

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

"Efecto del ácido α -naftalenacético (ANA) y
6-furfurilaminopurina (K) en el cultivo in
vitro de diferentes explantes provenientes
de plántulas de Eucalyptus cinerea F.v.Muell."

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

presenta

José Angel Lechuga Corchado

México, D.F., 1988



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.

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| I. INTRODUCCION..... | 2 |
| II. ANTECEDENTES..... | 4 |
| 1. Reguladores del crecimiento vegetal..... | 4 |
| 1.1 Generalidades..... | 5 |
| 1.2 Auxinas..... | 5 |
| 1.3 Citocininas..... | 6 |
| 2. Cultivo de tejidos vegetales..... | 7 |
| 2.1 Concepto..... | 7 |
| 2.2 Cultivo de tejidos en especies del género Eucalyptus..... | 9 |
| III. MATERIALES Y METODOS..... | 18 |
| 1. Especie estudiada..... | 18 |
| 2. Material biológico..... | 19 |
| 3. Medio nutritivo..... | 19 |
| 4. Siembra del material en el medio de cultivo.... | 19 |
| 4.1 Semillas..... | 19 |
| 4.2 Disección y obtención de explantes..... | 19 |
| 5. Fitorreguladores..... | 20 |
| 6. Evaluación de los cultivos..... | 20 |
| IV. RESULTADOS..... | 26 |
| V. DISCUSION..... | 43 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 49 |
| VII. BIBLIOGRAFIA..... | 51 |

RESUMEN.

Empleando ápices aislados, segmentos de raíz, hipocótilo y cotiledón de Eucalyptus cinerea F. v. Muell. bajo condiciones in vitro se estudió el efecto del ácido α -naftalenacético (ANA) y la 6-furfurilaminopurina (K) en la formación de callos y su proliferación. Se encontró que la formación de callos depende de la presencia y concentración de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo y que los diferentes explantes muestran distinta sensibilidad ante el efecto inductor de callo. La proliferación del tejido estuvo influenciada por los fitorreguladores e igualmente los diferentes explantes exhibieron patrones de crecimiento particulares. Bajo las condiciones de cultivo el ápice tuvo un crecimiento desviado del patrón normal de la plántula de E. cinerea.

I. INTRODUCCION.

Los eucaliptos son plantas originarias de Australia y tienen la capacidad de desarrollarse y crecer en lugares donde las condiciones ambientales son adversas, por esta razón han sido ampliamente utilizados en México con fines de reforestación lo que puede conducir a daños ecológicos considerables pues las sustancias volátiles y solubles que producen inhiben el desarrollo de otros vegetales (Jiménez, 1983). Por otro lado, los eucaliptos son árboles de importancia económica en algunas partes del mundo entre las que se cuentan Australia, España, Brasil y el sureste asiático, tal importancia radica en que proveen de aceites esenciales obtenidos por la destilación del follaje, útiles como saborizantes en dentífricos, en medicina y para la síntesis de mentol u otras esencias (Janik et al., 1974; Schery, 1952).

Ante el aumento en los costos y la escasez de combustibles fósiles la producción de biomasa forestal puede presentarse como una alternativa viable, se estima que la demanda de madera para leña en India es de 150×10^4 ton. actualmente se obtienen 130×10^4 ton. provenientes de tierras cultivadas y no cultivadas y de especies de árboles de rápido crecimiento, pertenecientes a los géneros Eucalyptus, Acacia, Prosopis, entre otros (Khuspe et al., 1987); en los países del Tercer Mundo la leña y el carbón representan el 90% de la energía disponible para millones de seres humanos de las zonas rurales. Sobre el uso de la leña y el carbón en México es poco lo que se sabe pero se piensa que son parte esencial del consumo global de energéticos (Gómez-Pompa, 1985).

Como vemos, las especies forestales con interés particular en las del género Eucalyptus, son fuente de materias primas para la industria química y afines, como fuente de energéticos representan un recurso importante (Khuspe et al., 1987; Lakshmi Sita, 1982). En la actualidad las necesidades de productos forestales son muy grandes, se ha calculado que los habitantes de Estados Unidos tienen el mayor consumo per cápita de madera a nivel mundial con aproximadamente 204 pies tabla (volumen de un cuadrado de madera de 30.4 cm^2 y 2.5 cm de grosor) por habitante (Owen, 1984).

Así pues, es necesario contar con plantaciones forestales formadas por individuos que posean las características para cubrir las necesidades mundiales presentes y futuras de productos forestales. Se deberán tener entonces, plantaciones con individuos de crecimiento rápido o de ciclo corto y aplicar sistemas que permitan la propagación masiva de aquellos individuos que manifiesten las características deseadas: madera de buena calidad, troncos uniformes, rápido crecimiento, ciclo corto, alto rendimiento del tronco con relación a

la biomasa, resistencia a enfermedades y plagas, capacidad fisiológica de aclimatación, facilidad de prácticas silvícolas y capacidad de fijación de nitrógeno (Villalobos et al., 1983).

La clonación de individuos destacados y el mejoramiento genético son alternativas para lograr las características antes mencionadas. Los métodos de propagación clonal en especies arbóreas son semejantes a las empleadas en agricultura y horticultura, prácticas como el injerto, enraizamiento de estacas y acodo no se han modificado en siglos y presentan la desventaja de que las respuestas observadas dependen del estado fisiológico de la planta donadora por ejemplo, el comportamiento de las estacas que se quiere enraizar tiene que ver con la edad del árbol, su vigor, la posición de la estaca en el árbol y la estación del año en la que es cortada, el tiempo de almacenamiento es otro factor a tomar en cuenta.

Los programas de mejoramiento tradicional son a largo plazo y requieren de grandes extensiones de terreno para probar los genotipos seleccionados. Desde la siembra de la semilla hasta la siguiente generación se requieren tiempos de hasta 15 o 20 años, lo cual representa uno de los mayores obstáculos para el mejoramiento genético tradicional o convencional.

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales abren una nueva dimensión para la propagación clonal y el mejoramiento genético de las especies arbóreas. Revisiones sobre la propagación vegetativa de árboles por cultivo de tejidos han sido realizadas por Konar y Nagmani (1974), Bonga (1977) y Winton (1978). Algunas de las especies de las cuales se han regenerado plantas completas a partir de cultivos de células, tejidos u órganos pertenecen a los géneros Araucaria, Picea, Pinus, Cryptomeria, Pseudotsuga, Sequoia, Thuja, Tsuga, Acacia, Betula, Eucalyptus, Hevea, Liquidambar, Populus, Santalum, Ulmus, entre otros. La regeneración de plantas in vitro para la multiplicación vegetativa puede ocurrir por dos caminos, la organogénesis y la embriogénesis somática, con la formación previa o no de un callo (Tisserat, 1985).

El potencial de mejoramiento genético en las especies forestales via cultivo de tejidos vegetales ha sido expuesto por Karnosky (1981), Lakshmi Sita et al. (1982) y Villalobos et al. (1983). Las estrategias para el fitomejoramiento son el cultivo de haploides, el aislamiento y fusión de protoplastos, la mutagénesis, la embriogénesis somática y el manejo del ADN.

Aunque se han realizado importantes avances en la micropropagación de plantas leñosas (en menor escala que para las especies no leñosas), y el mejoramiento genético por cultivo de tejidos es una posibilidad cierta, existen muchos fenómenos biológicos involucrados todavía no resueltos especialmente en lo que se refiere a la

diferenciación y desdiferenciación celular en sus aspectos genético, bioquímico y fisiológico, principalmente, una vez que se hayan resuelto se podrán a su vez resolver los problemas presentes en la propagación masiva de los individuos sobresalientes, de los cuales el principal ha sido la baja capacidad organogénica de los tejidos maduros, que provienen de las plantas que han mostrado su potencial genético (Villalobos, 1985).

El proceso de la desdiferenciación, que conduce a la formación de un callo (masa de tejido proliferativo que consiste predominantemente de células parenquimatosas), es inducido por un cambio en el ambiente químico de las células del explante, tal cambio puede ser debido a heridas y/o a la adición de sustancias estimuladoras del crecimiento, siendo esto último el factor más importante en la inducción y mantenimiento del callo. La inducción de la división celular va acompañada por una transformación en su estructura, dicho cambio refleja modificaciones metabólicas que involucran: lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y proteínas. La mayor parte de las investigaciones sobre las transformaciones metabólicas ocurridas durante la inducción del callo han estado relacionadas con ARN, ADN y proteínas y restringidas a pocos tejidos (Yeoman y Forche, 1980; Yeoman y McLeod, 1977).

Hay evidencias que indican que la diferenciación celular en cultivo de tejidos es inducida por diversos factores nutricionales, ambientales y particularmente por los reguladores del crecimiento. El conocimiento acerca del mecanismo de inducción y control del proceso es escaso y en su mayoría empírico. El cambio de concentración de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo es el factor que más se reconoce como iniciador de la división celular, sin embargo se carece de conocimientos acerca de su concentración endógena en los tejidos. Tampoco se entiende el mecanismo por el cual se producen las alteraciones metabólicas que conducen a la embriogénesis o a la organogénesis (Sánchez, 1985).

El objetivo del presente estudio es determinar los efectos que sobre diferentes tipos de explante, tomados de plántulas de Eucalyptus cinerea, ejercen el ácido α -naftalenacético (ANA) y la 6-furfurilaminopurina (K), presentes en el medio de cultivo, particularmente en lo que se refiere a la formación y crecimiento de los callos y al crecimiento y desarrollo de los ápices aislados.

II. ANTECEDENTES.

1. Reguladores del crecimiento vegetal.

1.1 Generalidades.

Se conoce como reguladores del crecimiento vegetal (RCV) a los compuestos orgánicos distintos de los nutrientes que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican cualquier proceso fisiológico en las plantas (Barba, 1987a). El crecimiento de las plantas es un proceso dinámico, complejo y rigurosamente controlado, en el cual los reguladores del crecimiento vegetal juegan un papel preponderante tanto en el organismo completo como en los niveles de órgano, tejido y célula (Wareing y Phillips, 1973). Es reconocido que la mayor parte de las actividades fisiológicas de las plantas a todos los niveles se desarrollan por influencia de los RCV, estas sustancias son activas a concentraciones muy pequeñas y ejercen sus efectos tanto en el lugar de síntesis como en otras partes de la planta (Bidwell, 1979), presentan un espectro de acción muy amplio y diverso. Se conocen promotores del crecimiento como: las auxinas, giberelinas y citocininas; inhibidores: ácido abscísico; y el etileno, al cual se le han asignado tanto actividades promotoras como inhibitorias (Bidwell, 1979).

En adelante se tratará solamente de las auxinas y citocininas ya que además de ser los grupos objeto de este estudio son los que más han sido estudiados en cultivo de tejidos.

1.2 Auxinas.

El ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina natural más frecuente en las plantas superiores, se sintetiza a partir del aminoácido triptófano. Otras auxinas naturales son el indolacetaldehído, el ácido indolpirúvico (AIP), el indolacetonitrilo (IAN) y el indoletanol, además existen compuestos sintéticos que presentan actividad auxínica (Fig. 1) (Rojas y Rovalo, 1985). La auxina se sintetiza en el meristemo apical caulinar, yemas y ápices de crecimiento de las hojas, de estas regiones meristemáticas es transportada en forma basípeta (Barba, 1987a). La polaridad del transporte se mantiene aún si el tallo es cortado y colocado de manera invertida (Bidwell, 1979). Las velocidades a las que son conducidas las auxinas son lo suficientemente altas como para que el principal proceso de desplazamiento sea la difusión, además, las auxinas se pueden mover en contra de un gradiente de concentraciones, por lo que se ha pensado que en su transporte interviene energía metabólica. El movimiento de las auxinas en la planta ocurre de 2 maneras: una depende de la energía metabólica y la otra se realiza por difusión simple. Devlin (1980) señala que el movimiento de las auxinas por difusión simple ocurre en condiciones anaerobias, mientras que Rojas y Rovalo (1985) plantean que en las plantas al principio de su desarrollo las auxinas se mueven con ese mecanismo y en las plantas desarrolladas es a través del floema junto con los productos de la fotosíntesis.

El transporte basipeto de la auxina es un hecho sumamente conocido, trae como consecuencia la formación de un gradiente de concentraciones desde el ápice del tallo hasta la raíz. Sus actividades incluyen tanto la estimulación como la inhibición del crecimiento y la misma célula o estructura puede exhibir respuestas diversas dependiendo de su concentración. Eventos que van desde las reacciones enzimáticas individuales hasta la división celular y formación de órganos, son estimulados o inhibidos por la auxina, sola o en conjunción con otros RCV. Así, sus efectos son diversos (Tabla 1), lo que constituye un problema de importancia relevante en fisiología vegetal, esto es, ¿de qué manera una molécula pequeña y relativamente simple tiene tantos efectos diferentes y cómo se coordinan todos ellos para conducir a un crecimiento y desarrollo ordenados? (Bidwell, 1979).

Para tratar de responder a la cuestión anterior muchos investigadores se han dirigido hacia la búsqueda de un efecto de control único. El lugar más lógico para buscar un efecto así es el nivel genético: el reprimir, desreprimir, seleccionar o modificar los diversos programas del desarrollo contenidos en el genoma de la célula, en otras palabras en el metabolismo de los ácidos nucleicos (Wareing y Phillips, 1973; Bidwell, 1979).

En efecto, desde 1953, año en que Skoog y sus col. observaron que el crecimiento, inducido por auxinas, de los tejidos en cultivo *in vitro* estaba asociado con un aumento en la síntesis de ARN y ADN, muchos trabajos se han realizado para estudiar la influencia de las auxinas en el metabolismo de los ácidos nucleicos (Bidwell, 1979). En los estudios de cultivo de tejidos que se realizaron posteriormente se comprobó que efectivamente en los tejidos tratados con auxinas se estimula la síntesis de ADN, ARN y las proteínas necesarias para la proliferación celular. Su influencia en la diferenciación, la cual requiere de expresión genética diferencial, sugiere que la "reacción maestra" se encuentra al nivel de la replicación y/o transcripción del genoma (Everett et al., 1978).

1.3 Citocininas.

La palabra citocinina se refiere a aquellas sustancias químicas que estimulan la división celular o citocinesis. La mayoría de las citocininas conocidas, naturales y sintéticas, son derivados de la adenina (Fig. 2). Durante muchos años se sabía que sustancias de este tipo eran necesarias para la división celular en cultivos de tejidos u órganos pero hasta la década de los 50's se logró el aislamiento de un producto de degradación del ADN animal (esperma de arenque) con tal efecto, se trataba de la 6-furfurilaminopurina o kinetina. Un ejemplo de citocinina sintética es la 6-bencilaminopurina. Hasta ahora se ha podido aislar un pequeño número de citocininas naturales como la zeatina

del endospermo del maíz, Zea mays, al parecer se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal (Fig. 3).

Las citocininas tienen menor movilidad en las plantas que las auxinas, existe evidencia de que se forman en las raíces y se transportan a hojas y tallo (Bidwell, 1979), la síntesis natural no se conoce pero químicamente basta sustituir con ciertos grupos el N_4 de la adenina para conferirle actividad citocininica (Rojas y Rovalo, 1985). Además de estimular la división celular median un amplio rango de respuestas (Tabla 2).

Al igual que las auxinas, un aspecto muy relevante de su estudio han sido las investigaciones encaminadas a esclarecer su mecanismo de acción en el nivel genético. Hasta el momento no es conocida del todo bien su actividad fundamental, se piensa que se adhiere al ARN_+ y cuando esto sucede en determinados sitios, provoca el funcionamiento de ciertos codones controlando de esta manera la síntesis de algunas proteínas. Asimismo, se ha propuesto que afecta la síntesis de ADN (Skoog y Armstrong, 1970). La solución al problema del mecanismo de acción de las citocininas debe considerar su presencia en el ARN_+ así como el hecho de que se ha demostrado que facilitan e incrementan la síntesis de ARN y de las proteínas (Wareing y Phillips, 1973; Bidwell, 1979).

2. Cultivo de tejidos vegetales.

2.1 Concepto.

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es un término empleado para referirse a todos los tipos de cultivos asépticos posibles en las plantas, así tenemos que sobre un medio nutritivo apropiado y en condiciones asépticas podemos cultivar plántulas (cultivo de plántulas); órganos aislados como ápices de raíz, tallo, primordios foliares, yemas florales inmaduras o frutos inmaduros (cultivo de órganos); embriones maduros e inmaduros (cultivo de embriones); segmentos de órganos de tallo y hoja y de los tejidos derivados de su proliferación (cultivo de tejidos o cultivo de callos); de células aisladas o pequeños agregados celulares creciendo en medio líquido (cultivo de células en suspensión) y de estructuras haploides (cultivo de anteras y polen) (Street, 1977). Otra modalidad del cultivo de tejidos vegetales es el cultivo de protoplastos, esto es, la obtención y mantenimiento en cultivo de células vegetales desprovistas de su pared celular (Evans y Cocking, 1977; Barba, 1987b).

El CTV ha sido empleado con éxito en las investigaciones de fisiología vegetal (Street, 1977), bioquímica, genética y en las investigaciones sobre los procesos de diferenciación celular y tisular (Sánchez,

1985). Lo anterior se debe a que el CTV hace posible disponer de sistemas experimentales reproducibles y cuantificables, lo que simplifica la experimentación en biología vegetal.

En un sentido más práctico el CTV tiene diversas aplicaciones: preservación de germoplasma; propagación masiva y clonal de especies de alto valor económico, de lenta o deficiente propagación en condiciones naturales o en peligro de extinción; producción de metabolitos secundarios; obtención de plantas libres de patógenos y el mejoramiento genético (Robert, 1985; Robert y Loyola, 1985).

El primer fuerte impulso que tuvo el cultivo de tejidos se dió en 1902 cuando el fisiólogo alemán G. Haberlandt formuló específicamente el concepto de cultivo de tejidos y realizó los primeros experimentos con cultivos de tejidos de plantas, a su vez, introduce el concepto de totipotencialidad celular, esto es, que las células en cultivo son capaces de recapitular las secuencias del desarrollo vegetal (White, 1943).

Entre los primeros aspectos estudiados se encuentran los requerimientos nutricionales que favorecen el crecimiento en cultivo de las células vegetales. Sacks y Knops en 1861 (citados por White, 1943), observaron que las plantas requieren de sustancias inorgánicas para su nutrición, ellos elaboraron una solución nutritiva cuya formulación sigue siendo empleada hasta nuestros días (Navarro y Vera, 1987). Investigaciones posteriores incluyeron sustancias orgánicas como vitaminas del complejo B y AIA, descubierto en 1937 por Went y Thiman (citado por Navarro y Vera, 1987), siendo White en Estados Unidos y Nobécourt y Gautheret en Francia los primeros en reportar un crecimiento indefinido de callosidades de raíz (White, 1943; Navarro y Vera, 1987).

El descubrimiento de la 6-furfurilaminopurina (kinetina) se realizó en 1956 por Miller, Skoog, Okamura, Saltz y Strong (Street, 1977). Anteriormente para obtener actividad citocinínica se empleaban suplementos orgánicos de composición compleja como el agua de coco (actualmente se sigue usando aunque su empleo no se recomienda por su variada composición química según el estado fisiológico de la planta de la cual proviene el coco), los primeros en emplearla fueron Oberveek, Conklin y Blakeslee para el cultivo de embriones de *Datura* (White, 1943).

En 1957 Skoog y Miller postulan que el mecanismo regulador básico de los eventos organogénicos en CTV es el balance auxina-citocinina, de tal manera que la formación de raíces ocurre con un decremento en la concentración de citocinina mientras que su aumento en relación a la auxina induce la formación de brotes (Navarro y Vera, 1987). Las investigaciones subsecuentes permitieron tener un mayor conocimiento acerca de los

factores que controlan el crecimiento y desarrollo de las células vegetales (Steward, 1963).

Estos trabajos fueron algunos de los que permitieron ilustrar las condiciones para el crecimiento ilimitado de las células vegetales a partir de tejidos diferenciados en el cual ocurre el proceso conocido como dediferenciación que conduce a la constitución de una masa de células indiferenciadas (callo). También ilustran sobre algunos de los mecanismos involucrados en los procesos de diferenciación celular y formación de órganos, asimismo apoyan fuertemente la idea de Haberlandt acerca de la totipotencialidad celular. Finalmente muestran las posibilidades que brinda el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales como sistema experimental para el estudio de la biología vegetal.

2.2 Cultivo de tejidos en especies del género Eucalyptus.

El género Eucalyptus es un grupo en el que se realizan esfuerzos considerables en muchas partes del mundo para desarrollar técnicas de cultivo in vitro que faciliten una propagación clonal eficiente y procuren sistemas que permitan el mejoramiento genético. Aunque en la mayoría de los reportes se tiene como principal objetivo la micropropagación, tales trabajos aportan información fisiológica.

Bachelard y Stowe (1963), en Australia realizan estudios con el fin de determinar los requerimientos para el crecimiento in vitro de ápices radiculares de Acer rubrum y E. camaldulensis. En E. camaldulensis encontraron que un extracto de levadura (0.01%) es un inhibidor del crecimiento, el ANA (50 µg/l) no ejerce ningún efecto sobre el crecimiento mientras que el agua de coco (14%) lo estimula. El efecto del agua de coco se vió disminuido al ser combinada en el medio de cultivo con los otros 2 componentes. Apoyan la idea de que el agua de coco induce el crecimiento por la interacción de sustancias presentes en su composición, las cuales incluyen aminoácidos libres, una fracción inactiva "neutral" y una fracción activa que contiene sustancias promotoras del crecimiento.

Aneja y Atal (1969), en India realizaron investigaciones con el fin de propagar clonalmente a individuos de E. citriodora con una alta productividad de aceites esenciales. La propagación a partir de estacas no tuvo éxito, por lo que optaron por la técnica de cultivo de tejidos. Cultivaron tejidos del tallo principal, de lignotubérculos (lignotubers en la bibliografía) y del ápice de la raíz de semillas germinadas in vitro. En los cultivos de tallo y ápice de raíz se formó una masa de callo y solamente en el de raíz observaron la formación de raíces. A partir de los cultivos de lignotubérculos

obtuvieron también un callo, del cual se originaron brotes aéreos verdes de los que algunos formaron raíz. Finalmente, establecen que en un medio con la misma composición la habilidad para la formación de plántulas es inherente al tejido del cual proviene el callo y que la habilidad de los lignotubérculos de E. citriodora para la formación de plántulas in vitro ofrece un potencial explotable en el cultivo de clones de alta productividad.

Paton et al. (1970), en Australia determinan la existencia de un inhibidor del enraizamiento de estacas presente en las plantas adultas de E. grandis. Sugieren que el desarrollo ontogenético de E. grandis involucra una asociación directa y gradual entre la disminución en la capacidad del enraizamiento de las estacas y un incremento en los niveles del inhibidor. Ellos postulan que los pobres resultados obtenidos hasta el momento en el enraizamiento de estacas de Eucalyptus se debe a la presencia del inhibidor y que la completa inhibición ocurre cuando se toman estacas por arriba del nudo número 14 en E. grandis.

de Fossard et al. (1974), en Australia obtienen callos de E. bancroftii a partir del cultivo de tejidos de tallo y lignotubérculos, experimentan con 175 combinaciones de auxina/citocinina y con ninguna de ellas logran la rediferenciación de las células del callo. Realizan cultivos mezclados de callos de tabaco con callos de E. bancroftii, E. grandis, E. nicholli, E. melliodora y E. laevopinea con el fin de que la rediferenciación en tabaco dirigiera la formación de brotes en Eucalyptus, con el resultado de que en ninguno de los casos se obtuvo lo esperado. Por otro lado, realizaron el cultivo de explantes nodales provenientes de plántulas de E. grandis obtenidas in vitro, para disminuir la contaminación microbiana tan frecuente cuando se utilizan explantes de individuos que han crecido en el campo y para extrapolar los resultados obtenidos en plántulas a los árboles adultos. Mediante el cultivo de órganos nodales tomados de plantas de 7 meses de edad inducen el enraizamiento y la formación de plántulas en un medio de cultivo con AIB 5×10^{-6} M. Finalmente concluyen que los callos de lignotubérculo son probablemente los tejidos más promisorios para la rediferenciación, se debe continuar la investigación con material joven y con la exposición secuencial del tejido a diferentes medios de cultivo. Con respecto al cultivo de explantes nodales de E. grandis señalan que se han tenido avances considerables a partir de los trabajos hechos con plántulas, de esta manera se determinaron el medio y las condiciones de incubación adecuados para esta especie; los experimentos realizados por estos investigadores muestran que la micropropagación de E. grandis puede ser posible con el cultivo de explantes

nodales de plantas con más de 15 nudos. E. grandis no tiene lignotubérculos.

Cresswell y Nitsch (1975), en Francia logran la formación de plántulas a partir del cultivo de explantes nodales de E. grandis, utilizaron como explante nudos por arriba del número 14 el cual había sido establecido como límite para el enraizamiento. En la técnica que desarrollan, los explantes son sumergidos en agua destilada estéril durante 2 horas, al extraerlos el agua había adquirido una coloración amarillenta y el pH se modificó de 5.6 a 6.1, las autoras suponen que en esa agua se encontraba el inhibidor y por tal razón lograron la micropropagación partiendo de tejidos adultos, aunque no realizaron ninguna prueba que apoye su hipótesis.

Lakshmi Sita (1979), en India pudo realizar la micropropagación de E. citriodora por medio de la regeneración de brotes en callos de cotiledón y su posterior enraizamiento. En callos obtenidos del brote apical y de hojas de plantas de 1 año de edad no observa la formación de brotes o raíz. Determinó que el crecimiento del callo está influenciado por el tipo y concentración de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo y, por otro lado, los brotes diferenciados en el callo cotiledonar no provinieron de un meristemo preexistente. La diferenciación se llevó a cabo en el medio de cultivo suplementado con AIA (0.2 mg/l) y zeatina (1.0 mg/l) y el enraizamiento con AIA o AIB (1.0 mg/l). Este es el primer reporte sobre diferenciación de brotes de E. citriodora en cultivos de callos cotiledonares.

Bennett y McComb (1982), en Australia describen una técnica de micropropagación para la producción de líneas clonales de E. marginata a partir de tejidos de plántula, la cual está basada en la formación de brotes en callos de cotiledón con AIA (0.5 M), los brotes no se formaron en callos de peciolo. La información sobre el medio de cultivo y las condiciones adecuadas para la diferenciación de brotes la aplicaron a explantes provenientes de árboles maduros, de estambres obtuvieron callos y de ellos nuevos brotes. Un problema frecuente cuando se emplean tejidos maduros es el alto porcentaje de contaminación el cual fué abatido con el empleo de explantes de filamento de estambre. Los brotes obtenidos fueron llevados a un medio de enraizamiento, con una sobrevivencia mínima de 50%. El porcentaje de enraizamiento de los brotes de tejidos maduros fué bajo comparado con el de los provenientes de explantes de plántula. Desarrollaron una técnica basada en la aplicación de los resultados registrados en explantes de plántula a explantes tomados de plantas maduras, esto es de gran importancia porque el uso de explantes de árboles maduros puede tener un alto potencial en la clonación de individuos sobresalientes, además es el primer reporte de regeneración de brotes en callos de un tejido floral.

Oka et al. (1982) en Canadá, con segmentos de hipocotilo de E. globulus como explante obtienen la formación de brotes y raíz, con formación o no de callo. El desarrollo de los brotes fue mejor al transferirlos a un medio sin fitorreguladores. Hacen un examen histológico durante la formación del brote lo que reveló que la iniciación del proceso empieza con la división de las células epidérmicas y subepidérmicas, lo cual conduce a la formación de tejidos meristemoides, algunos de los cuales se desarrollaron en un brote foliar.

Diallo y Duhoux (1984), en Senegal cultivando explantes de plántulas de E. camaldulensis en un medio suplementado con ANA y BAP obtienen la formación de brotes por organogénesis. Se logró la multiplicación después del aislamiento y cultivo de los brotes originados sobre cotiledón. Por otro lado, los callos regeneraron brotes sin una transferencia previa a otro medio. La técnica descrita por los autores puede ser utilizada en el mejoramiento y clonación de plantas seleccionadas.

Damiano et al. (1986), en Italia realizaron microinjertos de E. gunnii colocando ápices de 2 a 3 mm sobre plántulas de 20 a 25 días a las cuales se les practicó una pequeña incisión. El injerto creció sobre el mismo medio.

Curir et al. (1986), en Italia obtienen in vitro 19 clones de E. stuartiana y 18 de E. gunnii, con el fin de probar sus velocidades de multiplicación. Los resultados mostraron que las velocidades difieren tanto entre las dos especies como dentro de ellas. Después de agregar KNO_3 al medio basal y con 2 subcultivos registran diferencias entre los clones, otro factor que influyó en tales diferencias fue la modificación en la concentración de sacarosa (0.0 - 40.0 g/l). Para ambas especies el porcentaje de enraizamiento estuvo entre 0.0 y 40.0%. Indican que los resultados se deben a una alta heterocigosis dentro de las especies.

McComb y Wroth (1986), en Australia logran propagar vegetativamente E. resinifera por 2 caminos, el primero fue el enraizamiento de estacas bajo condiciones de invernadero. La poda fue realizada entre septiembre y enero, el máximo de enraizamiento ocurrió en los meses de febrero y agosto, la mayor longitud de raíz se encontró en febrero. La habilidad mostrada por las estacas de E. resinifera para el enraizamiento disminuyó casi hasta cero después de 12 meses de hecha la poda; el segundo fue la micropropagación con explantes de plántula, lo cual no fue posible con los explantes de plantas maduras. Las estacas de E. maculata no producen raíz bajo condiciones de invernadero pero se micropropaga a través del enraizamiento in vitro. E. resinifera es una especie en la que el enraizamiento de estacas es frecuente, constituyendo una forma de propagación vegetativa, por otro lado la propagación in vitro solo es lograda con

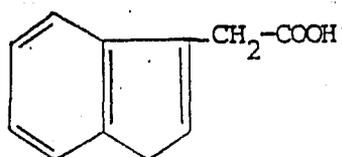
tejidos juveniles. E. maculata en cambio es propagada in vitro a partir de explantes de árboles maduros. Este trabajo muestra 2 técnicas para la clonación de individuos sobresalientes.

Muralidharan y Mascarenhas (1987), en India reportan la generación de plántulas por la formación de brotes adventicios en callos de explantes de hoja tomados de cultivos de vástagos de individuos seleccionados de E. camaldulensis. Los callos se formaron en la oscuridad sobre un medio con hidrolizado de caseína (1.0 g/l), ANA (3.0 mg/l), BA (0.1 mg/l) y sacarosa (5.0%), la formación de los brotes ocurrió al llevar los callos a la luz y a un medio con agua de coco (10.0%), BA (0.5 mg/l) y sacarosa (2.0%). Observaron en E. citriodora embriogénesis somática en cultivos de embriones cigóticos cuando se les mantuvo en la oscuridad sobre un medio suplementado con ANA (3.0 mg/l) y sacarosa (5.0%). en lo referente a organogénesis, los autores proponen una técnica que permite evitar el problema de la contaminación cuando se toman explantes de hoja y peciolo directamente del árbol donador, además de la presencia de exudados que provocan la muerte del tejido. Este trabajo es importante ya que contribuye a la micropropagación de individuos sobresalientes. Apoyan la idea de que la técnica más adecuada para la embriogénesis somática en las angiospermas leñosas debe estar basada en el cultivo de tejidos juveniles, tales como los embriones cigóticos. El reporte es una de las bases para la utilización de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales en la selección de variantes somacionales a nivel celular en especies del género Eucalyptus.

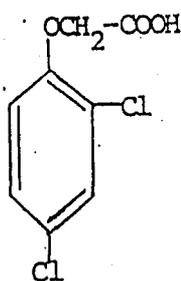
Burger (1987), en Estados Unidos logra la micropropagación de E. sideroxylon a través de la promoción y proliferación de brotes axilares en explantes nodales de individuos maduros bajo la influencia de BAP (2.0 - 4.0 M) y ANA (0.5 - 1.0 M). El AIB demostró ser más efectivo que el ANA para estimular la formación de raíces adventicias en los brotes a una concentración de 10.0 M.

Khuspe et al. (1987), en India estudió la producción de biomasa de plantas de E. tereticornis y E. torelliana obtenidas por cultivo de tejidos, las comparan con testigos que consistieron en plantas obtenidas por la germinación de semillas. El crecimiento de las plantas se realizó bajo 2 densidades de población. Los cultivos de tejidos fueron iniciados a partir de individuos seleccionados con una producción de biomasa 10 veces mayor que el promedio. Después de 34 meses de haber sido iniciadas las plantaciones la producción de biomasa fue mayor en las plantas provenientes del cultivo de tejidos y en las parcelas con mayor densidad de población (0.5 planta/m²). La característica mayor producción de biomasa de los individuos seleccionados es expresada en la descendencia formada por las plantas provenientes del

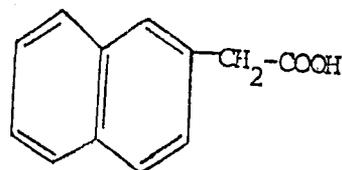
cultivo de tejidos, evidencia que apoya fuertemente la posibilidad de utilizar las técnicas de cultivo de tejidos vegetales para la propagación clonal de los mejores individuos.



(A)



(B)



(C)

Figura 1. Estructura de AIA y de 2 auxinas sintéticas (Rojas y Royalo, 1985). A: Acido indolacético (AIA); B: Acido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); C: Acido α -naftalenacético (ANA).

Tabla 1. Resumen de los efectos de las auxinas (Bidwell, 1979).

Formación de órganos (interactúa con citocininas)
Organización de tejidos (interactúa con citocininas)
División celular (interactúa con citocininas)
Alargamiento celular
Relajación de la pared celular
Síntesis de ARN y proteínas
Producción de etileno
Efectos enzimáticos
Respuestas trópicas y násticas
Dominancia apical
Prevención de la abscisión

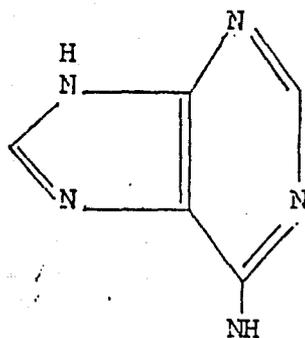


Figura 2. Adenina (Barba, 1987a).

Tabla 2. Resumen de los efectos de las citocininas (Bidwell, 1979).

| |
|---|
| Formación de órganos (interactúa con auxinas) |
| División celular |
| Alargamiento celular |
| Contrarresta el letargo |
| Liberación de la dominancia apical |
| Prevención de la senescencia |
| Movilización de los nutrientes |
| Regulación de los polirribosomas |

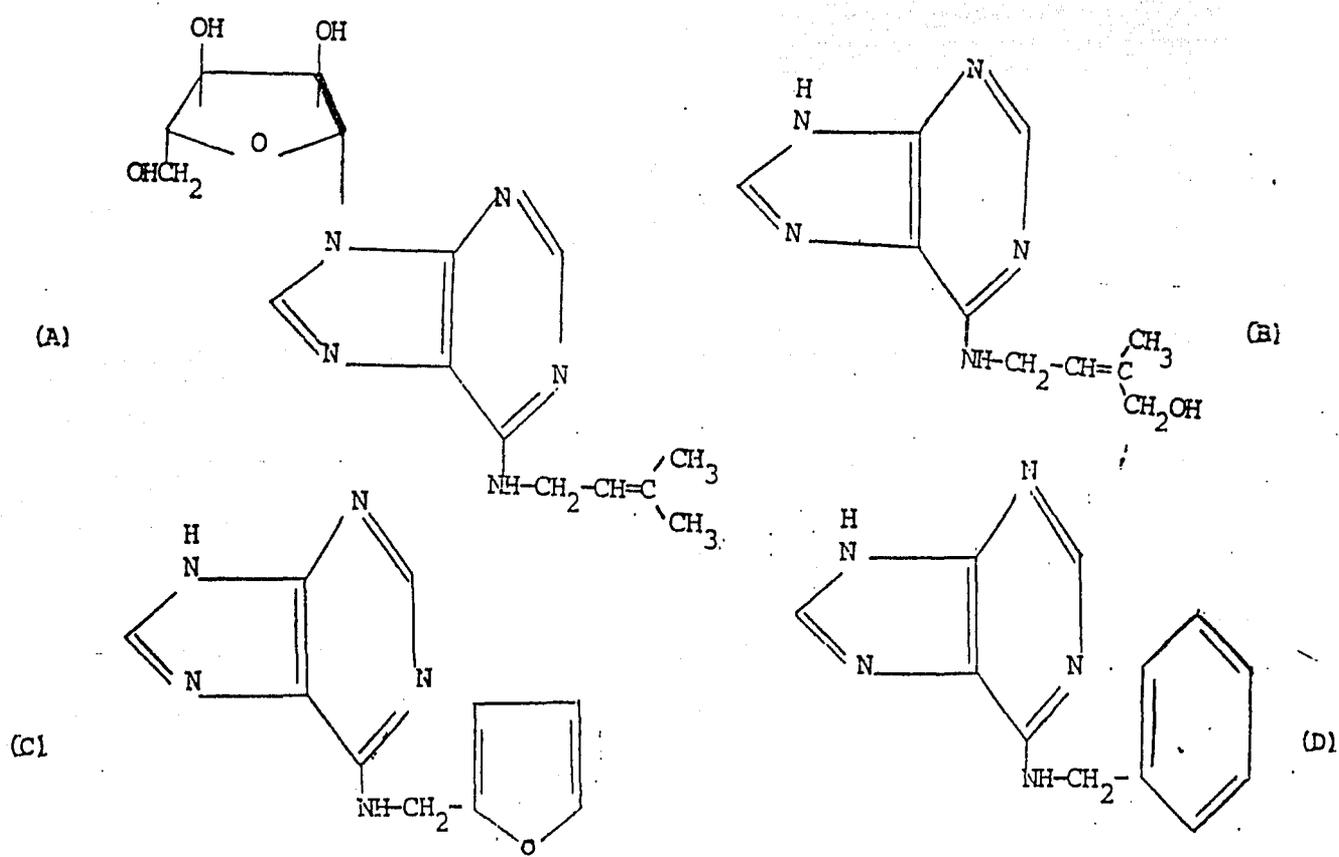


Figura 3. Citocininas naturales y sintéticas (Rojas y Rovalo, 1985). A: Isopentenil adenina (natural); B: Zeatina (natural); C: 6-furfurilaminopurina (sintética); D: Benciladenina (sintética).

III. MATERIALES Y METODOS.

1. Especie estudiada.

Posición taxonómica (Lawrence, 1951; Bold, 1957):

| | |
|--------------|--------------------------------|
| Reino: | Plantae |
| División: | Antophyta |
| Subdivisión: | Angiospermae |
| Clase: | Dicotyledonae |
| Subclase: | Cotyloideae |
| Superorden: | Apopetalae |
| Orden: | Myrtales |
| Suborden: | Myrtineae |
| Familia: | Myrtaceae |
| Subfamilia: | Leptospermoideae |
| Género: | <u>Eucalyptus</u> |
| Especie: | <u>E. cinerea</u> F. v. Muell. |

E. cinerea es un árbol pequeño, de corteza fibrosa y persistente, en la parte exterior presenta una coloración parduzca y canela en la parte interna. Las hojas son acovadas, subcordadas en la base, sésiles, opuestas, de 4 a 8 cm de largo, están cubiertas por una pruina plateada. Las nervaduras son muy notorias en la parte del haz, las secundarias divergen en ángulo de 45° o menor con respecto a la central; las terciarias están anastomosadas. Las flores son subsésiles o brevemente pediceladas y están dispuestas en umbelas axilares con 3 flores cada inflorescencia, sostenida por un pedúnculo a veces muy suavemente comprimido. El diámetro de los brotes florales es de 5 a 6 mm, con opérculo cónico, algo convexo y apiculado con el tubo del receptáculo obcónico tan largo como el opérculo; las anteras son ovoides con las tecas paralelas y una glándula en el tercio superior; todos los estambres son fértiles y se hallan doblados en el botón floral. Los frutos, turbinados, miden unos 8 mm de diámetro, con el reborde ancho separado del tubo del receptáculo por un pequeño canalículo; tienen 3 a 4 valvas triangulares, apenas exertas; las semillas son oscuras y rugosas (Bentham, 1866; Mangieri y Dimitri, 1871)

Es una especie afín a E. pulverulenta Sims, por otra parte es bastante cercano a E. cephalocarpa Blackely (sin. E. cinerea var. multiflora Maiden). E. cinerea es originario de la región montañosa de Nueva Gales del Sur y de Victoria, en Australia, desde los 33° a los 37° de latitud Sur, asociado con E. dives entre los 150 y 1100 m.s.n.m. Es uno de los eucaliptos que crecen mejor aún cuando se cultiva en condiciones poco favorables, en Argentina ha sido introducido para plantarse en parques y jardines y es cultivado con fines comerciales para la venta de sus ramas en florería (Mangieri y Dimitri, 1971); en México se le cultiva con el mismo fin en el

Municipio de Villa Guerrero, Edo. de México y se le da el nombre de "dolar", la propagación se realiza por medio de semillas por lo que la variabilidad genética dentro de las plantaciones es muy grande (Carmona, A., com. per.).

2. Material biológico

Se utilizó como fuente de explante plántulas de E. cinerea de 10 días de edad obtenidas a través de la germinación de semillas in vitro. Tales semillas fueron colectadas durante el mes de abril de 1987 en el Municipio de Villa Guerrero, Edo. de México.

3. Medio nutritivo.

Se empleó el medio nutritivo de Murashige y Skoog (1962), con 3.0% de sacarosa, 0.8% de agar y modificado en su composición de reguladores del crecimiento vegetal, el pH fue ajustado a 5.8 ± 0.005 con NaOH 1.0 N y HCl 1.0 N, todas las sustancias fueron grado reactivo (Tabla 3). Los recipientes de cultivo fueron frascos "gerber" cada uno con 20 ml de medio de cultivo, se cerraron con tapones de material plástico para ser por último esterilizados en autoclave a una presión de 1.0 kg/cm^2 y 121°C durante 15 a 20 minutos.

4. Siembra del material en los frascos de cultivo.

4.1 Semillas.

Las semillas fueron desinfestadas mediante el siguiente procedimiento: se sumergieron en alcohol etílico al 90% durante 10-15 segundos, posteriormente se lavaron agitando continuamente en cloro comercial (cloralex) al 1.0% durante 10 minutos, para eliminar el cloro se lavaron 3 veces en agua destilada esterilizada. Luego se colocaron sobre la superficie del medio de cultivo sin RCV. Todo lo anterior se hizo en una cámara de flujo laminar de aire. Los frascos de cultivo conteniendo a las semillas fueron llevados a una cámara de incubación y mantenidas bajo un fotoperíodo de 12 horas de luz con una intensidad luminosa de 400 pies candela y a una temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

4.2 Disección y obtención de explantes.

Una vez germinadas las semillas y a la edad de 10 días se procedió a la disección de las plántulas (Fig. 5), y a la siembra de los explantes en el medio de cultivo dentro de la campana de flujo laminar. Cada plántula fue extraída del frasco y sumergida en una solución de cloro comercial (cloralex) al 0.5% y enseguida lavada en agua destilada esterilizada. La disección fue sobre papel filtro esterilizado, de esta

manera se obtuvieron los ápices, segmentos de raíz, hipocótilo y cotiledón, con un peso fresco promedio de 1.1, 5.5, 2.8 y 4.2 mg respectivamente, estos explantes se colocaron horizontalmente sobre la superficie del medio de cultivo. Una vez inoculados los frascos se llevaron a la cámara de incubación. Fueron incubados bajo las mismas condiciones de fotoperiodo, intensidad luminosa y temperatura que las semillas. Los instrumentos de disección (pinzas y bisturíes) se mantuvieron sumergidos en alcohol etílico al 90% y fueron flameados en el mechero antes de cada manipulación, asimismo para disminuir el riesgo de contaminación microbiana se recurrió al uso de cofia, cubreboca y guantes de cirujano, tanto para la siembra de semillas como para la disección de las plántulas y siembra de los diferentes explantes. Por otro lado se mantuvieron en incubación algunos cultivos de plántulas obtenidas por la germinación de semillas in vitro.

5. Fitorreguladores.

El estudio de los efectos de las auxinas y citocininas en el cultivo in vitro de los explantes de plántulas de E. cinerea se realizó mediante el empleo de la auxina ácido α -naftalenacético (ANA) y la citocinina 6-furfurilaminopurina (kinetina, K). Los diferentes tratamientos de RCV se aplicaron en experimentos donde la concentración de K se mantuvo constante y el ANA se administró en concentraciones variables, así se tuvieron las combinaciones de auxina/citocinina que se muestran en la tabla 4. Todos los tratamientos se aplicaron por igual a los explantes estudiados, teniéndose un mínimo de 4 repeticiones por tratamiento y por explante. Se revisó a las 3 semanas para observar contaminación microbiana y a las 8 semanas para la evaluación de los cultivos.

6. Evaluación de los cultivos.

Para evaluar la inducción de callo (desdiferenciación) se consideró el porcentaje de explantes de raíz, hipocótilo, cotiledón y ápice que lo desarrollaron en relación al número total de explantes sembrado en cada uno de los tratamientos, corroborando su significancia con el empleo de la prueba estadística χ^2 , cuyo modelo es (Daniel, 1982; Mendenhall et al., 1986):

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

donde:

O_i = frecuencia observada en el i -ésimo tratamiento

E_i = frecuencia esperada en el i -ésimo tratamiento

k = número de tratamientos

Las hipótesis de la prueba fueron:

H_0 : Las respuestas observadas se deben únicamente al azar

H_A : Las respuestas observadas se deben al efecto de tratamiento

El criterio para emplear χ^2 fue que la respuesta "porcentaje de inducción de callo" se comporta como una variable discreta ya que en cada tratamiento existieron sólo 2 posibilidades, formación o no de callo, por lo tanto el parámetro considerado en la realización de la prueba fue la proporción muestral.

La proliferación de los explantes se evaluó midiendo su peso fresco y seco en todos los tratamientos a las 8 semanas de cultivo. Con el fin de determinar la significancia entre los diferentes efectos de tratamiento en las respuestas medidas se aplicó la técnica estadística del análisis de varianza para un diseño completamente aleatorizado (Daniel, 1982; Mendenhall et al., 1986; Vera, 1987):

$$Y_{ij} = \mu + \tau_j + e_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = i -ésima observación en el j -ésimo tratamiento

μ = media del grupo

τ_j = j -ésimo tratamiento

e_{ij} = error en la i -ésima observación del j -ésimo tratamiento

Se consideró la siguiente prueba de hipótesis:

H_0 : Los tratamientos tienen el mismo efecto

H_A : Existen al menos dos tratamientos con efectos diferentes

En los casos en que el análisis de varianza mostró la existencia de diferencias significativas entre los efectos de tratamiento se realizó una prueba de comparaciones múltiples, la cual fue la prueba de Fisher o diferencia mínima significativa (DMS o LSD, por sus siglas en inglés) (Daniel, 1982; Mendenhall et al., 1986; Vera, 1987).

El crecimiento y desarrollo de los ápices se evaluó además considerando el aumento en la longitud del eje principal y en el número de hojas por ápice mantenido en cultivo. La significancia se determinó igualmente con el análisis de varianza y la prueba DMS. Con fines de comparación del crecimiento y desarrollo del ápice se

evaluó el peso fresco, peso seco, longitud del eje principal y número de hojas en los cultivos de plántulas que se mantuvieron en cultivo sin RCV, ya que éstas al igual que los ápices portan al meristemo apical caulinar. La medición en las plántulas de las características enumeradas fué a partir del nudo cotiledonar. Se aplicó el mismo análisis estadístico.

Para todas la pruebas estadísticas se usó un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

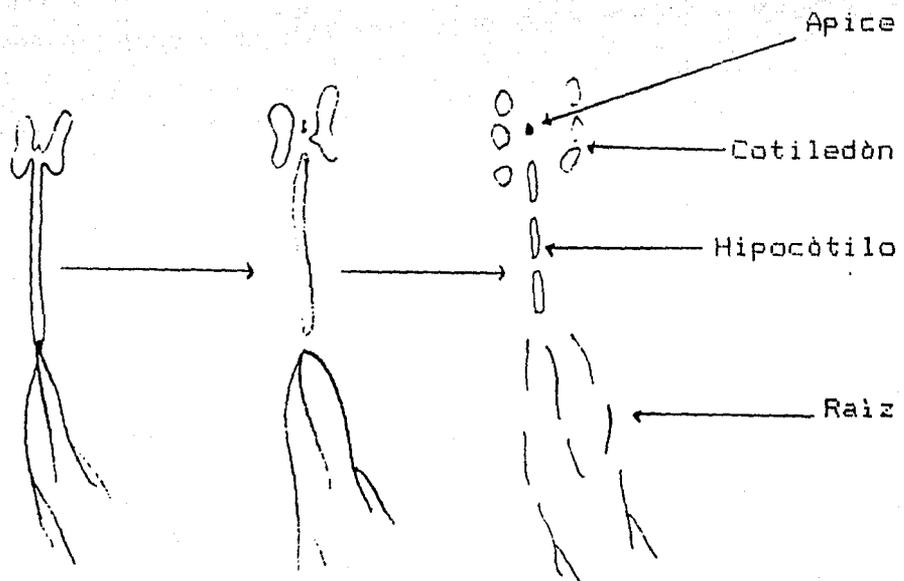


Figura 4. Esquema que muestra la disección de la plántula de *E. cinerea* y los tipos de explante obtenidos.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo (Murashige y Skoog, 1962).

| MACRONUTRIENTES (mg/l) | |
|---|-----------------|
| NH ₄ NO ₃ | 1650.0 |
| KNO ₃ | 1900.0 |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 440.0 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 370.0 |
| KH ₂ PO ₄ | 170.0 |
| Na ₂ EDTA | 37.3 |
| FeSO ₄ 7H ₂ O | 27.8 |
| MICRONUTRIENTES (mg/l) | |
| H ₃ BO ₃ | 6.2 |
| MnSO ₄ 4H ₂ O | 22.3 |
| ZnSO ₄ 7H ₂ O | 8.6 |
| KI | 0.83 |
| Na ₂ MoO ₄ H ₂ O | 0.25 |
| CuSO ₄ 5H ₂ O | 0.025 |
| CoCl ₂ 6H ₂ O | 0.025 |
| CONSTITUYENTES ORGANICOS | |
| Glicina | 2.0 mg/l |
| mio-inositol | 100.0 mg/l |
| Acido nicotínico | 0.5 mg/l |
| Piridoxina-HCl | 0.5 mg/l |
| Tiamina-HCl | 0.1 mg/l |
| Sacarosa | 30.0 g/l (3.0%) |
| Agar | 8.0 g/l (0.8%) |

Tabla 4. Combinaciones de ANA y K. La letra entre paréntesis indica la denominación del tratamiento.

| REGULADORES DEL CRECIMIENTO | CONCENTRACION (mg/l) | | | | |
|--------------------------------|----------------------|------------|------------|------------|------------|
| ANA | 0.0 | 0.1 | 1.0 | 2.0 | 5.0 |
| K | 0.0 (a) | 0.0 (b) | 0.0 (c) | 0.0 (d) | 0.0 (e) |
| ANA | 0.0 | 0.1 | 1.0 | 2.0 | 5.0 |
| K | 0.1 (f) | 0.1 (g) | 0.1 (h) | 0.1 (i) | 0.1 (j) |
| ANA | 0.0 | 0.1 | 1.0 | 2.0 | 5.0 |
| K | 1.0 (k) | 1.0 (l) | 1.0 (m) | 1.0 (n) | 1.0 (o) |
| ANA | 0.0 | 0.1 | 1.0 | 2.0 | 5.0 |
| K | 2.0 (p) | 2.0 (q) | 2.0 (r) | 2.0 (s) | 2.0 (t) |
| ANA | 0.0 | 0.1 | 1.0 | 2.0 | 5.0 |
| K | 5.0 (u) | 5.0 (v) | 5.0 (w) | 5.0 (x) | 5.0 (y) |

IV. RESULTADOS.

El callo apareció entre las 2 a 3 semanas de cultivo. La formación de callo inducida por ANA y K en los 4 explantes estudiados se encuentra registrada en las figuras 5 a 8. En el caso de la raíz y del ápice no se presentó la dediferenciación siempre que la auxina estuvo ausente, lo mismo ocurrió en los tratamientos b, c, l, m, & q en raíz, a, f, k, & u en hipocótilo, a, b, f, g, k, & l en cotiledón y a, b, f, g, k, l, m, p, q, r, u, & v en ápice. La formación del callo inducida únicamente por K se llevó a cabo en los tratamientos p en hipocótilo y p & u en cotiledón. Porcentajes de 100% se alcanzaron con los tratamientos j, n, o & y en raíz, j, o, t, w, x & y en hipocótilo, j, n, o, t, x & y en cotiledón y j, t & y en ápice. Todos los demás tratamientos tuvieron porcentajes de respuesta variables en los 4 explantes.

Se observa que la dediferenciación se da como un efecto de la presencia y concentración de los RCV en el medio de cultivo, por otro lado, afectaron de distinta manera a los diferentes explantes, así vemos que el aumento en el porcentaje de formación de callo ocurre junto con el incremento en la concentración de ANA en todos los niveles de K, excepto cuando se cultivan segmentos de raíz en el nivel de 2.0 mg/l de K, asimismo, los diferentes explantes responden de manera distinta ante el estímulo químico, se puede ver en la figuras 4 a 8 que no todos los tratamientos provocan callogénesis en los 4 explantes, de tal manera que el hipocótilo es el explante que muestra mayor sensibilidad, siguiéndolo en orden descendente el cotiledón, la raíz y el ápice.

Los callos se iniciaron sobre la superficie del corte, conforme se desarrollaron tendieron a invadir todo el explante, su consistencia fué compacta y con coloraciones verdosas en cotiledón, amarillo-rojo en hipocótilo y ápice y amarillo café en raíz.

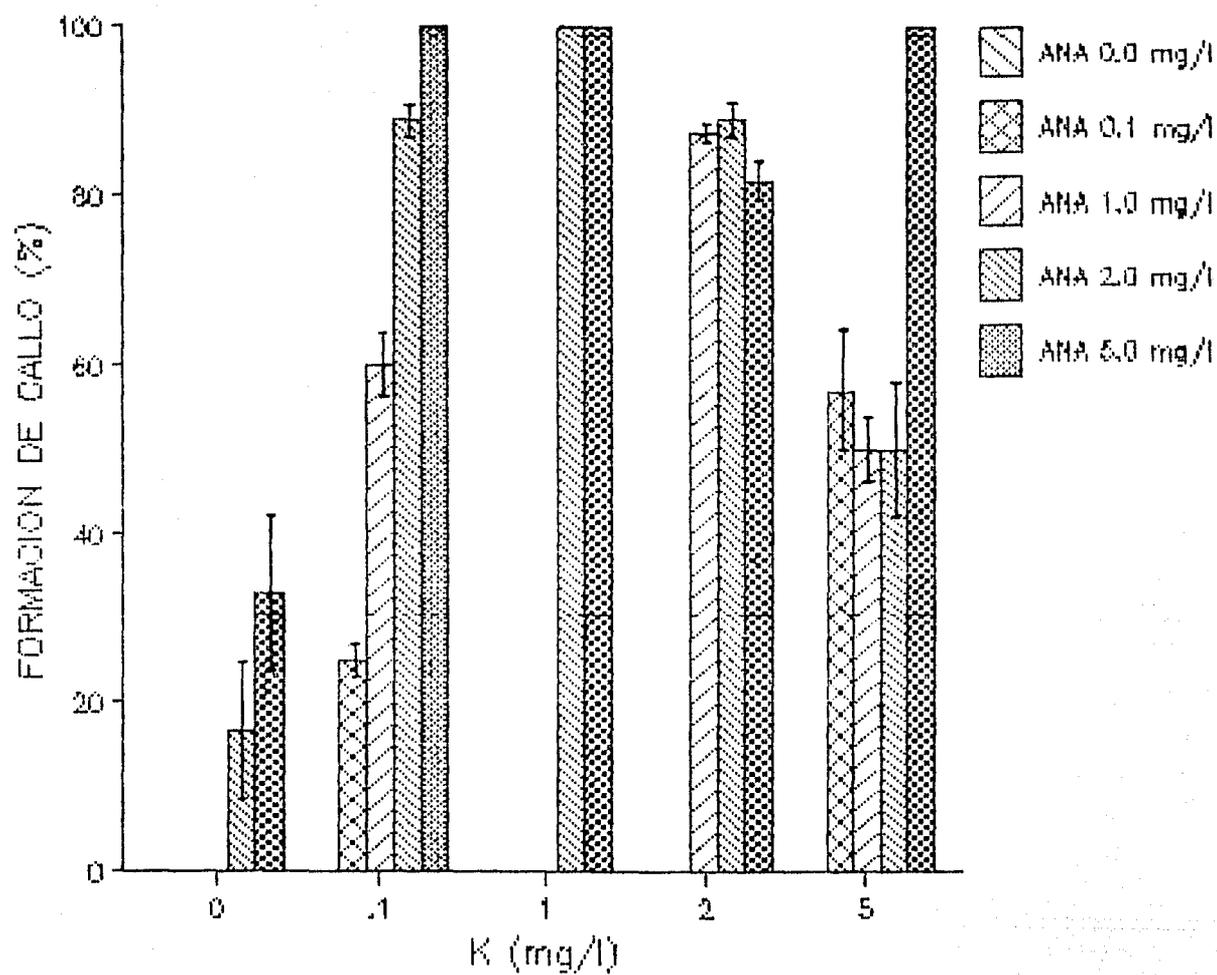


Figura 5. Efecto de ANA y K en la formación de callo en explantes de raíz de *E. cinerea* (x^2 g.l.=3; $\alpha=0.05$; $n=4$).

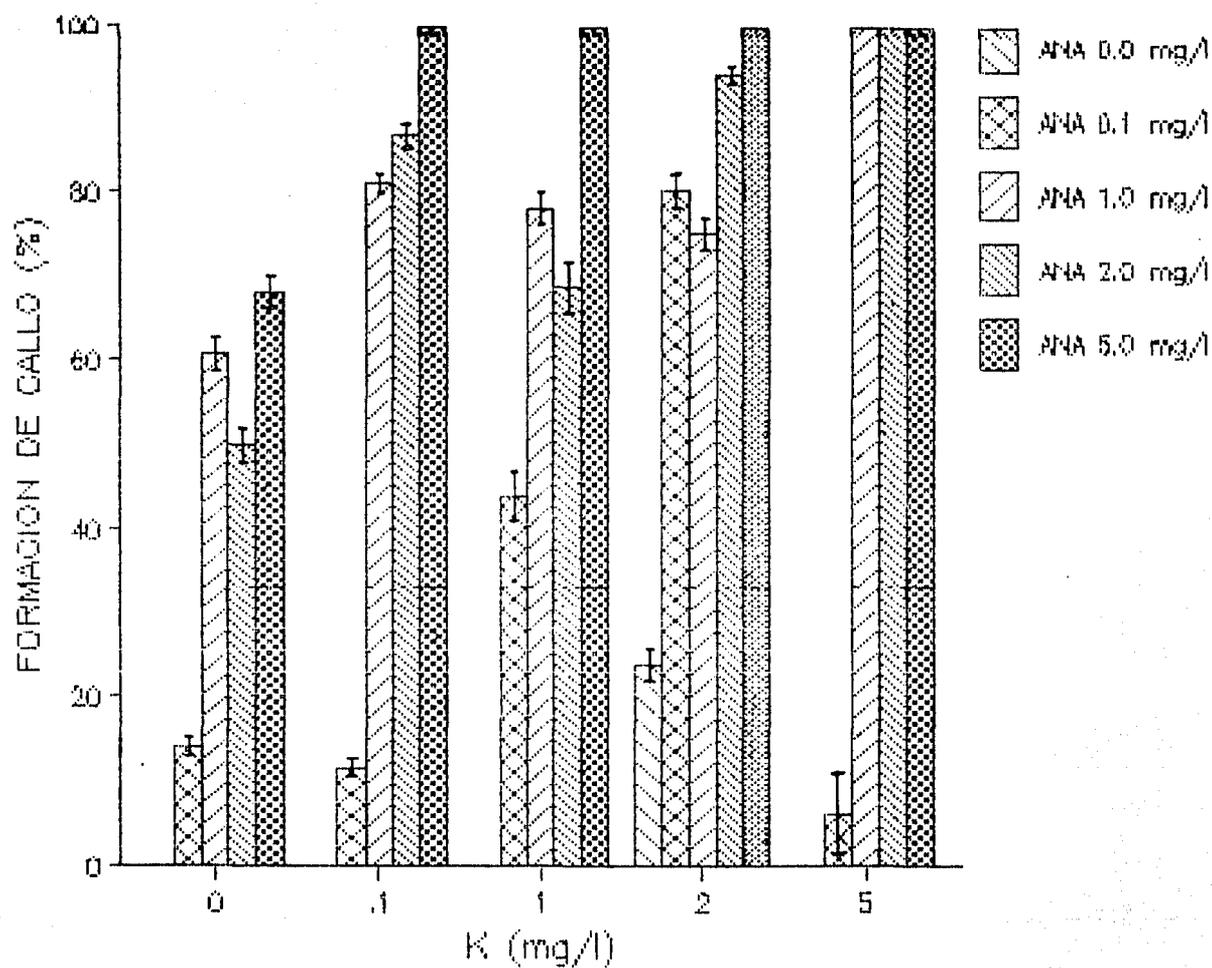


Figura 6. Efecto de ANA y K en la formación de callo en explantes de hipocótilo de *E. cinerea* (x^2 g.l.=3; $\alpha=0.05$; $n=4$).

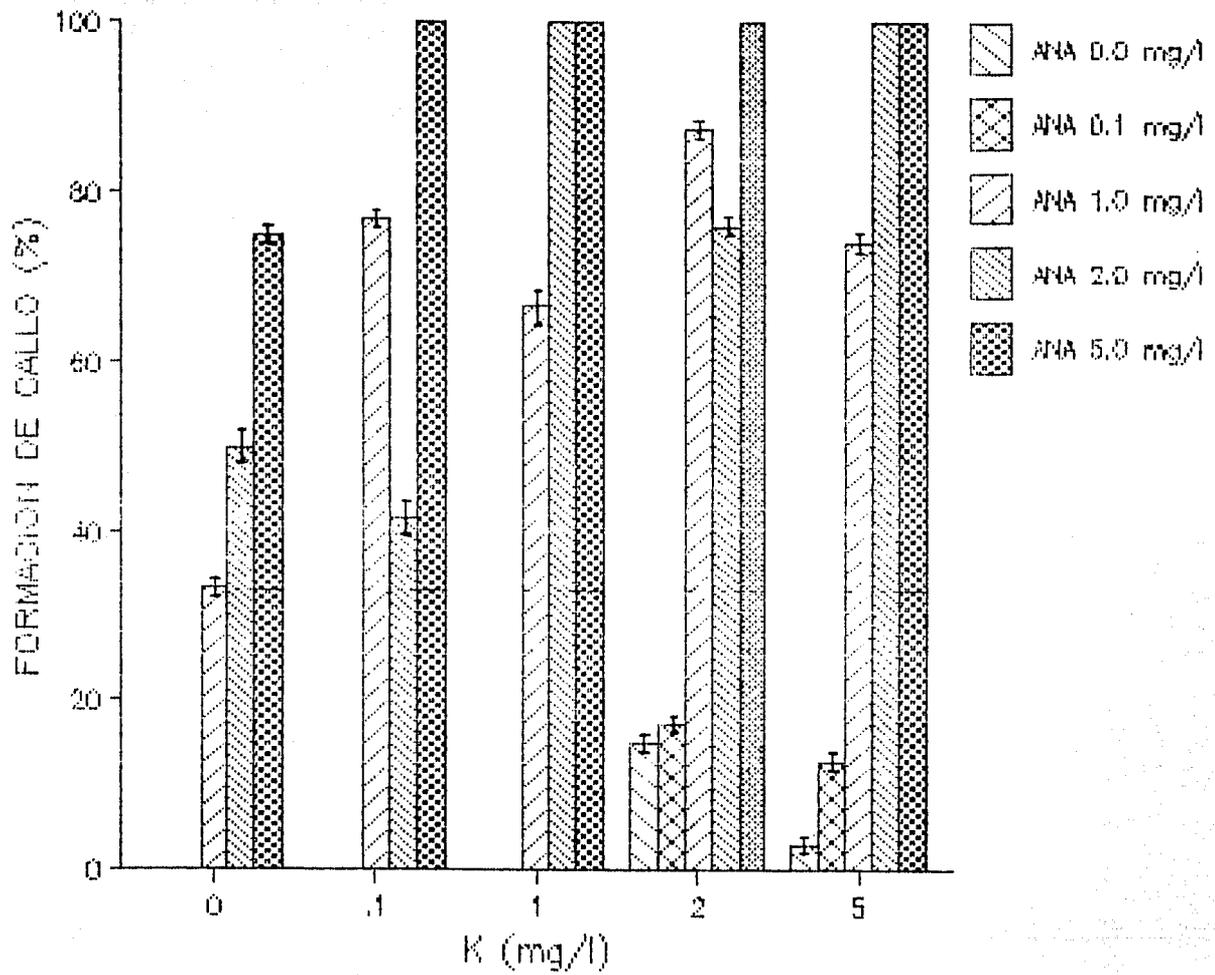


Figura 7. Efecto de ANA y K en la formación de callo en explantes de cotiledón de *E. cinerea* (χ^2 g.l.=3; $\alpha=0.05$; n=4).

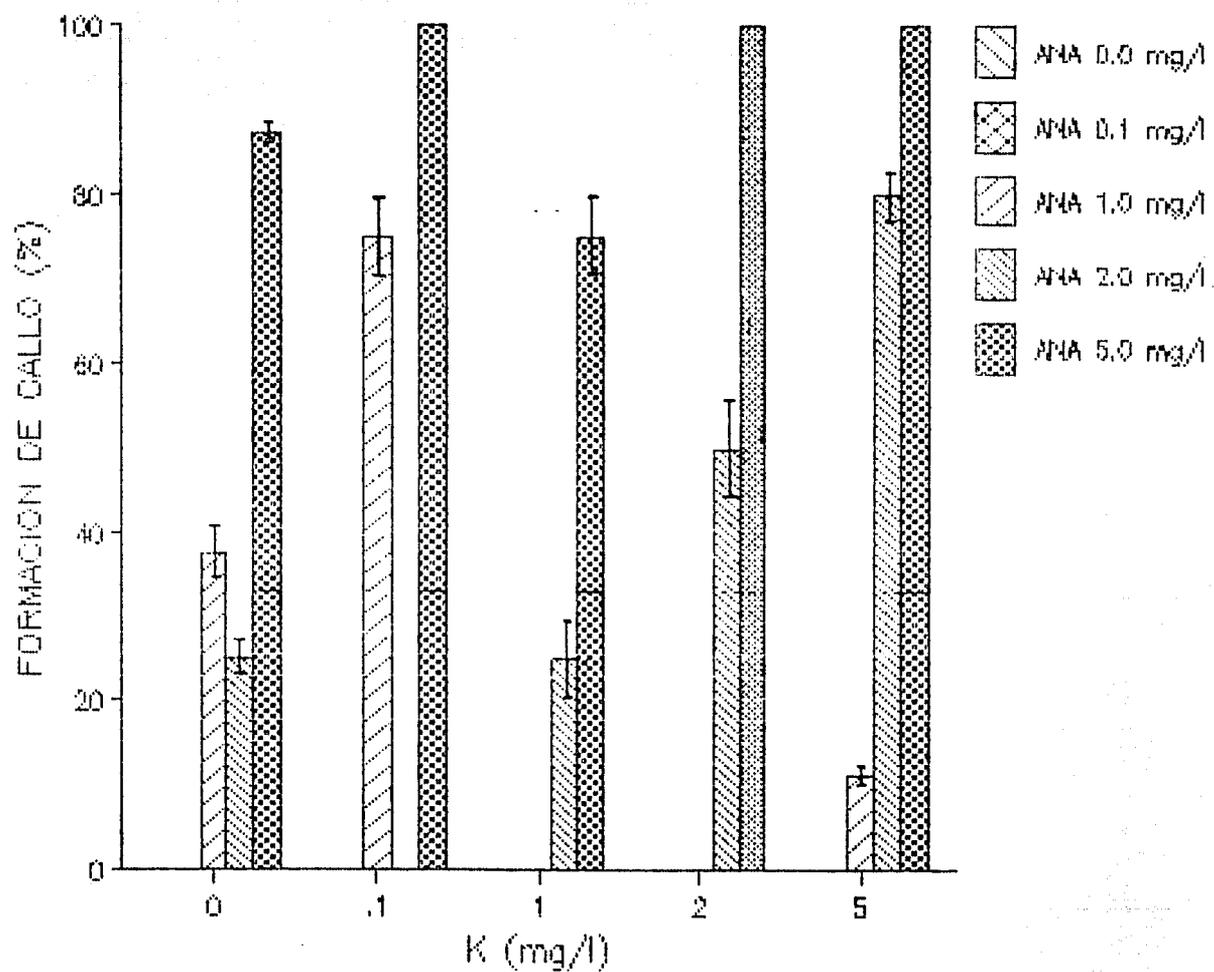


Figura 8. Efecto de ANA y K en la formación de callo en ápices de *E. cinerea* (χ^2 g.l.=3; $\alpha=0.05$; n=4).

Las figuras 9 a 16 muestran la influencia de ANA y K en el peso fresco y seco de los segmentos de raíz, hipocótilo, cotiledón y los ápices aislados, la tabla 5 corresponde a los resultados encontrados para el cultivo de plántulas en ausencia de reguladores del crecimiento, la longitud del eje principal del tallo y el número de hojas de los cultivos de ápice se encuentran en las figuras 17 y 18. En todos los casos se presentan valores promedio.

El aumento en biomasa (peso fresco y seco) de los explantes se vió influenciado por la presencia y concentración de ANA y K en el medio de cultivo y por la naturaleza propia del explante, de tal manera que los ápices son los que exhibieron una mayor biomasa en todos los niveles de K probados, en cotiledón fué mayor que en hipocótilo excepto en los niveles de 1.0 y 5.0 mg/l de K y en raíz se registraron los menores. La tendencia general fué el aumento en la biomasa conforme la concentración de ANA se incrementó. El peso fresco y seco medido en las plántulas superó al alcanzado por los ápices solamente cuando la auxina estuvo ausente, excepto en los niveles de 0.1 y 5.0 mg/l de K y con la auxina y citocinina ambas a 0.1 mg/l.

Eventos morfogénicos como el desarrollo del tallo y la formación de hojas se observaron solamente en los cultivos de ápice. La longitud se vió afectada por ANA y K, encontrándose que únicamente en los niveles de K de 2.0 y 5.0 mg/l existieron diferencias significativas, la longitud alcanzada por el tallo en las plántulas, medida a partir del nudo cotiledonar, fué mayor a la alcanzada por los ápices, esta diferencia fué significativa. Así, en todos los tratamientos se observó una disminución en la elongación del tallo con respecto a lo encontrado en la plántula. La formación de hojas es otro evento morfogénico llevado a cabo por los cultivos de ápice, se encontraron diferencias significativas en el número de hojas formadas en las concentraciones de K de 0.0, 2.0 y 5.0 mg/l. El número de hojas originadas en el cultivo de plántulas fué menor a los máximos encontrados en los cultivos de ápice, con excepción del nivel 0.1 mg/l de K, donde el máximo (3 hojas) coincidió al registrado para plántulas.

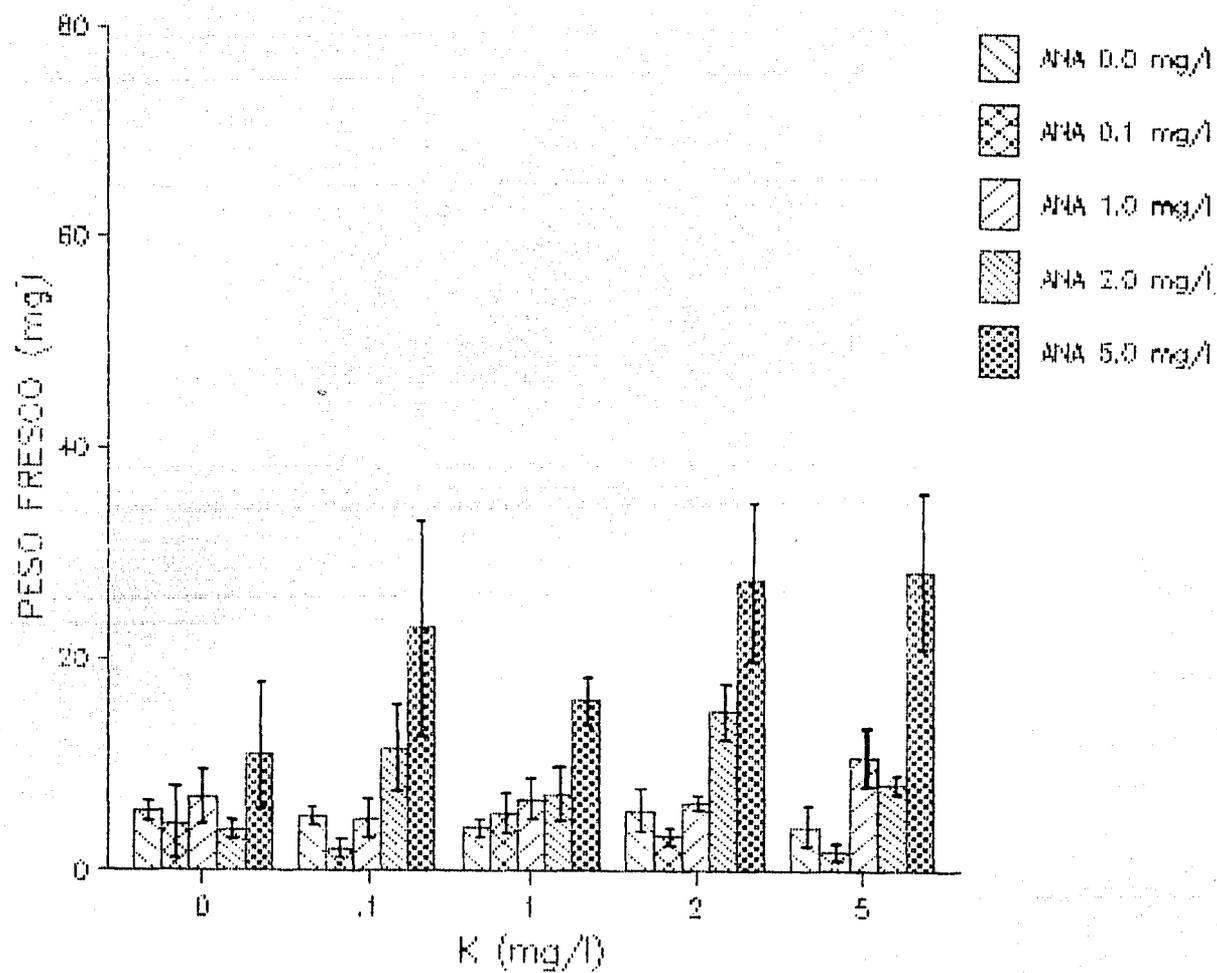


Figura 9. Efecto de ANA y K en el crecimiento de explantes de raíz de *E. cinerea* a las 8 semanas de cultivo (GLEG=4, GLDG=15; $\alpha=0.05$; $n=4$).

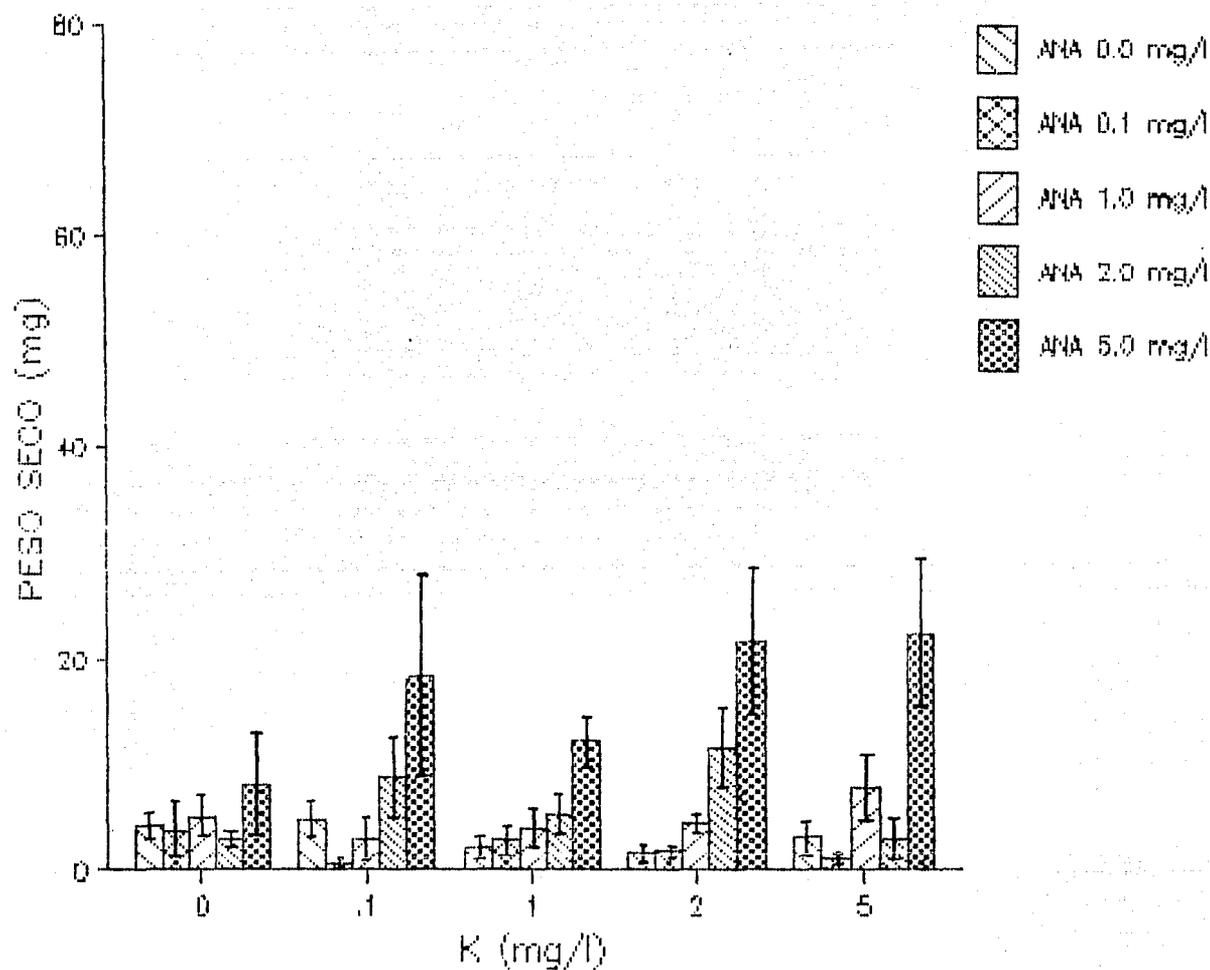


Figura 10. Efecto de ANA y K en el crecimiento de explantes de raíz de *E. cinerea* a las 8 semanas de cultivo (GLEG=4, GLDG=15; $\alpha=0.05$; n=4).

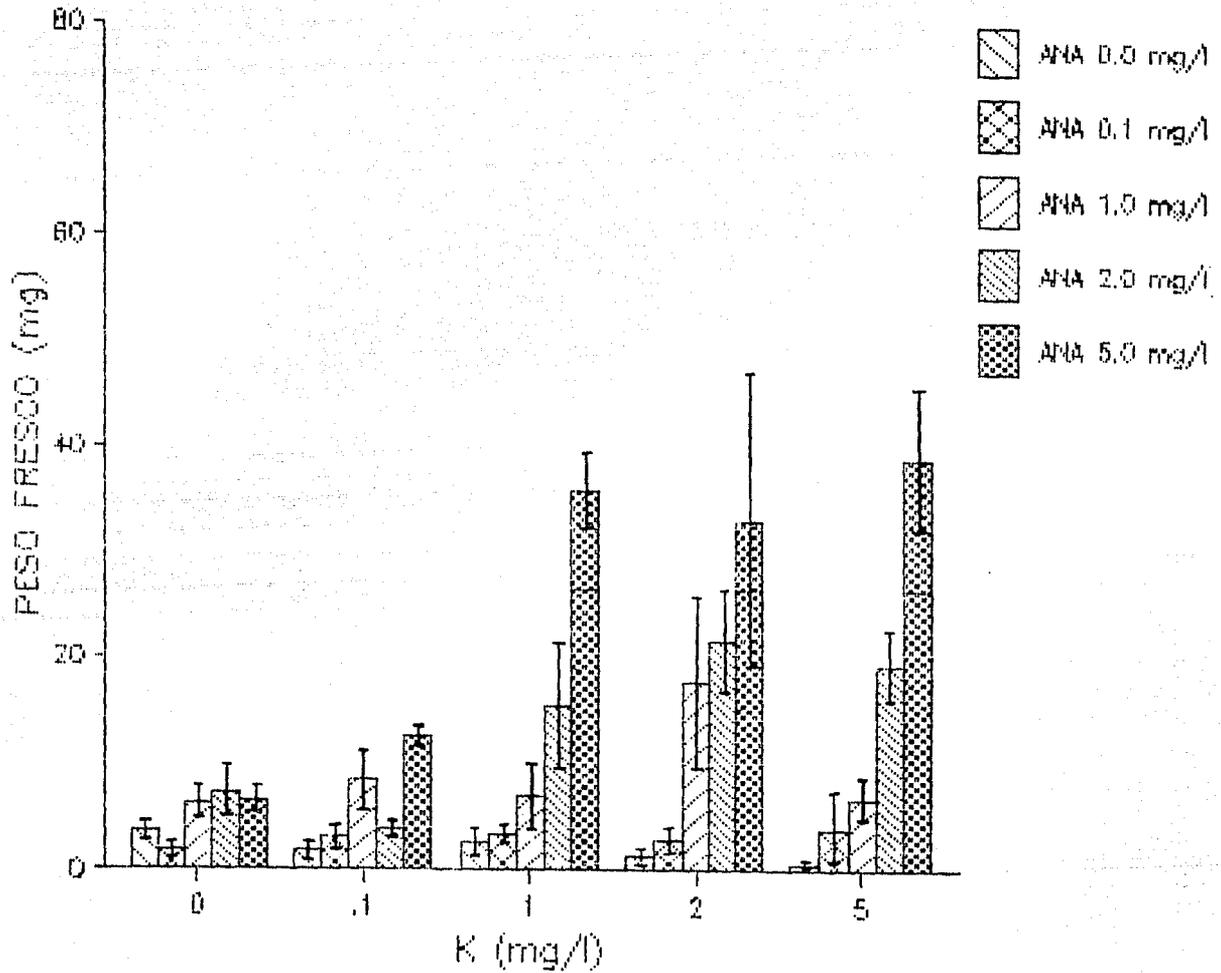


Figura 11. Efecto de ANA y K en el crecimiento de explantes de hipocótilo de *E. cinerea* a las 8 semanas de cultivo (GLEG=4, GLDG=15; $\alpha=0.05$; $n=4$).

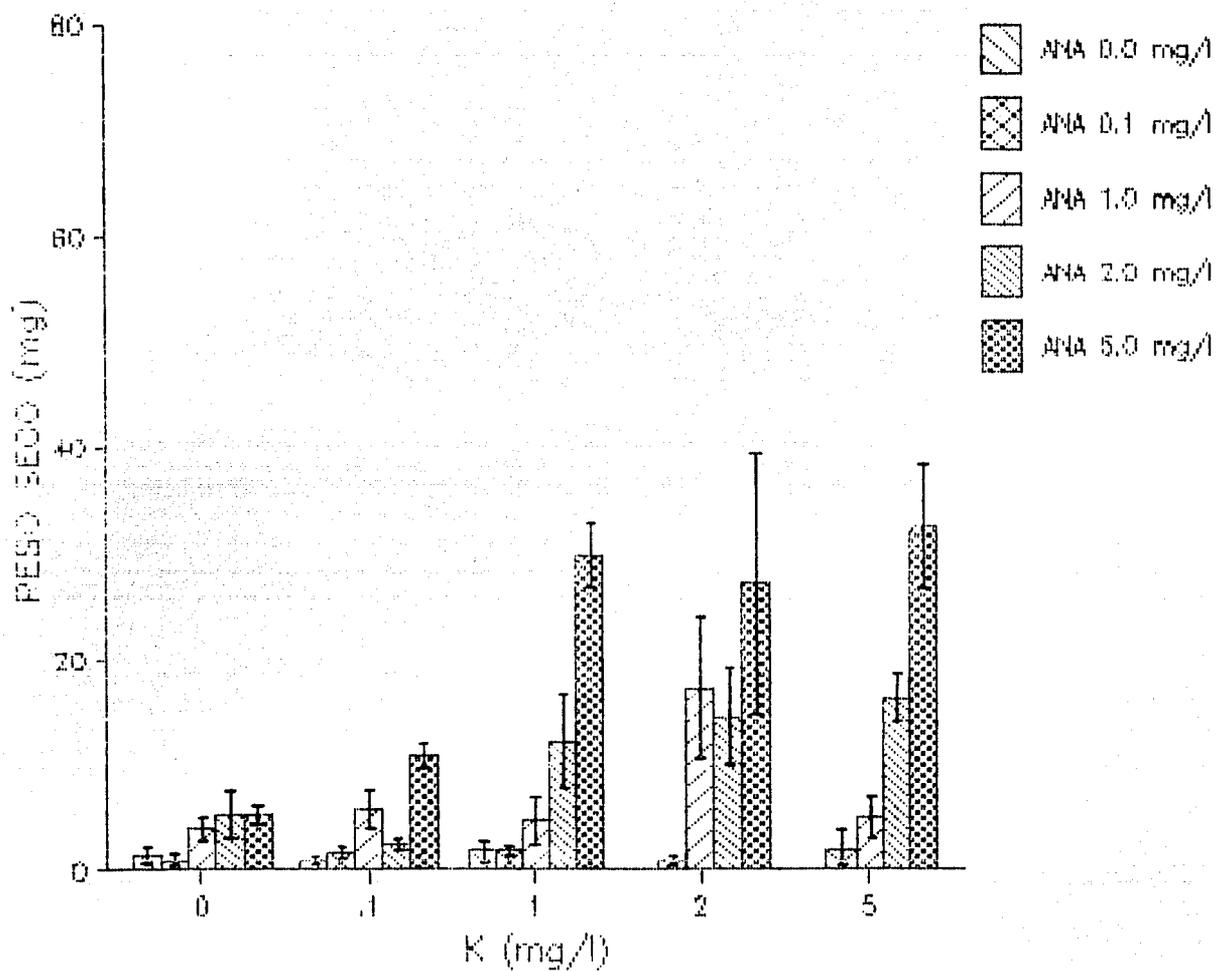


Figura 12. Efecto de ANA y K en el crecimiento de explantes de hipocótilo de *E. cinerea* a las 8 semanas de cultivo (GLEG=4, GLDG=15; $\alpha=0.05$; $n=4$).

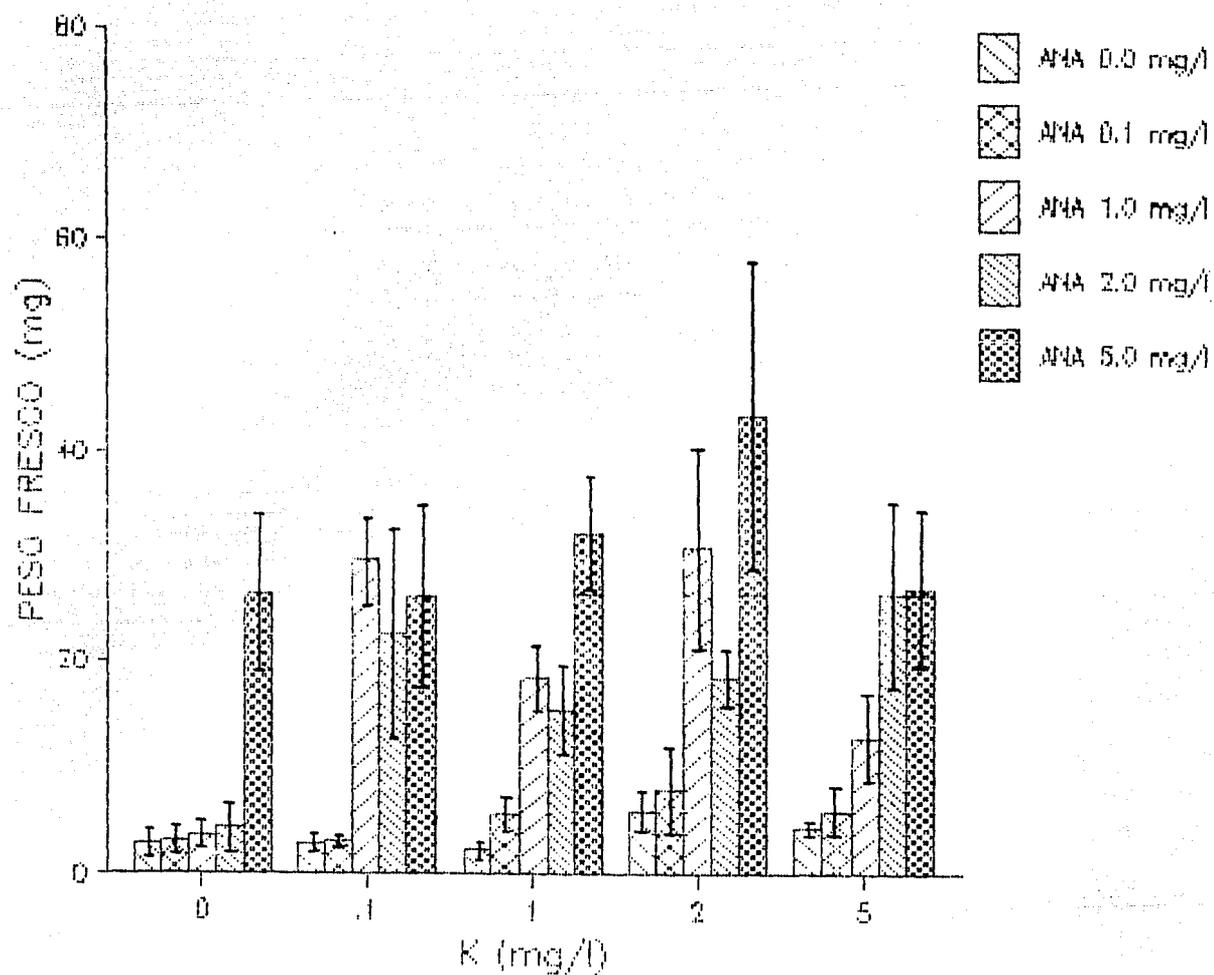


Figura 13. Efecto de ANA y K en el crecimiento de explantes de cotiledón de *E. cinerea* a las 8 semanas de cultivo (GLEG=4, GLDG=15; $\alpha=0.05$; $n=4$).

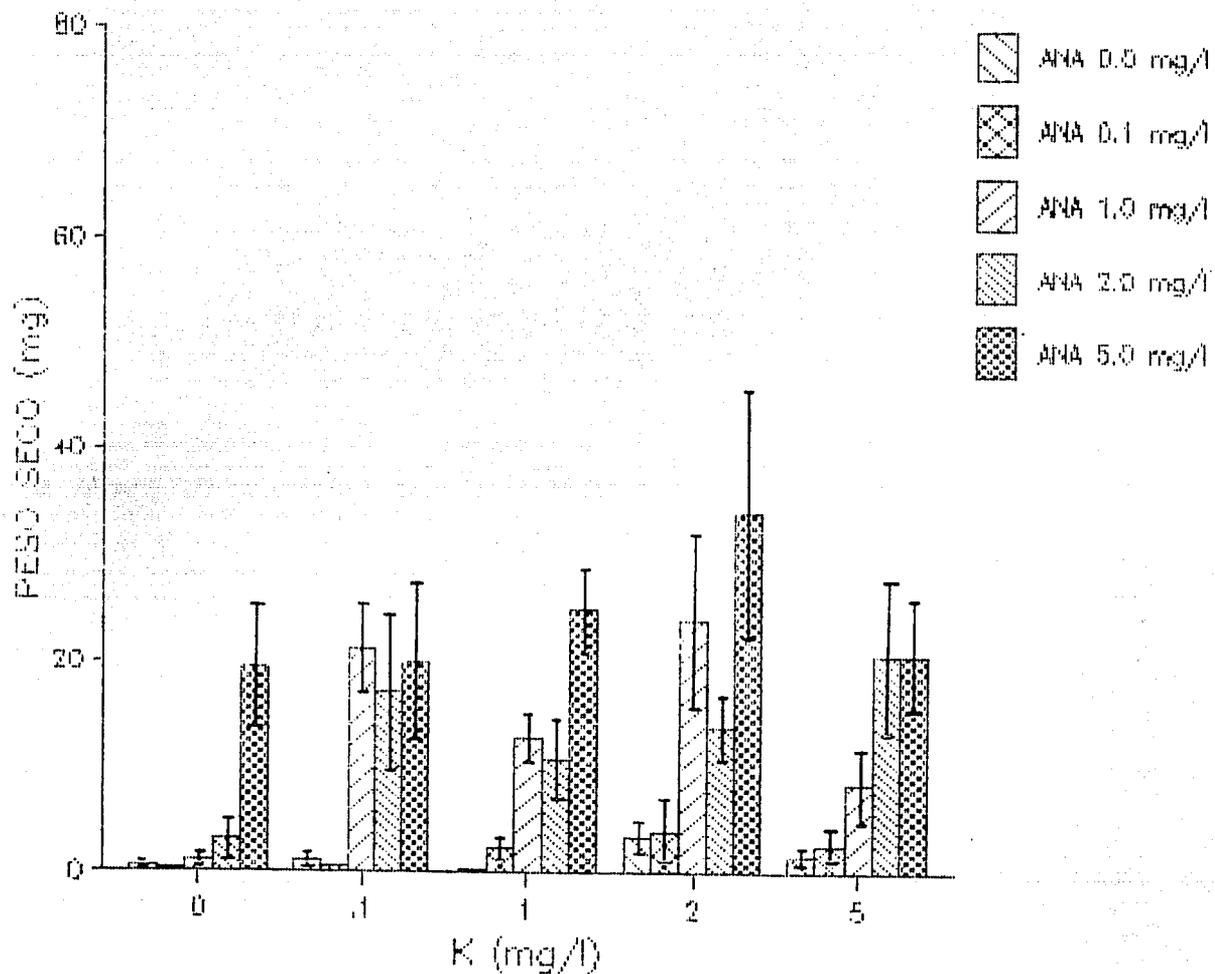


Figura 14. Efecto de ANA y K en el crecimiento de explantes de cotiledón de *E. cinerea* a las 8 semanas de cultivo (GLEG=4, GLDG=15; $\alpha=0.05$; $n=4$).

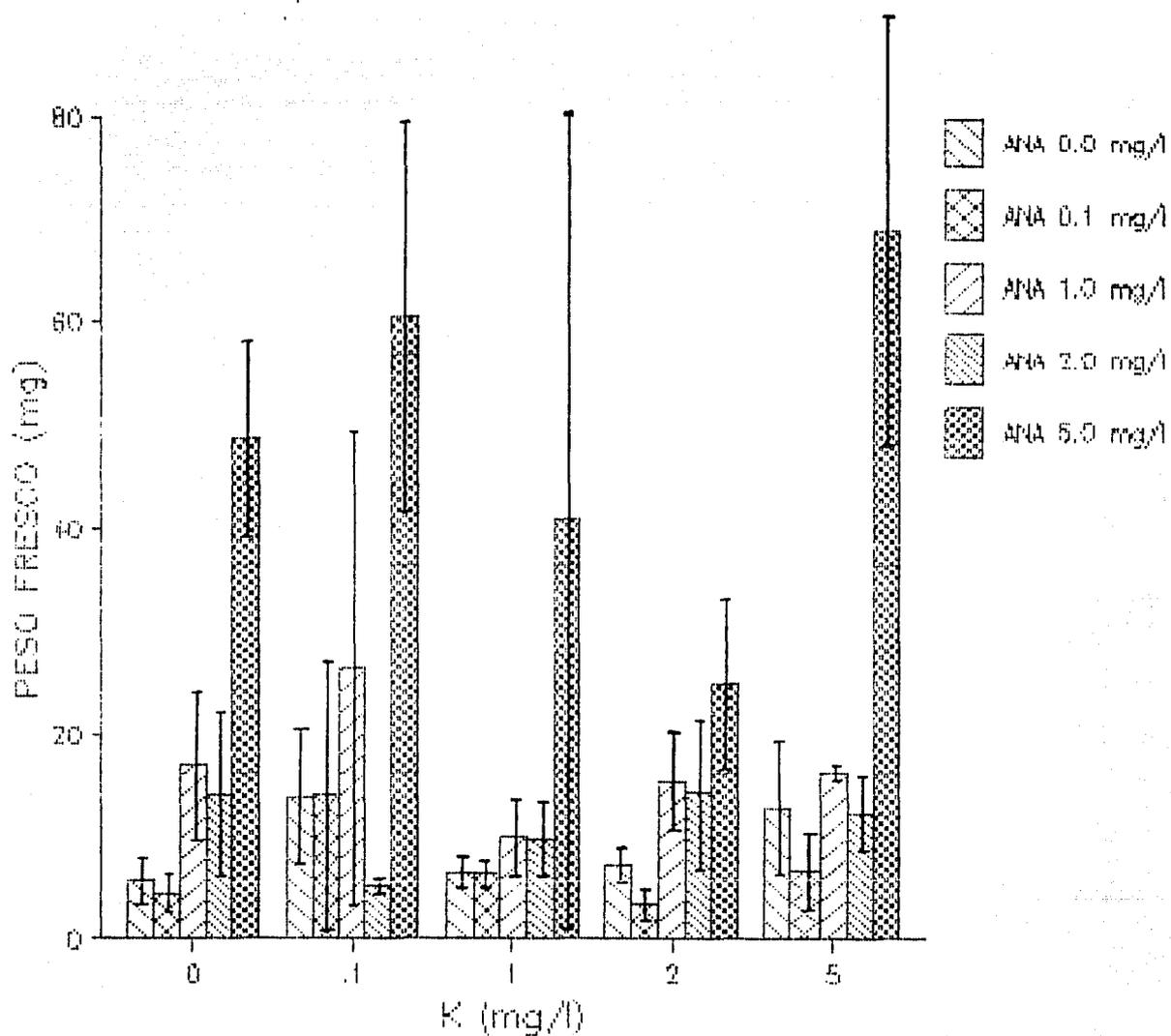


Figura 15. Efecto de ANA y K en el crecimiento de ápices aislados de *E. cinerea* a las 8 semanas de cultivo (GLEG=4, GLDG=15; $\alpha=0.05$; n=4).

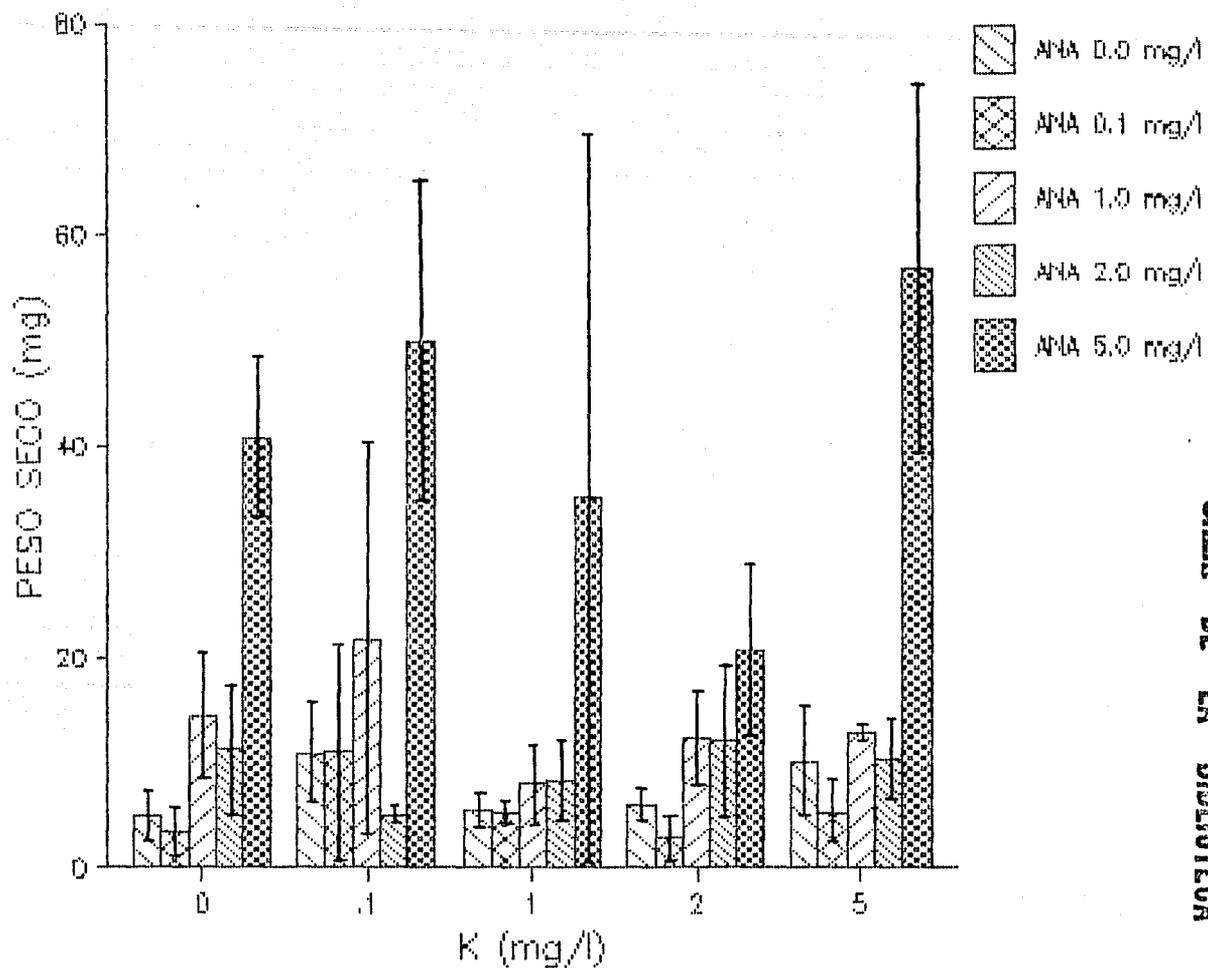


Figura 16. Efecto de ANA y K en el crecimiento de ápices aislados de *E. cinerea* a las 8 semanas de cultivo (GLEG=4, GLDG=15; $\alpha=0.05$; $n=4$).

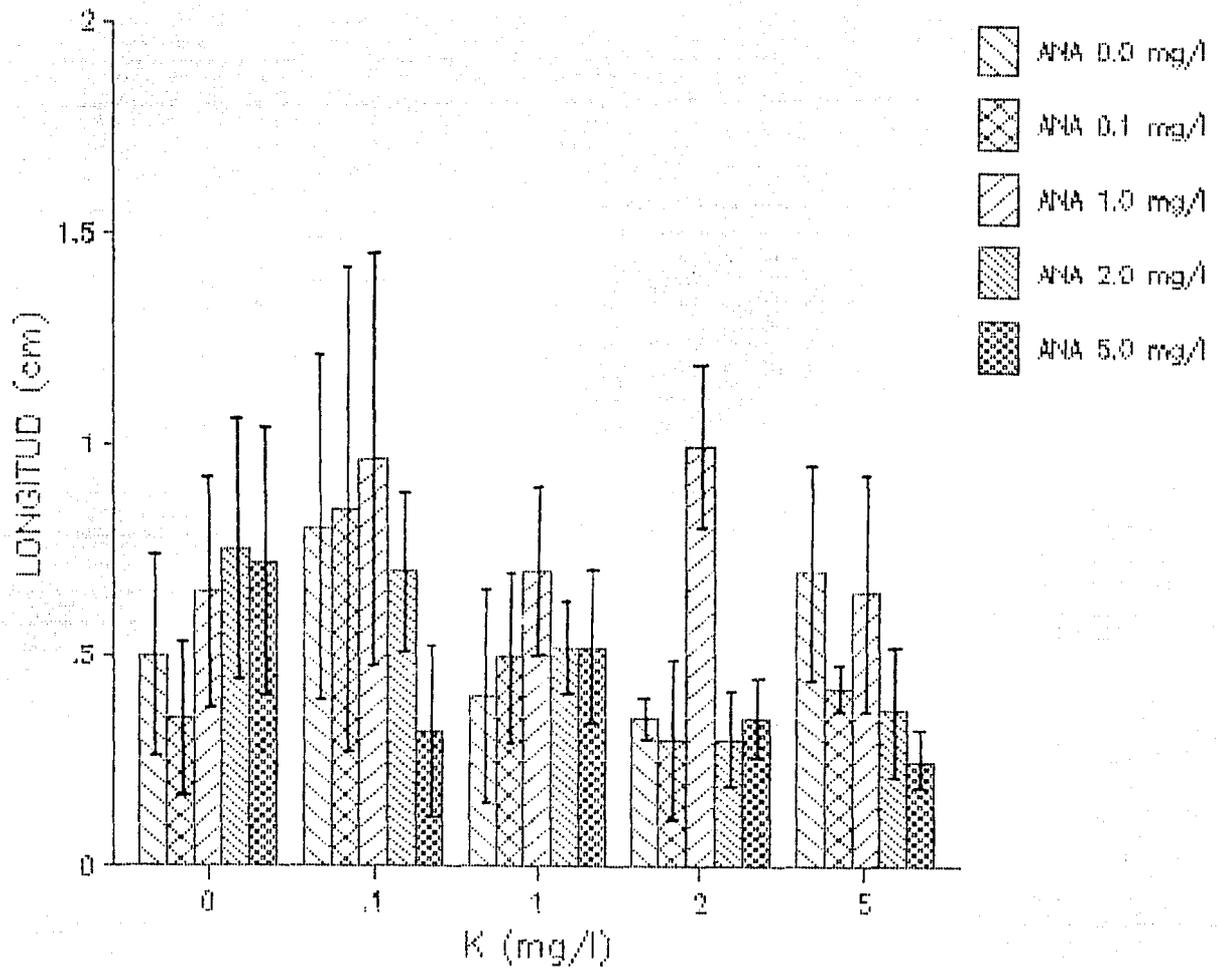


Figura 17. Efecto de ANA y K en la longitud alcanzada por ápices aislados de *E. cinerea* a las 8 semanas de cultivo (GLEG=4, GLDG=15; $\alpha=0.05$; $n=4$).

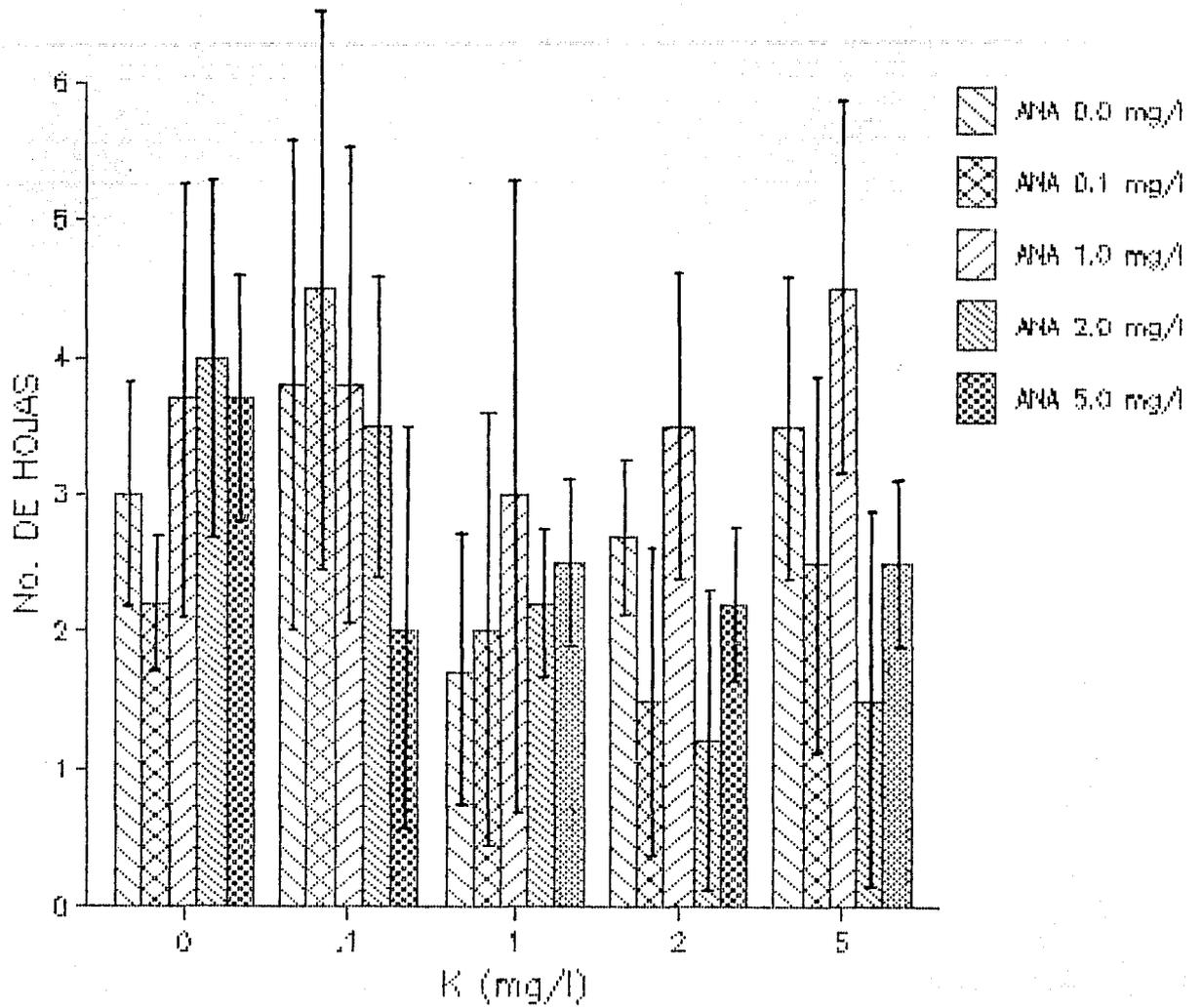


Figura 18. Efecto de ANA y K en el número de hojas en ápices aislados de *E. cinerea* a las 8 semanas de cultivo (GLEG=4, GLDG=15; $\alpha=0.05$; $n=4$).

Tabla 5. Respuestas de un cultivo de plántulas de E. cinerea sin reguladores del crecimiento medidas a partir del nudo cotiledonar. Periodo de cultivo 8 semanas.

| | Media(n=4) | D. S. |
|------------------|------------|-------|
| Peso fresco (mg) | 10.4 | 1.39 |
| Peso seco (mg) | 7.4 | 0.65 |
| Longitud (cm) | 1.8 | 0.38 |
| No. de hojas | 3.0 | 0.0 |

V. DISCUSION.

En el presente trabajo se estudió la influencia de diferentes concentraciones de ANA y K en distintos explantes de E. cinerea; en lo que se refiere a la formación de callo los resultados de estos experimentos muestran que la iniciación del callo en raíz y ápice depende de la presencia de la auxina, mientras que la citocinina sola es suficiente en una concentración de 2.0 mg/l para hipocótilo y a 2.0 y 5.0 mg/l para cotiledón, asimismo, la mayor producción de callo se encuentra a las mayores concentraciones de la auxina en todos los niveles de la citocinina, de tal manera que parece ser que el factor crucial en la inducción del callo es la auxina y la citocinina juega un papel complementario. En las figuras 4 a 8 se puede observar que porcentajes de formación de callo del 100% se encuentran desde la concentración de 0.1 mg/l de K combinada con el nivel más alto de ANA, este porcentaje es más frecuente al aumentar la concentración de K por lo que es probable que su efecto sea el de magnificar la acción inductora de la auxina. Resulta importante destacar que en ningún explante hay formación de callo cuando ambos reguladores están ausentes.

El ápice resultó ser el explante menos sensible al efecto inductor de ANA y K, probablemente se deba a que es el lugar de síntesis del AIA. Es probable que el AIA compita en condiciones favorables con el ANA impidiéndole su acción inductora (en los niveles probados) aún cuando se trata de otra auxina. Se ha observado que la actividad auxínica de algunas sustancias se debe a su composición y a su conformación espacial (Wareing y Phillips, 1973) y siendo el AIA la auxina natural, además de existir enzimas específicas para su degradación existen sitios específicos y particulares para su reconocimiento. El cultivo del meristemo apical sin primordios foliares (lugar de máxima síntesis de AIA), en presencia de AIA, ANA y citocininas exógenos podría ser de gran utilidad para intentar resolver este problema, ya que se ha visto que el meristemo solamente crece y se desarrolla ante auxinas y citocininas exógenas presentes en el medio de cultivo (Navarro, 1987).

La formación de callos inducida por reguladores del crecimiento ha sido reportada en varias especies del género Eucalyptus, a partir de partes de la plántula en E. citriodora (Aneja y Atal, 1969; Lakshmi Sita, 1979), en E. marginata (Bennett y McComb, 1982), E. globulus (Oka et al., 1982) y E. camaldulensis (Diallo y Duhoux, 1984). La formación del callo ha sido a partir de ápices radiculares, lignotubérculos, segmentos de hipocótilo y cotiledón en E. citriodora, de cotiledón en E. marginata y E. camaldulensis y de hipocótilo en E. globulus, como vemos, ésta es la primera ocasión que se estudia este

proceso cultivando el apice del tallo de la plántula en una especie del género.

Las características morfológicas y estructurales de los callos varían dentro de la misma especie y dependen del estado fisiológico del explante original y particularmente de las concentraciones de reguladores del crecimiento, en este trabajo, bajo las condiciones proporcionadas a los cultivos se encontraron diferencias en la pigmentación de los callos, tales diferencias indican diferencias metabólicas en la síntesis de clorofila y pigmentos accesorios. El estado fisiológico propio de cada explante va a determinar la respuesta in vitro de las células que lo componen y las características del callo formado.

La proliferación celular que representa la segunda fase para el establecimiento de los cultivos de callos, se caracteriza por el crecimiento continuo del tejido acompañado por un incremento en la tasa de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Ritchison et al., 1977). La evaluación de la fase de proliferación se basó en la producción de biomasa por cada explante en cada una de las combinaciones de ANA y K, al final del periodo de incubación.

En los 4 tipos de explante la proliferación se inició en la superficie del corte lo cual parece ser un patrón generalizado (Tran y Trinh, 1978). Para el establecimiento del callo juegan un papel importante los niveles endógenos y exógenos de reguladores del crecimiento en el cultivo.

En la literatura consultada sobre el género Eucalyptus solamente el trabajo de de Fossard et al. (1974) aporta datos acerca de la proliferación de los callos, ellos encontraron que la biomasa de callos de tallo de E. bancroftii aumenta conforme aumentan las concentraciones de ANA y K en el medio de cultivo. Aunque se trata de especies y explantes distintos, con una edad y estado fisiológico diferente, el efecto de ANA y K es similar al encontrado cuando se cultivaron segmentos de raíz e hipocótilo, no así en el caso del cotiledón y el ápice. En efecto, en las figuras 9 a 12 podemos observar en general, el aumento en peso fresco y seco a la vez que aumentan los niveles de ANA y K y en las figuras 13 y 14 (cotiledón) es posible apreciar que la tendencia al mayor aumento en la biomasa se detiene en el nivel de K de 2.0 mg/l. y en las figuras 15 y 16 (ápice) se tiene menor proliferación en los niveles de K de 1.0 y 2.0 mg/l, con un incremento de la biomasa en el nivel de K de 5.0 mg/l.

El tipo de explante fué un factor que influyó en la proliferación de los cultivos ante las mismas concentraciones de ANA y K probadas, vemos que el tejido menos proliferativo fué la raíz, siguiéndole en orden ascendente el hipocótilo, el cotiledón y el ápice, esto se debe probablemente a las características metabólicas propias de cada explante ya que el nivel de

diferenciación corresponde a la posición de la células en el cuerpo de la plántula. Los cotiledones y el ápice poseen células especializadas en el metabolismo fotosintético, en menor grado el hipocótilo mientras que la raíz carecía de tal especialización. Podemos notar entonces que los nutrientes aportados por el medio de cultivo no fueron suficientes para sostener en la raíz un incremento de biomasa de la misma magnitud que el alcanzado por los otros explantes.

El patrón de crecimiento encontrado en la raíz mostró una dependencia hacia la citocinina, los diferentes valores de peso fresco y seco tendieron a aumentar con la presencia y aumento de la concentración de la citocinina, el análisis de varianza mostró que no existen diferencias significativas en el crecimiento de los explantes ante las diferentes concentraciones de ANA cuando la K estuvo ausente, es decir, los promedios de peso fresco y seco encontrados fueron estadísticamente iguales. Este comportamiento característico nos indica que la citocinina está actuando al nivel de la división celular en conjunción con el ANA pues vemos en las figuras 9 y 10 que los mayores valores de peso fresco y seco ocurren a la concentración de 5.0 mg/l de ANA en combinación con todos los niveles de K.

El hipocótilo desarrolló una tendencia hacia el incremento de la biomasa conforme el ANA es proporcionado en mayor cantidad en el medio de cultivo aún cuando la K está ausente. En ausencia de K el crecimiento celular está determinado por el aumento en la longitud y el volumen celular influenciados por la auxina. En los niveles de K de 1.0, 2.0 y 5.0 mg/l el crecimiento se incrementa considerablemente lo cual sugiere una tasa de división celular alta por efecto de la citocinina, así como efectos sinérgicos de los reguladores.

En el cotiledón no se observó una tendencia gradual de aumento en la biomasa al incrementar la concentración de la auxina. Los mayores valores de peso fresco y seco se encontraron en los niveles de 0.1, 1.0 y 2.0 mg/l de K, con una disminución a la concentración de 2.0 mg/l de ANA, esto sugiere que en esta concentración la auxina posiblemente actúa como un inhibidor del crecimiento de este explante.

Estudios bioquímicos podrán aportar datos acerca de las modificaciones producidas por el ANA a 2.0 mg/l combinado con los niveles de K, mencionados en el párrafo anterior, sobre el metabolismo que provocan una menor producción de biomasa. El crecimiento por elongación celular y aumento en volumen ocurrió influenciado por ANA a 5.0 mg/l con 0.0 mg/l de K en cotiledón. La división celular por otro lado, es aumentada fuertemente en todos los niveles de K excepto el de 0.0 mg/l, a partir de la concentración de 1.0 mg/l de ANA, con un decremento en el nivel de 5.0 mg/l de K, esto sugiere interacciones sinérgicas entre la auxina y

la citocinina para inducir el crecimiento a partir de la concentración de 1.0 mg/l de ANA y 0.1 de K, en el rango de concentraciones probado, tal efecto se hace negativo al llegar al nivel de K de 5.0 mg/l.

En el caso del ápice los valores más altos de crecimiento se encuentran en los niveles de K de 0.0, 0.1 y 5.0 mg/l, siendo los niveles de 1.0 y 2.0 mg/l los que produjeron los menores. En todos los niveles de K, a la concentración de ANA de 5.0 mg/l se encontró la mayor producción de biomasa. Vemos que concentraciones altas de auxina y citocinina provocan un alto crecimiento, al nivel de 2.0 mg/l de K sufre una inhibición y en ausencia de K la biomasa se incrementa como efecto de la auxina en el alargamiento y aumento del volumen celular. El crecimiento de los explantes con ANA a 1.0 y 2.0 y sin K es considerable, indicando que el ANA es activo en estas concentraciones cuando no hay citocinina en el medio de cultivo.

Un factor muy importante en el crecimiento fue la formación de callo. Las figuras 5 a 8 nos indican que no en todas las combinaciones de fitorreguladores se dió la dediferenciación, por lo que el crecimiento alcanzado se debió al aumento de la biomasa del callo o al crecimiento del explante manteniendo su estado de diferenciación, en el caso del ápice en más del 50% de los tratamientos, especialmente en aquellos donde el ANA estaba ausente o en concentraciones bajas (0.1 y 1.0 mg/l), se dió el crecimiento del explante sin formación de callo, los tratamientos que tampoco produjeron callo en los otros explantes fueron igualmente los carentes o a bajas concentraciones de la auxina.

Los valores de peso fresco y seco para el cultivo de plántulas fueron menores a los encontrados para el ápice excepto en los tratamientos a, b, j, k, o, p, & u, es decir, en los tratamientos con baja concentración de la auxina y para el tratamiento i (2.0 mg/l de ANA y 0.1 mg/l de K), este resultado muestra que la producción de biomasa es mayor en cultivo de tejidos en presencia de ANA y K a concentraciones de 1.0, 2.0 y 5.0 mg/l que en la planta completa. Lo anterior puede ser causado por el efecto estimulador del crecimiento y de la división celular de los RCV sobre el explante.

Los eventos observados en el ápice relacionados con la morfogénesis fueron la elongación del tallo y la formación de hojas (consecuentemente, alargamiento de los entrenudos). El análisis de varianza señala que para los niveles de K de 0.0, 0.1 y 1.0 mg/l no existieron diferencias significativas entre las alturas registradas en cada tratamiento, mientras que en los restantes niveles los tratamientos r & u fueron los que provocaron una elongación significativa. No obstante, la tendencia general es la disminución de la elongación del tallo conforme aumenta la concentración de K, lo que puede verse en la figura 17. Vemos entonces que la citocinina

está posiblemente actuando a manera de contrarrestar el alargamiento celular y consecuentemente del tallo. La longitud alcanzada por el cultivo de plántulas fué muy superior al encontrado en los cultivos de ápice, esto nos señala diferencias morfológicas de los ápices en cultivo in vitro con respecto al patrón general de desarrollo de la plántula, diferencias posiblemente debidas a que el ápice está creciendo fuera del contexto del organismo y a la influencia de los reguladores del crecimiento.

La formación de hojas fué otro evento morfogénico observado. En los niveles de K de 0.1 y 1.0 mg/l no hubo diferencias significativas, mientras que en ausencia de K el análisis estadístico señala que con ANA a 2.0 mg/l se dá un máximo del número de hojas, 4.0, con K a 2.0 mg/l y ANA a 1.0 se alcanzaron 3.5 hojas y con 5.0 mg/l de K y 1.0 de ANA se tienen 4.5 hojas, siendo este número el máximo alcanzado en todos los niveles de K. Dicho evento morfogénico es influenciado únicamente por el ANA en los tratamientos a al f, k, p, & u y debe ser controlado por los niveles endógenos de auxinas y citocininas del explante. Todos los demás tratamientos indican una interacción entre el ANA y K para el evento morfogénico, encontrándose que el mayor número de hojas producidas ocurre cuando la relación auxina/citocinina favorece a ésta última. Al comparar con el número de hojas en el cultivo de plántulas vemos que al igual que con la longitud, el desarrollo de los ápices se aparta del patrón normal debido quizá a la presencia en el medio de cultivo de los reguladores el crecimiento.

Por último, cabe señalar que el cultivo de tejidos vegetales ha demostrado ser un modelo experimental eficaz para la investigación en fisiología vegetal. La revisión de literatura mostró que en diversas partes del mundo diferentes grupos realizan investigaciones que utilizan el CTV con el fin de desarrollar técnicas biotecnológicas de propagación clonal de especies de Eucalyptus. Los resultados de estos trabajos han mostrado algunas de las condiciones para la regeneración de plántulas in vitro en algunas de las especies que componen al género Eucalyptus, como son E. citriodora (Aneja y Atal, 1969; Lakshmi Sita, 1979; Muralidharan y Mascarenhas, 1987), E. grandis (de Fossard et al., 1974; Cresswell y Nitsch, 1975), E. marginata (Bennet y McComb, 1982), E. globulus (Oka et al., 1982), E. camaldulensis (Diallo y Duhoux, 1984; Muralidharan y Mascarenhas, 1987), E. resinifera (McComb y Wroth, 1986), E. maculata (McComb y Wroth, 1986) y E. sideroxylon (Burger, 1987).

Plántulas de E. tereticornis y E. torelliana han sido obtenidas in vitro y cultivadas en plantaciones controladas, para posteriormente ser comparadas en su crecimiento con individuos obtenidos por la germinación de semillas (Khuspe et al., 1987). Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la idea de utilizar las

técnicas de cultivo de tejidos vegetales en la propagación clonal de aquellos individuos que manifiesten características sobresalientes.

VI. CONCLUSIONES.

La formación de callos en los cultivos de ápice y segmentos de raíz, hipocótilo y cotiledón de E. cinerea depende del suministro de reguladores del crecimiento vegetal en el medio de cultivo. Es excepcional que la formación del callo ocurra en ausencia de ANA mientras que en ausencia de K es más frecuente, dentro del rango de concentraciones probado, y no ocurre en ausencia de los dos reguladores del crecimiento.

Los mayores porcentajes de formación de callo ocurren conforme aumenta el nivel de K y en conjunción con las mayores concentraciones de ANA, dentro del rango de concentraciones estudiado, por lo que el papel asignado a la K en esta especie y en estos explantes es el de aumentar el efecto inductor del ANA.

Los diferentes explantes son afectados de manera distinta por ANA y K, quizá debido a su estado fisiológico y de diferenciación particular. El explante más sensible a la inducción de callo fue el hipocótilo, el menos sensible el ápice, probablemente a que porta al meristemo apical caulinar, y en grado intermedio se encuentran el cotiledón y la raíz.

El crecimiento de los diferentes explantes se vió influenciado por los reguladores del crecimiento empleados, en ausencia de K el ANA promovió el alargamiento celular y el aumento de volumen de las células, la K sola y junto con ANA promovió la división celular, igualmente, los mayores valores de peso fresco y seco se encontraron en las concentraciones más altas de los reguladores, para raíz e hipocótilo; el cotiledón y el ápice exhibieron un comportamiento diferente, el mayor crecimiento del cotiledón se encontró en los niveles bajos e intermedios (0.1, 1.0 y 2.0 mg/l) de la citocinina y para el ápice en ausencia de citocinina y en sus niveles de 0.1 y 5.0 mg/l, pero en ambos explantes siempre en el nivel más alto de ANA, excepto con ANA y K a 0.1 mg/l.

Los valores de peso fresco y seco de los 4 explantes estuvieron relacionados con la formación de callo, así, los valores más bajos de peso fresco y seco correspondieron generalmente a los tratamientos donde no hubo producción de callo, mientras que los más altos a los que sí condujeron a su formación.

El crecimiento fue diferente según el explante cultivado, las mayores biomásas correspondieron al ápice y al cotiledón, les siguió el hipocótilo y el que menor crecimiento manifestó fue la raíz. Se pudo ver entonces que las características propias de cada explante provocan respuestas diversas, tanto en la inducción del callo como en su crecimiento.

El desarrollo de los ápices exhibió desviaciones del desarrollo normal de la plántula de E. cinerea como

efecto de los reguladoras del crecimiento utilizados, tales desviaciones correspondieron a un incremento en la biomasa, disminución de la longitud del tallo y número de hojas distinto (mayor o menor según el tratamiento aplicado).

Este es el primer trabajo realizado empleando cultivos de tejidos de E. cinerea, es necesario continuar la investigación particularmente en lo que respecta a sus aspectos citológico, histológico, bioquímico y fisiológico, principalmente, para poder contribuir al mejor conocimiento de la biología de esta especie en particular y en general de las especies forestales.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- Aitchison, P.A., A.J. McLeod and M.M. Yeoman. 1977. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In, Street, H.E. (ed.), Plant tissue and cell culture. Botanical Monographs, vol. 11, 2nd edn., Blackwell Scientific Pub., Great Britain.
- Aneja, S. and C.K. Atal, 1969. Plantlet formation in tissue cultures from lignotubers of Eucalyptus citriodora Hook. Curr. Sci., 38:69.
- Bachelard, E.P. and B.B. Stowe. 1963. Growth invitroof roots of Acer rubrum L. and Eucalyptus camaldulensis Dehn. Physiol. Pl., 16:20-30.
- Barba, A.A. 1987a. Reguladores del crecimiento vegetal. En, Hurtado M.D.V. y M.M.E. Merino (eds.), Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, México.
- , 1987b. Obtención y cultivo de protoplastos. En, Hurtado M.D.V. y M.M.E. Merino (eds.), Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, México.
- Bennett, I.J. and J.A. McComb. 1982. Propagation of Jarrah (Eucalyptus marginata) by organ and tissue culture. Aust. For. Res., 12:121-127.
- Bentham. 1866. Eucalyptus cinerea F.v.Muell. Flora Aust., 3:239.
- Bidweel, R.G.S. 1979. Fisiología vegetal. AGT editor, México.
- Bold, H.C. 1957. Morphology of plants. Harper and Row Pub., USA.
- Bonga, J.M. 1977. Applications of tissue culture in forestry. In, Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj (eds.), Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, New York, USA.
- Burger, D.W. 1987. In vitro micropropagation of Eucalyptus sideroxylon. HortScience, 22:496-497.
- Curir, P., C. Damiano and T. Cosmi. 1986. In vitro propagation of Eucalyptus gunnii Hook and Eucalyptus stuartiana F.v.M. HortScience, 21:699.
- Cresswell, R. and C. Nitsch. 1975. Organ culture of Eucalyptus grandis L. Planta, 125:87-90.

- Damiano, C., P. Curir and T. Cosmi. 1986. In vitro micrografting of Eucalyptus spp. HortScience, 21:684.
- Daniel, W.W. 1982. Bioestadística. Base para el análisis de datos de las ciencias de la salud. 3a. reimp., LIMUSA, México.
- Devlin, R.M. 1980. Fisiología vegetal. Omega, España.
- de Fossard, R.A., C. Nitsch, R.J. Cresswell and E.C.M. Lee. 1974. Tissue and organ culture of Eucalyptus. N.Z.J. For. Sci., 4:267-278.
- Diallo, N. and E. Duhoux. 1984. Organogenesis and multiplication in vitro of Eucalyptus camaldulensis. J. Plant Physiol., 115:117-182 (ABSTRACT).
- Evans, P.K. and E.C. Cocking. 1977. Isolates plant protoplasts. In, Street, H.E. (ed.), Plant tissue and cell culture. Botanical Monographs, vol. 11, 2nd edn., Blackwell Scientific Pub., Great Britain.
- Everett, N.P., T.L. Wang and H.E. Street. 1978. Hormone regulation of cell growth and development in vitro. In, Thorpe, T.A. (ed.), Frontiers of plant tissue culture 1978. University of Calgary, Canada.
- Gómez-Pompa, A. 1985. Los recursos bióticos de México (reflexiones). 1a. ed., INIREB, Alhambra, México.
- Janik, J., R.W. Schery, F.W. Woods and V.W. Ruttan. 1974. Plant Science. An introduction to world crops. 2nd edn., W.H. Freeman and Co., USA.
- Jiménez, R.J. 1983. ¿Debemos reforestar los bosques de pino con los eucaliptos? Ciencias, #4:40-41.
- Karnosky, D.F. 1981. Potential for forest tree improvement via tissue culture. BioScience, 31:114-120.
- Konar, R.N. and R. Nagmani. 1974. Tissue culture as a method for vegetative propagation of forest trees. N.Z.J. For. Sci., 4:279-290.
- Khuspe, S.S., P.K. Gupta, D.K. Kulkarni, U. Mehta and A.F. Mascarenhas. 1987. Increased biomass production by tissue culture of eucalyptus. Can. J. For. Res., 17:1361-1363.
- Lakshmi Sita, G. 1979. Morphogenesis and plant regeneration from cotyledonary cultures of Eucalyptus. Plants Sci. Lett., 14:63-68.

-----, C.S. Vaidyanathan and T. Ramakrishnan. 1982. Applied aspects of plant tissue culture with special reference to tree improvement. *Curr. Sci.*, 51:88-92.

-Lawrence, G.H.W. 1951. Taxonomy of vascular plants. McMillan Co., USA.

-Mangieri, H.R. y M.J. Dimitri. 1971. Los eucaliptos en la silvicultura. Estudios botánicos y forestales de las especies más comúnmente cultivadas. ACME SACI, Argentina.

-McComb, J.A. and M. Wroth. 1986. Vegetative propagation of Eucalyptus resinifera and Eucalyptus maculata using coppice cuttings and micropropagation. *Aust. For. Res.*, 16:231-242 (ABSTRACT).

-Mendenhall, W., R.L. Scheafer y D.D. Wackerly. 1986. Estadística matemática con aplicaciones. 3a. ed., Grupo Editorial Iberoamericana, S.A., México.

-Muralidharan, E.M. and A.F. Mascarenhas. 1987. In vitro plantlet formation by organogenesis in E. camaldulensis and by embryogenesis in Eucalyptus citriodora. *Plant Cell Rep.*, 6:256-259.

-Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Pl.*, 15:473-497.

-Navarro, U.S. 1987. Cultivo de meristemos. En, Hurtado, M.D.V. y M.M.E. Merino (eds.), Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, México.

----- y E.R. Vera. 1987. Historia del cultivo de tejidos vegetales. En, Hurtado, M.D.V. y M.M.E. Merino (eds.), Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, México.

-Oka, S., E.C. Yeung and T.A. Thorpe. 1982. Shoot formation in Eucalyptus globulus hypocotyl explants. *N.Z.J. For. Sci.*, 12:501-509 (ABSTRACT).

-Owen, O. 1984. Conservación de recursos naturales. 1a. reimp., Fax-México, México.

-Paton, D.M., R.R. Willing, W. Nichols and L.D. Pryor. 1970. Rooting of stem cuttings of Eucalyptus: a rooting inhibitor in adult tissue. *Aust. J. Bot.*, 18:175-183.

-Robert, M.L. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. En, Quintero, R.R. (comp.), Prospectiva de la biotecnología en México. FJBSAC-CONACyT, México.

----- y V.M. Loyola. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. En, Robert, M.L. y V.M. Loyola

(comp.), El cultivo de tejidos vegetales en México. CICY-CONACyT, México.

-Rojas, G.M. y Rovalo, M. 1985. Fisiología vegetal aplicada. 3a. ed., McGraw Hill, México.

-Sánchez, J.E. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en la investigación básica. En, Robert, M.L. y V.M. Loyola (comp.), El cultivo de tejidos vegetales en México. CICY-CONACyT, México.

-Schery, R.W. 1952. Plant for man. 2nd edn., Prentice-Hall Inc., USA.

-Skoog, F. and D.J. Armstrong. 1970. Cytokinins. Ann. Rev. Plant Physiol., 21:359-384.

-Steward, F.C. 1963. The control of growth in plant cells. Sci. Am., 209:104-113.

-Street, H.E. 1977. Introduction. In, Street, H.E. (ed.), Plant tissue and cell culture. Botanical Monographs, vol. 11, 2nd edn., Blackwell Scientific Pub., Great Britain.

-Tisserat, B. 1985. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In, Dixon, R.A. (ed.), Plant cell culture. A practical approach. IRL PRESS; England.

-Tran Thanh Van, T. and H. Trinh. 1978. Morphogenesis in thin cell layers: concept, methodology and results. In, Thorpe, T.A. (ed.), Frontiers of plant tissue culture 1978. University of Calgary, Canada.

-Villalobos, V.M. 1985. Las bases morfogénicas en la micropropagación de especies perennes. En, Robert M.L. y V.M. Loyola, (comp.), El cultivo de tejidos vegetales en México. CICY-CONACyT, México.

-----, T.A. Thorpe y E.C. Yeung. 1983. El papel del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo, 51:43-59.

-Vera, E.R. 1987. Bioestadística aplicada al cultivo de tejidos vegetales. En, Hurtado, M.D.V. y M.M.E. Merino (eds.), Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, México.

-Wareing, R.F. and I.D.J. Phillips. 1973. The control of growth and differentiation in plants. Pergamon Press, LTD, Great Britain.

-White, P.R. 1943. A handbook of plant tissue culture. The Jaques Cattell Press, Lancaster, Penn., USA.

-Winton, L. 1978. Morphogenesis in clonal propagation of woody plants. In, Thorpe, T.A. (ed.), *Frontiers of plant tissue culture 1978*. University of Calgary, Canada.

-Yeoman, M.M. and E. Forche. 1980. Cell proliferation and growth in callus cultures. In, Vasil, I.K. (ed.), *Perspectives in plant cell and tissue culture*. International Review of Cytology, Supplement 11A. Ac. Press, USA.

----- and A.J. McLeod. 1977. Tissue (callus) cultures - Techniques. In, Street, H.E. (ed.), *Plant tissue and cell culture*. Botanical Monographs, vol. 11, 2nd edn., Blackwell Scientific Pub., Great Britain.