDTA _____	37.3 mg/l	_____	373 mg/10 l.
20 litros X 100 ml	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ _____	27.8 mg/l	_____	278 mg/10 l.
SOLUCION CONCENTRADA 5.	Inositol _____	100 mg/l	_____	1000 mg/10 l.
20 litros X 100 ml				

VITAMINAS B5

SOLUCION CONCENTRADA 6.	Acido Nicotínico _____	1.0 mg/l	_____	10 mg/10 l.
10 litros X 100 ml	Piridoxina·HCl _____	1.0 mg/l	_____	10 mg/10 l.
	Thiamina·HCl _____	10.0 mg/l	_____	100 mg/10 l.
	Sacarosa _____	30 g/l		
	Agua de Coco _____	150 ml/l		
	Agar _____	8 g/l		

PREPARACION DE SOLUCIONES CONCENTRADAS

Los reguladores de crecimiento utilizados se prepararon en soluciones 10^{-3} M.

El 2,4-D y el ANA, se disolvieron en etanol, se calentaron ligeramente y diluyeron gradualmente en 100 ml de agua destilada. Después se guardaron en refrigeración hasta ser utilizados (Gamborg y Shyluk, 1981).

La BA se disolvió en un pequeño volumen de una solución 0.5 N HCl, calentada ligeramente y diluida en 100 ml de agua destilada y también almacenada en refrigeración (Gamborg y Shyluk, 1981).

AGRADECIMIENTOS

De manera especial deseo agradecer al Dr. Abraham Rubluo la dirección de esta tesis, así como sus acertadas sugerencias.

Al M. en C. Víctor Manuel Chávez, Dr. Jesús Manuel León Cázares, M. en C. Judith Márquez y Dra. Ma. Cristina Pérez Amador por su ayuda y comentarios.

Al Biólogo Sergio Zárate por su cooperación.

Al personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico por su apoyo en diferentes aspectos del trabajo.