



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

OBTENCION In Vitro DE EMBRIONES SOMATICOS A
PARTIR DE OVULOS FECUNDADOS DE Carica papaya L.

D. N. A. M.
FACULTAD DE ONTOGENIA
SOPITECHS - CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO AGRICOLA

P R E S E N T A N :

CARLOS CARBAJAL HERRERA

PATRICIA OLMOS NAVARRO

DIRECTOR DE LA TESIS:

DR. HECTOR GONZALEZ ROSAS



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.

CONTENIDO

	PAGINA
LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.....	vi
LISTA DE CUADROS Y FOTOGRAFÍAS.....	vii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	5
REVISION DE LITERATURA.....	6
Descripción botánica.....	6
Descripción general del virus de la Mancha Anular.....	9
Embriogénesis sexual ó cigótica.....	16
Origen y desarrollo del embrión.....	16
Estructura final del embrión.....	20
Origen y papel del endospermo.....	22
Diferenciación del embrión en plántulas.....	28
Embriogénesis somática.....	30
Embriogénesis asexual natural.....	31
Embriogénesis asexual inducida.....	33
Factores que afectan la embriogénesis <u>in vitro</u>	37
1. Reguladores de crecimiento.....	37
2. Medio de cultivo.....	44
3. Período de cultivo.....	50
4. Tipo y tamaño del explante.....	51
Origen del embrión.....	55
Efecto del 2,4-D en la embriogénesis inducida.....	58
MATERIALES Y METODOS.....	65
RESULTADOS.....	72
DISCUSION.....	84

	PAGINA
CONCLUSIONES.....	90
SUGERENCIAS.....	92
LITERATURA CITADA.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO

Acido Indolacético	AIA
Acido Giberélico	AG ₃
Acido Absicico	ABA
Acido Naftalenacético	ANA
Acido 2,4-Diclorofenoxiacético	2,4-D
Benciladenina	BA
Nitrato de Sodio	NaNO ₃
Cloruro de Amonio	NH ₄ Cl
Acido Desoxiribonucleico	ADN
Acido Ribonucleico	ARN
Acido Ribonucleico Mensajero	ARNm
Medio de Murashige y Skoog	MS
Plantas por vaso	Pl/vaso
Miligramos por litro	Mg/l

LISTA DE CUADROS

		PAGINA
I	Composición del medio MS modificado para papaya.....	71
II	Malformaciones observadas en las plantas pasadas a suelo obtenidas por embriogénesis.....	76
III	Malformaciones observadas en las plantas pasadas a suelo obtenidas por organogénesis.....	77
IV	Formación de callo en las cruzas interespecíficas de <u>Carica papaya</u> X las especies silvestres en diferentes concentraciones de 2,4-D.....	78

LISTA DE FOTOGRAFIAS

1.	a) Callo compacto de color amarillo-café del cual surgen los embriones. b) Callo blanco y friable del cual surgen las estructuras organogénicas....	79
2.	Callo netamente embriogénico, compacto y de color amarillo-café.....	79
3.	Embriones subcultivados en el medio sin reguladores de crecimiento, adenina y glutamina.....	80
4.	Plantas con hojas cotiledonares malformadas.....	81
5.	Presencia de raíces gruesas y/o pequeñas	81
6.	Fase globular.....	82

	PAGINA
7. Forma de corazón.....	82
8. Forma de torpedo.....	83
9. Forma cotiledonar.....	83

RESUMEN

El cultivo de tejidos de papaya (Carica papaya L.) se ha observado que la principal vía de regeneración es la embriogénesis (Yie y Liaw, 1977; Litz y Conover, 1981, 1982, 1983; González, 1985), aunque en algunos casos se ha obtenido también organogénesis (Yie y Liaw, 1977).

Para este estudio se propagó callo de 2 años de edad que provenía de embriones inmaduros de papaya. La propagación se hizo en un medio MS modificado con 0.1 mg/l de 2,4-D para inducir embriogénesis. Posteriormente se hicieron 2 tratamientos, uno que contenía ANA 2 mg/l; AIB 3 mg/l, glutamina 400 mg/l y adenina 80 mg/l, y otro carente de reguladores de crecimiento, adenina y glutamina. El primer tratamiento sirvió para enraizar plántulas y el segundo para el desarrollo de los embriones y para la preservación de callo a utilizar en los subsecuentes cultivos.

Se separaron los diferentes estados de desarrollo del embrión (fase globular, forma de corazón, forma de torpedo y forma cotiledonar) en la fase cotiledonar se observó sistema vascular que une al meristemo de raíz con el meristemo de tallo.

Además se realizó la siembra de las cruzas interespecíficas de C. papaya X C. cauliflora, C. pubescens y C. quercifolia en un medio MS con 8 diferentes tratamientos con 2,4-D, obteniendo mejores resultados con 0.1 mg/l.

INTRODUCCION

Dentro de los frutales tropicales, sobresale el papayo (Carica papaya L.); pues además de la utilización de sus frutos para consumo directo, en la industria alimentaria son requeridas ampliamente sus enzimas proteolíticas: quimo papaína, lisolicina, y la más importante, la papaína, enzima que actúa en forma similar a la pepsina y a la tripsina usándose principalmente en la industria cervecera, textil, de curtido, farmacéutica, lechera, fotográfica y en la alimentaria (Avilés, 1974; Rangel, 1977).

En México, el cultivo de la papaya, encuentra grandes extensiones con las condiciones propias para su desarrollo; ya que este país forma parte del centro de origen del cultivo.

En el año de 1983, se cuantificó la superficie dedicada al cultivo de papaya en: 13,192 ha, de las cuales 7,589 ha se encuentran bajo temporal el cual es su principal sistema de cultivo y 5,603 ha bajo riego; produciendo en total 316,806 ton que equivale para ese año a 5'294,339 (pesos) (DGEA, 1983).

Los principales estados productores son: Veracruz con 5,864 ha, con una producción de 100,997 ton; Guerrero con 2,425 ha y una producción de 35,768 ton; el tercer lugar lo ocupa Jalisco con una superficie de 785 ha y una producción de 20,400 ton (DGEA, 1981). Sin embargo, Veracruz resulta ser uno de los Estados que presentan más bajos rendimientos (18.67 ton/ha), comparado con Yucatán (53.116 ton/ha) y Oaxaca (52.000 ton/ha) (DGEA, 1981).

Estas cifras denotan que tanto a nivel nacional, como el principal estado productor, los rendimientos por unidad de superficie son bajos; y posiblemente se debe a la incidencia de plagas y enfermedades (viroas principalmente) junto con los factores climáticos y edáficos como: escasa y mala distribución de precipitación pluvial, suelos poco profundos, de baja fertilidad, pedregosos y textura pesada.

De los factores mencionados con anterioridad, los que influyen drásticamente sobre el papayo son las enfermedades virosas que han tomado tal proporción que su cultivo se ha mostrado incosteable en algunos lugares. En algunas localidades del Estado de Colima, cualquier plantación puede llegar a presentar un 100% de plantas enfermas en muy corto tiempo (De León, 1976).

En México se ha encontrado que el virus del mosaico de la papaya y el de la mancha anular están involucrados en conjunto en el problema viral de este cultivo en este país (Ochoa de Fischer, 1976), el cual se ha incrementado en los últimos años.

Al ser la papaya una planta originaria del centro de distribución Sur-mexicano y Centroamericano, que comprende el sur de México, Guatemala, Honduras y Costa Rica (Wilsie, citado por Mandujano, 1979) se ha tratado de buscar resistencia a esta enfermedad en estos lugares.

Por otro lado se han seleccionado líneas de papaya como la RW 11, 7D, K5A, K4, K1, 12D, 12C y C28-4 con buenas características agronómicas y que han mostrado resistencia al virus de la mancha anular (Litz y Conover, 1978).

Actualmente se sabe que otras especies del género Carica que se encuentran en este centro de distribución presentan resistencia al ataque de este virus. Dichas especies han sido Carica stipulata, C. pubescens y C. cauliflora, confiriéndole la resistencia a la presencia de un gen dominante (Horovitz y Jiménez, citados por Litz y Conover, 1979 y 1980). Por otro lado, Carica candamarcensis (sinonimia

de C. pubescens) ha mostrado resistencia a las cepas de este virus existente en Puerto Rico (Austin, 1975). Por lo cual una alternativa promisoría ha sido la obtención de un híbrido resistente a esta enfermedad por la incorporación de este gen dominante a Carica papaya mediante la cruce con las especies silvestres señaladas. Sin embargo, al hacer las cruces de estas especies con C. papaya se han manifestado una incompatibilidad sexual (Litz y Conover, 1980), produciendo frutos que caen prematuramente (aproximadamente a los 30 y 40 días de haber sido polinizados) de la planta y por ende, producen embriones que no pueden germinar normalmente (embriones abortivos).

OBJETIVOS

1. Propagación de material vegetal in vitro proveniente de embriones inmaduros de Carica papaya L.
2. Conocer la ontogenia de embriones somáticos y organogénesis en cultivo in vitro de una cepa de Carica papaya L.
3. Establecimiento de las plantas obtenidas in vitro de Carica papaya L., bajo condiciones de suelo.
4. Cultivo in vitro de embriones inmaduros de Carica papaya L. L-19-4-2 X Carica pubescens Lenne & Kock, Carica cauliflora Jacq., Carica quercifolia.

REVISION DE LITERATURA

Descripción botánica

La papaya (Carica papaya L.) es una planta herbácea gigante; mide de 2 a 10 metros de altura. El tallo es erecto, cilíndrico, con tejido esponjoso, hueco, de 10 a 30 cm de diámetro, sin ramas laterales, pero algunas veces dividido en varios tallos erectos. Las hojas se encuentran cerca del ápice del tronco, están arregladas espiralmente; el peciolo mide de 25 a 100 cm de largo, es hueco, de color gris pálido o teñido de púrpura; la lámina mide de 25 a 75 cm de diámetro, es orbicular y glabra, palmeada y profundamente lobulada, con 7 a 11 lóbulos, profundos y ampliamente dentados, de color verde pálido en el envés y con venación prominente. El papayo comienza a florear de los 4 a los 8 meses después de la siembra y emite inflorescencias axilares. Las flores son de 3 tipos de acuerdo con el sexo: estaminadas, pistiladas y hermafroditas. Las flores estaminadas son sésiles y se encuentran en cimas axilares de 25 a 75 cm de largo; el cáliz tiene forma de copa, mide 1 mm de largo, es pentadentado; la corola tiene forma de trompeta y mide 2.5 cm de longitud, de co-

lor blanco cremoso o amarillo; tiene 10 estambres insertos en la entrada del tubo de la corola en 2 hileras; las anteriores son oblongas, biloculares, amarillas; el pistilo es rudimentario y algunos autores lo consideran como una extensión del eje floral. Las flores pistiladas miden de 3.5 a 5 cm de largo, son axilares, con pedúnculo corto, solitarias o agrupadas en cimas; el cáliz tiene forma de copa, de 2 a 4 mm de longitud y con 5 dientes angostos; la corola tiene 5 pétalos casi libres, imbricados, incurvados, carnosos y de color amarillo; el ovario es grande, de 2 a 3 cm, ovoide-oblongo, de color verde pálido; con una cavidad central con numerosos ovulos. El fruto es una baya carnosa, con el pericarpio delgado, liso de color amarillo o naranja en la madurez; las semillas están adheridas, son esféricas, de color negro o grisáceo rodeadas por un tejido mucilaginoso llamado arilo (SARH-INIA, 1982).

La familia Caricaceae está constituida por 4 géneros que son Carica, Cylocomorpha, Jacaratia y Jarilla. El género Carica comprende 40 especies (Cobley, 1976), según Badillo (1971) citado por Mosqueda, 1973; menciona que este género está formado por 22 especies.

De las 22 especies que toma en cuenta Badillo, 1971,

(citado por Mosqueda, 1973) la mayoría son dioicas, algunas monoicas y otras polígamas (Storey, 1967, citado por Mosqueda, 1973); entre las especies consideradas como polígamas se encuentra Carica papaya L. (Storey, 1938, 1953, Alonso 1952, Nakasone 1955, Lassondiere 1968, Badillo 1971, citados por Mosqueda, 1973).

La planta usualmente es dioica y puede ocurrir un cultivar hermafrodita solo. El sexo es determinado por 5 genes muy ligados en el sexto cromosoma cuyos efectos pueden ser descritos como determinados por 3 alelos de un solo gen donde: M_1 es macho dominante, M_2 hermafrodita dominante y m como hembra recesiva, y las combinaciones son M_1m , macho; M_2m , hermafrodita; mm , femenino (Cobley, 1976).

Se ha escrito bastante sobre el alto grado de polimorfismo floral presente en Carica papaya L., Higgins y Holt (citados por Mosqueda, 1973), describen la existencia de 3 formas sexuales y Lange (1961) describe 15 formas hermafroditas, diferenciables una de otra por el número de estambres y de huellas vasculares en el ovario. Storey (citado por Mosqueda, 1973), redujo para fines prácticos las formas descritas por Higgins y Holt a solo 4 formas sexuales.

La primera información sobre las enfermedades causadas por virus de la papaya, es de Jamaica y apareció en el año de 1929 (Posdena, 1968, citado por Solano, 1975); a partir de esta fecha la cantidad de informes respecto a tal se han incrementado en todas partes del mundo. Sin embargo, a pesar de la gran información sobre estas enfermedades, experimentalmente no siempre se realizaron trabajos que permitieran afirmar que el agente causal era un virus.

Descripción general del virus de la Mancha Anular

Los primeros experimentos con transmisión que se pudieron conocer acerca del virus de la mancha anular de la papaya fueron los realizados en Puerto Rico, India, Australia y Hawaii (Solano, 1975).

En Florida se describen 3 virus, pero si se comparan los resultados que fueron obtenidos durante la transmisión de estas enfermedades virosas, se encontró que se trata de 2 tipos (Conover, 1962, citado por Solano, 1975).

El primer tipo es transmisible mecánicamente por injertos y áfidos; el segundo, lo es por injertos y cicadélidos.

Para 1982 se tienen reportadas 11 enfermedades virosas:

1. Mosaico
2. Mancha en anillos
3. Deformación foliar y mancha en anillos
4. Mosaico débil y manchas anulares
5. Mosaico suave
6. Cogollo arracimado
7. Muerte regresiva
8. Necrosis del ápice
9. Follaje amarillo y rizado
10. Hojas encrespadas
11. Hojas rizadas

De las cuales 3 presentan manchas en anillos como síntoma:

a. Mancha en anillos (Ringspot): el síntoma característico que las diferencia de otras enfermedades virales, es la presencia de manchas circulares verdes oscuras en los frutos, las cuales se tornan amarillentas al madurar los frutos, conservando verde el centro (Holmes, Ishii, Portis, Videla, citados por López Pinto, 1972).

b. Deformación foliar y mancha en anillos (Distortion ringspot): sus síntomas característicos son la presencia de estructuras filiformes en el follaje y manchas grasientas sobre tallo, peciolo y frutos.

c. Mosaico débil y mancha en anillos (Faint mosaic ringspot): presenta manchas anulares en tallo, peciolo y frutos y moteado débil en las hojas (Jensen, 1949, citado por López Pinto, 1972), llegándose a considerar como una cepa del virus de la deformación foliar y manchas en anillos.

Estas 3 enfermedades las considera López Pinto (1972) como una, denominándola Deformación y Mancha en Anillos, teniendo como hospedantes alternantes a Cucurbita pepo, Melothria guadalupensis, Cucumis sativum. La diseminación la realizan: Aphis spiraeicola, A. craccivora, A. gossypii, A. nerii, A. medicaginis, Macrosiphum solanifolii y Myzus persicae (en México).

La inactivación térmica de su agente causal es a 54 - 56 °C por 10 minutos y por dilución a 1/1000. Su duración in vitro es de 96 - 120 horas, su longitud promedio es de 780 nm. Sin embargo, no se pueden considerar estas caracte

terísticas como únicas, debido a que existen diversas cepas de virus, reportándose unas en Florida y otras en Puerto Rico (Austin, 1975).

Las primeras plantas infestadas exhiben clorosis en sus hojas más jóvenes, las cuales presentan rápidamente aclaramiento de la venación, rugosidad y un prominente moteado de la lámina, la cual puede convertirse extremadamente filiforme. Se desarrollan líneas elongadas verde-oscuro sobre los peciolo y en la mitad superior del tallo, pero eventualmente puede afectar el tallo completo; este lineado comúnmente sigue poco después, pero nunca precede la aparición de síntomas foliares. Las plantas infectadas se plasman, los peciolo se reducen y los frutos se asientan reducidos como la enfermedad progresa. El sabor y aroma de la fruta que amarra son notablemente afectados, desaparecen después de la infección.

Al final las plantas infestadas presentan una reducción en el tamaño, peso y número de frutos por planta, con desmejora notable en su aspecto, color y sabor. La magnitud de los daños varía según la temporada en que se desarrolla la enfermedad, condiciones ambientales imperantes en la zona (en climas frescos la expresión de los síntomas

es más severo), tiempo que las plantas llevan infestadas, edad y estado de desarrollo de las plantas al momento de la infección (Austin, 1975; López Pinto, 1972; Solano, 1975). Khurana (1970), encontró que el virus de la mancha anular reduce el contenido de azúcar en un 42% y causa deterioro en la calidad del látex.

Durante 1974 algunos investigadores observaron huertos de papaya en las zonas cercanas a Papantla, Veracruz y Tlaxi-potla, Morelos donde se colectaron materiales infectados (Ochoa de Fischer y Galindo, 1974), en 1975 se detectó en la región central de Veracruz una enfermedad de etiología viral llamada mancha anular, ocasionando severos daños al cultivo. El municipio donde se observó mayor incidencia fue Soledad de Doblado, principal productor de este frutal, actualmente se ha propagado esta enfermedad hacia el área de Tierra Blanca, lo cual ha favorecido la amplia diseminación del patógeno (Díaz, 1974).

Hasta ahora se ha podido determinar que el problema es en realidad, de origen viroso, y ha sido posible transmitir la enfermedad, de papaya a papaya mediante injertos y por transmisión mecánica. En el microscopio electrónico se ha podido observar partículas filiformes del virus, que

corresponden a las descripciones consignadas en la literatura para el virus de la mancha anular (Papaya Ringspot Virus).

Sin embargo, probablemente se trate de una cepa del virus diferente a la consignada en otros países, ya que ha sido imposible trasmitirla en forma mecánica a otras plantas herbáceas, como diversas especies de Chenopodium y un amplio intervalo de Cucurbitáceas.

Respecto a las medidas de control que se han practicado para el caso del virus en papaya sucede lo siguiente:

1. Las plantas enfermas no se recuperan por medio de fertilización ni podas (López Pinto, 1972).
2. Se ha visto que el uso de insecticidas para el control de vectores no ha sido satisfactorio para el control de la enfermedad, ni el aislamiento de las plantaciones de papaya (Austin, 1975).
3. Como la enfermedad se empieza a manifestar desde los 6 meses de edad de la planta, una de las medidas empleadas ha sido la extracción de los primeros árboles atacados y el control de malezas sin herbicidas (Mandujano,

1980). Sin embargo, esta eliminación de las plantas infestadas no ha dado resultados satisfactorios (Austin, 1975).

4. En 1978 el INIA determinó que el único medio de control por el momento es el escape al ataque mediante la determinación de fechas de siembra para cada región y eliminación de hospedantes alternantes (Ireta, 1978), sin que hasta la fecha haya evaluación de estas medidas.

El cultivo de tejidos in vitro se caracteriza por tener diversas aplicaciones prácticas que pueden ser empleadas para solucionar ciertos problemas que presentan algunas plantas de interés agrícola (Murashige, 1977).

De acuerdo a diversos trabajos realizados en cultivo de tejidos vegetales empleando tejidos, células u órganos, las respuestas morfogénicas de éstos forman un sistema complejo que dependen de las sustancias primarias involucradas, tipo, concentración y combinación de los reguladores de crecimiento, de la capacidad de los tejidos de responder al medio donde se le cultiva, así como de los factores ambientales físicos que favorecen la embriogénesis o la organogénesis.

La aplicación de cultivo de tejidos se pone de manifiesto en diversas publicaciones de algunas especies como es el caso de papaya, en donde se ha considerado como principal vía de regeneración a la embriogénesis (Yie y Liaw, 1977; Litz y Conover, 1981, 1982, 1983; González, 1985), aunque en algunos casos se ha obtenido también organogénesis (Yie y Liaw, 1977).

EMBRIOGENESIS SEXUAL O CIGOTICA

Origen y desarrollo del embrión

Se ha considerado que el embrión cigótico se origina a partir de la célula huevo del saco embrionario una vez que ha sido fertilizada por el núcleo haploide masculino; es decir, una vez que el cigoto ha sido conformado.

Para formar el embrión, generalmente el cigoto se divide transversalmente en relación al eje micrópilo chalaza. La segunda división puede variar en orientación. Generalmente la célula próxima al micrópilo se divide transversalmente y la distal puede dividirse transversal, oblicua o longitudinalmente, variando al momento de división de estas células según la especie (Esau, 1972). Todas las divisiones celulares posteriores forman filas celulares que

más tarde sufrirán la primera diferenciación en cuerpo principal o embrión propiamente dicho, y suspensor, que es un agregado celular en forma de pedúnculo que mantiene unido al embrión y saco embrionario en la región micropilar; aunque no todas las especies presentan la formación de suspensor.

La segunda división que ocurre en el cuerpo del embrión es la de los polos distal, más lejano de la región micropilar, y la proximal, más cercano a la región micropilar (Wardlaw, citado por Esau, 1972). Antes de la aparición de los cotiledones, hay un engrosamiento de la parte distal del embrión, dado por las divisiones periclinales que ocurren en él (Norstog, citado por Esau, 1972).

La organización del sistema de meristemas primarios (procambium, protodermis y meristemo principal) empiezan mucho antes de que el embrión alcanza su tamaño final. La protodermis se inicia por divisiones periclinales a lo largo del cuerpo del embrión y no en el suspensor. El procambium se organiza antes que los cotiledones y, a medida que esto sucede, continúan hacia ellos para unirlos con el eje embrionario (Esau, 1972).

La secuencia de división y destino de las células va-

ría incluso dentro de la misma especie, siendo la forma del embrión resultado de la interacción entre óvulo-embrión principalmente a nivel nutricional y espacio (Norstog, citado por Esau, 1972). Sin embargo, otros autores (Wareing y Graham, 1976) han considerado que los caracteres del embrión cigótico están determinado por los codones de proteína de tres genomas: el del padre, el de la madre y el del cigótico, difiriendo de los sistemas somáticos en los que interviene un solo genoma.

Por otro lado, se ha encontrado que el huevo organizado y el núcleo de la célula central, que da origen al endospermo, son ricos en ADN en sus estados iniciales, pero a medida que el núcleo sexual femenino se desarrolla se va diluyendo el contenido de ADN, lo cual indica que en esos momentos no hay más síntesis de la macromolécula y después de la fertilización dicho contenido es incrementado (Kapil y Tiwari, 1978 y Bhatnager y Sawhner, 1981) por la aportación del material genético por parte del núcleo masculino.

También se han encontrado diferencias metabólicas en cuanto a la especie y momento de desarrollo del embrión, lo cual manifiesta diferentes requerimientos externos que pueden ser aplicados a la embriogénesis in vitro. Por ejemplo:

en Lilium regale la célula huevo y sinérgidas presentan bajo contenido de polisacáridos comparados con sus antípodas y célula central, en cambio; en Lilium candidum las sinérgidas presentan alto contenido de polisacáridos antes de la fertilización, pero si se acumulan en la región micropilar al momento de ésta, tal vez por mayores requerimientos de energía de la célula huevo (Kapil y Tiwari, 1978).

Se ha encontrado que la diferenciación del embrión se lleva a cabo cuando se presentan los valores más bajos en cuanto a potencial osmótico, contenido de azúcar no reducida, proporción de respiración y contenido de nitrógeno en forma de amino en el tejido que lo rodea. Además de que el crecimiento del embrión, que se considera va del microtilo a la chalaza, se encuentra en dirección opuesta a los gradientes de estos mismos parámetros en el tejido que lo rodea (Ryckowski, 1980), lo cual concuerda con lo que sucede in vitro, ya que el embrión que se desarrolla siempre crece del agregado hacia la atmósfera y no se ha encontrado formación de esta estructura del agregado hacia el medio de cultivo sólido.

Estructura final del embrión

Una vez que el embrión ha llegado a su estado maduro, se le considera como una estructura bipolar, por presentar meristemas que crecen en sentido opuesto (meristemo apical de raíz y meristemo apical de vástago. En su mayor parte, las células están poco diferenciadas, aunque en su parte central del eje hay tejido vascular, o procambium, que une a los dos meristemas. El meristemo apical de raíz está protegido por una capa celular denominada caliptra (Esau, 1972).

Dentro del ciclo vital de una planta, se ha considerado al embrión como un esporofito parcialmente desarrollado, debido a que la relación que guarda el hipocótilo y los cotiledones es similar a la que existe entre tallo y hojas (Esau, 1972).

Para llegar a conformar esta estructura final, conocido como fase cotiledonar, el embrión tiene que pasar por otras formas, tales como: forma globular, forma de corazón, y forma de torpedo. Sin embargo, los embriones de monocotiledóneas y dicotiledóneas son similares solo hasta la forma globular, a partir de la cual en dicotiledóneas

se toma una forma bilobada y, en el caso de monocotiledóneas se toma una forma cilíndrica. Otra diferencia entre estos embriones es que en monocotiledóneas los meristemas se presentan más desarrollados como radícula y como brote embrionario. El brote embrionario consta de un eje con entrenudos y uno o más primordios foliares designándose epicótilo y plúmula respectivamente (Esau, 1972).

En gramíneas, la estructura del embrión es la siguiente: un eje provisto de escutelo a un lado, una radícula propiamente dicha, con caliptra y cubierta por coleoriza, y una plúmula cubierta por el coleoptilo y el polo del brote. Por encima de la coleoriza, insertada opuestamente al escutelo, se localiza una proyección denominada epiblasto. Por presentar sistema procambial, el escutelo se considera cotiledón y no es identificable ningún hipocótilo. El escutelo se encuentra en contacto con el endospermo, siendo la vía de suministro de alimento al cotiledón para su germinación (Esau, 1972).

Se ha considerado que la tendencia bipolar del embrión se establece desde que éste se encuentra como célula huevo en el saco embrionario, presentando una conformación histológica similar al tejido que se forma in vitro, como

se verá posteriormente. Por lo general la célula huevo es altamente polarizada mostrando una gran vacuola que cubre la tercera parte o mitad de la región micropilar, asemejando a las células que conforman al callo, mientras que al final chalazal se encuentra el núcleo y mucho citoplasma, semejante a las capas celulares externas del callo a partir de las cuales surgen los embriones in vitro (Street, 1976 y Wareing y Graham, 1976). Esta polaridad también se manifiesta en estados posteriores de desarrollo embriogénico. Después de la fertilización y de la primera división que es transversal y desigual, se origina una gran célula basal vacuolada hacia el micropilo, y una pequeña célula terminal densamente vacuolada y con núcleo prominente, dando origen al suspensor la primera y al cuerpo del embrión la segunda (Wareing, 1976).

Origen y papel del endospermo

La importancia del estudio del origen y funcionamiento de esta estructura en la embriogénesis radica en el hecho de que el endospermo es una de las principales fuentes de alimento del embrión in vivo, in vitro, el endospermo es sustituido por el callo y el medio de cultivo.

En angiospermas, los dos núcleos haploides de la célula central del saco embrionario se fusionan dando origen a un núcleo secundario de naturaleza diploide el cual, posteriormente se fusiona con uno de los núcleos masculinos que descarga el tubo polínico en el saco embrionario, y que no fue empleado en la fertilización de la célula huevo, para dar origen al núcleo primario del endospermo que es de naturaleza triploide. Las repetidas divisiones de este núcleo primario del endospermo son las que van a dar origen al endospermo, que aparece después de la fertilización de la célula huevo; siendo necesario, sobre todo para angiospermas no apomícticas, que se presente la naturaleza triploide para un crecimiento y desarrollo normal del endospermo y evitar la producción de semillas abortivas. Esto no ocurre en plantas gimnospermas, ya que en ellas el endospermo (gametófito) es de naturaleza haploide y se presenta al momento de la fecundación (Bhatnagar, 1981).

En algunos taxa, el tejido de reserva emerge de la nucela (tejido que rodea al saco embrionario) nombrándosele perispermo y siendo de naturaleza diploide (Esau, 1972).

No es necesario que se presente la naturaleza triploide para que la célula central empiece a funcionar como fuen

te de alimento a la célula huevo. Se ha encontrado que la hidrólisis gradual del almidón de reserva presente en la célula huevo y, sobre todo, en la célula central, provee la energía necesaria para la fertilización (Luxova, citado por Bhatnagar, 1981).

Se ha encontrado que la célula central presenta todos los organelos, tales como ribosomas, mitocondrias, aparato de golgi, cloroplastos, cuerpos de proteína, amiloplastos y esferosomas, entre otros, necesarios para la síntesis de macromoléculas que se emplean para el crecimiento de las sinérgidas, célula huevo y endospermo, así como para el almacenamiento. La presencia de estos organelos varía según la especie y momento de desarrollo del embrión, lo que denota diferentes rutas metabólicas (Bhatnagar, 1981), que deben ser consideradas en el cultivo de tejidos.

Después de la fertilización ocurren varios cambios en la estructura final de la célula central, incrementándose la actividad metabólica y síntesis de proteína, principalmente a los 12-20 días después, con disminución del contenido de aminoácidos, para la rápida diferenciación de la célula endospermica primaria. Asimismo, después de la fecundación el retículo endoplásmico se ramifica, conectan-

do la pared del saco embrionario con la membrana plasmática de células del endospermo, estando involucrado en la disposición de material de pared celular y secreción de enzimas hidrolíticas que degradan sinérgidas y nucela (Bhatnagar, 1981).

Por lo general el núcleo secundario dentro de la célula central está separado por una gran vacuola, que es reservorio de aminoácidos, azúcares y sales inorgánicas, de las antípodas del saco embrionario; y está unido a la célula huevo y sinérgidas por hilis citoplásmicos. En los puntos de unión con el resto de tejido que la rodea, la célula central presenta proyecciones llamadas haustorios que sirven para una mayor absorción de nutrientes y actividad metabólica (Bhatnagar, 1981).

En estados de madurez, el citoplasma del endospermo es llenado por cuerpos de proteína y almidón, llegando a ser de naturaleza poliploide el núcleo, o incluso las células endospermicas presentan 2 núcleos. Estos cambios en el material genético tal vez se deben a endomitosis, C-mitosis espontánea o a endoduplicación (Bhatnagar, 1981), siendo esto también característico de las células que conforman el callo in vitro.

En angiospermas se han clasificado en tres los tipos de endospermo que se presentan:

- a) Nuclear: el núcleo primario del endospermo sufre varias divisiones sincrónicas y asincrónicas sin formación de membrana celular, por lo cual pueden permanecer libres, o formar posteriormente membrana celular en todo el endospermo, o solo en la región micropilar, permaneciendo la chalaza con núcleos libres y es a partir de ella donde se origina el haustorio. Este tipo de endospermo lo presenta Cocus nucífera en estados iniciales de desarrollo, por lo cual se presenta en forma líquida y ha sido ampliamente empleado para obtener embriogénesis en cultivo de tejidos. Este tipo de endospermo también lo presentan las leguminosas y cucurbitáceas, en las cuales se utiliza para el crecimiento y maduración del embrión.
- b) Celular: en este tipo las divisiones nucleares van acompañadas de formación de paredes celulares. Sus ejemplos los encontramos en las familias Acanthaceae, Lobeliaceae y Scrophulariaceae.
- c) Helobial: Presenta condiciones intermedias entre los dos tipos anteriores. El núcleo primario del endosper-

mo se divide en dos núcleos con diferente potencial de división, siendo el de la región micropilar más grande y de origen celular, y el de la región chalazal más pequeño y puede o no dividirse, permaneciendo cenocítico. La mayoría de las monocotiledóneas presentan este tipo de endospermo.

Los materiales de almacenamiento más importantes son los carbohidratos como almidón, los lípidos y las proteínas, variando su presencia según la especie. El almidón se presenta como grano en el estroma del plastidio, embebido en una matriz de proteína en cereales. Las proteínas se localizan en distintos organelos llamados cuerpos de proteína, pudiendo tener su origen en la vacuola como en Yucca spp., Gossypium hirsutum, Phaseolus spp., Ricinus spp. y Vicia spp., o en los plastidios como en Triticum spp. y Oriza sativa, o en el retículo endoplásmico como Zea mays (Bhatnagar, 1981).

Cabe señalar que las sustancias nutrimentales del endospermo pueden ser consumidas de dos formas o momentos:

- 1) Durante el desarrollo del embrión hasta su maduración como sucede en leguminosas y cucurbitáceas, por lo cual desaparece y las sustancias de reserva necesarias para la

germinación se encuentran en los cotiledones, llamándose especies exalbuminosas. 2) Puede persistir durante el desarrollo del embrión, sirviendo como tejido de almacenamiento y soportar el desarrollo del embrión en la germinación como sucede en cereales, Phoenix sp. y Ricinus sp., nombrándose especies albuminosas.

Diferenciación del embrión en plántulas

Esta etapa de desarrollo ya no pertenece a la embriogénesis, pero involucra niveles de metabolismo y acción de hormonas que ayudan a entender el proceso de embriogénesis in vitro.

Después de la maduración fisiológica, el embrión sufre deshidratación, proceso que inactiva un buen número de rutas metabólicas. Dicha inactivación puede durar poco tiempo, como sucede en cereales o un tiempo relativamente grande, como sucede en especies frutales caducifolias.

Para la reactivación del metabolismo del embrión, y demás tejidos de la semilla, es necesario que se expongan a condiciones favorables de humedad, temperatura y aereación. Tales condiciones hacen posible la reactivación de enzimas ya existentes en la semilla, así como también la

síntesis de nuevas enzimas, tales como isocitasa, amilasa, peroxidasa y proteasas, la síntesis de aminoácidos y proteínas se inicia después de la rehidratación (Wareing y Graham, 1976). La reactivación de las enzimas ya existentes en la semilla se deben a la liberación de ácido giberélico (AG) dentro de la semilla.

Se ha encontrado que la síntesis de proteína durante los inicios de la germinación depende del ARNm que ya existe en la semilla seca y no totalmente de la síntesis de novo de ARNm; ya que al aplicar actinomicina D, que es un inhibidor de la síntesis de ARNm, no se afecta la síntesis de proteína (Wator, citado por Wareing y Graham, 1976). Al trabajar con embriones de algodón se ha encontrado que en aquellos que no han alcanzado el 60% de su peso final no desarrollan proteasas cuando se someten a tratamientos con actinomicina D, no así en aquellos embriones que han alcanzado más del 60% de su peso final. Esto tal vez debido a que en estados inmaduros del embrión no hay suficiente síntesis de ARNm. Por otro lado, se ha observado que el ARNm necesario para la síntesis de enzimas involucradas en la germinación, se sintetiza en los cotiledones, siendo necesario que se trasloque hacia el eje embrionario para cumplir su

cometido. Así, para evitar la germinación en estados tempranos (menos del 60% del peso en el caso del algodón) dicha traslocación es inhibida. Hay evidencias que indican al ácido abscisico (ABA) que se difunde en el embrión a partir de la pared del óvulo como inhibidor de dicha traslocación, permitiendo así que el embrión llegue a su madurez (Wareing y Graham, 1976). Este regulador del crecimiento ha sido empleado para eliminar formas deformes que se han obtenido por medio de cultivo de tejidos (Ammirato, 1974), tal vez porque permite que dichos embriones lleguen a su madurez.

Embriogénesis somática

Se considera como embriogénesis asexual o somática, al desarrollo de embriones a partir de células que no son producto de la fusión gamética, es decir, de células somáticas (Ammirato, 1983). Este proceso puede presentarse de manera natural, en la poliembrionía, como en varias Rutaceas, principalmente en Citrus spp., y en mango; o puede inducirse in vitro a partir de varios explantes o tejidos, lo cual es el tema principal del presente capítulo.

Embriogénesis asexual natural

Por lo general este tipo de embriogénesis se presenta en tejido interovarial, pudiendo surgir el embrión de las sinérgidas o antípodas, presentando número cromosómico haploide o diploide; del endospermo como sucede en Brachlaria setigera, presentando un número cromosómico triploide; de la nucela como sucede en Citrus spp., del proembrión cigótico o del suspensor, siendo en estos tres últimos casos de naturaleza diploide los embriones. En todos estos casos se tiene como característica el seguir la misma ontogenia y patrones de crecimiento que el embrión cigótico normal (Vasil y Vasil, 1972; Ammirato, 1983).

Ahora bien, en el ovario se puede presentar la formación de varios embriones aparte del cigótico, conociéndose así como poliembrionía. Cada embrión formado de esta manera se desarrolla independientemente. En el caso en que la poliembrionía surge a partir de sinérgidas o antípodas, se conoce como embriogénesis de endadura y es más común en el primer tipo de células, principalmente cuando están claramente contrastadas en cuanto a estructura final (Street, 1976).

Según Street (1976), la poliembrionía puede ser interpretada como resultado del rompimiento del mecanismo normal de regulación que ocurre en genotipos particulares, junto como la formación espontánea de tumores somáticos característicos de genotipos híbridos particulares. Es esta una de las principales bases de la "Teoría del Mosaico" que intenta explicar lo que sucede in vitro.

No todas las angiospermas presentan poliembrionía (Esan, citado por Tisserat y Murashige, 1977), encontró que la nucela de especies monoembriogénicas de Citrus spp. contiene un represor embriogénico difuso, trasmisible por injerto, que se presenta a bajas concentraciones en especies poliembriogénicas. Por tener efectos no reversibles se cree que dicho inhibidor actúa a nivel de transcripción genética. Posteriormente, Tisserat y Murashige (1977) encontraron que son varios los represores embriogénicos, siendo algunos volátiles, entre los que pueden estar el etileno, el etanol y el CO₂, y otros no volátiles, pudiendo ser AIA, AG₃ y/o ABA, ya que se presentan en mayores cantidades en especies monoembriogénicas. Se considera que este factor inhibidor también puede ser el responsable de la inhibición de la embriogénesis in vitro.

Embriogénesis asexual inducida

El primer informe que se tiene en cuanto a la obtención de embriogénesis somática in vitro es el de Steward (citado por Evans, et al., 1981; Ammirato, 1983) al trabajar con tejido de almacenamiento de raíz de Daucus carota L.; y ha sido el sistema más empleado para estudiar el proceso de embriogénesis in vitro. Hasta 1983, Ammirato informa que ha sido inducida embriogénesis somática in vitro en 32 familias, 81 géneros y 32 especies, incrementándose estas cantidades a medida que pasa el tiempo, debido al auge que ha tenido esta técnica y a las posibilidades de estudio que proporciona. Sin embargo, hay controversias en cuanto al número de especies que han exhibido embriogénesis in vitro, debido a la conceptualización de este proceso, principalmente para diferenciarlo de la organogénesis.

Haccius (citado por Street, 1976) enfatiza que solo puede ser considerada embriogénesis in vitro a aquel proceso regenerativo que presenta una estructura primaria bipolar, es decir, que presenta cotiledón y radícula, y que no está conectado por medio de tejido vascular con el explante o agregado (callo) en cultivo. Posteriormente se atribuye otra característica al proceso para considerarse como em-

brigiogénesis, la cual es que la estructura que se origina presente un desarrollo similar a la ontogenia del embrión cigótico Street (1976); es decir, que tenga un origen unicelular y que pase por los estados globular, corazón, torpedo y cotiledonar. Ultimamente se le han atribuido otras características, tales como no presentar proliferaciones extrañas (más cotiledones de los que normalmente presenta el embrión cigótico, eje muy corto con cotiledones largos o viceversa) y que sea capaz de originar una planta completa (Ammirato, 1983), siendo esta última característica la que ha reducido el número de casos en los que se han obtenido embriogénesis. Para tener una mejor idea en cuanto al número de casos en los que se ha obtenido embriogénesis se recomienda consultar Tisserat, et al. (1979) y Evans, et al. (1981).

Esta conceptualización no solo debe concebirse como de utilidad teórica para entender el proceso de embriogénesis, sino también como de utilidad práctica; ya que no solo es importante obtener embriones normales, sino también plantas completas normales para culminar el proceso regenerativo con un individuo completamente desarrollado.

Por otro lado, la diferenciación entre organogéne-

sis y embriogénesis tiene un valor práctico. Por ejemplo, en el caso de gramíneas las plantas obtenidas por brotes meristemoides (organogénesis) tienen un origen multicelular, por lo que no pueden ser empleados en la selección de mutantes u otro tipo de análisis genético; en cambio al obtener el embrión a partir de una célula si puede hacerse este tipo de selección ó estudios (Chin-Yi y Vasil, 1982). Aunque el posible origen unicelular no es ampliamente aceptado, a pesar de existir evidencias (Street, 1976; Santos, *et al*, 1983). Por otro lado, al presentar conexión vascular con el callo, las plantas obtenidas por organogénesis tienden a morir al transformarse al suelo, por no tener un flujo de nutrientes y agua entre raíz y tallo.

Otra diferencia entre organogénesis y embriogénesis es técnica, por ejemplo, en *Brachycome lineariloba* se logró la inducción de embriogénesis en un medio Miller B con ANA (0.5 mg/l) y cinetina (0.1 mg/l), en cambio en el mismo medio con ANA (0.5 mg/l) como único regulador se logró solo la formación de raíz y no se pudo lograr la embriogénesis al pasar este material al primer medio señalado, ya que hubo solo proliferación del callo. Al pasarse a un medio que solo tenía citocininas como único regulador

se logró la formación de brotes y, por tanto una planta completa (Gould, 1978). A pesar de estas diferencias metodológicas algunos autores consideran que hay solo una vía de regeneración in vitro (Wicart, et al., 1984), siendo intrínseco de la especie con la que trabajaron.

Por otro lado, la embriogénesis in vitro no solo tiene importancia en cuanto a obtener material vegetal clonal, sino también como herramienta de estudio de procesos fisiológicos y bioquímicos que se presentan en la embriogénesis sexual, como se ha hecho en la producción y caracterización de los lípidos producidos en la embriogénesis de Theobroma cacao (Pence, et al., 1981).

No solo se ha obtenido embriogénesis in vitro a partir de células somáticas, sino también a partir de células haploides como en Datura innoxia (Engvild, et al., 1972; Geier y Kohlenbach, 1973; Tyagi, et al., 1979, 1981), Nicotiana tabacum (Heberle y Reinert, 1979; Dollmantell y Reinert, 1980; Rashid y Reinert, 1981a, 1981b; Rashid, et al., 1981), Datura meteloides (Geier y Kohlenbach, 1973), Arachis hypogea y Arachis glabrata (Bajaj, et al., 1981).

Un problema muy importante que se ha encontrado en el cultivo de tejidos que siguen la vía de embriogénesis es un gran intervalo de formas aberrantes en adición a los embriones normales (Ammirato, 1974; González, 1985). Este problema ha sido una de las principales objeciones para seguir esta vía de regeneración, así como un paso importante por dar para perfeccionar la técnica de cultivo de tejidos.

Factores que afectan la embriogénesis in vitro

Entre los factores manipulables que se han tomado en cuenta para la obtención de embriones in vitro están los siguientes:

1. Reguladores de crecimiento

A través del conocimiento de la influencia de estas sustancias en diferentes procesos de desarrollo, las auxinas y las citocininas han sido los factores más estudiados en la propagación de plantas y en el cultivo de tejidos vegetales in vitro. Sin embargo, en el caso de la embriogénesis no deben ser los únicos factores a manejar, debido a que son muchas las condiciones que determinan este proceso, entre ellas otros reguladores del crecimiento.

Zbell (1980) señala que de todos los factores que intervienen en la embriogénesis es la auxina fundamental, ya que es prerequisite en el medio de cultivo para que alcance un nivel dentro del tejido que permita posteriormente la eliminación de ella para el desarrollo del embrión. Así, se tiene que las auxinas no son necesarias para el desarrollo in vitro, pero sí para su inducción (Kang et al., 1971; Tisserat y Murashige, 1977).

Halperin (citado por Vasil y Vasil, 1972 y Brown, et al., 1976) ha demostrado que la embriogénesis es un proceso vigoroso en aquellos cultivos en suspensión de zana-horia que han sido derivados de explantes inducidos a proliferar en un medio que tiene auxina como única hormona. Similares casos se han obtenido en el cultivo de tejidos de Pimpinella anisum (Ernest y Oesterhert, 1984; Ernest, et al., 1984). En otros casos, como en Brachycome lineariloba (Gould, 1979) y en Hyoscyamus niger (Cheng et al., 1985) es necesario inducir embriogénesis en un medio con auxina junto con citocinina a baja concentración y, posteriormente, para el desarrollo de embriones, es necesario eliminar la auxina. Así se tiene que la auxina es necesaria para la inducción de embriogénesis y posterior-

mente hay que eliminarla para el crecimiento de los embriones.

El protocolo dado anteriormente lo cumplen la mayoría de las especies que han seguido la ruta de embriogénesis en cultivo de tejidos (Tisserat et al., 1979); sin embargo, no es general ya que en cultivo de tejidos de Ranuncylus sceleratus se ha obtenido la inducción y crecimiento de embriones en el mismo medio sin eliminar o rebajar la auxina.

Se considera que a una alta concentración de auxina en el medio, o su permanencia después de inducir embriogénesis, puede inhibir el proceso de desarrollo de los embriones por la liberación de etileno, por inhibición de la expresión de isoperoxidasa requeridas para el desarrollo completo de los embriones, o por interferir el proceso de formación del huso acromático (Zbell, 1980; Kang et al., 1971).

En la inducción de embriogénesis, en las etapas intermedias, es decir la formación de callo se ha visto también la influencia que tiene la concentración de la auxina, ya que altas concentraciones incrementan la friabilidad del callo y, por tanto, la separación de células, considerándose se como tejido no embriogénico (Torrey y Reinert; citados

por Evans et al., 1981). Otro punto importante es el tipo de auxina, para determinar a que concentración debe manejarse. En el caso de cultivo de tejidos de trébol rojo se encontró que el AIA (0.5 mg/l) no induce embriogénesis, en cambio con 2,4-D (0.01-0.1 mg/l) se indujo embriogénesis en el 41% de los explantes (Phillips y Collins, 1980); siendo esta auxina más activa no solo en este sistema, sino en muchos más (Evans et al., 1981), aunque se observó la producción de embriones y plántulas malformadas y gran variación genética.

No solo debe considerarse el manejo de la auxina como único regulador de la embriogénesis, ya que ha sido encontrado que la aplicación exógena de 10^{-8} a 10^{-5} de zeatina promueve el crecimiento de embriones de Phaseolus coccineus in vitro (Bennici y Cionini, citados por Ernest y Oesterhert, 1984). Aunque los requerimientos de esta citocinina dependen del material vegetal. En umbelíferas se ha visto que no es necesaria para el desarrollo de embriones (Ammirato, 1983), tal vez porque es suficiente el nivel de esta hormona dentro del tejido. En Brachycome lineariloba se ha encontrado que la estructura de los embriones ya inducidos depende de la concentración de citocinina en el medio

ya que este regulador puede promover la maduración de los embriones somáticos (Gould, 1979; Yasuda et al., 1985).

Otro regulador de crecimiento importante a considerar es el ácido giberélico, el cual causa inhibición parcial o completa de la aparición de células embriogénicas, pero tiene poco efecto una vez que se han producido los embriones (Vasil y Vasil, 1972). En cultivo de zanahoria el ácido giberélico detiene a los embriones en estado de corazón y torpedo (Fujimara y Komamine, citados por Evans, et al., 1981).

Asimismo se ha encontrado que el ABA disminuye la frecuencia de embriones inducidos en cultivo de células de zanahoria a ciertas concentraciones (Fujimura y Komamine, citados por Evans, et al., 1981). En embriones obtenidos en cultivo en suspensión de Carum carvi se encontró que las aplicaciones de ABA a concentraciones que permitan el desarrollo de embriones (10^{-6} a 10^{-7} M) elimina las formas aberrantes, máximo cuando se incuba bajo condiciones de obscuridad (Ammirato, 1974). Esto tal vez se debe a que el ABA está involucrado en la maduración de embriones cigóticos y no permite la germinación precoz que puede ser causa de la malformación de los embriones, como sucede en el cultivo de

embriones inmaduros (Norstog, 1979).

Tisserat y Murashige (1977) han encontrado que la aplicación de ethephon, que es un liberador de etileno, causa una pequeña disminución en el número de embriones, pudiendo suceder que la preservación de auxina en el medio después de la inducción haga que se libere etileno, aunque esto no es del todo seguro, debido a la multiplicidad de acción que presenta la auxina (Zbell, 1980).

Las células que proliferan bajo la influencia de reguladores de crecimiento, principalmente bajo la acción de una auxina, son más grandes, vacuoladas, con apariencia parenquimatosa madura que deben seguir la desdiferenciación para convertirse en meristemáticas y presentar actividad mitótica. Durante este proceso, particularmente en presencia de auxinas, las células sufren muchos cambios, tales como alargamiento del núcleo y nucleolo, incremento en densidad de núcleohistonas alrededor del nucleolo o incremento en la síntesis de proteína, ADN y ARNr (Vasil y Vasil, 1972).

Sharp (1980) dice que los reguladores de crecimiento son los responsables para la iniciación del ciclo celular

de G_0 y juegan un papel directo ó indirecto en el control de la síntesis de factores citoplasmáticos durante G_1 y G_2 como histónas y proteínas, ácidos nucleares, que son responsables del enmascaramiento o desenmascaramiento de genes que transcriben ARN en los filamentos hijos de ADN en forma diferencial y da por resultado dos células hijas fenotípicamente diferentes (pero con genotipo igual) sometidas a diferentes patrones de desarrollo, causando de esta manera la citodiferenciación, creando células que permanecen meristemáticas, en tanto que la otra con las condiciones medioambientales se volvieron células madres embriogénicas. Hay muestras de diferenciación, como elementos traqueales y parénquima inmaduro sin la intervención de mitosis. Mientras que la diferenciación para la embriogénesis (formación de células madres embriogénicas) ocurre en una mitosis temprana. Estas células diferenciadas no pueden ser detenidas en un punto operacional del ciclo celular, pero si en un estado operacional de citodiferenciación que es el G_0 .

Un explante está formado en el cultivo primario de diferencias en morfología, bioquímica y tiempo en el ciclo mitótico, estas células tienen diferentes destinos de desarrollo impuestos sobre ellas por la diferencia de plantillas

de ADN disponibles para la transcripción, por eso actúan en forma diferencial al efecto de los reguladores de crecimiento. Variando la concentración de reguladores de crecimiento se puede observar la que afecta la mitosis o redeterminación de una población fenotípica particular, por lo cual las células madres embriogénicas son descendientes de una población de células receptoras a una inducción embriogénica crítica, inducidas con una concentración o proporción de sustancias reguladoras de crecimiento (auxina/citocinina). Estas células hijas procedentes de una que sufrió el tratamiento anterior, que tendrán acción génica diferente, una de ellas es probablemente la célula madre embriogénica.

El uso de otras sustancias pueden reforzar los efectos de los reguladores del crecimiento sobre la embriogénesis. Tal es el caso del uso de carbón activado, que elevó la producción de 45 embriones por recipiente a 1560 al empezar 2mM de BA y 1 mM de ANA en cultivo de Carica stipulata (Litz y Conover, 1980). Este efecto se atribuye a que el carbón activado absorbe inhibidores de los reguladores de crecimiento, tales como los fenoles.

2. Medio de cultivo

Este factor influye tanto por su composición nutricio-

nal como por sus características físicas. Respecto a la composición nutrimental, se ha encontrado que el nitrógeno, el potasio, el sodio y los complejos naturales presentes en el medio afectan a la embriogénesis.

El cultivo de zanahoria se ha encontrado que el nitrógeno en forma de ión amonio y la caseína hidrolizada estimulan fuertemente la embriogénesis en comparación con el nitrógeno en forma de nitratos y de glutamina, aunque al parecer el prerequisite importante para la embriogénesis es cierto nivel de NH_4^+ dentro del tejido más que su concentración y forma en el medio de cultivo (Tazawa y Reinert, 1969; Vasil y Vasil, 1972). La importancia del nitrógeno como NH_4^+ presente dentro del tejido radica en el hecho que es un precursor de aminoácidos y proteínas que son importantes en la embriogénesis, ya que las células embriogénicas son ricas en citoplasma y ribosoma (Tazawa y Reinert, 1969).

Se ha encontrado que el ion amonio y algunos aminoácidos de la caseína hidrolizada, que son fuentes de nitrógeno, producen tejido con fuerte capacidad embriogénica en zanahoria (Halperin, y Halperin y Wetherell, citados por Wetherell y Dougall, 1976). Sin embargo, tal vez por diferen-

cias en el explante empleado, Brown, et al (1976) al analizar requerimientos de potasio, encontraron poca formación de embriones al emplear aminoácidos de la caseína hidrolizada como fuente de nitrógeno, no así al emplear L-alanina, NH_4NO_3 y L-glutamina.

Los requerimientos de NH_4^+ pueden ser parcialmente reemplazados por la adenina, la glutamina o la caseína hidrolizada en cultivo de células de zanahoria (Evans et al., 1981).

Al emplear KNO_3 como única fuente de nitrógeno hay baja formación de embrioides, además de que el pH se eleva al aumentar su concentración en el medio (Wetherell y Dougall, 1976); encontrándose cierta relación entre la fuente de nitrógeno y el pH.

Se ha observado que al estar ausente el ion amonio del medio, o al presentarse el ion nitrato a bajas concentraciones, el medio no puede ser "bufereado", el pH fluctúa y puede inhibir la embriogénesis (Dougall y Verma, citados por Evans et al., 1981). Por otro lado, la caseína hidrolizada 40 M puede soportar embriogénesis a pH de 4.8 a 5.0 en cultivo de zanahoria silvestre en cultivo en sus

pensión (Wetherell y Dougall, 1976). Estos mismos autores han encontrado que el nitrógeno residual en el tejido que se trata con alguna fuente de nitrógeno no es suficiente para la embriogénesis si se pasa el tejido a un medio sin dicho elemento.

Los tejidos que son cultivados por largos períodos de tiempo, pierden habilidad para sintetizar nitrógeno orgánico a partir de ion amonio, correlacionándose con la reducción del potencial de producción de embriones (Vasil y Vasil, 1972).

Al emplear sales de sodio, tales como NaNO_3 5 mM o Na succinato + NH_4Cl 50 mM, como fuente de nitrógeno se reprime la embriogénesis, debido a los efectos del sodio (Wetherell y Dougall, 1976).

Respecto al potasio, se ha encontrado que sus efectos pueden ser separados de los efectos del nitrógeno (Evans et al., 1981). Sin embargo, en cultivo de zanahoria se ha encontrado que a medida que se reduce el contenido de potasio en el medio de cultivo, disminuye la formación de embriones; y este ion solo tiene efectos positivos cuando se adicionan cantidades favorables de nitrógeno al medio

(Tazawa y Reinert, 1969).

También en cultivo de tejidos de zanahoria, se ha encontrado que los requerimientos de potasio para una máxima formación de embriones son mayores (10 - 5 mM) que la requerida para un máximo crecimiento de callo (1 mM), siendo también dependiente de la fuente de nitrógeno para una máxima formación de embriones; y sus efectos no pueden ser reemplazados por el ion sodio (Brown et al., 1976).

Otro componente importante del medio de cultivo que influye en la embriogénesis es la fuente de carbono, siendo la más común la sacarosa. En el caso de cacao se ha encontrado que a mayor concentración de sacarosa del 3% comúnmente usado se inhibe la embriogénesis (Pence et al., 1981).

Uno de los complejos naturales más comúnmente usados en el medio de cultivo y que tiene efectos positivos sobre la embriogénesis es el agua de coco (Vasil y Vasil, 1972). Sin embargo, el empleo de este endospermo, así como de otros complejos naturales, trae problemas en cuanto a que no siempre presentan la misma composición química, pudiendo no ser repetitivos los efectos que produce.

El estado físico del medio de cultivo es otra característica

rística que afecta la embriogénesis in vitro, principalmente relacionada a los requerimientos nutrimentales, (Vasil y Vasil, 1972). La adenina sulfatada es esencial para la inducción de embriogénesis en perejil cuando se emplea un medio sólido. Sin embargo, en medio líquido no fue necesaria la presencia de este aminoácido (Vasil e Hildebrant, citados por Vasil y Vasil, 1972).

De todos los medios que se han obtenido para el cultivo de tejidos vegetales, el de Murashige y Skoog (MS) ha sido el más empleado en embriogénesis (Evans et al., 1981) con algunas modificaciones. Esto se ha debido a que presenta un mayor contenido de nitrato, amonio, fósforo, potasio y calcio respecto a otros medios, principalmente respecto al de White (Tazawa y Reinert, 1969) siendo necesario en este último la suplementación con nitrato de amonio para la embriogénesis.

Ammirato y Steward (1971) han sugerido que un desbalance en el medio de cultivo, o en el medio ambiente son las causas de una población malformada de embriones in vitro.

3. Período de cultivo

Sussex y Frei (citados por Evans et al., 1981) han reportado que no existe pérdida en el potencial embriogénico en tejido de zanahoria que ha sido cultivado por 10 años, aunque las plantas producidas resultaron estériles, lo cual da indicios de alteraciones en dichos tejidos. La mayoría de las especies trabajadas se ha encontrado que a mayor tiempo de cultivo hay reducción del potencial embriogénico.

Entre las posibles causas de pérdida de este potencial se han citado la pérdida de capacidad para sintetizar nitrógeno orgánico a partir de ion amonio; y a los cambios en el número cromosómico y arreglo de cromosomas (Smith y Street, citados por Evans et al., 1981) debido al uso de reguladores de crecimiento o a la división celular asincrónica que se lleva a cabo en el callo.

La pérdida del potencial embriogénico puede ser relacionada al número de generaciones de crecimiento celular, así como a un período absoluto de tiempo. Se ha encontrado que la pérdida del potencial embriogénico en células de zanahoria puede ser aliviada por menor frecuencia de subcultivos (Smith y Street, citados por Evans et al., 1981).

Otro factor al que puede deberse la pérdida en el potencial embriogénico es la secreción de fenoles por el tejido en cultivo, ante lo cual, la agregación de carbón activado al medio puede reestablecer esta capacidad (Drw, citado por Evans, 1981).

Ahora bien, el período de cultivo que va a ser necesario que pase un tejido para expresar embriogénesis va a depender, entre otros factores, de la especie que se trate, o más bien de su ciclo biológico in vivo. Para Citrus aurantifolia se han diferenciado embriones a los 75 días de cultivo (Mitra y Chaturvedi, 1972); en cambio en cultivo de tejidos de Pimpinella anisum se ha observado la presencia de embriones globulares a las 68 horas de incubación (Ernst et al., 1984).

4. Tipo y tamaño del explante

Para cualquier especie o cultivar puede ser necesario cierto tipo de explante para la regeneración de plantas, como sucede en cereales, tales como trigo (Shimada, 1978; Shimada y Yamada, 1979; Ozias y Vasil, 1983a, 1983b y Magnusson y Bornman, 1985), sorgo (Dustan et al., 1978) y cebada (Norstog, 1970), que requieren tejido embrionario

para obtener embriogénesis in vitro.

Siguiendo con la familia de las gramíneas, se ha encontrado que el embrión inmaduro de las especies de la subfamilia panicoidea presenta estructura similar a los embriones maduros de la subfamilia festucoidea, siendo la causa por la cual se requiere embriones inmaduros, en el caso de las primeras especies, y embriones maduros, en el caso de las segundas, para su cultivo in vitro y lograr embriogénesis (Mc Daniel et al., 1982; Magnusson y Bornman, 1985).

A pesar de esta información no es obligado que los tejidos derivados de embriones cigóticos normales (plántulas) formen más fácilmente embriones in vitro que aquellos derivados de raíz u otra parte de la planta. Lo que si se puede asegurar es que dependiendo del tejido empleado va a ser la provisión de reguladores de crecimiento, complejos naturales y nutrientes necesarios para obtener la embriogénesis in vitro.

La densidad celular y tamaño del explante o agregado son importantes en la inducción de embriogénesis y, principalmente, para obtener un proceso embriogénico sincroniza-

do (Fujimura et al., 1980). En Pimpinela anisum se ha encontrado que la densidad óptima es de aproximadamente 10^5 células/ml (Huber et al., citados por Evans et al., 1981), debiendo ser células embriogénicas. Por otra parte se ha encontrado que a bajas densidades celulares los embriones que se forman son más pequeños a aquellos que crecen en altas densidades celulares (Halperin, citado por Evans et al., 1981). Esto hace suponer que hay cierta interacción, tanto entre células embriogénicas como en no embriogénicas.

Todos los factores señalados anteriormente no actúan de manera aislada, sino en interacción. Esto viene a enfatizar la idea expresada anteriormente de que hay que dar las condiciones adecuadas de cultivo y regeneración a cada tejido que se emplee como explante.

Por otro lado, estos factores pueden influir indirectamente en la embriogénesis desde el momento que determinan las características del callo que es inducido (Evans et al., 1981).

Otros factores que influyen en la expresión morfogenética y por ende en la embriogénesis, que han sido poco considerados son:

- La especie, ya que se ha encontrado que las especies que siguen la vía de organogénesis no presentan embriogénesis al menos que se den condiciones especiales, como sucede en Solanaceas que requieren altas densidades de luz, o el caso de las crucíferas que no han presentado embriogénesis (Evans et al., 1981).
- La edad y estado fisiológico de la planta madre, principalmente relacionado al grado de diferenciación y contenido de nutrientes y hormonas de las células que se van a emplear como explante (Murashige, 1979). En el caso de papaya, se ha encontrado que para su establecimiento in vitro influyen el tipo sexual, y la época del año en la que se obtienen los explantes (Litz y Conover, 1981).

Por lo anterior, es necesario controlar los factores antes y después del establecimiento del cultivo in vitro.

Por la información aquí vertida se observa que es necesario realizar estudios de tipo bioquímico que suceden en el proceso de embriogénesis in vitro, para elucidar la interacción entre medio de cultivo, medio ambiente y el tejido. Ya que es poca la información con que se cuenta como los estudios respecto a cambios en la síntesis de ADN,

ARN y proteínas en tejidos que sufren embriogénesis (Fuji-mura et al., 1980).

Origen del embrión

Se ha considerado que son dos las vías de embriogénesis in vitro: una directa, que es cuando el embrión emerge directamente del explante sin la formación del callo, como ha sucedido en Ranunculus acceleratus; y otra indirecta, en la cual es necesario pasar por la formación de callo para que posteriormente emerja el embrión, siendo esta vía la más común en la mayoría de los vegetales estudiados (Ammirato, 1983), de la que se hará mención a continuación para entender el origen del embrión.

Al colocar un segmento de tejido vegetal en cultivo in vitro, uno de los indicadores que se ha establecido es la proliferación de una masa amorfa, denominada callo, que emerge principalmente de las partes seccionadas como producto de una rápida división celular de células dediferenciadas. Dicho agregado va a variar según sean las condiciones de cultivo a las que se someta, pudiendo diferenciarse en dos tipos: a) callo friable que presenta baja capacidad embriogenética y b) callo blanco y compacto que

con el tiempo toma una coloración amarilla-café del cual surgen los embriones.

En el caso del agregado embrionario, si se hiciera un corte de él, se encontrarían las siguientes características: capas superficiales de pequeñas células isodiamétricas, densamente citoplásmicas, con alto contenido de ribosomas, núcleo y nucleolo prominentes, con varias vacuolas pequeñas, numerosas mitocondrias y amiloplastos prominentes. Dichas capas rodean a un gran núcleo central de células grandes, de varias formas, de apariencia parenquimatosa, presentando una gran vacuola que llena toda la cavidad celular y presenta pocos ribosomas, mitocondrias y amiloplastos (Thomas et al., 1972; Nadar et al., 1978; Zee, 1981; Mc Daniel et al., 1982; Pierson et al., 1983; Wicart et al., 1984 y Magnusson y Bornman, 1985).

Las células superficiales del agregado a menudo se encuentran en mitosis, o están separadas por una delgada pared celular ondulante, asemejando secciones oblicuas de proembriones. A menudo se encuentran interconectadas por plasmodesmos (Thomas et al., 1972), los cuales solo se forman entre células hermanas, permitiendo un transporte más fluido de metabolitos y tal vez están involucrados en el

control de la diferenciación por influir en el transporte polar, principalmente de hormonas (Juniper, 1976).

Se ha observado que a partir de estas células superficiales es donde emerge el embrión, apareciendo primero como pequeños nódulos algodonosos. Sin embargo no todas las células superficiales tienen capacidad embriogénica, ya que algunas están involucradas en la proliferación del agregado (Thomas et al., 1972; Santos et al., 1983). Por otro lado, se ha observado la formación de embriones a partir de células en las profundidades del callo de Thylophora indica (Rao y Narayanaswamy, citados por Vasil y Vasil, 1980).

En cultivo en suspensión se ha encontrado que las células a partir de las cuales surge el embrión son pequeñas, esféricas, densamente llenas de almidón y usualmente forman colonias globulares (Vasil y Vasil, 1972).

Respecto a la ontogenia de desarrollo del embrión se han observado algunas diferencias. En el caso de cultivo de células de zanahoria, la formación del embrión empieza con una división celular desigual, similar a la formación del embrión cigótico, siguiendo la formación de tejido parenquimatoso y células embriogénicas (Backs y Reinert, cita-

dos por Zbell, 1980). En cambio, en alfalfa se ha visto que la primera división de células embriogénicas de células de igual tamaño (Santos et al., 1983). Respecto a los demás estados de desarrollo, es decir el globular, forma de corazón, torpedo y cotiledonar, si se han encontrado en los embriones formados in vitro (Pierson et al., 1983).

En algunos casos, la estructura del embrión está unida al agregado celular por medio de un suspensor similar al del embrión cigótico, como sucede en Coffea canephora (Pierson et al., 1983). Al parecer las células más externas dan origen al embrión y la subsuperficiales inmediatas dan origen al suspensor, sin determinarse exactamente si tiene una célula como origen común (Santos et al., 1983).

Respecto a la embriogénesis directa, también se ha obtenido en Coffea canephora (Dublin, citado por Pierson et al., 1983) y en cotiledones e hipocótilos de embriones somáticos inducidos in vitro de alfalfa (Santos et al., 1983).

Efecto del 2,4-D en la embriogénesis inducida

Los reguladores de crecimiento como el 2,4-D, tiene la función en el medio de cultivo de determinar las células madres embriogénicas y la sincronización de éstas, aunque ta-

les células parecen estar estáticas (arresto mitótico) hasta subcultivarlas en un medio sin la hormona, inductor de la embriogénesis.

Se dice que el 2,4-D induce diferenciación de acuerdo a los siguientes fenómenos:

1. Proliferación de una sola población celular (fenotípica) del explante original.
2. Alargamiento del ciclo mitótico de una población particular con la interferencia de uno o más puntos de control.
3. Determinación y paro de una población distinta de células en el ciclo celular con bloque de G_1 , G_2 ó G_0 .

También se piensa que existe un reajuste de la actividad de la enzima peroxidasa por el 2,4-D en la fase G_1 , G_2 ó G_0 , y cuando la auxina es liberada, cesa la proliferación del callo y ocurre la división en células embriogénicas preexistentes.

Es importante conocer como el 2,4-D está condicionando a las células del callo para la embriogénesis.

El 2,4-D llega a la membrana plasmática donde está localizado el sitio receptor de la hormona. La auxina primero hace contacto con la superficie exterior de la membrana, el 2,4-D conduce a un cambio conformacional en la membrana, por lo tanto libera al receptor o penetra en la membrana y ataca directamente al receptor liberado ó complejo hormona-receptor puede entonces ser liberado y se mueve a través del citoplasma y entra al núcleo, donde se lleva a cambio el cambio, controlando la actividad de la ARN-polimerasa I y II (Ahton y Crafts, 1973; Audus, 1976; Everett et al., 1978; More, 1979). Pero es estimulada principalmente la ARN-polimerasa encargada de la síntesis de ARNr (ARN ribosomal). También promueve la síntesis de ADN y estimula la proliferación, aunque tiene efecto en la diferenciación (Cherry, 1976; Bevan y Northcote, 1981).

Cherry (1976); Guifoyle et al. (1975) observaron que el 2,4-D controla la síntesis proteica a muchos niveles, uno es a nivel transcripción relacionado a la regulación específica de ADN dirigida a la síntesis de ARN, otro control puede ser a nivel del genoma por la desrepresión génica por remoción de histonas o proteínas ácidas o en la activación de una ARN-polimerasa específica.

Un segundo control es a nivel traslación, relacionado con la traducción del ARNm para la síntesis de proteínas. Esta regulación puede ser hecha afectando, la transferencia de ARNs específicos, ribosomas, incorporación de las cadenas de ARNm a los ribosomas (o poliribosomas). La existencia de ARNasas que ataquen selectivamente a un tipo de ARNm, dejando traducirse a un solo tipo de ARNm (Sharp et al., 1980). Pero es más probable que actúe a través de la regulación química de la transcripción y cambiando la expresión del genoma que puede resultar en la síntesis de nuevas proteínas (Guilfoyle et al., 1975; Cherry, 1976; More, 1979).

La inducción de la embriogénesis por la remoción del 2,4-D es controlada probablemente a nivel translacional y transcripcional. Las células creciendo en medio con 2,4-D pueden sintetizar ARN involucrado en la inducción embriogénica, probablemente no ocurre hasta la remoción del 2,4-D. Es probable que la transcripción original sintetizada en el medio con la auxina es modificado cuando las células son transferidas a un medio sin la auxina, esta modificación puede involucrar poliadenización o una modificación en la terminal 5'. También puede ser posible que la unión del ARN a los ribosomas se lleve a cabo hasta que la concen-

tración de la auxina es reducida o que el ARN necesario para la inducción de la embriogénesis sea sintetizado en presencia del 2,4-D y al quitarlo ocurre el desenmascaramiento del ARN.

Se ha visto que al remover el 2,4-D se dispara la síntesis de ARN poliadenizado, aunque no se sabe si la poliadenización del ARN es la del preexistente o es sintetizado por completo. Estos poli(A) + ARN traen cambios en el metabolismo del ARNm. Se ha visto que en ciertos productos traslocables de el ARN transcritos en presencia de la auxina son involucrados en estados tempranos de desarrollo del embrión, mientras que los productos translacionales de el poli(A) + ARN sintetizado de novo tienen un papel en los estados posteriores de desarrollo del embrión (Sharp et al., 1980).

La desventaja del uso del 2,4-D es que causa anomalías cromosómicas en cultivos in vitro tales como:

a) Incremento en el número cromosómico sin rompimiento:

Son simples cambios en forma repetida del grupo básico de cromosomas, tomando niveles $2n$, $4n$, $8n$, etc, teniendo como consecuencia la poliploidia.

- b) Decremento en número sin rompimiento cromosómico: La formación de haploides puede llevarse a cabo por varios mecanismos, como la formación del huso multipolar (Bayliss, 1973; D'Amato, 1978; Chand y Roy, 1980), no disyunción o retardo de las cromátides.
- c) Rompimiento cromosómico sin cambio numérico: Se refiere a cambios estructurales y a pérdida de material genético, alterando el cariotipo del cultivo original, son fuente de variación en cultivo de tejidos.
- d) Rompimiento cromosómico con cambio numérico: Un cambio en número cromosómico proveniente de un rompimiento, resulta invariablemente de la formación de un anillo.
- e) Endoreduplicación somática: Una irregularidad en cultivo de tejidos es la omisión de mitosis total, pero se permite la replicación de ADN, este fenómeno no provoca cambios estructurales o cambios en número, sino que consiste en una doble, triple o múltiple duplicación de cromosomas, creando los cromosomas politenicos.
- f) Fragmentación nuclear: Ocurre al momento de la inducción del callo por el efecto hormonal del 2,4-D, dando resultado células multinucleadas (micronúcleos) que pos-

teriormente sufre celularización, resultando células con número cromosómico muy variable, desde diploides a hipo e hiperploides, provocándose una población mixta (D'Amato, 1977, 1978 y 1980).

MATERIALES Y METODOS

Para la realización de este trabajo se propagó callo de 2 años de edad que provenía de embriones inmaduros de Carica papaya de 30 y 40 días de haber sido polinizados.

Se utilizó un medio básico de Murashige y Skoog (1962), adicionando 150 ml/l de agua de coco, 80 mg/l de adenina, 400 mg/l de glutamina, 30 g/l de sacarosa, 0.1 mg/l de 2,4-D (Cuadro 1) para inducir embriogénesis.

El medio de cultivo se preparó a partir de soluciones madre (concentradas), usándose para su elaboración agua tridestilada. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 empleando soluciones de NaOH 1N y NCl 1N, se solidificó con 7 g/l de agar y su esterilización se llevó a cabo en una autoclave a 120°C y 1.5 kg/cm² de presión, durante 15 minutos.

Posteriormente para enraizar plántulas se hizo un tratamiento que contenía ANA 2 mg/l, AIB 3 mg/l, adenina 80 mg/l, glutamina 400 mg/l, y otro medio carente de reguladores de crecimiento, sin adenina y sin glutamina para transferir callo y así obtener embriogénesis en los consecuentes subcultivos y lograr también la germinación de los embriones

y su desarrollo posterior.

En cada uno de los tratamientos se pusieron 50 frascos con 20 ml de medio de cultivo/frasco. En el caso del medio para enraizar plántulas se colocaron 3 plantas/frasco, y en el medio para callo y embriones 3 porciones en el caso del primero y 4 a 5 embriones/frasco.

Los frascos conteniendo el propágulo se colocaron en un cuarto de incubación con ambiente controlado, a una temperatura de 25-28°C y con un fotoperíodo de 16 horas luz, usando lámparas fluorescentes de 500 lux.

El material se transfirió a un medio nuevo cada cuatro semanas.

Los embriones subcultivados en el medio sin reguladores de crecimiento, siguieron su desarrollo normal y aproximadamente a los 8 días de haber sido transferidos a este medio las plántulas se pasaron a suelo estéril.

Antes de ser trasplantadas a suelo las plantas se enjuagaron con agua destilada estéril, para quitar cualquier residuo de agar que llevaran en la raíz, con la finalidad de evitar contaminación por hongos y/o bacterias. Asimismo al sue

lo se le dió un riego ligero con agua conteniendo fungicida (captán) a una concentración de 1 g/l.

Las plantas se colocaron en vasos de unicel (3/vaso), se cubrieron en bolsas de plástico para mantener una alta humedad relativa, reduciendo un poco el cambio drástico de in vitro a suelo, se etiquetaron y se mantuvieron en el cuarto de incubación a una temperatura de 25 a 28°C y un fotoperíodo de 16 horas luz a una intensidad de iluminación de 500 lux con lámparas fluorescentes Grolux, regándose con medio de cultivo a la mitad de su concentración 2 veces por semana durante 2 meses y posteriormente se pasaron a invernadero.

CLASIFICACION DE LOS ESTADOS DE DESARROLLO DE LOS EMBRIONES Y ESTRUCTURAS ORGANOGENICAS

Para la identificación de los diferentes estados de desarrollo y las estructuras organogénicas de una cepa de Carica papaya, se tomaron 3 frascos, primero se fijó en FAA (formol 10 ml, ácido acético 5 ml y alcohol etílico 50 ml). A los 3 días se pasaron a:

Metanol al 50%

Metanol al 70%

Metanol al 85% + eosina
Metanol al 95% + eosina
Metanol al 95% + eosina
Metanol al 95% + eosina
Metanol al 50% + 5% de xileno
Xileno al 100%
Xileno al 100%

Durante 15 horas mínimo en cada tratamiento.

Cuando el material estaba teñido de un color rosa, se separaron los diferentes estados embriogénicos (fase globular, forma de corazón, forma de torpedo y forma cotiledonar) así como, las estructuras organogénicas, con la ayuda de pinzas y un microscopio de disección.

Para montar cada una de las estructuras encontradas en la cepa se hicieron anillos de alambre de diferente diámetro y grosor. Se colocó la estructura en un portaobjetos y a su alrededor el anillo, se selló la muestra con resina y se cubrió con el cubroobjetos para después ponerla en una plancha caliente para secar la resina y eliminar las burbujas de aire. Cuando la resina estaba seca se procedió a la observación en el microscopio.

SIEMBRA DE EMBRIONES DE LAS CRUZAS INTERESPECIFICAS

Utilizando la misma metodología de Carica papaya se procedió a la siembra de los embriones inmaduros obtenidos de las cruzas interespecíficas de Carica papaya L. X Carica pubescens Lenne & Kock, Carica cauliflora Jacq. y Carica quercifolia de 30 y 40 días de haber sido polinizados, ya que es el momento en que el fruto cae prematuramente. Las polinizaciones se llevaron a cabo en plantaciones del campo experimental del Instituto de Investigaciones Agrícolas en Cotaxtla, Veracruz.

Los frutos permanecieron en refrigeración hasta que se llevó a cabo la siembra.

En el medio MS modificado para papaya (Cuadro I) se procedió a la siembra de los embriones inmaduros, utilizando 8 diferentes tratamientos con la adición de la auxina 2,4-D, 0.01 mg/l, 0.05 mg/l, 0.1 mg/l, 0.5 mg/l, 1.0 mg/l, 50 mg/l, 10.0 mg/l y 20.0 mg/l, 6 repeticiones/tratamiento.

Con las precauciones de asepsia necesarias la siembra del material vegetal se realizó de la siguiente manera:

Los frutos se limpiaron con alcohol, después se pasa-

ron a hipoclorito de sodio al 4% durante 20 minutos y posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada es téril dentro de la cámara de flujo laminar. Los frutos se dividieron a la mitad con la ayuda de un bisturí y pinzas previamente flameadas con una lámpara de alcohol, se colocaron de 15 a 20 embriones por frasco gerber con 20 ml de medio de cultivo MS, se sellaron con papel aluminio y se etiquetaron, para después colocarlos en el cuarto de incubación, con una temperatura de 25 a 28°C y con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, bajo una intensidad de iluminación de 500 lux con el uso de lámparas fluorescentes Gro-lux.

Cuadro I. Composición del medio MS modificado.

C o m p u e s t o	Mg/L	Millimol/L
Ca Cl ₂ . 2 H ₂ O	440.0	3.0 mM
NH ₄ NO ₃	1650.0	41.2 N
KNO ₃	1900.0	18.8 mM
KI	0.830	0.005 mM
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0.025	0.0001 mM
KH ₂ PO ₄	170.0	1.25 mM
H ₃ BO ₃	6.2	0.1 mM
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	10.250	0.001 mM
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	370.0	1.5 mM
Mn SO ₄ . 4 H ₂ O	17.0	0.1 mM
Cu SO ₄ . 5 H ₂ O	0.025	0.0001 mM
Zn SO ₄ . 7 H ₂ O	8.6	0.03 mM
Fe SO ₄ . 7 H ₂ O	27.8	0.1 mM (Fe)
Na ₂ EDTA	37.3	0.2 mM (Na)
Inositol	100.0	
Acido Nicotínico	0.5	
Piridoxina - HCl	0.5	
Tiamina - HCl	0.1	
Glicina	2.0	
Sacarosa	30,000.0	
Adenina	80.0	
Glutamina	400.0	
Agua de coco	150,000.0	
Na H ₂ PO ₄	170.0	
Agar	7,000.0	

Medio de Murashige & Skoog (1962), modificado por González, 1985.

RESULTADOS

La propagación del material vegetal en el medio con 0.1 mg/l de 2,4-D fue adecuado para inducir embriogénesis, encontrando en una misma cepa también organogénesis, es decir plántulas sin raíz o bien solo raíz. En este material pudimos observar que los embriones provienen de un callo compacto de color amarillo-café y surgen de las capas superficiales del callo, en tanto que las partes organogénicas surgen de un callo blanco y friable (Fotografías 1 y 2).

En el medio MS modificado con ANA 2 mg/l, AIB 3 mg/l, adenina 80 mg/l y glutamina 400 mg/l dió buenos resultados para enraizar las plántulas obtenidas por organogénesis. Las plantas en este medio de cultivo a los 20 y 30 días sus raíces tenían de 2 a 3 cm, y fue entonces cuando se transfirieron a suelo estéril.

Los embriones subcultivados en el medio sin reguladores de crecimiento, adenina y glutamina germinaron y siguieron su desarrollo posterior (presentando los dos polos, meristemático de raíz y tallo) (Fotografía 3). Asimismo este medio fue efectivo para preservar callo para los subse-

cuentes cultivos.

Los embriones a los ocho días de haber permanecido en este medio de cultivo se desarrollaron y fueron pasados a suelo estéril.

Al pasar las plantas a suelo observamos que algunas presentaron las hojas cotiledonares malformadas (una hoja grande y la otra pequeña o bien las dos grandes y redondas (Fotografías 4 y 5), y en otros casos la formación de callo en la base del tallo y la presencia de raíces gruesas o muy pequeñas (Cuadro II y III). Sin embargo, cuando las plantas tenían las hojas cotiledonares deformes se eliminaron cuando fueron pasadas a suelo y la planta siguió su desarrollo normal.

De las plantas establecidas en suelo encontramos que las que provenían de embriogénesis tuvieron un 18% de sobrevivencia mayor que las obtenidas por organogénesis (Cuadro II y III).

Estados de desarrollo del embrión

En la clasificación de los estados de desarrollo del embrión se encontró la forma globular, forma de corazón,

forma de torpedo y la forma cotiledonar (Fotografías 6, 7, 8, 9). Las diferentes etapas de desarrollo de los embriones se desprendían del callo en relación a las estructuras organogénicas que permanecieron conectadas a él.

Las preparaciones fijas se observaron al microscopio y se diferenció sistema vascular que une al meristemo radicular con el meristemo de tallo.

Cruzas interespecíficas de Carica papaya con las especies silvestres

En el cultivo de los embriones inmaduros de Carica papaya X las especies silvestres se observó que el mejor tratamiento para la proliferación de callo fue el de 0.1 mg/l de 2,4-D, seguido por los tratamientos 0.05 mg/l y 0.5 mg/l respectivamente, aunque hubo mejor respuesta en la cruce de C. papaya X C. cauliflora (ver Cuadro IV).

A los ocho días de la siembra algunos de los embriones inmaduros en el medio de cultivo presentaron una coloración verde y al mes comenzaron a desdiferenciarse, pero la proliferación de callo fue lenta en las tres cruces.

En el cultivo de C. papaya X C. pubescens tan solo

germinó un embrión inmaduro sin pasar por callo en el tratamiento con 0.1 mg/l de 2,4-D.

Cuadro II. Malformaciones observadas en las plantas pasadas a suelo obtenidas por embriogénesis.

No. Vaso 3 Pl/vaso	Plantas normales	Plantas con hojas deformes	Plantas con raíces gruesas ó pequeñas	Plantas con callo en la base del tallo	Sobrevi- vencia
1	3				3
2		3			2
3	2		1		2
4	3				3
5	3				3
6	3				3
7	3				3
8	3				3
9	3				3
10	1	1	1		2
11	1	1	1		3
12	3				3
13	1	2			2
14	1		1	1	1
15	2	1			3
16	3				3
17	2	1			3
18	2	1			3
19	3	1			3
20	1	2			1
21	1	2			3
22	2	1			3
23	1	2			2
24		3			2
25	3				3
75 plantas	50	21	3	1	66

88% de sobrevivencia.

Cuadro III. Malformaciones observadas en las plantas pasadas a suelo obtenidas por organogénesis.

No. Vaso 3 Pl/vaso	Plantas normales	Plantas con hojas deformes	Plantas con raíces gruesas ó pequeñas	Plantas con callo en la base del tallo	Sobrevi- vencia
1		1	1	1	1
2	1	2			2
3	1	2			3
4	2		1		2
5	2			1	2
6	1	2			3
7	1		1	1	1
8	3				2
9		2	1		1
10	2	1			3
11	2		1		3
12	2	1			2
13	2	1			2
14	1		1	1	1
15	3				2
16	1	2			2
17	2		1		3
18	3				3
19	1	2			3
20	2	1			2
21	2			1	1
22	1	1	1		2
23	3				2
24	1	2			2
25	3				3
75	42	20	8	5	53

70.6% sobrevivencia.

Cuadro IV. Formación de callo en las cruza interespecíficas de *C. papaya* x las especies silvestres en diferentes concentraciones de 2,4-D.

Concentración mg/L	No. frascos sembrados	Carica papaya x <i>Carica pubescens</i>	Carica papaya x <i>Carica cauliflora</i>	Carica papaya x <i>Carica quercifolia</i>
0.0	6	-	-	-
0.01	6	+	+	-
0.05	6	+	++	+
0.1	6	++	+++	++
0.5	6	+	++	+
1.0	6	-	+	+
5.0	6	-	+	+
10.0	6	-	-	-
20.0	6	-	-	-

- = no formación
 + = poco desarrollo
 ++ = buen desarrollo
 +++ = mejor desarrollo

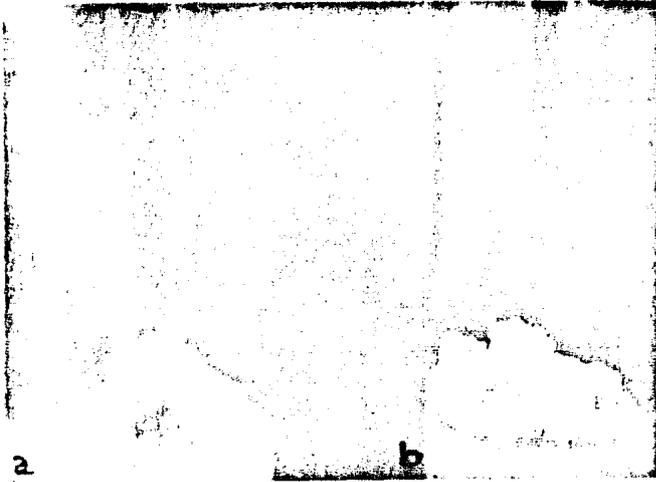


Foto 1. a) Callo compacto de color amarillo-café del cual surgen los embriones.
b) Callo blanco y friable de donde provienen las estructuras organogénicas



Foto 2. Callo netamente embriogénico, compacto y de color amarillo-café.



Foto 3. Embriones subcultivados en el medio sin reguladores de crecimiento, adenina y glutamina.



Foto 4. Plantas con hojas cotiledonares malformadas.



Foto 5. Presencia de raíces gruesas y/o pequeñas.

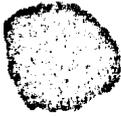


Foto 6. Fase globular.



Foto 7. Forma de corazón.



Foto 8. Forma de torpedo.



Foto 9. Forma cotiledonar.

DISCUSION

Los resultados obtenidos al cultivar in vitro embriones inmaduros de Carica papaya L., nos permitieron detectar que el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) induce la embriogénesis, pero después es necesario suprimir su efecto en el medio de cultivo para permitir que los embriones germinen y continúen su desarrollo posterior. Estas observaciones concuerdan con lo que señalan algunos autores, Zhell, 1980; Cheng et al., 1985; Kang et al., 1971 al trabajar con Daucus carota e Hyoscyamus niger encontraron que todos los factores que intervienen en la embriogénesis la auxina es fundamental, ya que es prerequisite en el medio de cultivo para que alcance un nivel dentro del tejido y, que posteriormente se elimine para el desarrollo del embrión. En otros casos, como en Bracochycome lineariloba (Gould, 1979) fue necesario inducir embriogénesis en un medio con 0.5 mg/l de ANA y 0.1 mg/l de cinetina y, posteriormente, para el desarrollo de embriones fue necesario eliminar la auxina.

Esto sucede en la mayoría de las especies que han seguido la ruta de embriogénesis (Tisserat et al., 1979), sin embargo no es general, ya que en cultivo de tejidos de -

Ranunculus sceleratus L. se ha obtenido la inducción y crecimiento de los embriones en el mismo medio sin eliminar la auxina.

Asimismo, al tratar de inducir embriogénesis es necesario considerar la concentración de la auxina, ya que altas concentraciones incrementan la friabilidad del callo y, por tanto, la separación de las células, considerándose como tejido no embriogénico (Torrey y Reinert, citados por Evans et al., 1981).

Se considera que una alta concentración de auxina en el medio, o su permanencia posterior a la inducción de embriogénesis, puede inhibir el desarrollo de los embriones por la liberación de etileno, por inhibición de la expresión de isoperoxidasas requeridas para el desarrollo completo de los embriones, o por interferir el proceso de formación del huso acromático (Zbell, 1980; Sharp et al., 1980).

Ahora bien no solo debe considerarse el manejo de la auxina como único regulador de la embriogénesis, existen también otros reguladores de crecimiento, las fuentes de carbono, nitrógeno y complejos naturales que intervienen en la embriogénesis in vitro, aunque no hay que perder

de vista otros factores que influyen en la expresión morfo-genética, y por ende en la embriogénesis, éstos son: la especie, la edad y estado fisiológico de la planta madre. En el caso de papaya, se ha encontrado que para su establecimiento in vitro influyen el tipo sexual, y la época del año en la que se obtienen los explantes (Litz y Conover, 1981). Por lo cual se deben considerar los factores que influyen en e l explante, antes de establecer el cultivo in vitro de Carica papaya y sus especies silvestres.

Un problema muy importante que se ha encontrado en el cultivo de tejidos que siguen la ruta de embriogénesis es un gran intervalo de formas aberrantes en adición a los embriones normales (Ammirato, 1974; González, 19 85). Como se observó en las plantas de Carica papaya obtenidas in vitro al presentar las hojas cotiledonares malformadas. Este problema ha sido una de las principales objeciones para seguir esta vía de regeneración, así como un paso importante de superar y de esta forma perfeccionar la técnica de cultivo de tejidos.

Por tal motivo, consideramos necesario realizar un análisis cromosómico del material de papaya proveniente de un medio con 2,4-D, puesto que no solo provoca alteracio-

nes fenotípicas, sino también anormalidades cromosómicas, tales como: incremento en el número cromosómico sin rompimiento, decremento en número sin rompimiento cromosómico sin cambio numérico, rompimiento cromosómico con cambio numérico, endoreduplicación somática y fragmentación nuclear (D'Ammato, 1977, 1978 y 1980; Evans et al., 1981). Además también serviría para establecer una metodología adecuada en los estudios cromosómicos de Carica papaya y sus especies silvestres, ya que muy poco se ha trabajado al respecto (Datta, 1971).

En cuanto a la separación de los diferentes estudios de desarrollo de los embriones, se encontró la fase globular, de corazón, torpedo y cotiledonar. En las observaciones que se hicieron al microscopio se encontró sistema vascular que une al meristemo radicular con el meristemo de tallo, lo cual da evidencias que es un embrión somático que sigue el mismo desarrollo de un embrión cigótico. Este embrión somático no está conectado por tejido vascular al callo. Por otro lado, en la misma cepa encontramos estructuras organogénicas raíz o tallo que estaban conectadas al callo.

Haccius (citado por Street, 1976) enfatiza que solo

puede ser considerada embriogénesis in vitro a aquel proceso regenerativo que presente una estructura primaria bipolar, es decir, que presente coleoptilo y radícula, y que no está conectado por medio de tejido vascular con el explante o agregado (callo) en cultivo. Posteriormente se atribuye otra característica al proceso para considerarse como embriogénesis, la cual es que la estructura que se origina presente un desarrollo similar a la ontogenia del embrión cigótico (Street, 1976); es decir que tenga un origen unicelular, y que pase por los estados globular, forma de corazón, forma de torpedo y cotiledonar y que sea capaz de originar una planta completa (Ammirato, 1983), como se observó en Carica papaya.

Por otro lado la diferencia entre organogénesis y embriogénesis es práctica. Por ejemplo, en gramíneas las plantas obtenidas por brotes meristemoides (organogénesis) tienen un origen multicelular, por lo que no pueden ser empleadas en la selección de mutantes u otro tipo de análisis genético; en cambio al obtener el embrión a partir de una célula si puede hacerse este tipo de selección de estudios (Chin-Yi y Vasil, 1982). Por otro lado, al presentar conexión vascular con el callo, las plantas obtenidas por orga-

nogénesis son más difíciles de establecer en suelo, como sucedió en Carica papaya.

La embriogénesis in vitro no solo tiene importancia en cuanto a obtener material vegetal clonal, sino también como herramienta de estudios de procesos fisiológicos y bioquímicos que se presentan durante la embriogénesis sexual, así como para la regeneración de plantas provenientes de embriones inmaduros, como es el caso de papaya en donde se desea obtener una planta híbrida entre Carica papaya y sus especies silvestres.

En cultivo de Carica papaya X Carica pubescens germinó tan solo un embrión inmaduro sin pasar por callo. Esto significa que es necesario hacer más investigación al respecto con el propósito de buscar las condiciones adecuadas y poder lograr la germinación de los embriones inmaduros sin pasar por la etapa de callo, siendo de esta forma más fácil y preciso considerar que la planta es híbrida.

CONCLUSIONES

Como se ha establecido por varios autores y una vez más se confirma en esta investigación, las auxinas y específicamente el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético es necesario para la inducción de la embriogénesis, y posteriormente debe ser eliminado del medio de cultivo para asegurar el desarrollo posterior de los embriones hasta obtener la planta completa.

Por las observaciones hechas en algunas plantas que presentaron malformaciones en hojas y raíces, consideramos que el 2,4-D causa alteraciones fenotípicas y anomalías cromosómicas en cultivo in vitro de embriones inmaduros de Carica papaya.

Los embriones de Carica papaya, se originan de las capas superficiales del callo que se muestra compacto y de color amarillo-café.

En una cepa de Carica papaya encontramos tanto embriogénesis como organogénesis.

Los embriones somáticos cultivados in vitro de Carica papaya presentan la misma ontogenia de un embrión cigótico,

es decir, presentan la fase globular, forma de corazón, forma de torpedo y cotiledonar, presentando tejido vascular que une al meristemo de raíz y tallo sin conexión con el callo, lo que apoya a ser considerados plenamente como embriones somáticos.

De las plantas establecidas en suelo, las obtenidas por embriogénesis tuvieron un 18% de sobrevivencia mayor que las provenientes por organogénesis.

Las plantas de 8 días de haber germinado los embriones tuvieron un prendimiento en suelo mejor que las que tenían más tiempo en el medio de cultivo.

El tratamiento con 0.1 mg/l de 2,4-D en el medio MS modificado para papaya a una temperatura de 25 a 28°C y un fotoperíodo de 16 horas luz fue el más efectivo para la producción de callo en las cruzas interespecíficas de Carica papaya x C. pubescens, C. cauliflora y C. quercifolia.

SUGERENCIAS

Consideramos que para la propagación masiva de papaya la vía de embriogénesis es efectiva, ya que en un cultivo se obtienen suficientes embriones que se desarrollan normalmente.

Se deben tomar en cuenta los factores tales como: la especie, edad y estado fisiológico de las plantas a utilizar en las cruzas interespecíficas de Carica papaya y sus especies silvestres, el momento de la polinización, la temperatura, luz, humedad, etc, es decir las condiciones de las plantas en campo.

Es necesario establecer una metodología adecuada para realizar el análisis cromosómico de Carica papaya y las especies silvestres.

En futuras investigaciones relacionadas con el tema se debe hacer énfasis en obtener las condiciones adecuadas para tener la germinación de los embriones inmaduros de las cruzas interespecíficas de Carica papaya con las especies silvestres sin pasar por la etapa de callo.

LITERATURA CITADA

- Acosta Marín, J.C. 1969. Insectos relacionados con la lechosa (Carica papaya L.), en Venezuela. Agron. Trop. Vol. 19(4): 251-267.
- Ammirato, P.V., y F.C. Steward. 1971. Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. Bot. Gaz. 132: 149-158.
- Ammirato, P.V. 1974. The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (Carum carvi L.). Bot. Gaz. 135: 328-333.
- Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. In: Handbook of Plant Cell culture. Vol. I. Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. y Yamada, Y. (eds.). MacMillan Publishing Co. New York. pp 82-123.
- Ahton, F.M. and A.S. Crafts. 1973. Mode of action of herbicides. John Wiley & Sons, N.Y. pp. 504.
- Audus, J.L. 1976. Herbicides. Physiology, Biochemistry, Ecology. 2nd. Edition. Academic Press. Great Britain. pp. 555.
- Austin, C.A. 1975. Diseases of tropical and subtropical fruits and nuts. Hafner Press. New York. pp. 317.
- Avilés, C.A. 1971. Estudio Agroindustrial de la papaya. Tesis profesional. Chapingo, México. pp. 121.
- Bajaj, Y. P.S., K.S. Labana and M.S. Dhanju. 1981. Induction to polley embryos and pollen callus in anther culture of Arachis hypogea and A. glabrata. Brief report. Protoplasma. 103: 397-399.

- Bayliss, M.W. 1973. Origin of chromosome number variation in cultured plant cells. *Nature*. 246: 529-530.
- Bevan, M., and D.H. Northcote. 1981. Some rapid effects on synthetic auxins on mRNA levels in cultured plant cells. *Planta*. 152: 32-35.
- Bhatnagar, S.P., and V. Sawhney. 1981. Endosperm - its morphology, ultrastructure and histochemistry. *Int. Rev. Cytol.* 73: 55-102.
- Brown, S., D.F., Wetherell, and D.K. Dougall. 1976. The potassium requirements for growth and embryogenesis in wild carrot suspension culture. *Physiol. Plant.* 37: 73-79.
- Cobley, L.S. 1976. The cultured tropical fruits and introduction to the botany of tropical crops. London Longman. pp. 181-185.
- Curtis, P.J. 1985. Comunicación personal. Dpto. de Fitotecnia.
- Chand, S., and C.S. Ray. 1980. Cytological abnormalities during culture of Nigella sativa. *Ptooplasma*. 104: 353-357.
- Cheng, J., and V. Raghavan. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Hyoscyamus niger. *Amer. J. Bot.* 72 (4): 580-587.
- Cherry, J.H. 1976. Action of nucleic acid protein metabolism. In: *Herbicides*, Audus, L.J. (ed.) Academic Press. N.Y. pp. 525-546.

- Chin-Yi, L., and I.K. Vasil. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of Panicum maximum Jacq. Amer. J. Bot. 69: 77-81.
- D'Amato, F. 1977. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. In: Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture. (Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. eds.) Springer, Berlin. pp. 343-357.
- D'Amato, F. 1978. Chromosome number variation in cultured cells: In Frontiers of tissue cultured. Edited by Thorpe, A.T. International Association for Plant Tissue Culture; University of Calgary, Canada. pp. 287-297.
- D'Amato, F., A. Bennici, P.G. Cionni, S. Baroncelli and M.C. Lupi. 1980. Nuclear fragmentation followed by mitosis as mechanism for chromosome number variation in tissue cultures; its implications for plant regeneration. In: Plant cells cultures, results and perspectives. Edited by Sala, F., Parisi, B.; Elsevier/North Holland Biomedical Press. Printed in the Netherland. pp. 67-73.
- Datta, P.C. 1971. Chromosomal biotypes of Carica papaya Linn. Cytologia. 36: 555-562.
- De León, M., J. 1976. Plagas y enfermedades de la papaya. Entomología del CIASE, INIA. IV Simposio Nacional de Parasitología Agrícola (6-9).
- Díaz, B., V. 1979. Incidencia y cuantificación de daños ocasionados por el virus de la mancha anular del papayo en la Región Central del Estado de Veracruz. Apartado Postal # 12, Zacatepec, Morelos.

- Dollmantell, H.J., and J. Reinert. 1980. Auxin levels, antiauxin(s) and androgenic plantlet formation in isolated pollen culture of Nicotiana tabacum. Protoplasma. 103: 155-162.
- Dustan, D.I., K.C. Short, and E. Thomas. 1978. The anatomy of secondary morphogenesis in cultured scutellum tissue of Sorghum bicolor. Protoplasma. 97: 251-260.
- Engleman, M.E. 1985. Comunicación personal. Centro de Botánica. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Engvild, K.C., L.I. Linde, A. Lundqvilst. 1972. Anther culture of Datura innoxia flower bud stage and embryoid level of ploidy. Hereditas. 72: 331-332.
- Ernst, D., and D. Oesterhelt. 1984. Effect of exogenous cytokinins on growth and somatic embryogenesis in anise cells (Pimpinella anisum L.). Planta. 161: 246-248.
- Ernst, D., D. Oesterhelt, and W. Schafer. 1984. Endogenous cytokinins during embryogenesis in an anise cell culture (Pimpinella anisum L.). Planta. 161: 240-245.
- Esau, K. 1972. Anatomía Vegetal. Trad. Pons, R.J. Omega, Barcelona. 760 p.
- Evans, D.A., Sharp, W.R., and Flick, C.E. 1981. Plant regeneration from cell cultures. Hort. Rev. 3: 214-314.
- Geier, T., and H.W. Kohlenbach. 1973. Entwicklung von embryonen und embryogenum kallus aus pollenkörnern von Datura metiolooides un Datura innoxia. Protoplasma. 78: 381-396.

- González, R.H. 1985. Comunicación personal. Centro de Fruticultura. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Gould, A.R. 1978. Diverse pathways of morphogenesis in tissue cultures of the composite Brachycome lineariloba (2n = 4). *Protoplasma*. 97: 125-135.
- Heberle, B.E., and J. Reinert. 1979. Androgenesis in isolated pollen cultures in Nicotiana tabacum dependence upon pollen development. *Protoplasma*. 99: 237-245.
- Ho, W.J., and K. Vasil. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (Saccharum officinarum L.). 1. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma*. 118: 169-180.
- INIA. 1982. Ciclo del cultivo. pp. 86.
- Ireta, O.A. 1978. Estado actual de la investigación con frutales tropicales y subtropicales en el INIA. En Memoria del II Congreso Nacional de Fruticultura 1977, CONAFRUT. México, D.F. pp. 18-22.
- Jagannathan, V., and A.F. Mascarenhas. 1980. Plant Tissue Culture and its Application to Agricultural Problems Relevant to India. *Newsletter*. 32: 11-13.
- Juniper, B.E. 1976. Junction between plant cells. In: *The Developmental Biology of Plants and Animals*. Graham, C.F. and Wareing, R.F. (eds). W.B. Saunders Company. Philadelphia. Toronto. pp. 111-126.
- Kang, B.G., Newcomb and S.P. Burg. 1971. Mechanism of auxin-induced ethylene production. *Plant Physiol.* 47: 504-509.

- Kapil, R.N., and S.C. Tiwari. 1978. Plant embryological investigations and fluorescent microscopy: an assessment of integrations. *Int. Rev. Cytol.* 53: 291-331.
- Litz, R.E., and R.A. Conover. 1978. Recent advances in papaya tissue culture. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 91: 180-182.
- Litz, R.E., and R.A. Conover. 1980. Somatic embryogenesis in cells cultures of Carica stipulata. *Hortscience.* 15: 733-735.
- Litz, R.E., and R.A. Conover. 1981a. Effect of sex type, seasonal and other factors on in vitro establishment and culture of Carica papaya L. explants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106: 792-794.
- Litz, R.E., and R.A. Conover. 1981b. In vitro polyembryony in Carica papaya L. ovules. *Z. Pflanzenphysiol.* 104: 285-288.
- Litz, R.E., and R.A. Conover. 1982. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration from Carica papaya L. ovular callus. *Plant Sci. Lett.* 26: 253-258.
- Litz, R.E., and R.A. Conover. 1983. High frequency somatic embryogenesis from Carica suspension cultures. *Ann. Bot.* 51: 683-686.
- López, P.O. 1972. Identificación de las virosis de la lechosa (Carica papaya L.) en Venezuela. *Rev. Fac. Agron.* 6: 5-36.

- Magnusson, I. and C.H. Bornman. 1985. Anatomical observations on somatic embryogenesis from scutellar tissue of immature zygotic embryos of Triticum aestivum. Physiol. Plant. 63: 137-145.
- Mandujano, B., R. 1979. Comparación de dos tipos locales de papaya (Carica papaya L.) con dos variedades de introducción en tres densidades de población. En: Memoria del Simposio: La Investigación y el Desarrollo Experimental en CONAFRUT durante 1978. CONAFRUT, México. pp. 154-168.
- Mandujano, B., R. 1980. Arrope del suelo en papaya "cera". En: Memoria del Simposio: La Investigación y el Desarrollo Experimental en CONAFRUT durante 1979. CONAFRUT, México. pp. 1076-1085.
- Mann, J.D., and W.B. Storey. 1966. Rapid action of Carbamate herbicides upon plant cell nuclei. Cytologia. 31: 203-207.
- Marín, A. J.C. 1969. Insectos relacionados con la lechosa Carica papaya L. en Venezuela. Agron. Trop. Vol. 19 (4): 251-267.
- Martorell, L.F. 1952. Insects associated with papaya virus diseases in the Antilles and Florida. Jour. Econ. Entomol. 45(5): 863-868.
- Mosqueda, V.R. 1973. Análisis de formas sexuales, correlación y componentes de rendimiento usando coeficientes de sendero en una población de Carica papaya L. de la parte central de Veracruz. Tesis de Maestría en Ciencias. Escuela Nacional de Agricultura-Colegio de Postgraduados, Chapingo, Méx. pp. 81.

- Murashige, T. 1979. Plant tissue culture and its importance to agriculture. In: Practical Tissue Culture Applications. Maramoroch, K. and Hirumi, H. (eds.). Academic Press. New York. London, Toronto, Sidney. pp. 27-44.
- Nadar, H.M., S. Soeprapto, D.J. Jeinz, and S.L. Ladd. 1978. Fine structure of sugarcane (Saccharum sp) callus and the role of auxin in embryogenesis. Crop Sci. 18: 210-216.
- Norstog, K. 1979. Embryo culture as a tool in the study of comparative and developmental morphology. in: Plant cell and Tissue culture. Principles and applications. Sharp, W.R., Larsen, P.O., Paddock, E.F. and Raghavan, V. (eds.). Ohio State University Press. Columbus. pp. 179-202.
- Norstog, K. 1970. Induction of embryo-like structure by kinetin in cultured barley embryos. Dev. Biol. 23: 665-670.
- Ochoa de Fisher, M. y J. Alonso. 1974-75. Mancha anular de la papaya Carica papaya L. En: Avances en la Enseñanza y en la Investigación 1974-1975. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. pp. 90.
- Ochoa de Fisher, M. y J. Alonso. 1976. Virosis de la papaya en México. En: Avances en la Enseñanza y la Investigación 1975-1976. C.P. Chapingo, México. 100-101.
- Ozias-Akins, P., and I.K. Vasil. 1983a. Callus induction and growth from the mature embryo of Triticum aestivum (wheat). Protoplasma. 115: 104-113.

- Ozias-Akins, P., and I.K. Vasil. 1983b. Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in Triticum aestivum. Protoplasma. 117: 40-44.
- Pence, V.C., P.M. Hasegawa, and J. Janick. 1981. Sucrose-mediated regulation of fatty acid composition in asexual embryos of Theobroma cacao. Physiol. Plant. 53: 378-384.
- Phillips, G.C., G.B. Collins. 1980. Somatic embryogenesis from cell suspension cultures of red clover. Crop. Sci. 20: 323-326.
- Pierson, E.S., and A.M. Lameren A.; J.H.N. Schel and G. Staritsky. 1983. In vitro development embryos from punched leaf discs of Coffea canephora. Protoplasma. 115: 208-216.
- Posdena, C.I. 1968. Estudio de las enfermedades virosas de la fruta bomba (Carica papaya L.) en Cuba. Rev. de Agric. 2(1): 9-107.
- Rangel, C.A. 1977. Anteproyecto para la creación de una industria para el beneficio de la papaya. En: Memoria del II Congreso Nacional de Fruticultura. CONAFRUT, México. 417-425.
- Rashid, A., and J. Reinert. 1981. Selection of embryogenic pollen from cold treated buds of Nicotiana tabacum var. Badisher Burley and their development into embryos in culture. Protoplasma. 105: 161-167.
- Rashid, A., and J. Reinert. 1981. In vitro differentiation of embryogenic pollen, control by cold treatment and embryo formation in Ab inition pollen cultures of Nicotiana tabacum var. Badischer Burley. Protoplasma. 109:285-287.

- Rashid, A., A.W. Siddiqui, and J. Reinert. 1981. Ultrastructures of embryogenic pollen of Nicotiana tabacum var. Badischer Burley. Protoplasma. 107: 375-385.
- Ryczkowski, M. 1980. Physico-biochemical and physiological gradients in the ovule during embryogenesis. Bull. Soc. Bot. Fr. 127. Actual Bot. 3 y 4: 51-58.
- Sánchez de Luque y L.G. Martínez. 1976. Reconocimiento del virus de la mancha anular de la papaya (Carica papaya L.) en Colombia. Rev. ICA-Bogotá (Colombia). Vol. 11 (3): 205-220.
- Santos, A. V.P., E.G. Cutter, and M.R. Davey. 1983. Origin and development of somatic embryos in Medicago sativa L. Protoplasma. 117: 107-115.
- SARH-DGEA. 1981. Anuario Estadístico. Producción Agrícola Nacional.
- SARH-DGEA. 1983. Econotecnia Agrícola. Vol. 7 (9): 95.
- Sharp, W.R., M.R. Sondahl, L.S. Caldas, and V. Marakfas. 1980. The physiology of in vitro asexual embryogenesis, the mitotic cell cycle and embryo determination. Hort. Rev. 2: 290-296.
- Shimada, T. 1978. Plant regeneration from the callus induced from wheat embryo. Japan J. Genet. 53: 371-374.
- Shimada, T. and Y. Yamada. 1979. Wheat plants regeneration from embryo cell cultures. Japan J. Genet. 54: 379-385.

- Solano, A.I. 1975. Plagas y enfermedades del papayo. FIRA, Banco de México. México. pp. 27-35.
- S.P.P. 1978. Consumos Aparentes de Productos Agrícolas, p. 115.
- Street, H.E. 1976. Experimental embryogenesis - The totipotency of cultured plant cells. In: The Developmental biology of Plants and Animals. Graham, C.F. and Wareing, P.F. (eds.). W.B. Sanders Company. Toronto. pp. 73-89.
- Tazawa, M., and J. Reinert. 1969. Extracellular and intracellular environments in relation to embryogenesis in vitro. *Protoplasma*. 68: 157-163.
- Thomas, E.; R.N. Konar, and H.E. Street. 1972. The fine structure of the embryogenic callus of Ranunculus aceleratus L. *Jour. of Cell Sci.* 11: 95-109.
- Tisserat, B., and T. Murashige. 1977. Effects of ethephon, ethylene and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on asexual embryogenesis in vitro. *Plant Physiol.* 60: 437-439.
- Tisserat, B.; E.B. Esan, and T. Murashige. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1: 1-78.
- Tisserat, B., and T. Murashige. 1977. Probably identity of substances that repress asexual embryogenesis. In Vitro. 13: 785-789.
- Tyagi, A.K., A. Rashid, and E. C.I. Maheshwari. 1979. High frequency production of embryos in Datura innoxia from isolated pollen grains by combined cold treatment and serial cultures of anthers in liquid medium. *Protoplasma*. 99: 11-17.

- Tyagi, A.K., A. Rashid, and S. C.I. Maheshwari. 1981. Promotive effect of polybinylpolypyrrolidone on pollen embryogenesis in Datura innoxia. *Physiol. Plant.* 53: 405-406.
- Vasil, I.K., and V. Vasil. 1980. Clonal propagation. *Int. Rev. of Cyt. Suppl.* 11A: 145-173.
- Vasil, K.K., and V. Vasil. 1972. Totipotency and embryogenesis in plant cell and tissue cultures. *In Vitro.* 8: 117-125.
- Wareing, P.F., and C.F. Graham. 1976. Nucleus and cytoplasm. In: *The Developmental Biology of Plants and Animals*. Graham, C.F. and Wareing, P.F. (eds.). W.B. Sanders Company. Philadelphia. Toronto. pp. 3-13.
- Wetherell, D.F., and Dougall, D.R. 1976. Source of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.* 37: 97-103.
- Wicart, G., A. Mouras, y A. Lutz. 1984. Histological study of organogenesis and embryogenesis in Cyclamen persicum Mill tissue culture: evidence for a single organogenic pattern. *Protoplasma.* 119:159-167.
- Yie, S.T. e I. Liaw. 1977. Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. *In Vitro.* 13: 564-568.
- Zbell, B. 1980. Biochemical aspects of embryogenesis in vitro. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 127. *Actual Bot.* 3 y 4: 87-91.
- Zee, S.Y. 1981. Studies on adventive embryo formation in the petiole explants of coriander (Coriandrum sativum). *Protoplasma.* 107: 21-26.

FE DE ERRATAS

IX Dice El, Debe decir En.

Pág. 4 Dice se han manifestado, Debe decir se ha manifestado.

Pág. 7 Dice SARH-INIA, Debe decir INIA.

Pág. 10 Dice Para 1982, Debe decir Para 1972.

Pág. 35 Faltó subrayar el nombre científico Brachycome lineariloba

Pág. 39 Dice Ranuncylos, Debe decir Ranunculus

Pág. 55 Dice células dediferenciadas, Debe decir células desdiferen
ciadas.

Pág. 56 Dice agregado embriónico, Debe decir agregado embriogénico.

Pág. 65 Dice Ncl, Debe decir Hcl.

Pág. 74 Dice desidferenciarse, Debe decir desdiferenciarse.

Pág. 84 Dice Zhell, 1980, Debe decir Zbell, 1980.

Pág. 88 Dice selección de estudios, Debe decir selección o estudios.