



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIO DEL EFECTO DE NaCl Y KANAMICINA
EN LOS PROCESOS DE DIVISION CELULAR,
REDIFERENCIACION Y DESARROLLO DE YEMAS
DE *Lycopersicon esculentum* Y *Saccharum officinarum*."

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIOLOGO

PRESENTA:
JUANA JUAREZ MUÑOZ.

MEXICO, D. F.

1989.

FALLA DE ORIGEN



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

	PÁG.
INDICE DE CUADROS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	5
2.1. <i>Lycopersicon</i> spp.	5
2.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA	6
2.1.2. REPRODUCCIÓN	7
2.2. <i>Saccharum</i> spp.	8
2.2.1. DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA	9
2.2.2. REPRODUCCIÓN	10
2.3. CULTIVO DE TEJIDOS Y APLICACIONES	11
2.4. ORGANOGÉNESIS	11
2.5. EMBRIOGÉNESIS	12
2.6. USO DE LOS ANTIBIÓTICOS	13
2.7. ESTUDIOS CON NaCl <i>in vitro</i>	17
III. MATERIALES Y METODOS	22
3.1. REACTIVOS	22
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO	22
3.3. MEDIOS DE CULTIVO	22
3.4. SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETATIVO	25
3.5. DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETATIVO	27

	PÁG.
3.6. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS	27
3.7. INCUBACIÓN	28
3.8. EFECTO DEL NaCl Y KANAMICINA EN EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE <i>L. esculentum</i> Y <i>S. officinarum</i>	29
3.8.1. EFECTO DEL NaCl Y KANAMICINA EN EL PROCESO DE REDIFERENCIACIÓN DE <i>S. officinarum</i> .	29
3.8.2. EFECTO DEL NaCl Y KANAMICINA EN EL DESARROLLO DE ÁPICES DE TALLOS DE <i>L. esculentum</i> ,	30
IV. RESULTADOS	31
4.1. DETERMINACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS ESTÁTICOS DE <i>L. esculentum</i> Y <i>S. officinarum</i> .	31
4.2. EFECTO DEL ANTIBIÓTICO KANAMICINA EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA.	34
4.3. EFECTO DEL NaCl EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA.	37
4.4. EFECTO DE KANAMICINA SOBRE EL PROCESO DE REDIFERENCIACIÓN CELULAR DE <i>S. officinarum</i> .	42
4.5. EFECTO DEL NaCl SOBRE EL PROCESO DE REDIFERENCIACIÓN CELULAR DE <i>S. officinarum</i> .	45
4.6. EFECTO DE KANAMICINA EN EL DESARROLLO DE ÁPICES Y YEMAS AXILARES DE TALLOS DE <i>L. esculentum</i> .	45
4.7. EFECTO DEL NaCl EN EL DESARROLLO DE ÁPICES Y YEMAS AXILARES DE TALLOS DE <i>L. esculentum</i> .	48
V. DISCUSION	51
5.1. EFECTO DEL NaCl EN CÉLULAS DE <i>L. esculentum</i> Y <i>S. officinarum</i> EN TRES ESTADOS DE ORGANIZACIÓN.	51
5.2. EFECTO DEL ANTIBIÓTICO KANAMICINA EN CÉLULAS DE <i>L. esculentum</i> Y <i>S. officinarum</i> EN TRES ESTADOS DE ORGANIZACIÓN.	57

PÁG.

VI. CONCLUSIONES	59
VII. BIBLIOGRAFIA	61
VIII. APENDICE	69

INDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁG.
1	EFEECTO DE KANAMICINA EN EL PROCESO DE REDIFERENCIACIÓN DE CALLOS DE SEGMENTOS DE TALLOS DE <i>S. officinarum</i> . LOS CULTIVOS SE INCUBARON EN MEDIO SMS S/H A $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, POR UN PERÍODO DE 30 DÍAS.	43
2	EFEECTO DEL NaCl EN EL PROCESO DE REDIFERENCIACIÓN DE CALLOS DE SEGMENTOS DE TALLOS DE <i>S. officinarum</i> . LOS CULTIVOS SE INCUBARON EN MEDIO SMS S/H A $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, POR UN PERÍODO DE 30 DÍAS.	46
3	EFEECTO DE KANAMICINA EN EL DESARROLLO DE ÁPICES Y YEMAS AXILARES DE TALLOS DE <i>L. esculentum</i> . LOS CULTIVOS SE INCUBARON EN MEDIO CN A $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, POR UN PERÍODO DE 30 DÍAS.	48
4	EFEECTO DEL NaCl EN EL DESARROLLO DE ÁPICES Y YEMAS AXILARES DE TALLOS DE <i>L. esculentum</i> . LOS CULTIVOS SE INCUBARON EN MEDIO CN A $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, POR UN PERÍODO DE 30 DÍAS.	49

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁG.
1	CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES DE <i>L. esculentum</i> INCUBADOS EN MEDIO 6MS A $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$.	32
2	CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES DE <i>S. officinarum</i> INCUBADOS EN MEDIO 5MS A $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$.	33
3	EFFECTO DE KANAMICINA EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE CULTIVOS DE <i>L. esculentum</i> INCUBADOS A $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, EN MEDIO 6MS CONTENIENDO DE 0 A 25 $\mu\text{G}/\text{ML}$ DE KANAMICINA. CADA BARRA REPRESENTA LA MEDIA DE DIEZ FRASCOS POR CONCENTRACIÓN. LA BIOMASA SE EVALUÓ EN BASE AL PESO FRESCO DE LA MASA CELULAR.	35
4	EFFECTO DE KANAMICINA EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE CULTIVOS CELULARES DE <i>S. officinarum</i> INCUBADOS A $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, EN MEDIO 5MS CONTENIENDO DE 0 A 100 $\mu\text{G}/\text{ML}$ DE KANAMICINA. CADA BARRA REPRESENTA LA MEDIA DE DIEZ FRASCOS POR CONCENTRACIÓN. LA BIOMASA SE EVALUÓ EN BASE AL PESO FRESCO DE LA MASA CELULAR.	36
5	EFFECTO DEL NaCl EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE CULTIVOS CELULARES DE <i>L. esculentum</i> INCUBADOS A $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ EN MEDIO 6MS CONTENIENDO DE 0 A 1.2% DE NaCl . CADA BARRA REPRESENTA LA MEDIA DE DIEZ FRASCOS POR CONCENTRACIÓN. LA BIOMASA SE EVALUÓ EN BASE AL PESO FRESCO DE LA MASA CELULAR.	38
6	APARIENCIA DE CALLOS DE <i>L. esculentum</i> DESPUÉS DE 30 DÍAS DE INCUBACIÓN EN PRESENCIA DE NaCl .	39

FIGURA		PÁG.
7	EFFECTO DEL NaCl EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE CULTIVOS CELULARES DE <i>S. officinarum</i> INCUBADOS A $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, EN MEDIO 5MS CONTENIENDO DE 0 A 1.2% DE NaCl, CADA BARRA REPRESENTA LA MEDIA DE DIEZ FRASCOS POR CONCENTRACIÓN, LA BIOMASA SE EVALUÓ EN BASE AL PESO FRESCO DE LA MASA CELULAR.	40
8	APARIENCIA DE CALLOS DE <i>S. officinarum</i> INCUBADOS EN OBSCURIDAD CONSTANTE A $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$.	41
9 A	ASPECTO DE LAS PLÁNTULAS REGENERADAS A PARTIR DE CÉLULAS DESDIFERENCIADAS DE <i>S. officinarum</i> , LOS CULTIVOS SE INCUBARON A $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ EN MEDIO 5MS S/H SUPLEMENTANDO CON KANAMICINA.	44
9 B	ASPECTO DE LAS PLÁNTULAS REGENERADAS A PARTIR DE CÉLULAS DESDIFERENCIADAS DE <i>S. officinarum</i> . LOS CULTIVOS SE INCUBARON A $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ EN MEDIO 5MS S/H SUPLEMENTANDO CON NaCl.	47
10	DESARROLLO DE ÁPICES DE <i>L. esculentum</i> INCUBADOS A $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, EN MEDIO CN SUPLEMENTANDO CON KANAMICINA O NaCl.	50

RESUMEN

Los antibióticos se han utilizado frecuentemente para controlar la contaminación o bien con fines de selección de clones celulares animales y vegetales y las sales (NaCl y KCl) para mantener el equilibrio osmótico o en la selección de líneas celulares resistentes a salinidad. Sin embargo, existe muy poca información sobre los efectos colaterales en la biología de los cultivos (división celular y morfogénesis).

Al determinar el efecto del NaCl y del antibiótico kanamicina en tres estados de organización de las células de *L. esculentum* y *S. officinarum*, a lo largo de tres transplantes consecutivos en el mismo medio se encontró que a nivel de células desdiferenciadas la kanamicina inhibió gradualmente la producción de biomasa en ambas especies, hasta 80% en el tercer ciclo de cultivo.

En el proceso morfogenético la kanamicina también interfirió el patrón de desarrollo: Inhibió la regeneración de raíces de *S. officinarum* y en ápices de tallos de *L. esculentum*, además de inhibir el desarrollo del sistema radical se redujo la presencia de los pigmentos verdes y el crecimiento de los tallos.

El NaCl de manera similar a lo que ocurrió en el caso del antibiótico inhibió la producción de biomasa en las dos especies, sin embargo, mientras que en cultivos de *L. esculentum* desarrollados en presencia de 1.2% P/V la producción de biomasa, gradualmente fue incrementándose a lo largo de los tres ciclos de crecimiento representado con 20%, 45% y 70% en relación al testigo, tendencia que se observó a concentraciones menores, en el caso de *S. officinarum*, en el tercer ciclo de crecimiento no se detectó ningún incremento. En el proceso de regeneración de plántulas a partir de ápices y yemas laterales del tallo o de células desdiferenciadas, el grado de inhibición detectado fue proporcional a la concentración de sal presente en el medio, llegando a 100% en presencia de 1.2% P/V de NaCl en el medio de cultivo.

I. INTRODUCCION

Tanto los antibióticos como ciertas sales inorgánicas se han utilizado mezclados en los medios de cultivo: los antibióticos para reducir la frecuencia de contaminación en cultivos *in vitro* de células animales y vegetales o con fines de selección, dado que éstos son marcadores genéticos que pueden ser detectados con relativa facilidad; las sales para mantener el equilibrio osmótico o bien con la finalidad de obtener líneas celulares resistentes a niveles elevados de salinidad como el cloruro de sodio.

Los antibióticos son metabolitos secundarios de bajo peso molecular que específicamente interfieren con el desarrollo de los microorganismos. En base a esta propiedad han sido utilizados en forma individual o en combinaciones para evitar la contaminación durante el establecimiento de cultivos *in vitro* de tejidos y órganos vegetales, principalmente en el caso de contaminaciones sistémicas donde el uso de estos compuestos es necesario para controlar la contaminación y asegurar el éxito de los cultivos, o bien en ciertos materiales como el pólen o las semillas de algunas especies en las que no es recomendable efectuar la desinfección con sustancias como el hipoclorito de sodio dado que se altera la viabilidad de las mismas.

Dado que el uso de los antibióticos y el NaCl tiende a incrementarse en los cultivos *in vitro* se requiere por lo tanto determinar los efectos colaterales de estas sustancias en los procesos como: División celular y morfogénesis, para hacer un uso más racional de dichas sustancias y asegurar los resultados que se propone obtener un investigador en este campo.

Zamcki y Umiel (1978) demostraron que ciertas concentraciones de estreptomycin inhiben la formación de los pigmentos verdes y el crecimiento de las células desdiferenciadas de *Nicotiana tabacum* (Tabaco) y que esto se debió a que la estreptomycin al igual que la kanamicina inhiben la síntesis de proteínas en cloroplastos y mitocondrias de las células de eucariotes de manera similar como ocurre en las células de procariotes. Sin embargo, Owens en 1979 indicó que en cultivos de *Daucus carota* (Zanahoria) y *N. tabacum* concentraciones relativamente bajas de kanamicina promueven la expresión del potencial morfogenético. La exposición prolongada de las células o tejidos en presencia del antibiótico puede dar como resultado el desarrollo de líneas celulares resistentes a estas drogas. Existen trabajos (Cella *et al.*, 1984, 1987; Schimke, 1980; Scott *et al.*, 1986; Stark, 1984) que intentan explicar los mecanismos mediante los cuales las células somáticas adquieren resistencia a los antibióticos, específicamente en el caso de la resistencia a metotrexato se han descrito tres posibles mecanismos. El primero consiste en una mutación que modifica a la proteína

membranal modificando el transporte del compuesto hacia el interior de la célula. El segundo está relacionado con una mutación que reduce el grado de afinidad de la enzima dihidrofolato reductasa por el compuesto. El último mecanismo, propone el incremento de esta enzima en la célula para contrarrestar a las moléculas de metotrexato que se encuentren asociadas a la enzima, como resultado de un proceso de amplificación de genes.

Con frecuencia se utilizan azúcares como el manitol y el sorbitol o sales como el KCl y NaCl en el cultivo de células y de manera especial, en el cultivo de protoplastos de células vegetales, para mantener el equilibrio osmótico que permite la integridad de estas células sin pared. Si bien los azúcares mencionados son más utilizados que las sales, el NaCl ha sido empleado para provocar tensión en la célula y obtener así mediante procesos de selección, líneas celulares resistentes a dicha sal.

Debido al uso de antibióticos y sales en los medios de cultivo cada vez más generalizado, es necesario determinar los efectos colaterales de estas sustancias en las células vegetales, por lo que en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- a) Estudiar el efecto de kanamicina y del NaCl en la producción de biomasa en cultivos estáticos *in vitro* de *Lycopersicon esculentum* (Jitomate) y *Saccharum officinarum* (Caña de azúcar).

- b) Determinar el efecto de kanamicina y del NaCl en el proceso de la obtención de plántulas *in vitro* a partir de células desdiferenciadas de *S. officinarum*.
- c) Estudiar el efecto de kanamicina y del NaCl en el desarrollo de plántulas a partir de ápices de los tallos de *L. esculentum*.

II. ANTECEDENTES

2.1. *Lycopersicon* spp.

El jitomate pertenece al género *Lycopersicon* de la familia de las Solanáceas. Este género incluye las especies *L. cheesomani*, *L. chilense*, *L. chmielewskii*, *L. esculentum*, *L. hirsutum*, *L. pennellii*, *L. peruvianum*, *L. pimpinellifolium*, (Warnock, 1988). Las especies silvestres son originarias de Sudamérica, más concretamente de la región andina (Rut *et al.*, 1983, Rick, 1978), aunque posteriormente fueron llevadas por los distintos pobladores de un lugar a otro extendiéndose por todo el continente. La domesticación del cultivo parece haberse iniciado en México. Esta idea se apoya en estudios enzimáticos los cuales indican que existe una mayor relación entre los antiguos cultivares Europeos y los cultivares primitivos de México y Centro América (Rick, 1978).

Su nombre deriva de la lengua náhuatl de México, donde se le llamaba tomatl.

La planta fue cultivada durante mucho tiempo en Europa como ornamental, dado que se le creía venenosa, por su relación con plantas de la familia de las Solanáceas tales como el beleño, belladona y otras. El alcaloide causante de la pretendida toxicidad en el jitomate es la tomatina, que se encuentra principalmente en las hojas y el fruto verde, pero

que se degrada al madurar (Rodríguez *et al.*, 1984). Superada esta idea y debido a que es una planta que se adapta a una gran variedad de climas, con excepción de aquellos en que se producen heladas, se cultiva en diferentes regiones del mundo.

En México se cultiva principalmente en los estados de Campeche, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa y Sonora.

El jitomate forma parte de la alimentación en varios países por lo que tiene importancia económica para los países productores (Brasil, China, Egipto, España, Grecia, Italia, México, URSS) dado que la mayor parte de la producción se exporta (Kut *et al.*, 1983).

2.1.1. Descripción de la planta

El tallo es erecto durante los primeros estadios del desarrollo, pero posteriormente se tuerce a consecuencia del peso, puede medir hasta dos metros de longitud. Su superficie es angulosa y esta provista de pelos y glándulas productoras de la sustancia llamada tomatina (Rodríguez *et al.*, 1984).

Las hojas son compuestas y alternas. El limbo se divide en siete, nueve y hasta once foliolos.

Las flores se encuentran formando inflorescencias que pueden ser de cuatro tipos: Racimo simple, cima uniflora,

cima bípara, cima múltipara, pudiendo llegar a tener hasta 50 flores por inflorescencia. La flor está formada por un pedúnculo corto, el cáliz es gamosépalo y la corola gamopétala. El androceo está constituido de cinco o más estambres unidos a la corola. El gineceo presenta de dos a treinta carpelos.

El fruto es una baya de color rosado o rojo debido a la presencia de licopinas y carotinas. Pueden ser redondos, achatados o en forma de pera y de tamaño variable.

Las semillas son grisáceas, de forma oval, aplanada y miden de 2 a 3 mm de diámetro.

El sistema radical está constituido por una raíz principal que puede alcanzar hasta 60 cm de profundidad, simultáneamente se desarrollan raíces adventicias (Rodríguez *et al.*, 1984).

2.1.2. Reproducción

El jitomate es una especie autógena que se reproduce por semilla (reproducción sexual), bajo condiciones de invernadero o al aire libre. La aplicación de las técnicas de mejoramiento genético han permitido obtener un mayor rendimiento y calidad de este cultivo.

2.2. *Saccharum* spp

La caña de azúcar es un miembro del género *Saccharum* de la tribu Andropogoneae, familia Gramineae. Las especies de *Saccharum* son generalmente poliploides, no se conocen di ploidés. La variabilidad interespecífica del número de cro mosomas y mantenimiento de aneuploidias son características de la caña de azúcar. Este género incluye las especies *S. barberi*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. spontaneum* (Liu, 1983).

Todas las variedades comerciales de caña de azúcar, co nocidas como nobles, pertenecen a la especie *S. officinarum* y su número cromosómico es $2n = 80$ (Clemens, 1980).

El género *Saccharum* es originario de las regiones tró- picales de la Melanesia. Su área de dispersión primitiva abarcó la Polinesia y el sureste del Continente Asiático (Clemens, 1980; Sánchez, 1972).

Se considera a la India como el país de origen de la caña de azúcar y el lugar donde el azúcar fue producida des de épocas muy remotas. En un principio, la caña de azúcar se utilizó para mascar o producir un material sólido llama- do Gur, resultante de la deshidratación por ebullición del ju go obtenido de su molienda.

El cultivo de la caña de azúcar fue introducido a Mé- xico en el año de 1525, en el cantón de Santiago Tuxtla, hoy conocido como San Andrés Tuxtla, en el estado de Vera-

El tallo está formado por una sucesión alterna de nudos y entrenudos. Los nudos están limitados por una zona de color más claro y generalmente poseen un diámetro diferente al del entrenudo, en cada nudo se inserta una hoja y una yema (Sánchez, 1972).

Las hojas son alternas y están constituidas por el limbo y la vaina o parte inferior de la hoja que está pegada al tallo en el nudo. Los entrenudos de la región apical del tallo presentan un gran número de hojas aglomeradas que forman un penacho o cogollo.

Las flores se encuentran formando inflorescencias del tipo panícula o flecha.

La caña de azúcar produce semillas del tipo cariospide las cuales a diferencia de los otros cereales tiene un alto grado de heterocigocidad por lo cual no se utilizan comercialmente (Clements, 1980).

2.2.2. Reproducción

La caña de azúcar se propaga mediante reproducción sexual o asexual. Debido a que las variedades cultivadas son altamente heterocigotas, en el cultivo comercial de la caña se prefiere recurrir a la reproducción asexual ya que este tipo de reproducción permite conservar las características de las variedades a través del tiempo.

El cultivo generalmente se propaga por estacas o frag

ciones de tallos que tengan una o más yemas, generalmente se usa como "semilla" caña joven de 6 a 9 meses de edad (Humbert, 1984).

2.3. Cultivo de tejidos y aplicaciones

La técnica de cultivo de tejidos se refiere al desarrollo de células vegetales en diferentes estados de organización, en un medio nutritivo apropiado y bajo condiciones ambientales controladas. Esta técnica se ha empleado para realizar estudios fisiológicos (Binzel *et al.*, 1985; Bressan *et al.*, 1982; Epstein, 1980; Flowers *et al.*, 1986; Handa *et al.*, 1982), Citológicos (Carrillo *et al.*, 1986; Nilsson, 1986), bioquímicos (Ishida *et al.*, 1971; 1973; Rawal *et al.*, 1985), patológicos (Schaffner, 1979; Shields *et al.*, 1984) y otros; así como para la propagación y mejoramiento de especies agrónomicamente importantes (Thorpe, 1981, Evans *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1982; Ojeda y Carrillo, 1980).

La regeneración de plántulas *in vitro* es posible mediante los procesos de organogénesis y de embriogénesis somática, explicados a continuación:

2.4. Organogénesis

En cultivos de tejidos la organogénesis se refiere a la iniciación de estructuras organizadas a partir de tejidos no diferenciados (Dodds y Roberts, 1985). La organogénesis se manifiesta primordialmente con la formación de meristemoi-

des los cuales posteriormente darán origen a brotes o raíces (Torrey, 1966).

La organogénesis depende del tipo de explante utilizado, así como de la selección apropiada del medio de cultivo y el control del medio ambiente físico (Thorpe, 1980).

Mediante este sistema se han regenerado plántulas de *N. tabacum*, *D. innoxia*, *L. esculentum*, *Petunia hybrida*, *Medicago sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Picea abies*, *Citrus limettoides*, *Solanum tuberosum*, *Browallia viscosa*, *Arabidopsis thaliana* y otras especies (Flick et al., 1983).

2.5. Embriogénesis

Es el proceso de iniciación y desarrollo de un embrión a partir de un cigoto.

La embriogénesis somática se refiere a la formación de estructuras semejantes a embriones (embroides) a partir de células somáticas (Dodds y Roberts, 1985). El embrión somático presenta bipolaridad al igual que el embrión cigótico. Su desarrollo y germinación se lleva a cabo mediante los mismos eventos que ocurren en el desarrollo de los embriones sexuales.

La embriogénesis asexual puede ser directa si en el inóculo existen células pre-embriogénicas o indirecta cuando se requiere de la proliferación de células no diferenciadas para posteriormente inducir la formación de embriones mediante la

manipulación del medio de cultivo (Dodds y Roberts, 1985; Tisserat, 1985).

Las primeras observaciones sobre la embriogénesis somática se realizaron en *D. carota* (Wetherell, 1963; Steward et al., 1958). La regeneración de plántulas mediante este proceso se ha observado en *Asparagus officinalis*, *Theobroma cacao*, *Coffea arabica*, *C. canephora*, *Gossypium klotzschianum*, *Citrus cinensis* (Evans et al., 1981). *Zea mays* (Rapela, 1985), *Medicago sativa* L. (Brown, 1988). *S. officinarum* L. (Ho y Vasil, 1983), y otras especies.

2.6. Uso de los antibióticos

Los antibióticos son productos microbianos de bajo peso molecular que específicamente interfieren con el desarrollo de los microorganismos (Aharonowitz y Cohen, 1981). Su sitio de acción es muy diverso abarcando casi todos los procesos importantes en el desarrollo de una bacteria. Los antibióticos betalactam, interfieren con la síntesis de la pared celular bacteriana. Las bicomocinas y antraciclinas impiden la replicación del ADN mientras que las rifemicinas inhiben la transcripción del ADN a ARNm. Los aminoglicósidos (kanamicina, estreptomocina, gentamicina y otros), se unen a la subunidad 30S de los ribosomas de las células procariontas e inhiben la síntesis de proteínas provocando una lectura errónea de los tripletes del código genético (Lehninger, 1982).

Zuzuki y Kunimoli, (citados por Pestka; 1971), demostraron que la kanamicina impide que los ribosomas se muevan a lo largo del ARNm mediante la inhibición de la síntesis del enlace peptídico. El mecanismo de inhibición de la kanamicina hace que sea considerado como un bactericida (acción irreversible) y no como bacteriostático (inhibición reversible).

Por su mecanismo de acción los antibióticos se han utilizado como una alternativa para controlar la contaminación en el establecimiento de cultivos *in vitro* de tejidos y órganos vegetales o bien en el caso del polen (Fernández *et al.*, 1981) o las semillas (Carlson *et al.*, 1983) de algunas especies no es recomendable efectuar un tratamiento aséptico superficial, debido a que puede alterarse la viabilidad de dicho material.

Teóricamente los problemas de contaminación pueden solucionarse con la incorporación de uno o más antibióticos al medio de cultivo. Desafortunadamente los tejidos vegetales son sensibles a los antibióticos y muestran diferentes respuestas.

Existen muy pocos trabajos sobre el efecto de los antibióticos en las células vegetales. Gautheret en 1959 y Butenko en 1964 (citados por Dodds y Roberts, 1985) fueron los primeros en señalar que estos compuestos pueden alterar el crecimiento y el desarrollo de las células vegetales cultivadas *in vitro*. Posteriormente se encontró que el cloranfenicol (10 µg/ml) inhibió el crecimiento de callos y la

iniciación de tallos en cultivos celulares de *Nicotiana* spp. (Maliga et al., 1980). Este mismo fenómeno se observó en cultivos en suspensión de *N. plumbaginifolia* pero a una dosis de 1 µg/ml (Pollock et al., 1983).

También se ha observado que las clorotetraciclinas en dosis de 5 µg/ml inhiben la germinación de semillas de *Pisum sativum* (Pollock et al., 1983).

Umiel y Goldner, (1976) mencionan que en cultivos de *N. tabacum* la estreptomycinina (0.5 mg/ml) interfirió con la formación de los pigmentos verdes y con el crecimiento de la masa celular desdiferenciada, lo cual se ha atribuido a que la estreptomycinina, al igual que la kanamicina, inhibe la síntesis de proteínas en cloroplastos y mitocondrias de las células vegetales de manera similar a lo que ocurre en las células de procariotes. Sin embargo, en cultivos de *D. carota* y *N. tabacum* la kanamicina (2.5 µg/ml) incrementó la diferenciación de tallos (Owens, 1979).

Pollock et al., (1983), ha demostrado que las penicilinas y cefalosporinas en dosis de 100 µg/ml no causan efectos negativos en células de *N. plumbaginifolia*. Asimismo, se ha observado que la bacitricina (50-100 ppm), griseoflavina (2.5-5 ppm) y la estreptomycinina (2.5 ppm o menos) no son tóxicos para los cultivos de *Carantus roseus* (Carew y Patterson, 1970).

Por otro lado se ha encontrado que la rifampicina a

50 µg/ml es efectiva contra los microorganismos en cultivos de *Helianthus tuberosus* sin afectar el desarrollo de las células vegetales (Phillips et al., 1981).

Los antibióticos también se han utilizado con fines de selección, dado que son marcadores genéticos que pueden ser detectados con relativa facilidad. Debido a esto, las líneas celulares resistentes a estas drogas se han empleado como marcadores selectivos en hibridación somática y técnicas de transformación para introducir nueva información genética en las células vegetales.

La resistencia a antibióticos en plantas se ha analizado más extensamente que cualquier otro mutante aislado *in vitro*, especialmente en las líneas de *N. tabacum* aisladas y caracterizadas por Maliga et al., (1973), muchos antibióticos como la estreptomycin, kanamicina y cloranfenicol interfieren con la síntesis de proteínas en procariotes y eucariotes. La estreptomycin y kanamicina son activas en los ribosomas de los procariotes, estos ribosomas también se encuentran en los cloroplastos y mitocondrias de los organismos eucariotes. De aquí que la resistencia a estos compuestos puede ser heredada como un carácter citoplasmático (Maliga et al., 1973; 1975).

Se han logrado obtener cultivos celulares de *P. hybrida* (Binding et al., 1970) y *N. tabacum* (Maliga, 1973; Umiel y Goldner, 1976; Umiel, 1979), resistentes a 0.5 mg/ml de estreptomycin. Debido a que la estreptomycin inhibe la for

mación de los pigmentos verdes y el desarrollo de la masa celular desdiferenciada, los autores tomaron como clones resistentes aquellos que presentaban color verde en presencia del antibiótico y los de color blanco que exhibían un mayor crecimiento en comparación con los otros clones. En estudios de ultraestructura (Zamski y Umiel, 1978) se encontró que los cloroplastos y mitocondrias son afectados por la estreptomicina pero que únicamente los cloroplastos mostraron evidencias estructurales de resistencia.

Por otra parte se han aislado líneas celulares de *N. tabacum* resistentes a 150 μ M de kanamicina. Sin embargo, las plantas regeneradas fueron parcialmente estériles (Owens, 1981).

2.7. Estudios con NaCl *in vitro*

Con frecuencia en el medio de cultivo de células vegetales y especialmente en el cultivo de protoplastos, se utilizan azúcares como el manitol, sorbitol, glucosa o algunas sales como el KCl y NaCl para mantener el equilibrio osmótico (Eriksson *et al.*, 1978; Jefferies, 1980), el cual juega un papel muy importante en la estabilidad, viabilidad y futuro crecimiento de las células cultivadas. Si bien las azúcares mencionadas son más utilizadas que las sales, el NaCl ha sido empleado para provocar tensión en las células y obtener mediante procesos de selección, líneas celulares resistentes a dicha sal.

Los efectos perjudiciales de la sal en las células vegetales se deben a la influencia de los iones en el medio externo, lo cual afecta el balance del agua en la planta y/o al efecto directo de los iones en las funciones fisiológicas y bioquímicas de la célula (Flowers *et al.*, 1977). El NaCl puede interferir con la permeabilidad de la membrana celular o la actividad enzimática, inhibir el crecimiento y la fotosíntesis. También puede causar deficiencia nutricional y deshidratación (Hasegawa *et al.*, 1986; Tal, 1983).

Entre las primeras investigaciones sobre el efecto del NaCl en cultivos *in vitro* se encuentran las de Babaeva *et al.*, 1968 en cultivos de *D. carota*. En los que se observó que el NaCl (1%) inhibió el crecimiento de la masa celular desdiferenciada y el proceso de diferenciación.

En otro trabajo (Goldner *et al.*, 1977) se determinó el efecto de diferentes sales orgánicas en comparación con el efecto del agua de mar así como el del manitol sobre el crecimiento y coloración de callos *D. carota*. En este experimento los autores concluyeron que el crecimiento se inhibió principalmente por el incremento en el potencial osmótico, mientras que la inhibición, de los pigmentos verdes y la necrosis de la masa celular se debió a la toxicidad de la sal.

Por otra parte al analizar el crecimiento de callos derivados de una planta halofita (*Suaeda maritima* L.) en medios sin o con NaCl, se encontró que los callos pueden cre-

cer en un medio sin sal, pero que su crecimiento se incrementa notablemente al añadir sal al medio de cultivo (Vondenstrom y Breckle, 1974).

En cultivos de *Brassica campestris* desarrollados en medio sin y con NaCl (43, 86, 171 mM) se encontró que los callos presentaban una coloración más verde en el medio con NaCl, lo cual se debió a un incremento de la concentración de clorofila en todos los casos con excepción del tratamiento con 171 mM de NaCl. También se observó que en presencia de la sal se incrementó el nivel de prolina (Paek *et al.*, 1988).

Kurtz en 1982 indicó que en cultivos celulares de *L. esculentum* el crecimiento de la masa celular se inhibió en forma gradual a medida que se incrementó la dosis de NaCl, inhibiéndose por completo a una concentración de 1.5% de NaCl.

La regeneración de plántula a partir de células de *S. officinarum* NCO-310 adaptadas a 1.5% de NaCl se inhibió drásticamente (Yasuda *et al.*, 1982).

En un estudio comparativo entre el establecimiento de callos y ápices de tallos de *L. esculentum* se encontró que los últimos tienen una mayor capacidad adaptativa para desarrollarse en medio salino (Bourgeois *et al.*, 1987).

El exceso de sales en el suelo limita el crecimiento de muchas especies vegetales. El desarrollo de plantas con

resistencia genética ha sido propuesto como un medio para la expansión de la agricultura a las regiones afectadas por la sal. Además de las técnicas tradicionales de fitomejoramiento se ha propuesto como un método alternativo; utilizar la técnica de cultivo de tejidos para producir plantas tolerantes a sal (Evans *et al.*, 1983; Garciglia *et al.*, 1985).

Mediante la técnica de cultivo de tejidos se han seleccionado líneas celulares tolerantes a sal de diferentes especies vegetales. Líneas celulares de *Oryza sativa* (Croughan *et al.*, 1981) y *M. sativa* respectivamente crecieron en presencia de 1 y 2% de NaCl. En cultivos celulares de *Ipomoea batata* se encontró que las células retienen su tolerancia a sal (1% de NaCl) después de varios subcultivos en un medio sin NaCl (Garciglia *et al.*, 1985). En cultivos de *N. sylvestris* (Dix y Street, 1975) y *C. sinensis* (Hayyin y Kochba, 1982) se mantiene el carácter de resistencia a sal (1%, 0.2M de NaCl) durante tres subcultivos en ausencia del NaCl. Este mismo fenómeno se observó en líneas celulares de *N. tabacum* var. *Grossii* adaptadas a 500 mM de NaCl (Watah *et al.*, 1985). Sin embargo, en células seleccionadas de *N. tabacum* var. *Wisconsin-38* a 1% de NaCl, se encontró que el carácter de resistencia se pierde cuando se transfieren a un medio sin NaCl (Hasegawa *et al.*, 1980).

La característica de resistencia a sal no solamente se ha manifestado a nivel celular, sino que también se ha transmitido a subsecuentes generaciones a través de la regeneración de plantas.

Se ha observado que en las plantas regeneradas de líneas celulares de *N. tabacum* tolerantes a 0.64% de NaCl, la característica de resistencia se transmite a dos subsecuentes generaciones y que la mayoría de estas plántulas sobreviven cuando se irrigan con una solución salina al 3.34% (Nabors *et al.*, 1980).

Por otra parte, se menciona que el 54% de las plántulas de *Saccharum* spp regeneradas *in vitro*, a una concentración de 1.5% de NaCl, sobrevivieron cuando fueron transferidas a suelo salino (Maribona *et al.*, 1986).

Sin embargo, la regeneración de plántulas a partir de células tolerantes a sal ha sido limitada. En muchos casos por el tiempo en que se hace la selección dado que muchas células pierden su capacidad regenerativa con el tiempo (Méndez y Carrillo, 1986) y por factores intrínsecos de cada especie.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Reactivos

Los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron de grado químicamente puro, adquiridos en: Sales inorgánicas (Merck, J.T. Kaber, Técnicas Químicas, S. A.); aminoácidos (Eastman Kodak. Co., Merck); vitaminas (Eastman Kodack. Co. y Pharmaceutical ICN); hormonas (Nakaris Chemical LTD., Sigma y Nutritional Bioquímicals. Co.); meso-inositol, sacarosa y agar (Merck); kanamicina (Bristol).

3.2. Material biológico

Como material biológico se utilizaron semillas de *L. esculentum* (jitomate) de la variedad floradade y plantas de *S. officinarum* (Caña de azúcar) variedad 2Méx. 55-32 de entre ocho y diez meses de edad en el ciclo plantilla, proporcionadas por el Campo de Investigaciones Forestales Agropecuarias de Morelos (CIFAP-MOR).

3.3. Medios de cultivo

Se emplearon los medios de cultivo de Murashige y Skoog (1962) y Cresswell y Nitsch (1975), modificados de acuerdo a las indicaciones que a continuación se presentan.

- a) 5MG (contiene las sales inorgánicas del medio de Murashige y Skoog, meso-inositol, 5.5×10^{-4} M; tiamina, 2.9×10^{-6} M; 2, 4-D, 2.2×10^{-5} M; L-cisteína, 2.8×10^{-4} M; ac. ascórbico, 5.67×10^{-4} M; agua de coco, 18% v/v).
- b) 5MS s/h (fue el medio 5MS sin 2, 4-D).
- c) 5MS-K (fue el medio 5MS conteniendo kanamicina de 25 a 100 μ g/ml según lo indica el subíndice).
- d) 5MS-S (fue el medio 5MS conteniendo NaCl de 0.8% a 1.2% p/v según lo indica el subíndice).
- e) 5MS s/h-k (fue el medio 5MS s/h conteniendo kanamicina de 25 a 100 μ g/ml según lo indica el subíndice).
- f) 5MS s/h-s (fue el medio 5MS s/h conteniendo NaCl de 0.5% a 1.2% p/v según lo indica el subíndice).
- g) 6MS (contiene las sales inorgánicas del medio de Murashige y Skoog, meso-inositol, 5.52×10^{-4} M; glicina, 2.6×10^{-5} M; tiamina, 1.48×10^{-5} M; biotina, 1×10^{-7} M; piridoxina-HCl, 2.30×10^{-6} M; ac. nicotínico, 4.06×10^{-5} M; ac. fólico, 1×10^{-6} M; ac. ascórbico, 5.67×10^{-4} M; L-glutámico, 7×10^{-3} M; L-arginina, 5.74×10^{-4} M; L-metionina, 3.35×10^{-4} M; L-cisteína, 2.85×10^{-4} M; ANA, 5×10^{-6} M; 6BAP, 7.90×10^{-6} M).
- h) 6MS-K (fue el medio 6MS conteniendo kanamicina de 6 a 25 μ g/ml según lo indica el subíndice).

- i) 6MS-S (fue el medio 6MS conteniendo NaCl de 0.5% a 1.2% p/v según lo indica el subíndice).
- j) CN (Cresswell y Nitsch).
- k) CN-K (fue el CN conteniendo kanamicina de 6 a 26 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ según lo indica el subíndice).
- l) CN-S (fue el CN conteniendo NaCl de 0.5% a 1.2% p/v según lo indica el subíndice).

La composición química de los medios se indica en el apéndice (Carrillo, 1978).

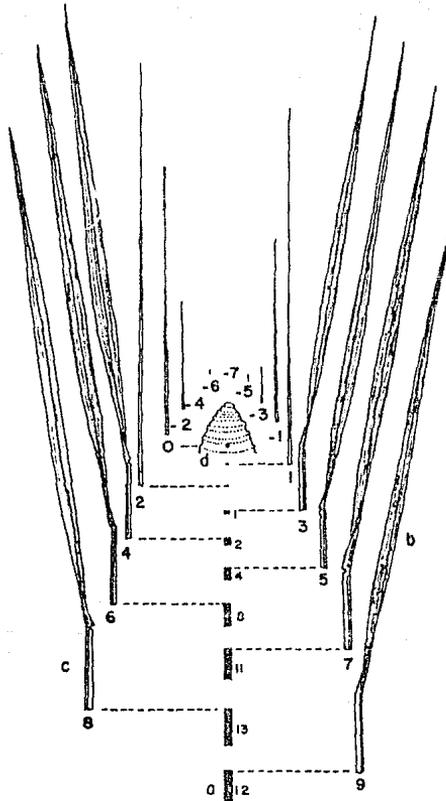
Los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas preparadas con agua bidestilada (ver apéndice). A un volumen de agua bidestilada equivalente al 50% del total del medio que se desea preparar se añadieron las cantidades necesarias de cada una de las soluciones inorgánicas concentradas, así como los constituyentes orgánicos y el agua de coco cuando fue el caso y se ajustó el pH del medio a 5.8 con NaCl o HCl 1N en un potenciómetro Sargent Welch. A continuación se aforó el volumen final con agua bidestilada, se agregó el agar y el medio se licuó con la ayuda de una parrilla eléctrica con agitación. Posteriormente se sirvieron 10 ml de medio con ayuda de una pipeta, en frascos de vidrio de 30 ml de capacidad y tapón de rosca, esterilizándose en autoclave de vapor a una presión de $1.05 \text{ kg}/\text{cm}^2$ durante 15 minutos.

Cuando los medios contenían kanamicina, ésta se agregó después de esterilizar dichos medios (debido a que se degrada con la temperatura), mezclando bien y posteriormente se sirvieron bajo condiciones asépticas, en la misma forma que la descrita en el caso anterior. La solución de kanamicina se esterilizó con membranas "Millipore" de 0.45 μ m en soporte de vidrio de 250 ml de capacidad de la misma marca, con la ayuda de una bomba de vacío.

3.4. Selección del material vegetativo

Para el establecimiento de los cultivos de células diferenciadas de *L. esculentum* se utilizaron las hojas maduras de plantas de entre 20 a 30 días de edad y en la inducción de morfogénesis se tomaron los ápices de tallo.

En el establecimiento de los cultivos de células diferenciadas de *S. officinarum* se utilizaron segmentos de la porción apical del tallo que comprendía desde el entrenudo -1 hasta la zona meristemática apical del tallo (ver Esquema 1). Estos segmentos se obtuvieron retirando las vainas de las hojas maduras de cada planta, hasta descubrir el entrenudo uno y a la altura de este se efectuó un corte para eliminar la parte basal del tallo y aproximadamente a los 10 cm de este corte, se realizó otro con la finalidad de eliminar la parte terminal del cogollo. Los extremos de los segmentos obtenidos se sellaron con parafina para posteriormente desinfectarlos.



Esquema 1. Ilustración que muestra las principales partes del extremo vegetativo del tallo de una planta de caña de azúcar (a) entrenudos; (b) hojas; (c) vaina; (d) región meristemática (Clemens, 1980).

3.5. Desinfección del material vegetativo

En todos los casos se siguió el mismo tratamiento de desinfección. El material vegetativo se colocó en un frasco de vidrio y se lavó varias veces con agua corriente. El proceso de la desinfección superficial se realizó primero sumergiendo el material en alcohol al 70% v/v durante 30 segundos, se retiró el alcohol y se adicionó una solución de hipoclorito de calcio al 3% p/v y dos gotas de Tween 20 (agente humectante), mezclándose bien y manteniéndose en ella durante 30 minutos, después de esto el material, bajo condiciones asépticas, se enjuagó cuatro veces con agua destilada estéril.

3.6. Establecimiento de los cultivos

A partir del material biológico previamente desinfectado, frente a un mechero, se obtuvieron los fragmentos de tejido vegetal utilizando pinzas y bisturí previamente flameados, en el caso de las hojas, éstas se colocaron en cajas de Petri de vidrio (100 x 15 mm) y se seccionaron en fragmentos de aproximadamente 1 cm^2 , se tomaron con las pinzas y se transfirieron al medio (6MS) de cultivo, flameando la boca del frasco antes y después de insertar el explante en el medio, conservando su polaridad como en la planta cuidando de hacerlo siempre de esta forma.

De los segmentos apicales de los tallos se aislaron los ápices de aproximadamente 5 mm de largo, los cuales se sem-

braron en medio CN de la misma manera que los fragmentos de hoja.

En la siembra de caña de azúcar el segmento se colocó en una caja de petri, se cortaron los extremos cubiertos con parafina. Posteriormente se transfirieron a otra caja donde se retiró la hoja cero (hoja externa que envuelve a las más jóvenes) y a partir del extremo donde se encuentra el nudo, se cortaron de 3 a 4 rodajas de aproximadamente 3 mm de grueso, las cuales se sembraron en el medio SMS, en la misma forma que en el caso anterior.

3.7. Incubación

Los cultivos de jitomate (ápices y células desdiferenciadas) se incubaron a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

El material de caña de azúcar se incubó en medio SMS a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, bajo condiciones de oscuridad, por períodos de 20 días al cabo de los cuales, se transfirieron a un nuevo medio. Para la regeneración de plántulas los cultivos desdiferenciados, se transfirieron a un medio para rediferenciación (SMS s/h), después del tercer período de crecimiento y se incubaron a las mismas condiciones que los cultivos de jitomate.

En todos los casos el material se transfirió cada 20 días a un medio de cultivo fresco para su conservación.

3.8. Efecto del NaCl y kanamicina en el crecimiento de células de *L. esculentum* y *S. officinarum*

Para determinar el crecimiento de los cultivos celulares de *L. esculentum* y *S. officinarum* se establecieron cinéticas de crecimiento de las dos poblaciones, evaluando los incrementos de biomasa en peso fresco cada cinco días. En el caso de *L. esculentum* se utilizó el medio 6MS y en *S. officinarum* el 5MS, medios en que los cultivos alcanzan su máximo desarrollo.

El efecto del antibiótico y del NaCl en el crecimiento de *L. esculentum* y *S. officinarum* se evaluó durante tres periodos consecutivos de 20 días cada uno, en los medios 6MS y 5MS respectivamente, suplementados con el antibiótico o con NaCl. Se utilizaron diez cultivos por tratamiento, la evaluación se realizó tomando en cuenta el peso inicial y final del inóculo, esto se hizo al final de cada periodo de incubación de 20 días. En forma cualitativa se vio la consistencia y la apariencia (pigmentación, escarchamiento) de la masa celular.

3.8.1. Efecto del NaCl y kanamicina en el proceso de rediferenciación de *S. officinarum*.

En este caso se utilizaron cultivos celulares de 60 días de incubación, los cuales se transfirieron al medio que induce el proceso de rediferenciación (5MS s/h), suplementando con kanamicina o NaCl. Se realizaron tres experimen-

tos, con un total de 10 muestras por tratamiento. Para evaluar el efecto se tomaron como criterios la diferenciación de raíces o tallos, el tamaño y la pigmentación de las plántulas regeneradas. En forma cuantitativa se determinó el porcentaje de explantes que mostraron algún tipo de diferenciación.

3.8.2. Efecto del NaCl y kanamicina en el desarrollo de ápices de tallos de *L. esculentum*

Para evaluar el efecto de estas sustancias, los ápices se sembraron directamente en el medio CN suplementado con kanamicina o NaCl, el tamaño de la muestra fue de 10 cultivos por tratamiento y se realizaron 4 experimentos. La evaluación se hizo en la misma forma que en el caso anterior.

IV. RESULTADOS

4.1. Determinación de las cinéticas de crecimiento de cultivos estáticos de *L. esculentum* y *S. officinarum*.

El primer objetivo de este trabajo, fue establecer las cinéticas de la producción de biomasa, en los cultivos celulares de *L. esculentum* y *S. officinarum*, para lo que se realizaron las cinéticas de crecimiento de las dos poblaciones celulares, evaluando los incrementos de biomasa en peso fresco cada cinco días en los medios 6MS y 5MS respectivamente. En la figura 1 se muestran las diferentes fases de la cinética de crecimiento de los cultivos de *L. esculentum*, en donde puede apreciarse una fase lag entre los 0-5 de incubación, seguida de un crecimiento exponencial hasta los 10 días de cultivo con una pendiente de 60 la cual se determinó mediante la ecuación $m = \frac{Y_2 - Y_1}{X_2 - X_1}$, entre los 10 y 12 días se observó una fase de desaceleración, la cual es seguida de una fase estacionaria. Al inicio de la fase estacionaria se obtuvo la mayor producción de biomasa. En este caso el peso del inóculo se incrementó hasta 5 veces. En los cultivos de *S. officinarum* (figura 2) se observó una fase lag entre los 0 a 4 días de incubación, seguida de una fase exponencial hasta los 17 días de cultivo con una pendiente de 40 la cual se definió de la misma manera que en el caso anterior, entre los 17 a 22 días se puede apreciar una fase

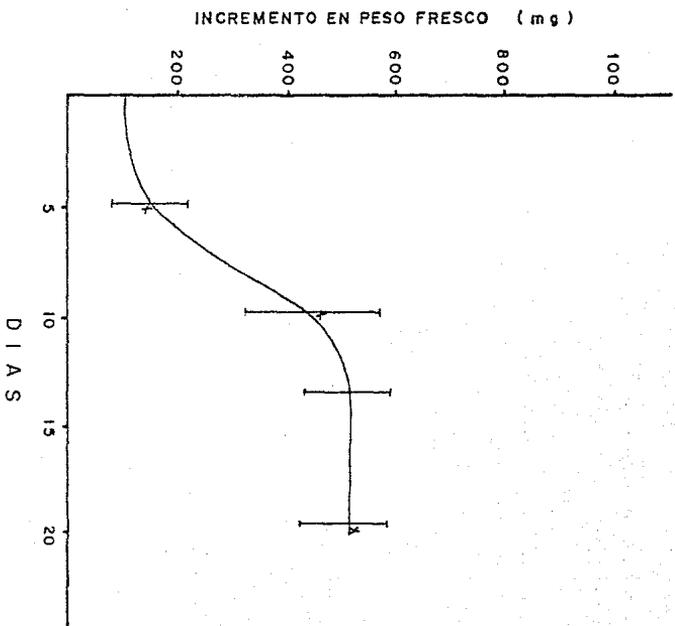


Figura 1. Cinética de crecimiento de cultivos coluñares de *L. esculentum* incubados en medio 6MS a 26 ± 2°C.

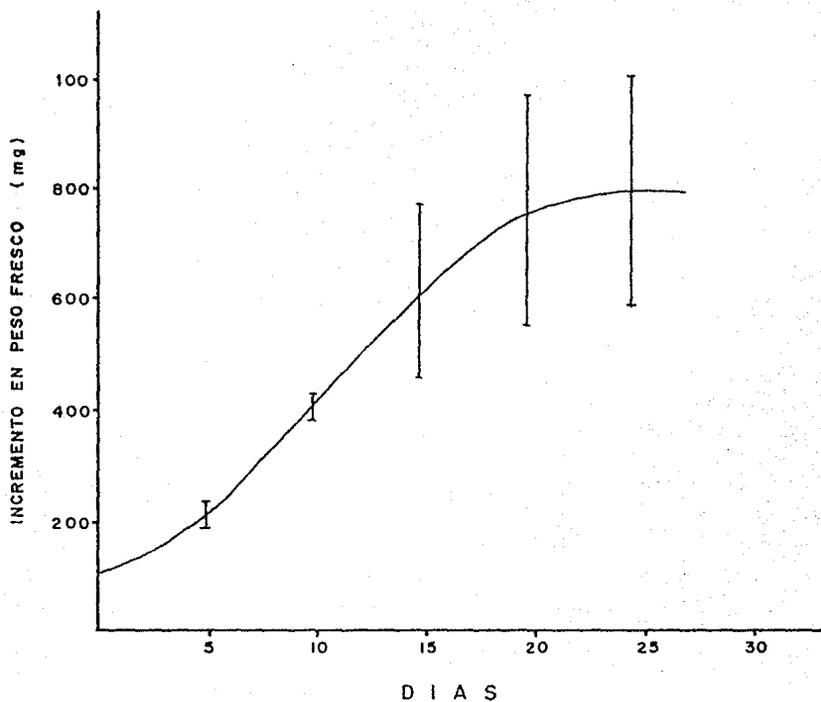


Figura 2. Cinética de crecimiento de cultivos celulares de *S. officinarum* incubados en medio 5MS a $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

de desaceleración la cual es presedida de una fase estacionaria. Al inicio de la fase estacionaria se notó la mayor producción de biomasa. En este caso el peso del inóculo, se incrementó aproximadamente 8 veces.

4.2. Efecto del antibiótico kanamicina en la producción de biomasa.

El conocimiento de la naturaleza de la cinética de crecimiento nos indicó el tiempo mínimo en que puede obtenerse la máxima producción de biomasa. A continuación se procedió a determinar el efecto de kanamicina en el desarrollo de las dos poblaciones celulares, durante tres períodos consecutivos de 20 días cada uno. En el caso de *L. esculentum* se utilizó el medio 6MS y en *S. officinarum* el 5MS. En la figura 3 se muestra que en presencia de 25 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina el peso de la biomasa de *L. esculentum* disminuyó en relación al testigo en 45%, 70% y 80%, durante el primer, segundo y tercer período de incubación respectivamente. El mismo patrón de desarrollo se observó en los otros cultivos a las concentraciones de 6 $\mu\text{g/ml}$ y 12 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina, aunque al mismo nivel de reducción lo que implicó más efecto de la concentración de la kanamicina.

En la figura 4 puede apreciarse que en presencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina el peso de la biomasa de *S. officinarum* disminuyó con respecto al testigo en 50%, 80% y 80% durante el primero, segundo y tercer período de incubación respectivamente. Esta misma tendencia se observó en los otros cultivos a las concentraciones de 25 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$ de kana-

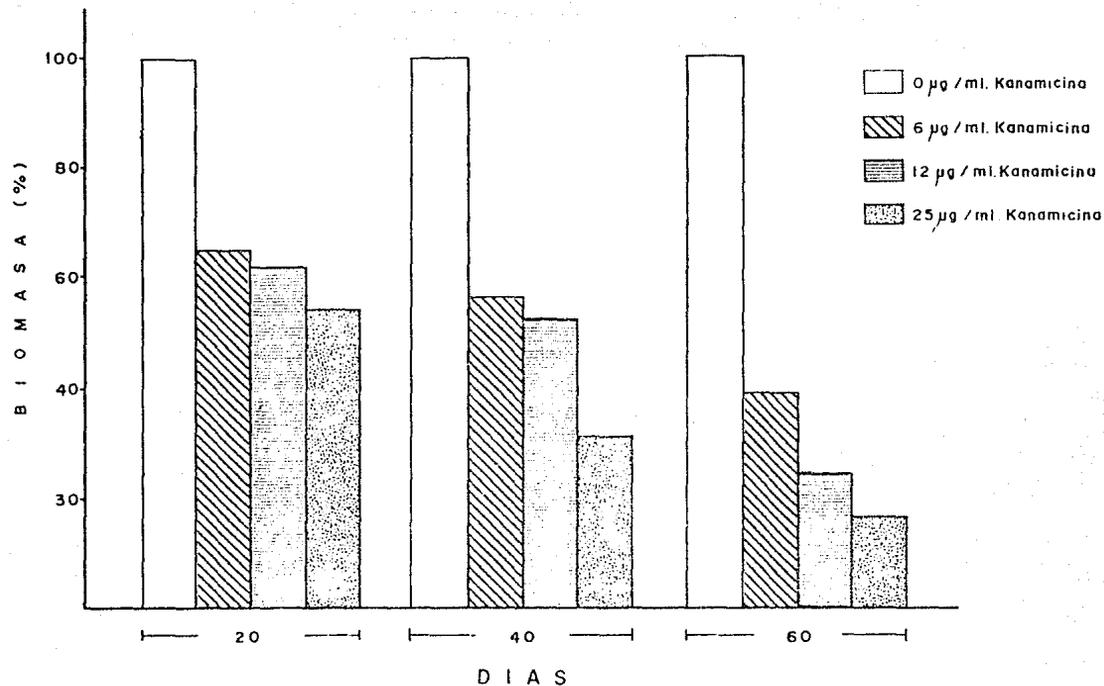


Figura 3. Efecto de kanamicina en la producción de biomasa de cultivos celulares de *L. esculentum* incubados a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, en medio 6MS conteniendo de 0 a 25 µg/ml de kanamicina. Cada barra representa la media de diez frascos por concentración. La biomasa se evaluó en base al peso fresco de la masa celular.

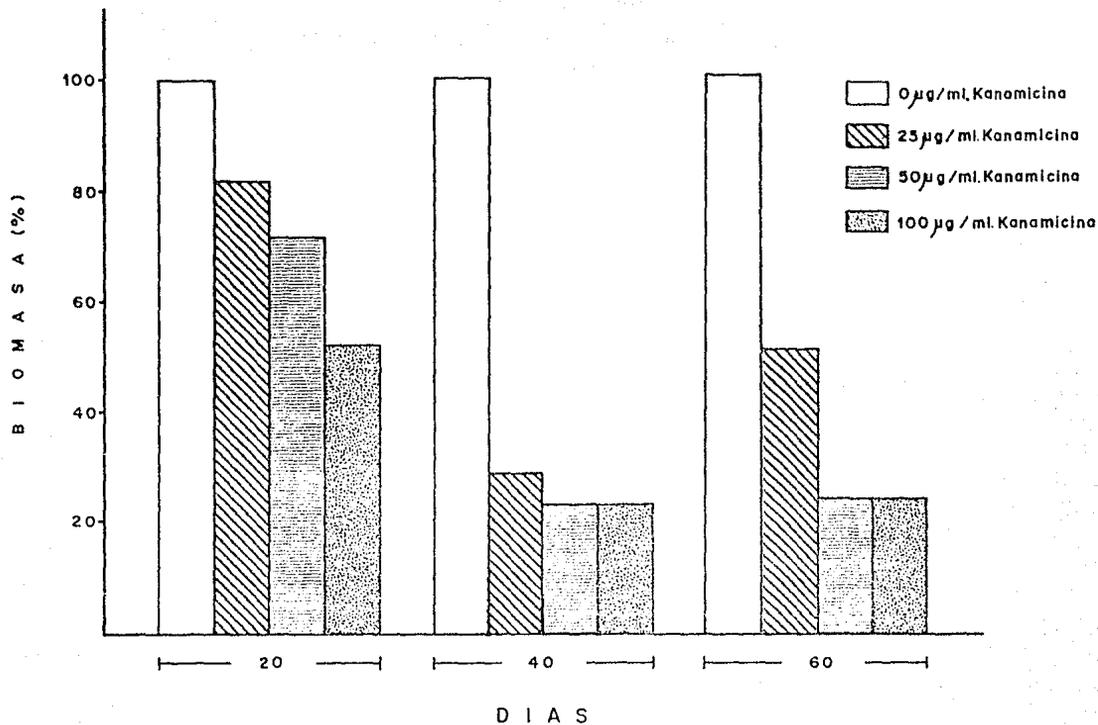


Figura 4. Efecto de kanamicina en la producción de biomasa de cultivos celulares de *S. officinarum* incubados a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, en medio SMS conteniendo de 0 a 100 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. Cada barra representa la media de diez frascos por concentración. La biomasa se evaluó en base al peso fresco de la masa celular.

micina. Sin embargo, durante el tercer período de incubación, se notó que en los cultivos con 25 µg/ml de kanamicina, el peso de la biomasa en los lotes experimentales se incrementó en un 20% en relación al segundo período de incubación mientras que en aquellos con concentraciones más altas no se observaron diferencias.

Los tratamientos fueron seleccionados en base a experimentos previos sobre este aspecto.

4.3. Efecto del NaCl en la producción de biomasa

El efecto del NaCl en el desarrollo de las dos poblaciones celulares se determinó en la misma forma que en el caso anterior. En la figura 5 se observa que el peso de la biomasa de *L. esculentum* durante un primer período de incubación en presencia de 1.2% de NaCl disminuyó 80% con respecto al testigo. Durante el primero y segundo período hubo una recuperación de los cultivos al alcanzar crecimientos de 46% y 70% con respecto al testigo. Este mismo patrón de desarrollo se observó en los cultivos a concentraciones menores de NaCl. Además se notó que a medida que se incrementó la concentración de NaCl, se incrementó la intensidad de los pigmentos verdes y la friabilidad (facilidad de disgregación de la biomasa) de la masa de células desdiferenciadas mientras que los cultivos libres de NaCl no se observó la formación de tales pigmentos y las masas de células desdiferenciadas fueron muy compactas (figura 6).

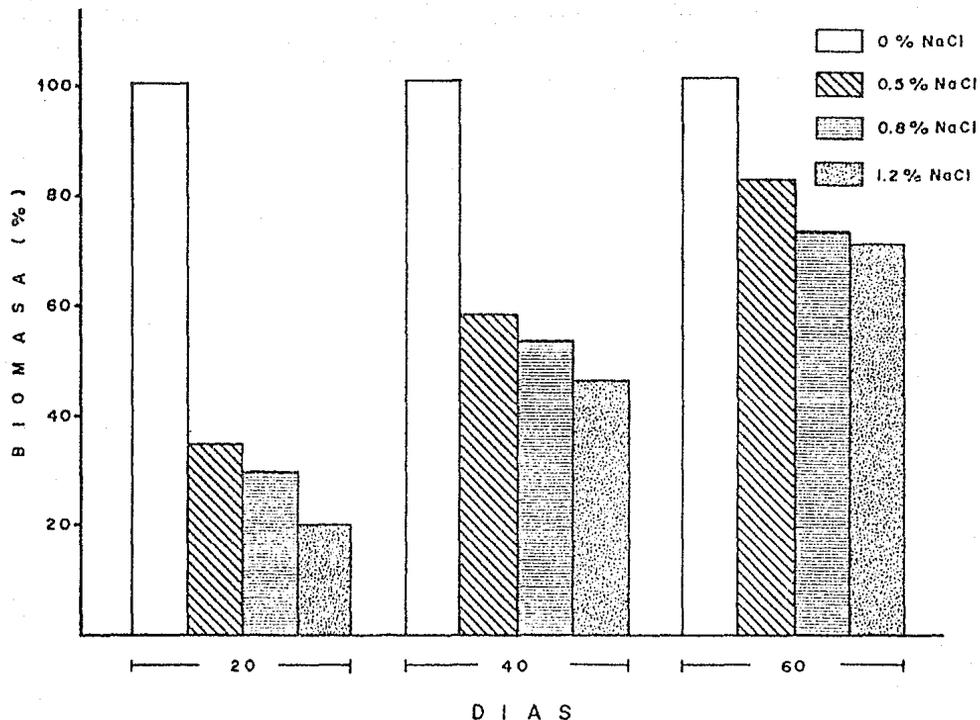


Figura 5. Efecto del NaCl en la producción de biomasa de cultivos celulares de *L. esculentum* incubados a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, en medio 6MS conteniendo de 0 a 1.2% de NaCl. Cada barra representa la media de diez frascos por concentración. La biomasa se evaluó en base al peso fresco de la masa celular.

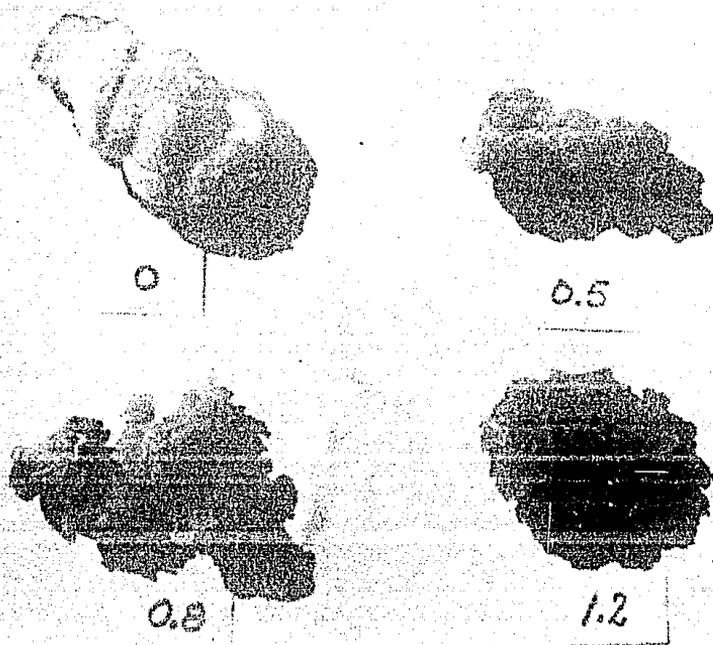


Figura 6. Apariencia de callos de *L. esculentum* después de 30 días de incubación en presencia de NaCl.

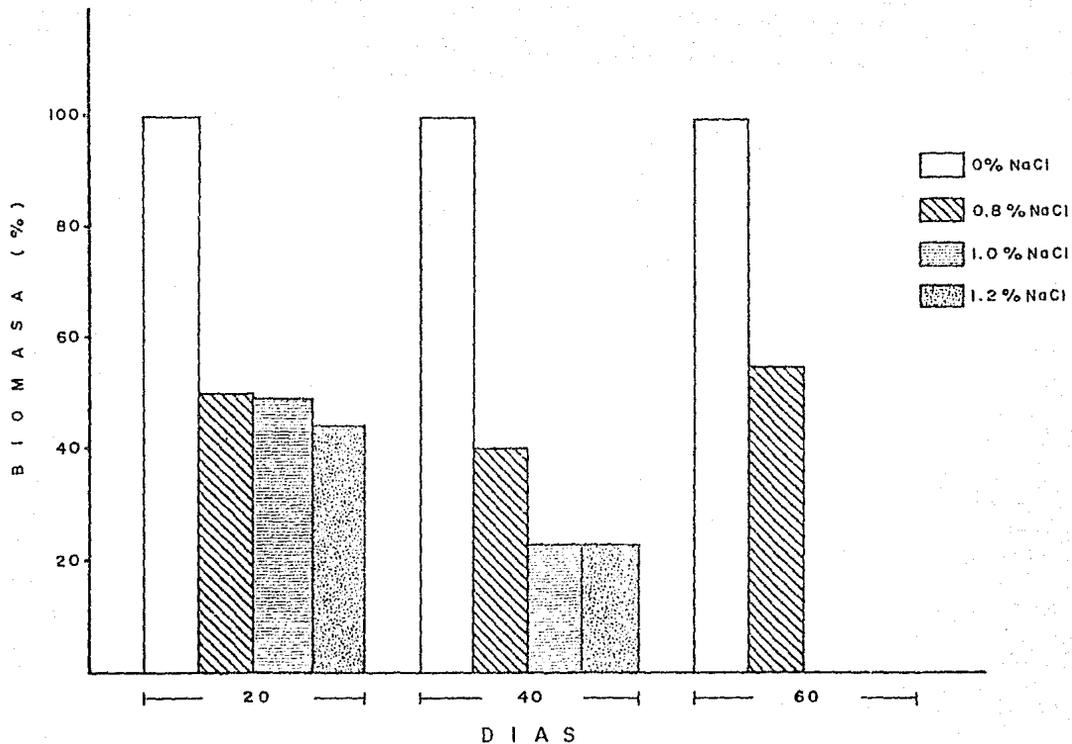


Figura 7. Efecto del NaCl en la producción de biomasa de cultivos celulares de *S. officinarum* incubados a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, en medio 5MS conteniendo de 0 a 1.2% de NaCl. Cada barra representa la media de diez frascos por concentración. La biomasa se evaluó en base al peso fresco de la masa celular.

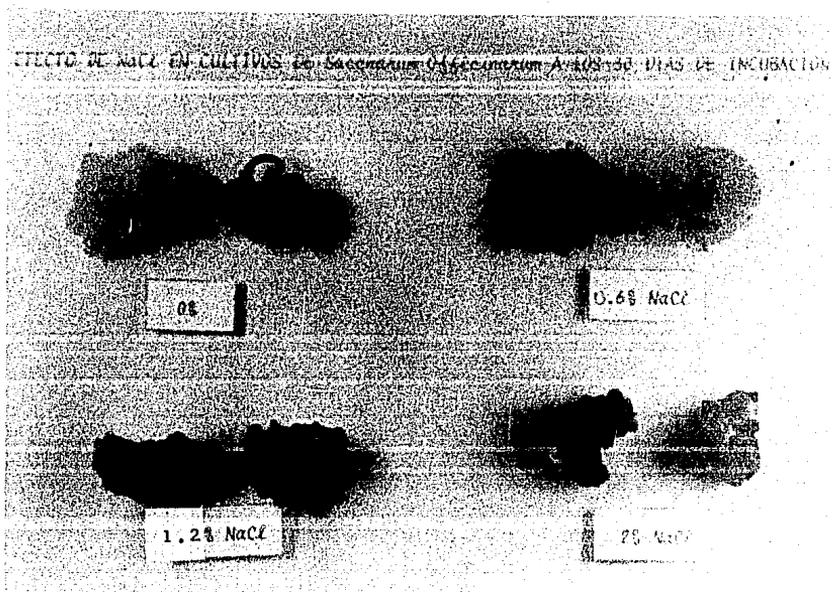


Figura 8. Apariencia de callos de *S. officinarum* incubados en obscuridad constante a $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

En la figura 7 se muestra que el peso de la biomasa de *S. officinarum* en presencia de 1.2% de NaCl disminuyó en 50%, 77% y 100% con respecto al testigo en el primero, segundo y tercer período de incubación respectivamente. Este mismo fenómeno se observó en los otros cultivos a las concentraciones de 0.8% y 1.0% de NaCl. Durante el tercer período de incubación puede apreciarse que en presencia de 0.8% de NaCl el nivel de inhibición fue igual al del primer período de incubación, mientras que en los medios con concentraciones más altas el desarrollo de la biomasa se inhibió por completo. Por otra parte pudo observarse que en los medios suplementados con NaCl las masas celulares desdiferenciadas adquirieron una coloración café la cual se incrementó en relación a la concentración de NaCl, siendo este efecto más drástico en 1.2% de NaCl donde el tejido se necrosó y posteriormente murió. En los cultivos desarrollados en ausencia de NaCl se observó una coloración crema. Los resultados se muestran en la figura 8.

4.4. Efecto de kanamicina sobre el proceso de rediferenciación celular de *S. officinarum*.

Para evaluar este efecto se utilizaron cultivos celulares desdiferenciados de 60 días de incubación, los cuales fueron transferidos al medio que induce el proceso de rediferenciación, suplementando con kanamicina (0 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En el Cuadro 1 se observa que en el medio SMS s/h el 72% de los cultivos desarrollaron plántulas, mientras que en los

Cuadro 1. Efecto de kanamicina en el proceso de rediferenciación de callos de segmentos de tallo de *S. officinarum*. Los cultivos se incubaron en medio SMS S/h a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, por un período de 30 días.

Kanamicina ($\mu\text{g/ml}$)	Tipo de desarrollo			Plántulas	
	Plántulas C/raíz	Plántulas S/raíz	Callo	Long. cm.	Color
	(%)				
0.0	72.00	0.00	28.00	6	Verde
25.00	0.00	11.00	88.90	1	Blanco
50.00	0.00	16.60	83.40	0.5	Blanco
100.00	0.00	11.10	88.90	0.5	Blanco

Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones, con 10 cultivos por tratamiento.

medios que contenían kanamicina solamente se obtuvieron plántulas sin raíz (11%) en presencia de 25 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. En las plántulas desarrolladas en presencia de kanamicina se notó una disminución gradual en los pigmentos verdes y en el tamaño del tallo al aumentar la concentración del antibiótico en el medio. El aspecto de las plántulas se observa en la Figura 9A.



Figura 9A. Aspecto de las plántulas regeneradas a partir de células desdiferenciadas de *S. officinarum*. Los cultivos, se incubaron a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ en medio SMS s/h suplementando con kanamicina.

4.5. Efecto del NaCl sobre el proceso de rediferenciación celular de *S. officinarum*.

El efecto del NaCl se determinó bajo las mismas condiciones experimentales del caso anterior. En el Cuadro 2 puede observarse que en el medio libre de NaCl el 72% de los cultivos desarrollaron plántulas, valor que disminuyó a 44% y 23% en los medios que contenían 0.5% y 0.3% de NaCl respectivamente. En la concentración de 1.2% no hubo formación de raíces. Sin embargo, en un 44% de los cultivos se observó la regeneración de tallos. (Figura 9B).

4.6. Efecto de kanamicina en el desarrollo de ápices y yemas axilares de tallos de *L. esculentum*.

Otro de los objetivos planteados en el trabajo fue estudiar el desarrollo de plántulas a partir de ápices o yemas axilares en presencia de kanamicina. Para evaluar tal efecto los ápices o yemas se sembraron en el medio CN suplementando con kanamicina. En el Cuadro 3 se muestra que en el medio CN el 85% de los cultivos regeneraron plántulas, mientras que en presencia de kanamicina en todos los casos se inhibió la formación de raíces. El desarrollo de tallos se observó en un 32%, 16% y 4% de los cultivos en presencia de 6, 12 y 25 µg/ml de kanamicina respectivamente.

Cuadro 2. Efecto de NaCl en el proceso de rediferenciación de callos de segmentos de tallo de *S. officinarum*. Los cultivos se incubaron en medio SMS s/h a 26 ± 2°C, por un periodo de 30 días.

NaCl	Tipo de desarrollo			Plántulas	
	Plántulas C/raíz	Plántulas S/raíz	Callo	Long. cm.	Color
	(%)				
0.00	72.00	0.00	28.00	6	Verde
0.50	44.40	0.00	55.60	3	Verde
0.80	27.70	0.00	72.30	1	Verde
1.20	0.00	44.40	55.60	0.5	Amarillo

Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones, con 10 cultivos por tratamiento.



Figura 9B. Aspecto de las plántulas regeneradas a partir de células desdiferenciadas de *S. officinarum*. Los cultivos se incubaron a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ en medio 5MS s/h suplementando con NaCl.

Cuadro 3. Efecto de kanamicina en el desarrollo ápices y yemas axilares de tallos de *L. esculentum*. Los cultivos se incubaron en medio CN a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, por un periodo de 30 días.

Kanamicina ($\mu\text{g/ml}$)	Tipo de desarrollo			Total
	Plántulas c/raíz	Plántulas S/raíz	Raíces	
0.00	85.00	0.00	15.00	100.00
6.00	0.00	32.00	0.00	32.00
12.00	0.00	16.00	0.00	16.00
25.00	0.00	4.60	0.00	4.60

Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones con 10 cultivos por tratamiento.

4.7. Efecto de NaCl en el desarrollo de ápices y yemas axilares de tallos de *L. esculentum*.

Para evaluar el efecto de NaCl los ápices y yemas axilares se sembraron en el medio CN suplementando con NaCl. En el Cuadro 4 puede apreciarse que con 1.2% de NaCl no se observó ningún tipo de desarrollo. En el medio CN el 85% de los cultivos desarrollaron plántulas y un 15% únicamente raíces mientras que con 0.5% y 0.8% de NaCl el desarrollo de plántulas fue de 55% y 5% respectivamente. También con 0.5%, 0.8% de NaCl se observó el desarrollo de tallos en 15% y 10% de los cultivos respectivamente. En la figura 10 se observa el desarrollo de los ápices.

Cuadro 4. Efecto de NaCl en el desarrollo de ápices y yemas axilares de tallos de *L. esculentum*. Los cultivos se incubaron en medio CN a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, por un período de 30 días.

NaCl	Tipo de desarrollo			
	Plántulas c/raíz	Plántulas s/raíz	Raíces	Total
(%)				
0.00	85.00	0.00	15.00	100.00
0.50	56.00	15.00	10.00	81.00
0.80	5.00	10.00	10.00	25.00
1.20	0.00	0.00	0.00	0.00

Cada valor representa el promedio de 3 repeticiones con 10 cultivos por tratamiento.

DESARROLLO DE APICES DE *Lycopersicon esculentum*
A LOS 40 DIAS DE INCUBACION

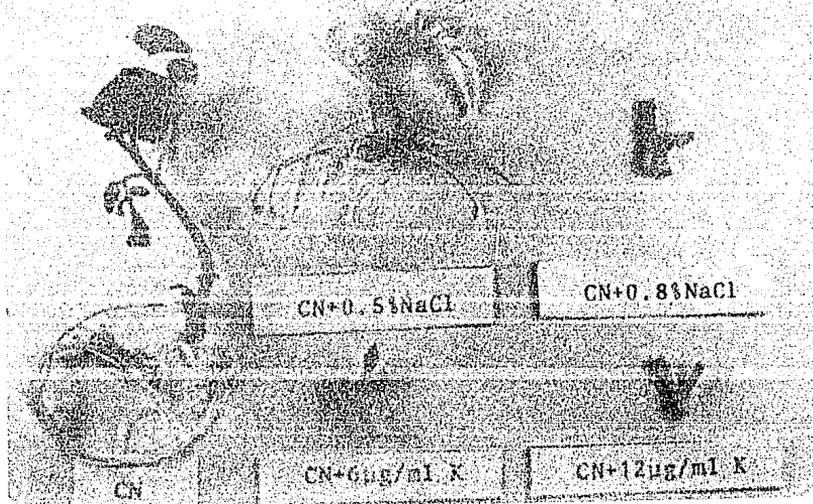


Figura 10. Desarrollo de apices de *L. esculentum* incubados a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, en medio CN suplementando con kanamicina o NaCl.

V. DISCUSION

5.1. Efecto del NaCl en células de *L. esculentum* y *S. officinarum* en tres estados de organización.

Generalmente el NaCl, se ha utilizado en la selección de líneas celulares resistentes y a partir de estas lograr la obtención de plantas que podrían manifestar la característica de resistencia a salinidad (Nabors, *et al.*, 1980; Barlass y Skene, 1981; Dix, 1980; Liu y Yeh, 1982; Ochoa y López, 1987; Tal *et al.*, 1978). En ocasiones, la concentración de sal presente en el medio de selección de líneas celulares es la misma que toleran las plantas regeneradas. También es reconocido el hecho de que al seleccionar la semilla en base a su capacidad de germinación en medio altamente salino (comunicación personal del Dr. Guillermo Carrillo Castañeda), las plantas obtenidas no toleran los mismos niveles de salinidad a lo largo de su desarrollo ontogénico, es decir que en los diferentes estadios del desarrollo de la planta presentan diferentes grados de susceptibilidad o tolerancia.

El proceso de selección de líneas celulares resistentes a salinidad, consiste generalmente en crecer las células en un medio que contiene una concentración de sal relativamente baja y se incrementa gradualmente hasta los límites desea

dos. Sin embargo, mediante este sistema de selección se podría correr el riesgo de perder los cultivos, dado que en cada incremento, se elimina gran parte de la población celular y en ocasiones altas concentraciones de sal pueden ser letales. Otro aspecto que hay que considerar, es que mediante este proceso de selección se requiere de mucho tiempo para obtener líneas celulares resistentes a altas concentraciones de sal. Si bien este es el método más frecuentemente utilizado, en el presente trabajo se usó un sistema de selección diferente el cual consistió en crecer la masa de células diferenciadas en un medio a la concentración de NaCl que permitió inicialmente un desarrollo equivalente al 50% del observado en los cultivos libres de NaCl y a partir de este cultivo se hicieron varios subcultivos manteniendo en el medio la misma cantidad de NaCl. Mediante este sistema existe mayor seguridad de conservar el material y se demuestra que es posible la obtención de poblaciones celulares resistentes a NaCl, pues en los bioensayos realizados con células de *L. esculentum* y *S. officinarum* se encontró que, a través de tres subcultivos en presencia de NaCl, hubo incrementos en la producción de biomasa (Figuras 5 y 7). Es posible que el incremento en la producción de biomasa, se deba ya sea a la selección de tipos celulares resistentes o a un fenómeno de adaptación de la célula que permitió el desarrollo de la población celular en diferentes niveles de salinidad en términos de producción de biomasa.

Al analizar los resultados de las Figuras 5 y 7, se ve que el NaCl afectó más drásticamente el crecimiento de la población celular de *S. officinarum*, dado que únicamente hubo un aumento en la producción de biomasa en los cultivos desarrollados en el medio con la concentración más baja de NaCl. Estos resultados muestran que las células de *L. esculentum* y *S. officinarum* tienen diferente grado de susceptibilidad al NaCl. Sin embargo, se esperaba una mayor resistencia en los cultivos de *S. officinarum*, dado que se cree que la poliploidía y la distribución de mosaicos en esta especie favorece el mecanismo de amplificación de genes, lo cual podría explicar su alta adaptabilidad y variación fisiológica (Maribona, et al., 1986).

Otras manifestaciones de los cultivos de *L. esculentum* en presencia de NaCl fue: un incremento de la intensidad de los pigmentos verdes, un mayor grado de friabilidad de la masa celular desdiferenciada (Figura 6). Este cambio en la pigmentación, probablemente es debido a un incremento en la concentración de clorofila. Resultados similares se han observado únicamente en cultivos de *B. campestris* (Paeck, et al, 1988).

Si bien, se han obtenido líneas celulares resistentes a NaCl aun no se ha establecido el mecanismo mediante el cual las células adquieren resistencia al NaCl, además se ha encontrado que cuando estas líneas celulares se subcultivan, en ausencia del agente de selección el carácter de resisten

cia puede ser estable o perderse, como lo indican las investigaciones que se indican a continuación:

En cultivos celulares de *N. sylvestris*, *C. aurantius*, se ha observado que el carácter de resistencia se mantiene después de tres subcultivos en ausencia del agente de selección (Dix y Street, 1975; Hayyin y Kachba, 1982), y en *Pennisetum americanum* se mantiene después de siete subcultivos (Rangan y Vasil, 1983). El carácter de resistencia, también se ha mantenido en plantas regeneradas de líneas celulares resistentes al NaCl (McHughen y Swarts, 1984; Nabors, et al., 1980). Sin embargo, en células de *N. tabacum* var. *sansum* el carácter de resistencia se pierde en ausencia del agente de selección (Hasegawa, et al., 1980).

Schimke, 1980 señaló que en cultivos de células de mamífero, la resistencia a metotrexato, se debió a un incremento de la enzima dehidrofolato reductasa como resultado de un proceso de amplificación de genes y que la pérdida de resistencia se debe a que los genes amplificados se encuentran en elementos extracromosómicos.

En nuestro caso, no podemos establecer si la resistencia observada en los cultivos de *L. esculentum* y *S. officinarum*, se presentó dado que las células seleccionadas no se subcultivaron después en ausencia del NaCl para verificar si la resistencia es estable. Debido a que no fue un objetivo planteado para el presente trabajo.

Por lo general en varios trabajos (Dix, 1980; Hasegawa, *et al.*, 1986; Korneva y Maribona, 1984; Kurtz, 1986; Maribona, *et al.*, 1986; Mathur, *et al.*, 1980; McHughen y Swartz, 1984; Nabors, *et al.*, 1980; Rains, *et al.*, 1980; Yano, *et al.*, 1982; Yasuda, *et al.*, 1982) con la idea de mantener una población celular uniforme en relación a la resistencia, el proceso de diferenciación se induce en presencia de la sal y poca atención se ha presentado a conocer sus efectos en el proceso morfogénético.

Al analizar el efecto de NaCl, se encontró que no solamente afectó el patrón morfogénético sino que también con dosis relativamente altas (1.2% NaCl), se inhibió la regeneración de plántulas hasta en un 100% (Cuadro 2). Dado que se conoce que la morfogénesis está regulada en gran parte por el balance entre los reguladores de crecimiento, especialmente auxinas y citocininas u otros factores (Skoog y Miller, 1957), es posible que el NaCl cause un desequilibrio en el balance hormonal, lo cual puede inhibir o cambiar el patrón morfogénético o bien interferir con la actividad de ciertas enzimas, tales como la nitrato reductasa, glutamino sintetasa, glutamato deshidrogenasa y peroxidasa relacionadas con el proceso de rediferenciación (Burgeais *et al.*, 1987; Dwivedi *et al.*, 1984; Rawal y Mehta, 1982). También es posible, que las variaciones en el patrón morfogénético encontradas en las plántulas se deban a una respuesta fisiológica a altas concentraciones de sal en el medio de cultivo. Quedaría por determinar que las plántulas obtenidas, al

desarrollarse en campo son más resistentes a salinidad que las progenitoras.

El hecho de que el NaCl afecte negativamente el patrón morfogenético como queda demostrado en el presente trabajo, indica que es necesario realizar estudios para establecer en qué momento sería más importante no exponer los cultivos celulares al NaCl restableciendolo cuando el proceso de diferenciación se encuentre avanzado.

En los bioensayos realizados con ápices de tallos de *L. esculentum* también se encontró que el NaCl afectó el patrón morfogenético e inhibió el desarrollo de los ápices (Cuadro 4 y Figura 10).

Generalmente las plántulas obtenidas de líneas celulares resistentes a NaCl son transferidas a suelo salino para determinar si el carácter de resistencia es estable. Algunos autores (Maribona, et al., 1986) han encontrado que de las plantas de probeta que logran sobrevivir en campo al utilizar tejidos de estas para establecer cultivos *in vitro* se ha encontrado que estas son resistentes a la sal, lo que demuestra que el carácter de resistencia se ha mantenido. Nuestros resultados indican que los ápices del tallo de plantas de *L. esculentum* no se desarrollan normalmente en el medio salino y queda pendiente por demostrar en este caso específico, si las que provienen de plantas seleccionadas como resistentes tienen un desarrollo normal en los medios con NaCl, de ser este el caso, esta prueba podría ser de gran utilidad en la práctica.

5.2. Efecto del antibiótico kanamicina en células de *L. esculentum* y *S. officinarum* en tres estados de organización.

Al analizar el efecto del antibiótico se encontró (Figuras 3 y 4) que en las dos especies, este compuesto disminuyó la producción de biomasa, acentuándose este efecto durante el segundo y tercer subcultivo en presencia del antibiótico. Resultados similares se han observado con estreptomomicina en cultivos de *N. tabacum* (Umiel, 1976). El antibiótico también alteró negativamente el patrón morfo-genético inhibiendo la regeneración de raíces, la pigmentación verde y el desarrollo de los ápices de tallos (Figuras 9 y 10). Dado que se sabe que las mitocondrias y los cloroplastos tienen ribosomas del tipo bacteriano, es posible que la disminución en la producción de biomasa y la alteración en el patrón morfo-genético, así como la disminución del pigmento verde se deba a la inhibición de la síntesis de proteínas en cloroplasto y mitocondrias, lo cual indirectamente puede afectar algunos procesos metabólicos (Schatz y Mason, 1974). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la inhibición resulte de la alteración de algún otro mecanismo (Obe, 1972). En cultivos de *N. tabacum* L. cv. Havana 38, la kanamicina también afectó negativamente el patrón morfo-genético (Owens, 1981). Sin embargo, en cultivos de *D. carota* este antibiótico incrementó la diferenciación de tallos (Owens, 1979). Los resultados obtenidos en el presente trabajo con *L. esculentum* y *S. officinarum* indican que

estas especies son particularmente sensibles al antibiótico, por lo que se sugiere que en los diferentes estudios con antibióticos se determine la concentración apropiada de estos compuestos para cada especie utilizada. Dado que ciertas concentraciones pueden ser inofensivas para algunas de ellas mientras que para otras pueden ser letales.

Al comparar el efecto del NaCl y del antibiótico en los cultivos de *L. esculentum* y *S. officinarum* se encontró que las dos sustancias inhibieron la producción de biomasa y alteraron negativamente el patrón morfogénico. Sin embargo, en los cultivos de *L. esculentum* durante el segundo y tercer subcultivo en presencia del NaCl se observó cierto incremento gradual en la producción de biomasa (Figura 5). Si bien las dos sustancias alteraron negativamente el patrón morfogénico, el efecto más drástico se observó con el antibiótico, el cual inhibió por completo la regeneración de raíces en ambas especies (Cuadro 1 y 3). Los resultados obtenidos indican que en los tres estados de organización de las células de *L. esculentum* y *S. officinarum* el antibiótico es más tóxico que el NaCl.

VI. CONCLUSIONES

1. En cultivos celulares desdiferenciados, en presencia de kanamicina la producción de biomasa disminuyó en forma gradual durante los 3 ciclos observados hasta 80% en ambas especies.
2. La producción de biomasa de *L. esculentum* en presencia del 1.2% de NaCl, fue inhibida en 80, 55 y 30% con respecto al testigo en el primero, segundo y tercer ciclo consecutivo respectivamente, es decir, la inhibición fue gradualmente menor y esta misma tendencia se observó a concentraciones menores de NaCl contrastando estos resultados con los encontrados en el caso del antibiótico. Sin embargo, en *S. officinarum* a las concentraciones del 1 y 1.2% de NaCl se inhibió por completo el crecimiento al tercer ciclo, pero se observó cierta recuperación en la concentración de 0.8% de NaCl.
3. La diferenciación de plantas de *S. officinarum* a partir de células desdiferenciadas en presencia de NaCl se inhibió en forma gradual a medida que se incrementó la concentración llegando al máximo de inhibición (100%) en 1.2% de NaCl.

4. La kanamicina inhibió, el desarrollo de plántulas a partir de los ápices de tallos de *L. esculentum* mientras que en medios con 1.2% NaCl no se observó ningún tipo de desarrollo de los ápices. Sin embargo, en las concentraciones más bajas fue posible la regeneración de plántulas hasta en un 56%, así como el desarrollo de raíces y tallos en forma independiente.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Aharonowitz, Y., and G. Cohen. 1981. The microbiological production of pharmaceuticals. *Sci. Amer.* 245: 141-152.
- Babaeva, Zh. A., R. G. Butenko, and B. P. Strogonov. 1968. Influence on salinization of nutrient medium on the growth of isolated carrot tissue. *Soviet Plant Physiol.* 15: 75-82.
- Barlass, M., K. G. Skene. 1981. Relative NaCl tolerances of grapevine cultivars and hybrids *in vitro*. *Z. Pflanzenphysiol.* 102: 147-156.
- Binding, H., K. Binding, and J. Straub. 1970. Selection in gewebekulturen mit haploiden Zellen. *Naturwissenschaften* 57: 138-139.
- Binzel, M. L., P. M. Hasegawa, A. K. Handa, and R. A. Bressan. 1985. Adaptation of tobacco cell to NaCl. *Plant Physiol.* 79: 118-125.
- Bourgeois, P., G. Guerrier, and D. G. Strulla. 1987. Adaptation au NaCl de *Lycopersicon esculentum*: étude comparative des cultures de cals ou de parties terminales de tiges. *Can. J. Bot.* 65: 1989-1997.
- Bressan, R. A., A. K. Handa, S. Handa, and P. M. Hasegawa. 1982. Growth and water relation of cultured tomato cells after adjustment to low external water potentials. *Plant Physiol.* 70: 1303-1309.
- Brown, D. C. W. 1988. Germplasm determination of *in vitro* somatic embryogenesis in alfalfa. *HortSci.* 23: 526-531.
- Carew, D. P., B. D. Patterson. 1970. The effect of antibiotics on the growth of *Catharantus roseus* tissue cultures. *Lloydia* 33: 275-277.
- Carlson, J. R., Jr. J. M. Martin, D. C. Sands, R. L. Ditterline, and R. E. Lund. 1983. Alfalfa seed germination in antibiotic agar containing NaCl. *Crop. Sci.* 23: 882-885.
- Carrillo, C. G. 1978. Citocultivos (Manual de laboratorio) 2a. Ed., Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 81 pp.

- Carrillo, C. G., M. Vargas, M. Vargas-Villanueva. 1986. Cultivos *in vitro* de *Saccharum officinarum* L: Efecto de la especialización sobre la rediferenciación. Turrialba. 36: 533-540.
- Cella, R., A. Albani, M. G. Biasini, D. Carbonera, and B. Parisi. 1984. Isolation and characterization of a carrot cell line resistant to methotrexate. J. Exp. Bot. 35: 1390-1397.
- _____, _____, D. Carbonera, L. Etteri, E. Maestri, and B. Parisi. 1987. Selection of methotrexate resistant cell lines in *Daucus carota*: Biochemical analysis and genetic characterization by protoplast fusion. J. Plant Physiol. 127: 135-146.
- Chen, W. H., W. Cockburn, and H. E. Street. 1982. Cell plating and selection of cold-tolerant cell lines in sugarcane. Proc 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Plant Tissue Culture. 485-486.
- Clemens, H. I. 1980. Sugarcane crop logging and crop control. The University Press of Hawaii Honolulu. 520 pp.
- Cresswell, R. and C. Nitsch. 1975. Organ culture of *Eucalyptus grandis* L. Plant. 125: 87-90.
- Croughan, T. P., S. J. Staverek, D. W. Rains. 1981. *In vitro* development of salt resistant plants. Environ. Expt. Bot. 21: 317-324.
- Dix, P. J., and H. E. Street. 1975. Sodium chloride resistant cultured cell lines from *Nicotiana sylvestris* and *Capsicum annuum*. Plant Sci. Lett. 5: 231-237.
- _____, 1980. Environmental stress resistance, selection and plant cell culture. In Sala, F., B. Parisi, R. Cella, and O. Ciferri (Eds.) Plant cell cultures: Results and perspectives. Biomedical Press, Amsterdam, New York and Oxford. 183-186 pp.
- Dodds, J. H., and L. W. Roberts. 1985. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, New York. 232 pp.
- Dwivedi, U. N., B. M. Khan, S. K. Rawal, and A. F. Mascarenhas. 1984. Biochemical aspects of shoot differentiation in sugarcane callus: I. nitrogen assimilating enzymes). J. Plant Physiol. 117: 7-15.
- Eriksson, T., K. Glimelius, and A. Wall. 1978. Protoplast isolation cultivation and development. In Thorpe, T. A. (Ed.) Frontiers of plant tissue culture. The international association for plant tissue culture. University of Calgary, Canada. 131-139 pp.

- Epstein, E. 1980. Response of plant to saline environment .
In Rain, D. W., R. C. Valentine, A. Hollander (Eds.)
Genetic engineering of osmoregulation. Plenum Press.
New York. 135-153 pp.
- Evans, D. A., W. R. Sharp, and C. E. Flick. 1981. Growth and
behavior of cell cultures: Embryogenesis and organoge-
nesis. In Thorpe, T. A. (Ed.) Plant tissue culture.
Methods and applications in agriculture. Academic Press,
New York, London, Toronto, San Francisco. 45-113 pp.
- _____, _____, P. V. Ammirato, Y. Yamada. 1983.
Handbook of plant cell culture Vol. 1. MacMillan
Publishing Co. New York 720 pp.
- Fernández, R. E., G. Gómez, L. Rallo. 1981. Pollen germina-
tion of alive cultivars. An Estac Exp. Aula Dei. 15:
261-273.
- Flick, C. E., D. A. Evans, and W. R. Sharp. 1983. Organoge-
nesis. In Evans, D. A., W. R. Sharp, P. V. Ammirato,
Y. Yamada (Eds.) Handbook of plant cell culture Vol. 1.
MacMillan Publishing Co. New York. 13-81 pp.
- Flowers, T. J., P. F. Troke, and A. R. Yeo. 1977. The mecha-
nism of salt tolerance in halophytes. Annu. Rev. Plant
Physiol. 28: 89-121.
- _____, A. R. Yeo. 1986. Ion relations of plant under
drought and salinity. Aust. J. Plant Physiol. 13: 75-
91.
- Garciglia, S. R., F. G. López, N. A. Ochoa. 1985. NaCl resis-
tant variant cell isolated from sweet potato cell sus-
pensions. Plant cell tissue Organ culture. 5: 3-12.
- Goldner, R., N. Umiel, and Y. Chen. 1977. The growth of car-
rot callus cultures at various concentrations and
compositions of saline water. Z. Pflanzenphysiol. 85:
307-318.
- Hayyim, G. B., J. Kochba. 1982. Aspects of salt tolerance in
a NaCl-selected stable cell line of *Citrus sinensis*
Proc. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture.
Plant Tissue Culture. 493-494.
- Handa, A. K., R. A. Bressan, S. Handa, and P. M. Hasegawa.
1982. Characteristics of cultured tomato cells after
prolonged exposure to medium containing polyethylene
glycol. Plant Physiol. 69: 514-521.
- Hasegawa, P. M., R. A. Bressan, A. K. Handa. 1980. Growth
characteristics of NaCl-selected and non selected cells
of *Nicotiana tabacum* L. Plant Cell Physiol. 21: 1347-
1355.

- _____, _____. 1986. Cellular mechanisms of salinity tolerance. *HortSci.* 21: 1317-1324.
- Ho, W. J., and I. K. Vasil. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann. Bot.* 51: 719-726.
- Humbert, P. R. 1984. El cultivo de la caña de azúcar C. E. C. S. A., México. 7-719 pp.
- Ishida, M. R., T. Kikuchi, T. Ikushima, T. Matsubara, and N. Mizuma. 1971. Kinetic study on the incorporation of ^{14}C -uracil into *Chlamydomonas* cell in the presence of rifampicin. *Ann. Repts of Res. Reactor Inst. Kyoto Univ.* 4: 69-72.
- _____, _____, T. Matsubara, G. Tsushimoto, and N. Mizuma. 1973. Effect of rifampin on the incorporation of ^{14}C -uracil into *Euglena* cell exposed to light and dark periods. *Ann. Repts of Res. Reactor Inst. Kyoto Univ.* 6: 78-81.
- Jefferies, R. L. 1980. The role of organic solutes in osmoregulation in halophytica higher plants. In Rains, D. W., R. C. Valentine and A. Hollaender (Eds.) *Genetic engineering of osmoregulation*. Plenum Press, New York. 14: 135-153.
- Korneva, S. B., and R. H. Maribona. 1984. Salt resistant sugarcane somaclones Int. Symp. Plant Tissue and Cell Culture. Olomouc. Czechoslovakia. 349-359.
- Kurtz, S. M., 1982. *In vitro* response of *Lycopersicon esculentum* to sodium chloride. *Proc. 5th. Intl. Cong. Plant tissue and Culture.* 479-480.
- Kut, S. A., J. E. Bravo, and D. A. Evans. 1983. Tomato In Sharp W. R., D. A. Evans, P. V. Ammirato, Y. Yamada (Eds.) *Handbook of plant Cell Culture Vol. 2.* MacMillan Publishing Company, New York. 247-257 pp.
- Lehninger, L. A. 1982. *Bioquímica 2a. Ed.* Omega, S. A. Barcelona. 941-967 pp.
- Liu, M. C., H. S. Yeh. 1982. Selection of NaCl tolerant line through stepwise salinized sugarcane cell cultures. *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and cell culture. Plant Tissue Culture.* 477-478.
- Liu, M. C. 1983. Sugarcane. In Ammirato, P. V., D. A. Evans, W. R. Sharp, Y. Yamada (Eds.) *Handbook of plant cell Culture Vol. 3.* MacMillan Publishing Company, New York. 572-600 pp.

- Maliga, P., A. S. Breznovits., and L. Marton, 1973. Streptomycin-resistant plant from callus culture of haploid tobacco. *Nature*. 244: 29-30.
- _____, _____, _____, and F. Joo. 1975. Non-mendelian streptomycin resistant tobacco mutant with altered chloroplast and mitochondrial. *Nature*. 255: 401-402.
- _____, Lt. Xacan, P. J. Dix and Cseplo. 1980. In Sala-effect (Eds.) plant cell cultures: Results and perspectives. Elsevier. North Holland. Amsterdam 161-162.
- Maribona, R. H., S. Korneva, M. R. Leal, A. Ruiz, and F. Izquierdo. 1986. *In vitro* selection of sugarcane. Proc. of the 19th. Cong. Int. Soc. Sugarcane Technol. Indonesia. 533-543 pp.
- Mathur, A. K., P. S. Ganapathy, B. M. Johri. 1980. Isolation of sodium chloride tolerant plants of *Kickxia ramosissima* under *In vitro* conditions. *Z. pflanzenphysiol.* 99: 287-294.
- Méndez, S. R., y G. Carrillo-Castañeda. 1986. Cultivo *in vitro* de *Saccharum officinarum* L. Influencia del estado de diferenciación sobre la potencialidad de rediferenciación. *Agrociencia* 65: 247-249.
- McHughen, A., and M. Swarts. 1984. A tissue culture derived salt tolerant line of flax (*Linum usitatissimum*). *J. Plant Physiol.* 117: 109-117.
- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Mabors, M. W., S. E. Gibbs, C. S. Berstein, and M. E. Meis. 1980. NaCl-tolerant tobacco plants from cultured cells. *Z. pflanzenphysiol.* 97: 13-17.
- Nilsson, J. R. 1986. Effects of chloramphenicol on the physiology and fine structure of *Tetrahymena pyriformis* GL: Correlation between diminishing inner mitochondrial membrane and cell doubling. *Protoplasma.* 135: 1-11.
- Obe, G., 1972. Action of Streptomycin and dhydrostreptomycin on the chromosomes of *vicia faba*. *Molec. Gen. Genetic.* 119: 373-375.
- Ochoa, A. N., F. G. López. 1987. Effect of light and NaCl salinity on the growth of callus cultures of *Ipomea pescaprae* (L.) R. Brown and *Ipomea batatas* (L.) Lam. *Ann. Bot.* 59: 495-497.

- Ojeda, E. M. A., y G. Carrillo-Castañeda. 1980. Establecimiento de citocultivos e inducción de diferenciación en dos variedades de *Sesbanium* Sp. Agrociencia. 42: 59-67.
- Owens, L. D. 1979. Kanamycin promotes morphogenesis of plant tissues. *Plant Sci. Lett.* 16: 225-230.
- _____, 1981. Characterization of kanamycin-resistant cell lines of *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.* 67: 1166-1168.
- Paek, K. Y., S. F. Chandler, T. A. Thorpe. 1988. Physiological effects of Na_2SO_4 and NaCl on callus cultures of *Brassica campestris* (Chinese cabbage). *Physiol Plant.* 72: 160-166.
- Pestka, S. 1971. Inhibitors of ribosome functions. *Ann. Rev. Microbiol.* 25: 487-562.
- Phillips, R., S. M. Arnott, S. E. Kaplan. 1981. Antibiotics in plant tissue culture: rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. *Plant Sci. Lett.* 21: 235-240.
- Pollock, K., D. G. Barfield, R. Shields. 1983. The Toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell. Rep.* 2: 36-39.
- Rains, D. W., T. P. Croughan, and S. J. Stavarek. 1980. Selection of salt-tolerant plant using tissue culture. In Rains, D. W., R.C. Valentine, and A. Holoander (Eds.) Genetic engineering of osmoregulation. Plenum Press, New York. 14: 279-292 pp.
- Rangan, T. S., I. K. Vasil. 1983. Sodium chloride tolerant embryogenic cell lines of *Pennisetum americanum* (L). K. Schum. *Ann. Bot.* 52: 59-64.
- Rapela, M. A. 1985. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissue cultures of Argentine Maize (*Zea mays* L.). *J. Plant Physiol.* 121: 119-122.
- Rawal, S. K., and A. R. Mehta. 1982. Changes in enzyme activity and isoperoxidases in haploid tobacco callus during organogenesis. *Plant Sci. Lett.* 24: 67-77.
- _____, U. N. Dwivedi, B. M. Khan, and A. F. Mascarenhas. 1985. Biochemical aspects of shoot differentiation in sugarcane callus: II. Carbohydrate metabolizing enzyme). *J. Plant Physiol.* 119: 191-199.
- Ric, C. M. 1978. The tomato. *Sci. Amer.* 239: 66-76.

- Rodríguez, R. R., J. Ma, T., Rodríguez, J. A. M. San Juan. 1984. El tomate. Mundi-Prensa, España. 13-38 pp.
- Sánchez, N. F. 1972. Materia prima caña de azúcar. Edit. Porrúa y Cia. S. A. México. 7-719 pp.
- Schaffner, C. P. 1979. Animal and plant tissue culture decontamination. In Maramorosch K., and H. Hirumi (Eds.) Practical tissue culture applications. Academic Press, San Francisco. 203-214 pp.
- Schatz, G., and T. L. Mason. 1974. The biosynthesis of mitochondrial protein. Ann Rev. Biochem. 43: 51-87.
- Schimke, R. T. 1980. Gene amplification and drug resistance. Sci. Amer. 243: 50-59.
- Scott, K. W., J. L. Biedler, P. W. Melera. 1986. Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in Mammal cell. Science. 232: 751-754.
- Shields, R., S. J. Robinson, and P. A. Anslow. 1984. Use of fungicides in plant tissue culture. Plant Cell. Rep. 3: 33-36.
- Skoog, F., and C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *In vitro* Smp. Soc. Expt. Biol. 11: 118-131.
- Stark, G. M. 1984. Gene amplification. Ann. Rev. Biochem. 53: 447-491.
- Steward, F. C., M. O. Mapes, and K. Mears. 1958. Growth and organized development of cultured cell. II. Organization in cultures growth from Freely Suspended Cells. Am. J. Bot. 45: 705-708.
- Tal, M., H. Deikin, and K. ehan. 1978. Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: Responses of callus tissue of *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* *Solanum pennellii* to high salinity. Z. Pflanzenphysiol. 86: 231-240.
- _____, 1983. Selection for stress tolerance. In Evans, D. A., W. R. Sharps, P. V. Ammirato, Y. Yamada (Eds.) Handbook of plant Cell Culture Vol. 1. MacMillan Publishing Company. 461-469 pp.
- Thorpe, T. A. 1980. Organogenesis *In vitro*: Structural, physiological, and biochemical aspects. International Review of Cytology, Supplement IIA: 71-111.
- _____, 1981. Plant tissue culture methods and applications in agriculture. Academic Press. New York. 23-31 pp.

- Tisserat, B. 1985. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In R. A. Dixon (Ed.). Plant Cell Culture. Oirlpress, Oxford. Washington D. C. 79-95 pp.
- Torrey, J. G. 1966. The initiation of organized development in plant. Adv. Morphogenesis 5: 39-91.
- Umiel, N., and R. Goldner. 1976. Effects of Streptomycin on diploid tobacco callus cultures and the isolation of resistant mutants. Protoplasma. 89: 83-89.
- _____, 1979. Streptomycin resistance in tobacco: III. a test on germinating seedlings indicates cytoplasmic inheritance in the S_c-R 701 mutant. Z. Pflanzenphysiol. 92: 295-301.
- Von Hendenstrom, H., and S. W. Breckle. 1974. Obligate halophytes. A test with tissue culture methods. Z. Pflanzenphysiol. 74: 183-185.
- Warnock, S. J. 1988. A review of taxonomy and phylogeny of the genus *Lycopersicon*. HortSci. 23: 669-673.
- Watad, A. A., H. R. Lener, and L. Reinhold. 1985. Stability of the salt-resistance character in *Nicotiana* Cell lines adapted to grow in high NaCl concentrations. Physiol. Veg. 23: 887-894.
- Wetherell, D. F. and W. Alperin 1963. Embryos derived from callus tissue cultures of the wild carrot. Nature 200: 1336-1337.
- Yano, S. I., M. Ogawa, and Y. Yamada. 1982. Plant formation from selected rice cells resistant to salts. Proc. 5th. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Plant Tissue Culture. 495-496 pp.
- Yasuda, T., H. Maegawa, and T. Yamaguchi. 1982. The selection for the tolerance of mineral stress in tropical plant tissue culture Proc. 5th. Cong. Plant Tissue and Cell. Plant Tissue Culture. 491-492 pp.
- Zamski, E., and N. Umiel. 1978. Streptomycin resistance in tobacco: II. Effects of the drug on the ultrastructure of plastids and mitochondrial in callus cultures. Z. Pflanzenphysiol. 88: 317-325.

VIII. APENDICE

MEDIO 5MS

1. Composición:*

CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.992 × 10 ⁻³ M
NH ₄ NO ₃	2.061 × 10 ⁻² M
KNO ₃	1.879 × 10 ⁻² M
KI	4.900 × 10 ⁻⁶ M
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.000 × 10 ⁻⁷ M
KH ₂ PO ₄	1.249 × 10 ⁻³ M
H ₃ BO ₃	1.002 × 10 ⁻⁴ M
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.000 × 10 ⁻⁶ M
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.501 × 10 ⁻³ M
MnSO ₄ ·4H ₂ O	7.620 × 10 ⁻⁵ M
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.000 × 10 ⁻⁷ M
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.990 × 10 ⁻⁵ M
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.007 × 10 ⁻⁴ M
Na ₂ EDTA	1.002 × 10 ⁻⁴ M
Meso-inositol	5.550 × 10 ⁻⁴ M
Tiamina-HCl	2.964 × 10 ⁻⁶ M
L-cisteína	2.840 × 10 ⁻⁴ M
Acido ascórbico	5.670 × 10 ⁻⁴ M
2, 4-D	2.260 × 10 ⁻⁵ M
Sacarosa	8.764 × 10 ⁻² M

* Todas las cantidades están dadas por litro de solución a menos que se indique otra cosa.

MEDIO SMS

2. Soluciones:*

Solución A (100 X)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2.992 \times 10^{-1} \text{ M}$
---	----------------------------------

Solución B (10X)

NH_4NO_3	$2.061 \times 10^{-1} \text{ M}$
--------------------------	----------------------------------

KNO_3	$1.879 \times 10^{-1} \text{ M}$
----------------	----------------------------------

Solución C (100 X)

KI	$4.999 \times 10^{-4} \text{ M}$
----	----------------------------------

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1.720 \times 10^{-5} \text{ M}$
---	----------------------------------

Solución D (100 X)

KH_2PO_4	$1.249 \times 10^{-1} \text{ M}$
--------------------------	----------------------------------

H_3BO_3	$1.002 \times 10^{-2} \text{ M}$
-------------------------	----------------------------------

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1.033 \times 10^{-4} \text{ M}$
---	----------------------------------

Solución E (100 X)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1.501 \times 10^{-1} \text{ M}$
---	----------------------------------

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$7.622 \times 10^{-3} \text{ M}$
---	----------------------------------

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1.000 \times 10^{-5} \text{ M}$
---	----------------------------------

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2.990 \times 10^{-3} \text{ M}$
---	----------------------------------

Solución F (200 X)

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2.003 \times 10^{-2} \text{ M}$
---	----------------------------------

Na_2EDTA	$2.001 \times 10^{-2} \text{ M}$
--------------------------	----------------------------------

MEDIO SMS

3. Preparación:*

Solución A	10.00 ml
Solución B	100.00 ml
Solución C	10.00 ml
Solución D	10.00 ml
Solución E	10.00 ml
Solución F	5.00 ml
Tiamina-HCl	1.00 ml
Meso-inisitol	100.00 mg
L-citeína	50.00 mg
Acido ascórbico	100.00 mg
2, 4-D	5.00 mg
Sacarosa	30.00 g
Agua de coco	180.00 ml
pH	5.8
Agar	4.0 g

MEDIO 6MS

1. Composición:*

CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.992 × 10 ⁻³ M
NH ₄ NO ₃	2.061 × 10 ⁻² M
KNO ₃	1.879 × 10 ⁻² M
KI	4.900 × 10 ⁻⁶ M
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.000 × 10 ⁻⁷ M
KH ₂ PO ₄	1.249 × 10 ⁻³ M
H ₃ BO ₃	1.002 × 10 ⁻⁴ M
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.000 × 10 ⁻⁶ M
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.501 × 10 ⁻³ M
MnSO ₄ ·4H ₂ O	7.620 × 10 ⁻⁵ M
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.000 × 10 ⁻⁷ M
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.990 × 10 ⁻⁵ M
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.007 × 10 ⁻⁴ M
Na ₂ EDTA	1.002 × 10 ⁻⁴ M
Meso-inositol	5.550 × 10 ⁻⁴ M
Glicina	2.660 × 10 ⁻⁵ M
Acido nitotínico	4.060 × 10 ⁻⁵ M
Piridoxina-HCl	2.300 × 10 ⁻⁶ M
Tiamina-HCl	2.400 × 10 ⁻⁶ M
Biotina	1.940 × 10 ⁻⁷ M

* Todas las cantidades están dadas por litro de solución a menos que se indique otra cosa.

Acido fólico	1.000×10^{-6} M
L-glutámico	7.000×10^{-3} M
L-arginina	5.740×10^{-4} M
L-metionina	3.350×10^{-4} M
L-cisteína	2.840×10^{-4} M
Acido ascórbico	5.670×10^{-4} M
ANA	5.100×10^{-6} M
6 BAP	7.900×10^{-6} M
Sacarosa	8.764×10^{-2} M

2. Soluciones:*

Son las mismas que las del Medio 5MS.

MEDIO 6MS

3. Preparación:*

Solución A	10.00 ml
Solución B	100.00 ml
Solución C	10.00 ml
Solución D	10.00 ml
Solución E	10.00 ml
Solución F	5.00 ml
Meso-inisitol	100.00 mg
Glicina	2.00 mg
Acido nicotínico	5.00 mg
Piridoxina-HCl	0.50 mg
Tiamina-HCl	1.00 mg
Biotina	0.048 mg
Acido fólico	0.48 mg
L-glutámico	100.00 mg
L-arginina	100.00 mg
L-metionina	50.00 mg
L-cisteína	50.00 mg
Acido ascórbico	100.00 mg
ANA	0.94 mg
6 BAP	1.80 mg

MEDIO CN

1. Composición:*

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.099×10^{-3} M
KNO_3	1.199×10^{-3} M
KH_2PO_4	9.199×10^{-4} M
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.099×10^{-4} M
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.007×10^{-4} M
Na_2EDTA	9.990×10^{-5} M
H_3BO_3	1.534×10^{-4} M
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.330×10^{-5} M
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.270×10^{-5} M
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	9.612×10^{-8} M
$\text{Na}_2\text{NO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	9.000×10^{-7} M
Glicina	2.660×10^{-5} M
Meso-inositol	5.550×10^{-4} M
Acido nicotínico	4.050×10^{-5} M
Piridoxina-HCl	2.300×10^{-6} M
Tiamina-HCl	1.480×10^{-6} M
Biotina	1.000×10^{-7} M
Acido fólico	1.000×10^{-6} M
AIB	9.000×10^{-7} M
Sacarosa	5.980×10^{-2} M

* Todas las cantidades están dadas por litro de solución a menos que se indique otra cosa.

MEDIO CN

2. Soluciones:*

Solución ASolución BSolución CSolución DSolución E (solución FM/S)

MEDIO CN

3. Preparación:*

Solución A	10.00 ml
Solución B	10.00 ml
Solución C	10.00 ml
Solución D	10.00 ml
Solución F M/S	5.00 ml
Glicina	2.00 mg
Meso-inositol	100.00 mg
Acido nicotínico	5.00 mg
Piridoxina-HCl	0.50 mg
Tiamina-HCl	1.00 mg
Biotina	0.048 mg
Acido fólico	0.48 mg
AIB	0.203 mg
Sacarosa	20.00 g
pH	5.8
Agar	4.00 g

ABREVIATURAS

Ac.	=	Acido
AIB	=	Ac. Indol-3-Butirico
ANA	=	Ac. 1-Naftalenacético
6BAP	=	6-Benzilaminopurina
2, 4-D	=	2,4-Diclorofenoxiacetico
MS	=	Murashige y Skoog
CN	=	Cresswell y Nitsch