

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

UTILIZACION DE FITOHORMONAS EN LA OBTENCION DE
CALLOS DE TRIGO Y CENTENO.

TESIS.

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

JORGE IGNACIO GARCIA MENDEZ

MEXICO D.F.

1977.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

M-165

CLAS. Tesis
ADQ. 1977
FECHA
PROC. MT 163



QUIMIOA

CON CARIÑO A MIS PADRES :

JORGE Y JULIA

POR EL APOYO, ESTIMULO -
Y CONFIANZA QUE ME HAN -
BRINDADO EN TODO MOMENTO.

A MIS HERMANAS :

ESPERANZA, JULIETA Y ALEJANDRA
POR EL CARIÑO QUE SIEMPRE NOS
HEMOS TENIDO.

A MI SOBRINO:

SERGIO

POR SER COMO ES.

CON AMOR A MI ESPOSA:

ALICIA

POR LA PACIENCIA, APOYO MORAL Y
CARIÑO QUE ME HA BRINDADO SIEMPRE.

A MIS AMIGOS POR LOS GRANDES MOMENTOS
DE CONVIVENCIA.

A TODOS LOS MAESTROS QUE DE ALGUN MODO
CONTRIBUYERON EN MI FORMACION PROFESION
AL EN ESPECIAL A LA DRA. ESTELA SANCHEZ
DE JIMENEZ.

A MIS FAMILIARES.

Jurado asignado
originalmente
Según el tema

PRESIDENTE Dra. ESTELA SANCHEZ DE J.
VOCAL Dra. ANGELINA QUINTERO RUIZ.
SECRETARIO Dr. ALEJANDRO BLANCO LABRA.
1er. SUPLENTE Dra. BEATRIZ MEDINA J.
2do. SUPLENTE Dr. ALEJANDRO BAYON CASO.

Sitio donde se

desarrolló el tema: DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES.
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA.
FACULTAD DE QUIMICA.
U.N.A.M.

SUSTENTANTE: JORGE IGNACIO GARCIA MENDEZ

ASESOR DEL TEMA: Dra. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ.

CONTENIDO

ABREVIATURAS Y DEFINICION DE TERMINOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO.

- I- OBJETIVO
- II- INTRODUCCION
 - 1. ANTECEDENTES
 - 2. SUSTANCIAS REGULADORAS DEL CRECIMIENTO
 - 2.1. Auxinas
 - 2.2. Citoquininas
 - 2.3. Vitaminas
 - 2.4. Elementos esenciales
 - 3. HISTORIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS
- III- MATERIAL Y METODOS
- IV- RESULTADOS Y DISCUSION
- V- TABLAS
- VI- GRAFICAS
- VII- CONCLUSIONES
- VIII- BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS Y DEFINICION DE TERMINOS EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO.

ANA	ácido naftalen acético
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA	ácido indolacético
AIB	ácido indolbutírico
2,4,5-T	ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético
6-BAP	6-bencil amino purina
DFU	sym-difenil urea
2-BTOA	ácido benzotiozil-2-oxiacético
ppm	partes por millon

DEDIFERENCIACION.- Proceso por medio del cual se obtiene tejido vegetal no diferenciado (callo) a partir de tejido vegetal diferenciado.

EQUIVALENCIA DE ppm a MOLARIDAD

2,4-D		
ppm		M
0.5	_____	2.25×10^{-6}
1	_____	4.5×10^{-6}
2	_____	9×10^{-6}
3	_____	1.35×10^{-6}
4	_____	1.8×10^{-5}
5	_____	2.25×10^{-5}
10	_____	4.5×10^{-5}

Kinetina		
ppm		M
0.1	_____	4.6×10^{-7}
0.5	_____	2.3×10^{-6}
1	_____	4.6×10^{-6}
2	_____	9.2×10^{-6}
3	_____	1.38×10^{-5}
5	_____	2.3×10^{-5}
10	_____	4.6×10^{-5}

I OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es encontrar el medio de cultivo, las fitohormonas y la concentración de las mismas más adecuados para la obtención de células no diferenciadas de trigo y centeno, el tejido formado por células no diferenciadas, en términos generales totipotenciales, es conocido como callo.

Además de ser pocos los trabajos realizados sobre este tema, los diferentes autores emplean medios, tejidos iniciales, tipo y concentración de fitohormonas diferentes, por lo que se consideró necesario realizar estudios que unificaran el criterio sobre este tema.

Para lograr la obtención de callos de monocotiledóneas, en especial de cereales, es necesario utilizar: altas concentraciones de auxina en el medio, tejido homogéneo y una fuente de carbohidratos, de lo contrario resulta muy difícil su obtención. (1)

Para la obtención de callos de estos cereales se usaron semillas y embriones debido a que estos tejidos son menos diferenciados y más homogéneos.

La obtención de los callos de trigo y centeno resulta importante ya que con estos cereales es posible efectuar estudios en varios campos como son:

- **GENETICA.**- El estudio citológico del trigo y centeno ha mostrado que estos cereales presentan variantes de gran interés tales como monosomía, nuli-tetrasomía, monotrisomía, etc., los cuales facilitan la identificación de cromosomas o segmentos responsables de cada evento del desarrollo, (2) además el estudio genético de estos cereales puede conducir a la obtención de híbridos (triticale) o variedades con mayor contenido de carbohidratos y proteínas de consumo humano.

- **BIOQUIMICA.**- Los callos de estos cereales son un material muy atractivo y adecuado para efectuar estudios relacionados con el metabolismo y regulación de procesos como diferenciación celular y ontogénesis.

- **FITOPATOLOGIA.**- Es posible estudiar la relación huésped-patógeno (especialmente hongos) usando callos.

- **PRODUCTOS NATURALES.**- Existen estudios encaminados a la obtención de sustancias fisiológicamente activas a partir de mutantes de callos o usando estos como medio para el cultivo de microorganismos que produzcan dichas sustancias.

II INTRODUCCION

1. ANTECEDENTES

Existen pocos estudios dirigidos a la obtención de callos de trigo y centeno, los cuales presentan diferencias con respecto a las condiciones recomendadas como óptimas para dicho fin. (3-10)

Son 5 los factores necesarios para la obtención de callos:

- Tejido inicial.- Es recomendable para la iniciación de callos el uso de tejido lo menos diferenciado posible, ya que, de lo contrario, el proceso de dediferenciación resulta más lento, sin embargo, casi todos los autores usan tejido muy diferenciado como raíces de varias edades, diversas partes del tallo de diferentes edades (brotes, áreas nodales, -- parte basal, rachis) y endospermo. (3-10)

Solo Warick (3) utiliza semillas de trigo y Carew (4) embriones de centeno, que es tejido menos diferenciado.

- Medio de cultivo.- Otro aspecto fundamental para la obtención de los callos es el medio de cultivo, ya que éste deberá contener las concentraciones de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y fuente de carbono que sean adecuadas para la conservación y el crecimiento del tejido.

Han sido probados una serie de medios de diferente com
posición que llevan el nombre de su autor tales como: Heller, --
White, Lismainer-Skoog, B₅, Schenk-Hilderbrant, Hilderbrant,-
Riker, Duggar, Nistch, Straus, Nostog, Pelet et al, Torrey---
Reiner, T, Smith, PRL-4, Knop, a casi todos estos medios se -
les han efectuado modificaciones que van desde añadir sustan-
cias como vitaminas, extracto de levadura, leche de coco, --
agua de maíz y DPU, hasta cambiar la concentración de macro -
y micronutriente, y vitaminas.

Algunos de estos medios y los medios modificados a los
que se les añade por ejemplo agua de coco, extracto de levadur
a, hidrolizado de caseina etc. son medios de composición quí
mica desconocida ya que estas sustancias están formadas por -
una serie de compuestos no muy bien definidos y que se encuenn
tran en concentraciones muy variables, sobre todo con el agua-
de coco, por lo que el uso de estas sustancias para modificar
los medios no resulta muy recomendable ya que, aún en el ca-
so de estimulación de la inducción de callos es imposible sa-
ber a que se debió esta, y la reproductibilidad de los experi-
mentos es muy defectuosa.

Las modificaciones de la concentración de vitaminas y-
de los macro y micronutrientes resultan informativas, ya que-
en este caso es posible conocer con exactitud si las modificac
iones efectuadas resultan positivas o negativas para la in--

ducción y el crecimiento de los callos.

Los medios reportados como más adecuados para centeno son: Heller (modificado) y Lismainer-Skoog (modificado). --- (4,5)

Los medios reportados como convenientes para la inducción de callos de trigo son: Hiderbrant "D", T, Smith (modificado), PRL-4, Knop, White, Lismainer-Skoog. (3,5-10)

- Fitohormonas.- El tipo, concentración y combinación de fitohormonas tiene un papel determinante en el éxito de la obtención de callos, ya que son éstas las que inician el proceso de dediferenciación y mantienen al tejido sin diferen---ciar.

Las fitohormonas probadas por los diferentes investi--gadores han sido: 2,4-D, AIA, ANA, 1,3 difenil urea, kineti--na, ácido giberélico, 6 bencil aminopurina, Zeatina, dicamba, benazolin, 2,4,5-T, Banvel y 2-BTOA, en diferentes concentra--ciones. (3-10)

Los resultados encontrados con respecto a la concentra--ción adecuada de fitohormonas para la inducción de callos depende del tejido utilizado.

Los callos de centeno se lograron obtener con 2,4-D en una concentración de 2 ppm a partir de tallo y embriones, con una porción de scutelum. (4,5)

Los callos de trigo se lograron obtener con 2,4-D en-

un rango de concentración de 2 a 10 ppm, a partir de raíz-tallo, segmentos de raíces, brotes, semillas y tallos, (3,6-9)- con AIA en concentración de 10^{-2} - 2×10^{-2} M (1800-3600 ppm) a partir de segmentos de rices (9), y con ANA en una concentración de 1 a 5 ppm, a partir de segmentos de semillas germinadas. (10)

Las otras fitohormonas probadas muestran resultados -- contradictorios con respecto a su acción sobre la inducción -- de callos de trigo y centeno.

El sulfato de adenina, kinetina y ácido giberélico no estimulan la inducción de callos en centeno, cuando se parte de embriones, áreas nodales de tallos jóvenes y endospermo. - (4)

En trigo es posible inducir callos a partir de segmentos de raíces y brotes de raíces germinadas utilizando 2,4,5-T, benzolin, dicamba, banvel D. (6)

La kinetina, benziladenina y zeatina son inhibitorias o no muestran ningún efecto en la inducción o crecimiento de los callos a partir de segmentos de raíces o tallo de semillas germinadas y trozos de tallo maduro de trigo (6,8,10).

- Carbohidratos.- Los carbohidratos de que disponga -- el tejido vegetal para metabolizar y obtener energía son muy importantes, sin embargo, los reportes existentes en trigo y centeno no mencionan haber probado diferentes carbohidratos -

para la inducción de callos. Con excepción de Carew (4), --- quien prueba dos concentraciones de sacarosa y recomienda como óptimo 2% para inducción de callos de centeno, ningún reporte indica que se probaran diferentes concentraciones de sacarosa, sin embargo es utilizada al 3% . (3,5-10)

- Condiciones de cultivo.- Las condiciones de cultivotales como: temperatura, iluminación y humedad, deben estar de acuerdo con la variedad de la que se desean obtener los callos.

Las condiciones utilizadas por diferentes autores para la obtención de callos de trigo y centeno son:

- Temperatura.- En un rango de 20 a 27 °C. (3-10)
- + Iluminación.- Fotoperíodo. (5,10)
- Oscuridad.- (3,4,6-9)
- Humedad.- 60 a 70% (10)

2. SUSTANCIAS REGULADORAS DEL CRECIMIENTO

El término hormona es aplicado a ciertas sustancias - que son sintetizadas en una parte del organismo, las cuales actúan a muy bajas concentraciones después de ser translocadas, produciendo efectos fisiológicos en otra parte del mismo, este concepto fué originado en la fisiología animal y la palabra hormona viene de una raíz griega que significa "excitar". (2)

A las hormonas vegetales se les puede denominar fitohormonas y son sintetizadas principalmente en el tejido meristemático apical de: hojas jóvenes, raíces, yemas y flores, pero a diferencia de las hormonas animales, las fitohormonas pueden existir en cualquier parte de la planta (2,11)

Los términos de hormona y fitohormona se han restringido a compuestos que son sintetizados en forma natural por el organismo.

Existen muchos compuestos que no son sintetizados por las plantas que tienen la característica de producir en éstas los mismos efectos que las fitohormonas, a dichas sustancias se les denomina reguladores del crecimiento.

Las fitohormonas y sustancias reguladoras del crecimiento se han clasificado en tres grupos fundamentales que son: auxinas, citoquininas y giberilinas. (12)

Estos 3 grupos de fitohormonas y sustancias reguladoras del crecimiento se encuentran involucrados en procesos tales como: la división, elongación y diferenciación celular.

A continuación se encuentra un cuadro en el que se puede ver el efecto de las auxinas, citoquininas y gibelinas en los procesos antes mencionados.

	AUXINAS	GIBERILINAS	CITOQUINIAS
DIVISION CELULAR	Crecimiento de callos, proliferación celular, formación de células cambium, crecimiento del fruto e inhibición del crecimiento de tallos laterales.	División celular en apices, desarrollo de células cambium, crecimiento del fruto rompimiento de la dormancia.	Promoción de división celular en células cultivadas, crecimiento de tallos laterales, crecimiento del fruto, rompimiento de la dormancia en varios tipos de plantas.
ELONGACION CELULAR	Crecimiento del tallo- crecimiento de flores- laterales, crecimiento del fruto.	Crecimiento de hojas y raíces en varios tipos de plantas, inducción de tallos laterales, crecimiento de pétalos de flores, crecimiento del fruto rompimiento de la dormancia en semillas.	Crecimiento de tallos en varios tipos de plantas Crecimiento de fragmentos de hojas Rompimiento de la dormancia en varios tipos de plantas.
DIFERENCIACION CELULAR	Formación de raíces en tallos cortados formación de brotes de muchos tejidos diferenciación de células cambium expresión del sexo.	Formación de flores en plantas de día largo formación de brotes inhibición de la formación expresión del sexo formación de órganos sexuales en helecho.	Inducción de formación de raíces y tallos en cultivo de células de tabaco K C raíces A K A C Tallos Inducción de formación de tallos en diferentes plantas.
EFECTO A NIVEL MOLECULAR EN - CELULAS	Promoción de corrientes en el altoplasma.	Síntesis de carbocilasa en la capa de aleurona de cereales.	Inhibición de la degradación de la clorofila y proteínas acumulación de metabolitos y agua.

K = CITOQUININA

A = AUXINAS

C = CRECIMIENTO.

2.1 Auxinas

Las auxinas son sustancias reguladoras que actúan como promotores de la elongación, división y diferenciación celular en diferentes órganos de las plantas.

Se conocen algunas sustancias con actividad de auxina que pueden ser extraídas de las plantas, a estas sustancias se les conoce con el nombre de auxinas naturales.

De las auxinas naturales únicamente ha sido posible demostrar que el ácido indolacético es sintetizado por las plantas a partir del aminoácido triptofano y que el precursor inmediato de éste es el indol - 3 - acetaldehído. (13,14)

Se han encontrado dos rutas metabólicas generales para la síntesis del ácido indol-acético, la primera tiene como intermediario el ácido indol-pirúvico y la segunda a la triptamina. (15, 16)

Se conocen otras 2 rutas metabólicas para la síntesis del ácido indol-acético, sin embargo, estas vías se han descrito solamente en un número muy reducido de plantas, una es conocida como la vía del indolacetaldoxina-indolacetonitrilo, (17), y de la otra existen evidencias de que el triptofano es buen precursor del ácido indol-láctico y de triptofol (18,19) y el triptofol puede ser convertido en ácido indolacético. Figura I (pág. 19)

Por otra parte se ha demostrado que las plantas se en-

cuentran parasitadas por muchas especies de bacterias capaces de metabolizar al triptofano y convertirlo en ácido indolacético. (20,21)

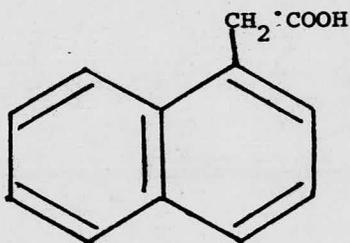
La oxidación del ácido indolacético in vivo está caracterizada por isoenzimas de la peroxidasa y da lugar a varios-compuestos siendo el más importante el metilen oxindol. (22)

Las reacciones de oxidación del ácido indolacético son importantes en el control de la actividad de éste, ya que estas reacciones destruyen o producen la forma activa del ácido indolacético. (23,24)

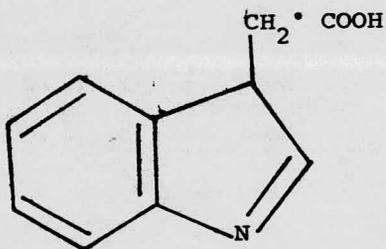
Un gran número de compuestos que no son sintetizados - en las plantas, tienen la misma acción del ácido indolacético y son llamados auxinas sintéticas.

Las auxinas más conocidas son: ANA, AIA y 2,4,-D.

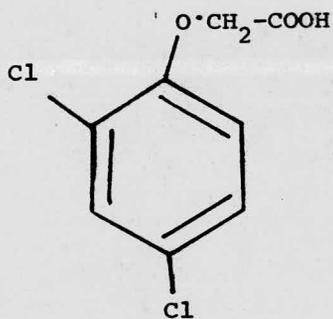
A continuación se expresan sus formulas. (2,11)



ANA



AIA



2,4-D

La comparación de las formulas estructurales de los compuestos que tienen actividad de auxina muestran rasgos -- comunes, por lo general todos son portadores de una cadena lateral con un grupo carboxilo (grupo carboxilo o un grupo carboxilo potencial unido a un núcleo no saturado plano (benzeno, indol o naftaleno) al menos con un doble enlace y una relación estérica entre el anillo y el carboxilo o el grupo carboxilo potencial). (2,11)

Las auxinas pueden ser inhibidas por degradación enzimática o por la acción de componentes conocidos como antiauxinas (25), las cuales presentan dos formas de acción que -- son:

a) Por ser químicamente similares a las auxinas actúan a través de una inhibición competitiva, como ejemplo tenemos el caso del ácido 2,6-diclorofenoxiacético que es la antiauxina del ácido 2,4 - Diclorofenoxiacético y del ácido indol 3 acético; Otro caso interesante es el del ácido trans-cinámico que inhibe la acción de su isómero el ácido cis-cinámico que es una auxina. (26)

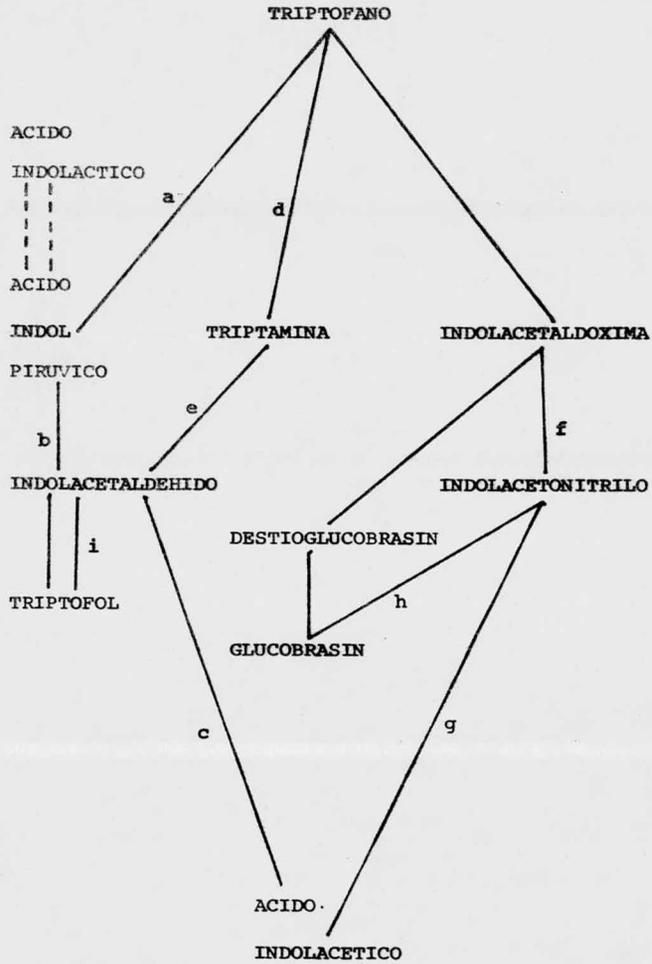
b) Otro mecanismo de acción de las antiauxinas es por inhibición de la translocación (emigración de una sustancia, de raíz a tallo, de tallo a hoja, etc.) de las auxinas, como ejemplo de esto tenemos el ácido abscísico, el cual inhibe la translocación del ácido indolacético. (27,28)

La multiplicidad de procesos en los cuales intervienen las auxinas es su característica fundamental; entre dichos procesos los más conocidos que podemos mencionar son: - elongación de células y órganos, inducción de yemas, hojas y raíces, fototropismo, geotropismo, dominancia apical, partenocarpia, abscisión, activación de células cambium iniciación floral, determinación del sexo y otros. (2,11)

Los procesos mencionados anteriormente dependen de la concentración de auxinas es decir, ésta es diferente para la realización de cada uno de ellos (aún no está bien definida para todos), además en casi todos los casos las auxinas no son por sí solas las causantes de estos fenómenos, sino que éstos son producidos por la combinación de ellas con vitaminas y/u otras fitohormonas siendo importantes las citoquininas.

Es un hecho notable observar que las auxinas intervienen no solo durante los procesos mencionados, sino también en la dediferenciación celular; cuando se aplican altas concentraciones de auxinas se presenta un efecto tóxico o letal, como en el caso del 2,4-D que es usado como herbicida - (29), pero si la concentración de auxina aplicada no es suficiente para que sea letal ni tan baja que actúe como fitohormona y se coloca sobre una sección fresca del tallo, produce rápidamente una callosidad cuyo corte transversal revela que

la diferenciación ha sido fuertemente alterada sobre todo en los tejidos conductores, esta metástasis se distingue también del tejido normal porque su estructura está desorganizada. (2,11)



- a = Tryptofano amino transferasa;
 b = Acido indol piruvico descarboxilasa;
 c = Indolacetaldehido deshidrogenasa u oxidasa;
 d = Tryptofano descarboxilasa;
 e = Triptamina oxidasa;
 f = Indolacetaldoxima hidrolasa;
 g = Nitrilasa;
 h = Mirosinasa;
 i = Triptofol deshidrogenasa u oxidasa.

Figura I.- ESQUEMA DE LAS RUTAS METABOLICAS DE SINTESIS DEL ACIDO INDOLACTICO. (30)

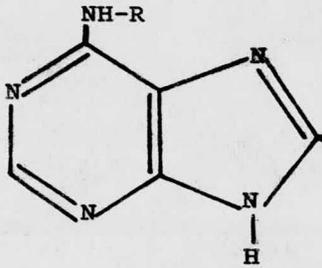
2.2. Citoquininas.

El primer compuesto con actividad de citoquinina fué aislado por Skoog a partir de preparados de ácidos nucleicos de origen diverso y lo denominó Kinetina (6 - furfurilamino-purina) (2), la cual probablemente no sea una fitohormona natural; tiempo después se aisló la zeatina de granos de maíz y posteriormente también de otras plantas. (31-34)

Las citoquininas tienen una estructura básica de anillo de purina.

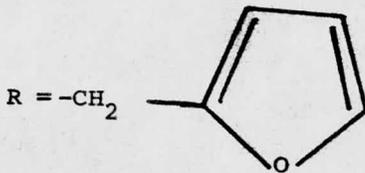
Se ha demostrado que un gran número de otros compuestos con un núcleo de adenina se sintetizan en las plantas y presentan actividad de citoquinina, además se han aislado de animales y otros, se han sintetizado por el hombre.

A continuación se expresan las formulas de las citoquininas más conocidas. (11)

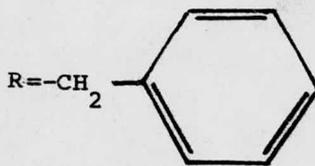


NUCLEO FUNDAMENTAL

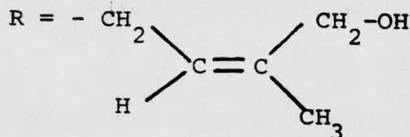
SUSTITUYENTES:



KINETINA



6-Benzilaminopurina



ZEATINA

Las citoquininas se definen como fitohormonas de multiplicación celular. Su síntesis aparentemente se lleva a cabo en meristemas apicales de raíz, inflorescencias y frutos en desarrollo y posteriormente son translocadas al resto de la planta. (2,11)

Estas hormonas se encuentran además involucradas en los procesos de iniciación y proliferación de brotes, alargamiento y elongación celular, retardo del envejecimiento, rompimiento de la dormancia de semillas, partenocarpia y floración. (2,11)

El efecto más característico de las citoquininas en cultivo de tejidos es su influencia en la proliferación celular. Skoog encontró que la Kinetina es un factor necesario para la citoquinesis y la mitosis. (35, 36)

Utilizando cultivo de tejidos ha sido posible aislar e identificar dos citoquininas y sus ribósidos (6- Δ^2 -isopentilaminopurina y zeatina) de bases libres, nucleósidos y RNA de transferencia, lo cual demuestra que las células en cultivo son capaces de sintetizar citoquininas. (37,38)

Se ha observado que durante la mitosis de células de tabaco cultivadas en un medio que no contiene citoquininas, la metafase se prolonga y la profase no es afectada, esto sugiere que las citoquininas estimulan la síntesis de proteínas específicas que están involucradas en la metafase. (39)

Las citoquininas afectan también la elongación celular ya que incrementan la síntesis de lignina en cultivos de callos de tabaco. (40)

Un efecto característico de las citoquininas en la diferenciación celular es la inducción de tilacoides y la formación de grana en plástidos. (41) Así mismo, se ha demostrado en cloroplastos de tabaco, que la Kinetina incrementa la incorporación de ¹⁴C-leucina en las proteínas, pero no prolonga la síntesis de proteínas. (42)

Las auxinas estimulan la formación de polisomas y la síntesis de RNA mensajero, las citoquininas en contraste, no tienen este efecto, pero combinadas con las auxinas incrementan el efecto de éstas. (43,44) Por otra parte se ha demostrado que la citoquinina se une específicamente a los ribosomas por medio de un receptor de naturaleza proteica que se encuentra asociado a estos ribosomas. (45-47), por lo que tal vez tengan acción en los procesos de translación.

No se conocen aún las vías metabólicas de síntesis y degradación de las citoquininas naturales, pero por sus semejanzas con las purinas es probable que sean sintetizadas y degradadas por vías metabólicas semejantes a las de las purinas.

2.3. Vitaminas

Existen otras sustancias clasificadas como vitaminas en la fisiología animal; sin embargo, las plantas, a diferencia de los animales, son capaces de sintetizar todas las vitaminas necesarias para mantener sus procesos metabólicos, - sin que esto quiera decir que cualquier tejido vegetal pueda sintetizarlas en cantidades adecuadas. (2)

El hecho de que cultivos de raíces, tallos, hojas o - embriones aislados, requieran de vitaminas en los medios de cultivo para poder continuar su crecimiento indica la importancia de las vitaminas en estos procesos.

Entre las vitaminas más importantes encontramos: tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), ácido pantoté- nico, biotina, y ácido fólico. Los cuales en su mayoría actúan como grupos prostéticos o coenzimas de las enzimas importantes para el metabolismo vegetal. (2,11)

2.4. Elementos esenciales.

Constituyentes minerales de las células vegetales.

Los progresos técnicos de análisis de elementos han permitido reconocer hasta la fecha 18 elementos que pueden ser considerados como esenciales para el funcionamiento óptimo de las plantas. (2)

Resulta posible efectuar una división de estos 18 elementos en función de la cantidad requerida por las plantas.- Aquellos elementos que son necesarios en mayor cantidad se les denomina "macronutrientes" y los que son requeridos en menor cantidad se les denomina "micronutrientes". (2)

Los macronutrientes son: carbono, hidrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, calcio, magnesio y potasio.

Los micronutrientes son: hierro, manganeso, cobre, -- zinc, boro, cloro, cobalto, molibdeno y vanadio.

Los macronutrientes en su mayoría entran en la constitución de macromoléculas por lo que sus funciones son múltiples y manifiestas. Cuando se encuentran formando sales o en forma de iones tienen funciones de gran importancia como son: Regulación de la presión osmótica, pH celular, efectos -- iónicos, poder de imbibición del citoplasma etc.

Los micronutrientes, por otra parte, actúan en su mayoría, como elementos catalíticos en las relaciones metabólicas de óxido-reducción de las plantas. (2)

Las plantas no tienen capacidad para obtener estos - elementos en cualquier forma que se les presenten, es necesario que ellos se encuentren como sales solubles en el medio- y a concentraciones que sean adecuadas y no tóxicas para el- desarrollo de la planta.

Existe antagonismo entre varios pares de elementos como Mg^{++}/Mn^{++} , K^{+}/Ca^{++} , Mg^{++} etc., sin que haya sido posible elucidar el por que. (2)

Los callos como tejido vegetal requieren de los ele-- mentos esenciales; por lo que se han probado una gran varie- dad de medios con diferentes concentraciones de estos elemenutos esenciales para poder establecer cual es la concentración óptima para su crecimiento.

3. HISTORIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS

El campo del cultivo de tejidos in vitro se inició - a principios de este siglo y muy recientemente se han hecho progresos rápidamente en esta área del conocimiento; a tal punto que actualmente se ha convertido en una nueva rama de la Biología.

Una técnica del cultivo de tejidos, anterior a ésta - fué el uso de técnicas semejantes en agricultura práctica - durante muchos años, por ejemplo, en fruticultura los injertos y el estacado de plantas, que tienen como fin cultivar una parte de las plantas a fin de propagarlas o mejorarlas.

Casi paralelamente a las técnicas de cultivo de tejidos in vitro, se han desarrollado estudios destinados a la obtención de tejido vegetal no diferenciado (callo) en condiciones estériles.

Existen una gran semejanza entre el cultivo de tejidos y la obtención de callos, debido a que las técnicas empleadas son similares y la finalidad en ambos casos es lograr cultivar in vitro el tejido vegetal.

La diferencia fundamental que existe entre el cultivo de tejidos y la obtención de callos estriba en que el primer caso se trata de cultivar tejido vegetal que se mantenga diferenciado y en el segundo caso la finalidad es lo-

grar, por medio de la aplicación de auxinas al medio de cultivo, la obtención de células sin diferenciación (callos).

Existen muchísimos autores que han trabajado en el campo de cultivo de tejidos y obtención de callos; a continuación serán mencionados aquellos trabajos que tengan un papel relevante en los estudios de la obtención de callos.

Los primeros trabajos realizados en este campo se deben a Sacks (1860) y Knops (1861) quienes prepararon una solución nutritiva a base de sales inorgánicas para el desarrollo de las células in vitro, ya que éstas eran los principales nutrientes de las plantas. Esta solución ha sido utilizada posteriormente por muchos investigadores para lograr la obtención de callos de diferentes plantas.

El primer investigador que trató de cultivar células in vitro fué el fisiólogo vegetal, Haberlandt (1902), quien encontró una fitohormona a la cual denominó traumatina, la cual producía una masa amorfa de células sobre la superficie cortada de tubérculos de papa y a esta masa le llamó "callo"

Goebel (1902), sugirió que todas las células somáticas jóvenes podían tener capacidad de producir una planta nueva, es decir, que una célula somática puede ser totipotencial. Posteriormente se sugirió que las células de callo eran totipotenciales y trabajos posteriores confirmaron esta hipótesis. (48,49)

Knudson (1919), Robbins (1922), White (1933) y otros se esforzaron por mejorar la composición de los medios de cultivo.

White (1933), después de lograr crecimiento de primordios florales y observar la división celular de fragmentos de meristemo por un largo tiempo, mediante trasplantes en el medio de Uspenskaia (1925) y Uspenski (1925) pensó que los tejidos vegetales en cultivo podían vivir normalmente in vitro sin que lleguen a diferenciarse.

Nobecourt (1937-1938) enfatizó la necesidad de transplantar el tejido producido de novo a medio fresco, con el fin de obtener crecimiento del parénquima de zanahoria o papa por tiempo ilimitado.

Actualmente el transplantar un tejido es un método usado para mantener los callos vivos por largos períodos de tiempo.

Desde 1935, cuando se conocieron las condiciones del crecimiento ilimitado de células homogéneas, aparecieron numerosos reportes en los que se buscó mejorar condiciones para una rápida división celular y mayor velocidad de crecimiento, debido a que la obtención de callos resulta adecuada para estudiar fenómenos biológicos in vitro.

Con el fin de lograr los medios de cultivo para la obtención de callos se ha probado: agua de coco, extractos -

de diversas plantas, etc., y diferentes concentraciones de fitohormonas, vitaminas, carbohidratos, micro y macronutrientes.

Como resultado del esfuerzo de muchos investigadores, se conocen hoy las condiciones en que las células de diferentes tejidos vegetales pueden dividirse sin formación de órganos. Por otra parte, en algunos casos, también es posible -- que cambiando las condiciones se obtengan a partir de éstos -- callos plantas completas. (48,49)

Los trabajos realizados con el fin de lograr la obtención de callos de monocotiledóneas, especialmente las de cereales, son relativamente pocos, debido a la gran dificultad de obtener de éstos un tejido homogéneo.

Struis y Larme (1954), iniciaron hace 22 años la inducción de callos y el mantenimiento de cultivo de cereales in vitro, usando endospermo de maíz joven; posteriormente, en 1958, Carew y Schwart (4) obtuvieron callos de centeno a partir de embriones.

Pero la solución del problema de obtención de callos de cereales no se inició hasta 1967 con la utilización de altas concentraciones de auxinas en el medio de cultivo.

En lo que respecta a cultivo de tejidos de trigo no se lograron obtener callos hasta 1968 por Trique et al., usando áreas nodales de tallos jóvenes. (9)

Existen unicamente 2 reportes de obtención de callos de centeno (4,5) y 7 de la obtención de callos de trigo. --- (3,5-10)

Las técnicas del cultivo de células (callos o tejidos) están siendo aplicadas a diversos campos como: Genética, Morfogénesis, Fisiología, Bioquímica, Fitopatología, Farmacología y Enzimología, tanto en ciencia pura como aplicada.

En el futuro estos métodos podrán ser utilizados en los más variados campos de la ciencia y ser aplicados además a industrias, como ejemplo de esto tenemos las investigaciones realizadas en Japón, donde las compañías productoras de tabaco han logrado producción masiva de células de tabaco y compañías farmacéuticas trabajan actualmente en la obtención en gran escala de células de plantas que producen sustancias con actividad farmacológica. (50)

Existen unicamente 2 reportes de obtención de callos de centeno (4,5) y 7 de la obtención de callos de trigo. --- (3,5-10)

Las técnicas del cultivo de células (callos o tejidos) están siendo aplicadas a diversos campos como: Genética, Morfogénesis, Fisiología, Bioquímica, Fitopatología, Farmacología y Enzimología, tanto en ciencia pura como aplicada.

En el futuro estos métodos podrán ser utilizados en los más variados campos de la ciencia y ser aplicados además a industrias, como ejemplo de esto tenemos las investigaciones realizadas en Japón, donde las compañías productoras de tabaco han logrado producción masiva de células de tabaco y compañías farmacéuticas trabajan actualmente en la obtención en gran escala de células de plantas que producen sustancias con actividad farmacológica. (50)

III MATERIAL Y METODOS

1) MATERIAL BIOLÓGICO: TRIGO POTAMO PROPORCIONADO POR PRONASE (SAG) CENTENO SNOOPY PROPORCIONADO POR EL CIMMYT.

2) PREPARACION DE SOLUCIONES DE SALES INORGANICAS CONCENTRADAS

a) MEDIO MS (51)

a.1) M/S solución A:	CaCl ₂ .2H ₂ O (MERK)	44 g/l
a.2) M/S solución B:	NH ₄ NO ₃ (MERK)	16.5 g/l
	KNO ₃ (MERK)	19 g/l
a.3) M/S solución C:	KI (MERK)	83 mg/l
	CoCl ₂ .6H ₂ O (MERK)	2.5 mg/l
a.4) M/S solución D:	KH ₂ PO ₄ (MERK)	17 g/l
	H ₃ BO ₃ (TECNICA QUIMICA)	0.62 g/l
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (MERK)	25 mg/l
a.5) M/S solución E:	MgSO ₄ .7H ₂ O (MERK)	37 g/l
	MnSO ₄ .4H ₂ O (MERK)	1.7 g/l
	CuSO ₄ .5H ₂ O (MERK)	2.5 mg/l
	ZnSO ₄ .7H ₂ O (MERK)	0.66 g/l
a.6) M/S solución F:	FeSO ₄ .7H ₂ O (MERK)	5.57 g/l
	Na ₂ EDTA (MERK)	7.45 g/l

b) MEDIO TMS (52)

b.1) TMS solución A:	MgSO ₄ .7H ₂ O	123 mg/l
(MENOR)	KH ₂ PO ₄	51 mg/l
	MnSO ₄ .4H ₂ O	2.23 g/l

ZnSO ₄ ·4H ₂ O	860 mg/l
KI	83 mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.5 mg/l
CoSO ₄ ·7H ₂ O (BAKER ANALYSES)	3 mg/l

c) MEDIO SH (53)

c.1) SH solución A:	KNO ₃	50 g/l
(MAYOR)	MgSO ₄ ·7H ₂ O	8 g/l
c.2) SH solución A ₁ :	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4 g/l
(MAYOR)		
c.4) SH solución B:	MnSO ₄ ·4H ₂ O	200 mg/l
(MENOR)	H ₃ BO ₃	100 mg/l
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	20 mg/l
	KI	20 mg/l
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	4 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2 mg/l
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	2 mg/l
c.5) SH solución C:	FeSO ₄ ·7H ₂ O	15 g/l
c.6) SH solución C ₁ :	Na ₂ EDTA	20 g/l

d) MEDIO SMITH (54)

d.1) Smith solución A:		
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	7.11 g/l
d.2) Smith solución B:		
	KNO ₃	4.05 g/l

d.3) Smith solución C:

NaCl	600 mg/l
ZnCl ₂	6.2 mg/l
MnCl ₂	4.9 mg/l
CuCl ₂	2.7 mg/l

d.4) Smith solución D:

KH ₂ PO ₄	700 mg/l
H ₃ BO ₃	5.7 mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.5 mg/l

d.5) Smith solución E:

MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.45 g/l
--------------------------------------	----------

d.6) Smith solución F:

Na ₂ EDTA	373 mg/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278 mg/l

3) PREPARACION DE SOLUCIONES DE SUSTANCIAS ORGANICAS CONCENTRADAS.

2.1) Piridoxina HCl (MERK)	10 mg/100 ml
2.2) Tiamina HCl (MATHERSON COLEMAN AND BEIL)	10 mg/100 ml
2.3) Acido nicotínido (MERK)	10 mg/100
2.4) Meso-inositol (MERK)	1 g/100 ml
2.5) Glicina (NBC)	100 mg/100 ml
2.6) Edamin (SIGMA)	1 g/100 ml
2.7) Difenilurea (SIGMA)	10 mg/100 ml
2.8) p-clorofenilalanina (SIGMA)	100 mg/100 ml

2.9) Fenilalanina (CALBIOCHEM)	100 mg/100 ml
2.10) Acido 1 naftalenacético (ANA) (BPH CHEMICAL LTD)	
2.11) 6-benzilaminopurina (SIGMA)	50 mg/100 ml
2.12) Kinetina (SIGMA)	10 mg/100 ml
2.13) Acido 2,4-diclorofenoxiacético (MERK)	10 mg/100 ml

NOTA.- El 2,4-D y el ANA requieren NaOH para poder disolverlos mientras que la 6 BAP y la kinetina requieren HCl con el mismo fin.

4) PREPARACION DE SOLUCIONES GENERALES

3.1) Hipoclorito de calcio al 10% y 4%

3.2) Hidroxido de sodio IN (APROXIMADAMENTE)

3.3) Acido clorhidrico IN (APROXIMADAMENTE)

3.4) Esterilización de agua destilada y desionizada en autoclave a 120°C y 15lb durante 15 min.

NOTA: Como las soluciones de HCl y NaOH se usan unicamente para ajustar el pH de los medios y disolver las fitohormonas no es necesario valorarlas por lo que son aproximadas.

5) PREPARACION DE LOS MEDIOS SIN FITOHORMONAS

El procedimiento a seguir está dado a continuación para cada medio, añadiendo la cantidad de solución sacarosa mencionada, ajustando al pH indicado y aforando.

Es recomendable hacer el medio en un vaso en el que se aña

dirá previamente agua destilada, con el fin de que al añadir - las soluciones del medio de cultivo, no precipiten las sales - que las forman; con el mismo fin, es recomendable tener agitación continua.

a) PREPARACION DEL MEDIO MS (51)
(sin fitohormonas)

MS solución A	10 ml
MS solución B	100 ml
MS solución C	10 ml
MS solución D	10 ml
MS solución E	10 ml
MS solución F	5 ml
Glicina	2 ml
Inositol	10 ml
Acido nicotínico	5 ml
Piridoxina HCl	5 ml
Tiamina HCl	1 ml
Sacarosa	30 g
pH	5.8
Aforar	1 litro

b) PREPARACION DEL MEDIO TMS (52)
(sin fitohormonas)

MS solución A	5 ml
MS solución B	50 ml

MS solución D	10 ml
MS solución F	5 ml
TMS solución A (menor)	10 ml
Inositol	10 ml
Tiamina HCl	10 ml
Sacarosa	10 g
pH	5.8
Aforar	1 litro

c) PREPARACION DEL MEDIO SH (53)
(sin fitohormonas)

SH solución A (mayor)	50 ml
SH solución A ₁ (mayor)	50 ml
SH solución A ₂ (mayor)	50 ml
SH solución B (menor)	50 ml
SH solución C	1 ml
SH solución C ₁	1 ml
Paraclorofenilalanina o fenilalanina	2 ml
Tiamina HCl	50 ml
Acido nicotínico	50 ml
Piridoxina HCl	5 ml
Inositol	100 ml
Sacarosa	30 g
pH	5.8
Aforar	1 litro

d) PREPARACION DEL MEDIO SMITH (54)
(sin fitohormonas)

Smith solución A	100 ml
Smith solución B	100 ml
Smith solución C	100 ml
Smith solución D	100 ml
Smith solución E	100 ml
Smith solución F	100 ml
Tiamina	10 ml
Piridoxina HCl	10 ml
Acido nicotínico	50 ml
Glicina	30 ml
Edamin	100 ml
Inositol	10 ml
Sacarosa	20 g
pH	6
Aforar	1 lt.

6) PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO CON FITOHORMONAS

Se efectua la preparación del medio sin fitohormonas y antes de ajustar el pH se añaden las fitohormonas, a las concentraciones que se desean probar.

7) PREPARACION DE LOS MEDIOS PARA SEMBRAR

a) Una vez aforado el medio (con o sin fitohormonas) -

se pasa éste a un matraz erlenmeyer que tenga el --
agar necesario para obtenerlo al 0.65%.

- b) Poner a disolver el agar en baño maría
- c) Con el medio aún caliente se procede a agregar 8 --
ml en cada tubo de siembra.
- d) Tapar con papel aluminio cada uno de los tubos.
- e) Esterilizar en autoclave por 15 min a 15 lb de pre-
sión y 120°C.

8) METODOS DE OBTENCION DE EMBRIONES DE TRIGO Y CENTENO

- a) Cortar uno por uno con navaja
 - a.1) Tomar la semilla con las pinzas
 - a.2) Poner el embrion hacia arriba
 - a.3) Con una navaja efectuar un corte transversal,-
de modo que se obtenga el embrion con la menor
cantidad de almidón posible.
- b) Moler las semillas
 - b.1) Medir 300 ml de semillas
 - b.2) Ponerlas en la licuadora
 - b.3) Moler 5 seg. a baja velocidad
 - b.4) Pasar la molienda por una malla de los números
10, 16, 25.
 - b.5) La parte que no pasa la malla #10 se regresa a-
la licuadora y se repite el proceso.

b.6) La parte que pasa la malla del # 16 pero no la del # 25 son embriones, pedazos de almidón y cascara.

b.7) Para quitar la cáscara se pasan a un vaso de 500 ml y se sopla.

b.8) Después que se eliminaron las cáscaras se revisan con un microscopio de disecciones separando únicamente los embriones enteros.

7) METODO PARA ESTERILIZACION DE LAS SEMILLAS Y EMBRIONES DE TRIGO Y CENTENO

- a) Poner las semillas o los embriones en etanol 96%
- b) Sacarlos inmediatamente
- c) Ponerlos en hipoclorito de calcio a la concentración y tiempo dado en la Tabla I (Pag. 57)
- d) Sacarlos
- e) Ponerlos en etanol al 96%
- f) Sacarlos inmediatamente
- g) Enjuagar con agua destilada esteril, 3 veces.
- h) Pasarlos a una caja petri estéril

10) METODO PARA SEMBRAR LAS SEMILLAS Y LOS EMBRIONES DE TRIGO Y CENTENO EN LOS TUBOS CON MEDIO DE CULTIVO

La siembra de las semillas y embriones se efectúa en condiciones de esterilidad.

Se sembraron una semilla o dos embriones por tubo.

IV RESULTADOS Y DISCUSION

Al revisar los resultados de diversos autores (3-10), en relación a la formación de callos de trigo y centeno, se encontró que no existe información suficiente acerca de que parte del tejido de la planta presenta más ventajas para la inducción de callos, cuál es el medio con la concentración de sales más adecuada para la inducción, cuál o cuáles son las fitohormonas que inducen mejor la producción de callos y en que concentración deben encontrarse éstas para que dicha inducción sea óptima. Por lo tanto, para realizar este estudio, se decidió usar semillas y embriones de trigo y centeno, ya que el embrión es un tejido menos diferenciado que las hojas, tallos, endospermo y raíces, utilizadas por dichos autores, además que el cotiledón proporciona al embrión sustancias necesarias para su desarrollo (55), las cuales podrían contribuir a un mejor crecimiento del callo.

La utilización de semillas y embriones para la obtención de callos presenta la ventaja de que, laboratorios sin recursos adecuados para el mantenimiento de plantas, pueden usar semillas y embriones, sin embargo, presenta la desventaja de que una semilla produce un solo callo, en tanto que, - fragmento una planta existe la posibilidad de obtener varios callos.

El primer experimento que se efectuó se hizo a fin de conocer las fitohormonas y los medios que resultaron mejores para la inducción de callos a partir de semillas de trigo y centeno. Para este fin se probaron 7 medios los cuales difieren tanto en las sales como en las fitohormonas usadas.

Los medios usados fueron: MS_1 , MS_2 , TMS , TMS_1 , SH , SH_1 , y Smith; la concentración y el tipo de fitohormonas que contiene cada uno se puede ver en la Tabla II (pág. 57).

La evaluación de la inducción de callos por los diferentes medios probados en el presente trabajo se efectuó de dos formas:

1a.- Evaluación visual en la cual se le dió al tejido valores relativos expresados en cruces, calificando, en el caso de semillas, con +++ los callos de un diámetro entre 3 y 10 mm, ++ los callos de diámetro entre 5 y 7 mm y con + los callos con diámetro entre 2 y 4 mm.

2a.- Evaluación por peso fresco.

Las evaluaciones de la eficiencia de estos medios para inducir callos se efectuaron a los 24 días, cabe mencionar que se observa la formación de callos a partir del 4o. día, la Gráfica I (pág. 60) muestra los resultados obtenidos para trigo y la II (pág. 61) para centeno.

Como se puede observar en los medios MS_1 , MS_2 , TMS_1 ,

y SH que contienen kinetina y 2,4-D existe una mejor inducción que en los medios TMS, SH₁, y Smith, que contienen fitohormonas diferentes y en los cuales se observó muy poca inducción de callos.

Los datos anteriores fueron reproducibles en nuestro laboratorio y de ellos es posible concluir que las fitohormonas necesarias para la inducción de callos de trigo y centeno, son kinetina y 2,4-D y no las otras fitohormonas probadas, sin que esto signifique que éstas no inducen callos, ya que, como se dijo han sido usadas por algunos investigadores para obtener con éxito, callos de trigo a partir de segmentos de semillas germinadas.

Con el fin de saber cual es la combinación de sales más adecuada en el medio de cultivo se efectuó un segundo experimento en el cual se emplearon 3 medios diferentes en cuanto a concentraciones de sales pero la misma concentración de fitohormonas.

Se probaron las sales de los medios MS, TMS y SH con las concentraciones de fitohormonas que se expresan en las Gráficas III y IV (pág. 63 y 64).

La evaluación de los medios mencionados se efectuó a los 38 días, la Gráfica III (pág. 62) muestra los resultados para trigo y la IV (pág. 63) para centeno; los resulta-

dos de peso fresco se muestran en la Tabla III (pág.58).

En base a las Gráficas y la tabla es posible concluir que la concentración de sales y vitaminas que contiene el medio MS es la que da los mejores resultados tanto para trigo como para centeno.

Una vez que se encontró el medio y las fitohormonas más adecuada para la inducción de callos de trigo y centeno, se procedió a lograr la optimización de la concentración de fitohormonas.

En los experimentos realizados anteriormente se probaron medios diferentes con 0.5 ppm de kinetina, pero no se habían probado medios con concentraciones diferentes de esta fitohormona, Dudits (6) y Shimada (8) reportan que la kinetina es inhibitoria del crecimiento, por lo que se pensó que si se eliminaba ésta de los medios se obtendría una mejor inducción de callos, sin embargo, no se descartó la posibilidad de que solo a las concentraciones que utilizaron la kinetina fuera inhibitoria de la inducción de callos de trigo y centeno y no a otras concentraciones.

Tomando en cuenta estos antecedentes se probó el medio MS con la concentración de fitohormonas indicada en las Gráficas V, VI, VII y VIII (pág. 64 a 67). Como se puede observar se usó 2,4-D en 1 y 2 ppm, y kinetina en un rango de

0 a 10 ppm.

Las evaluaciones del crecimiento del tejido obtenido en los medios mencionados se efectuaron a los 24 días. Las Gráficas V y VI (pág. 64 y 65) muestran los resultados para trigo y las Gráficas VII y VIII (pág. 66 y 67) los resultados para centeno. Estos resultados son:

Trigo.- Con 2,4-D en concentración de 1 ppm la concentración óptima de kinetina se encuentra entre 0 y 1 ppm y con 2,4-D en concentración de 2 ppm la concentración óptima de kinetina se encuentra entre 0 y 1 ppm.

Centeno.- Con 2,4-D en concentración de 1 ppm la concentración óptima de kinetina se encuentra entre 0 y 1 ppm y con 2,4-D en concentración de 2 ppm, la concentración óptima de kinetina se encuentra entre 0 y 1 ppm.

De estos datos podemos concluir que la kinetina a una determinada concentración no resulta inhibitoria sino que parece favorecer la inducción de callos de trigo y centeno cuando se inicia la inducción a partir de semillas.

Los resultados obtenidos indican que para la inducción de callos de trigo y centeno es muy importante la relación que existe entre 2,4-D y kinetina, ya que cuando se man

tiene una de ellas en una concentración y la otra se varía, - existe solo una relación entre ambas fitohormonas que produce mayor inducción de callos, es importante hacer hincapié - en qué, a concentraciones mayores de 1 ppm de kinetina se -- forman raicillas.

Para poder encontrar la relación más adecuada de -- 2,4-D y kinetina se probó el medio MS con la concentración - de fitohormonas expresada en las Gráficas IX y X (pág. 68 - y 69), en la que observamos que se empleó 2,4-D en un rango de 0 a 5 ppm y kinetina en un rango de 0 a 2 ppm.

Las evaluaciones de los medios se realizaron a los - 39 días, las Gráficas IX y X (pág. 68 y 69) muestran los re sultados para trigo y las Gráficas XI y XII (pág. 70 y 71)- muestran los resultados para centeno, los resultados en peso fresco de tejido se muestran en la Tabla IV (pág. 58).

Los datos anteriores indican la concentración de fi- tohormonas óptima para la inducción de callos a partir de se millas de trigo y centeno son 2.4-D en 2 ppm y kinetina en - 0.5 ppm.

Con los experimentos anteriores se encontró el medio, las fitohormonas y la concentración óptima de éstas para la- inducción de callos a partir de semillas de trigo y centeno.

Con el fin de poder estudiar cuales son los requeri-

mientos hormonales y el medio de cultivo cuando el embrión -- no tiene la influencia del cotiledón. Se procedió a medir la velocidad de germinación de semillas y embriones en forma -- comparativa, sembrando semillas y embriones de trigo y cente-- no, en agar al 0.65% con 3% de sacarosa. Las plántulas produ-- cidas por 50 semillas sembradas tenían tallos mas gruesos -- que las producidas por el mismo número de embriones, además-- el desarrollo de los embriones fué mas lento comparado con -- el de las semillas. Estos resultados sugieren que el cotile-- dón no está proporcionando al embrión solamente energía para su desarrollo sino además algunas sustancias como pueden ser vitaminas, sales y fitohormonas. Es importante notar que la-- energía no es la única aportación fundamental que la semilla proporciona durante el desarrollo del embrión, ya que, el me-- dio en que fueron sembrados los embriones contenía sacarosa-- en cantidad suficiente para ser una adecuada fuente de ener-- gía, sin que los embriones lograran desarrollar igual que -- los de las semillas completas.

Por otra parte se observó que de los embriones de -- trigo y centeno sembrados en el agar al 0.65% con 3% de saca-- rosa no todos germinaron, por lo que se realizó otro experi-- mento para saber si los métodos de obtención de los embrio-- nes eran adecuados para este fin. Con el fin de saber si --

las condiciones de cultivo afectaban la viabilidad, se sembraron embriones de trigo y centeno cortados con navaja en agar al 0.65% con 3% de sacarosa. Por otro lado, se sembraron embriones de trigo y centeno obtenidos por el método de la mollienda en el medio MS sin fitohormonas.

En la Tabla V (pág. 59) se indican los porcentajes de viabilidad, los cuales son comparables en los 2 métodos de obtención de embriones utilizados, independientemente de las condiciones de cultivo por lo que se concluye que los métodos por los cuales se obtuvieron los embriones son los adecuados.

Teniendo los datos que sugieren que la semilla proporciona algunas sustancias al embrión y sabiendo que los métodos de obtención de los mismos son adecuados, se decidió hacer los experimentos para la obtención de callos a partir de embriones. Para este fin se efectuaron una serie de experimentos similares a los que se realizaron para semilla. Los 7 medios probados para embrión fueron MS₁, MS₂, TMS, TMS₁, SH, SH₁ y Smith. (Ver Tabla I, pág. 57).

Estos medios fueron probados con el fin de obtener datos relaciones con las fitohormonas y la concentración de las mismas necesarias para la obtención de callos a partir de embriones de trigo y centeno, aunque era de esperarse que

el medio y las fitohormonas adecuados para la inducción de callos a partir de embriones fueran los mismos que para semillas.

En la evaluación visual de los embriones, se clasificaron con +++ los callos de un diámetro entre 5 y 6 mm, ++ los callos de diámetro entre 3 y 4 mm. y con + los callos con un diámetro entre 2 y 1 mm.

Las evaluaciones de los experimentos en que se probaron estos medios se efectuaron a los 44 días, el tiempo de incubación fue mas largo debido a que la inducción de callos a partir de embrión es mas lenta y el tamaño de los callos obtenidos es menor.

Los resultados se muestran en la Gráfica XIII (pag. 72) para trigo y en la XIV (pág. 73) para centeno. De aquí es posible observar que los medios óptimos para la inducción de callos a partir de embriones son: para trigo, en orden decreciente de capacidad de inducción; TMS₁, MS₁ y SH; para centeno en el mismo orden: MS₁ y SH.

Estos resultados muestran que el medio óptimo para obtener callos a partir de embriones de trigo es diferente al medio optimo para obtener callos a partir de semillas de trigo.

Se observó que cuando los embriones de trigo y cente

no fueron sembrados en el medio MS₂ el cual contiene 2 ppm de 2,4-D y 0.5 ppm de kinetina el tejido se necroso, en base a dichos datos podemos pensar que a concentraciones mayores de 1 ppm de 2,4-D éste resulta tóxico para los tejidos en desarrollo.

Por otro lado se vió que la kinetina en 0.1 ppm combinada con 0.5 ppm de 2,4-D producía mejores callos de trigo y centeno que la relación de 0.5 ppm de kinetina con 1 ppm de 2,4-D que contenía el medio MS₁.

A partir de estos resultados podemos concluir que para los embriones las fitohormonas que inducen mejores callos son: 2,4-D y kinetina a las concentraciones mencionadas.

Es importante a este punto hacer resaltar que para lograr la inducción de callos a partir de embriones, de trigo y centeno es necesario el uso de 2,4-D en concentración menor de 1 ppm y kinetina en 0.1 ppm; mientras que, para inducir callos a partir de semillas, de trigo y centeno es necesario utilizar 2,4-D en concentración de 2 ppm y kinetina en 0.5 ppm. Estos datos sugieren la posibilidad de que la semilla completa produzca antagonistas de las fitihormonas mencionadas.

Con el fin de poder definir cual es el medio de cultivo con la concentración de sales más adecuada para la in-

ducción de callos a partir de embriones, se sembraron embriones de trigo y centeno en tres medios diferentes en composición de sales y vitaminas, pero con concentración de fitohormonas iguales, poniendo 0.5 ppm de 2,4-D y 0.1 ppm de kinetina para los tres medios.

Las evaluaciones de estos medios se efectuaron a los 46 días, la gráfica XV (pág. 74) muestra los resultados para trigo y la gráfica XVI (pág. 75) los resultados para centeno; los resultados en peso fresco de tejido se muestran en la tabla VI. (pág. 59)

Los resultados obtenidos en las gráficas difieren de los obtenidos por peso fresco promedio; esto se debe a que la evaluación visual efectuada a los callos se basa fundamentalmente en el tamaño, sin tomar en cuenta su consistencia, por lo que en algunos casos los callos calificados con +++, en la evaluación por peso fresco pasaban menos que los calificados con ++, esto nos indica que los callos calificados con ++ son más compactos que los calificados con +++.

Los resultados de peso fresco promedio indican que los callos de trigo producidos en el medio TMS_1 son más compactos que los producidos en el medio $MS_{1/2}$ y que los callos de centeno que se obtienen en el medio $MS_{1/2}$ son más compactos que los producidos en el medio SH.

Estos datos indican que el medio óptimo para la, in-

ducción de callos a partir de embriones es diferente para cada uno de estos cereales, ya que trigo presenta un mejor crecimiento en el medio TMS y centeno crece mejor en el medio MS.

Es necesario hacer notar que, contrariamente a lo que se suponía, el medio ideal para la inducción de callos a partir de embriones de trigo no resultó ser el medio MS sino el medio TMS.

La constitución de los medios MS y TMS difieren fundamentalmente en las concentraciones presentes de fosfatos, tiamina y sacarosa; los fosfatos y la tiamina se encuentran en mayor concentración en el medio TMS con respecto al medio MS. Por otro lado la sacarosa se encuentra al 3% en el medio MS y al 1% en el medio TMS.

Con el fin de esclarecer si la diferencia que presentaban los medios MS y TMS para la inducción de callos era debida a la fuente de energía, se sembraron embriones de trigo y centeno en el medio TMS en concentraciones de sacarosa de 1% y 3%. Las evaluaciones de estos experimentos se efectuaron a los 46 días, la tabla VII (pág. 59) muestra los resultados obtenidos en peso fresco. De estos resultados en donde se demuestra que no hay diferencia significativa en peso fresco entre 1 y 3% de sacarosa para la inducción de callos-

a partir de embriones, podemos decir que aparentemente la fuente de energía no es un factor determinante en el rango utilizado para la inducción de callos de trigo y centeno, sin embargo, la diferencia encontrada para trigo, en los resultados que se muestran en la Tabla VI (pág. 59) pueden ser debidos a la concentración de tiamina y de fosfatos, ya que el medio MS contiene una menor concentración de estos componentes que el medio TMS.

Durante la generación de los callos se hicieron algunas observaciones con respecto a las diferencias entre los callos obtenidos de trigo y centeno a partir, tanto de semillas como de embriones.

Cabe mencionar antes que nada, que los callos producidos por las semillas son a partir del embrión que se encuentra en estas y no de otro tejido.

Cuando las semillas de trigo o centeno se colocan en un medio para lograr la inducción de callo; pueden suceder 2 cosas:

1a.- La semilla germina y produce un tallo, en la parte que corresponde a la raíz se forma un callo, el cual en algunas ocasiones (sobre todo en trigo) forma raicillas, las cuales al entrar en contacto con el medio de cultivo forman callo nuevamente.

2a.- La semilla produce un callo en la parte en la cual se encuentra el embrión, este callo es generalmente mas pequeño que cuando la semilla produce también tallo.

Con lo que respecta a los embriones de trigo y centeno que se colocan en un medio para lograr la inducción de callo, estos embriones producen un callo el cual en muy pocas ocasiones presenta un pequeño tallo.

De estas observaciones podemos concluir que los callos obtenidos de embriones son mas homogéneos que los obtenidos de semillas, ya que los embriones no logran diferenciar tallo y raíces.

Los callos obtenidos de semillas de centeno son de apariencia mas compacta húmeda y homogénea que los obtenidos a partir de semillas de trigo.

En lo relativo al color los callos de trigo presentan un color blanco lechoso y los de centeno un blanco mas cristalino.

Comparando las condiciones recomendadas como óptimas por los diferentes autores para la inducción de callos de trigo y centeno con las condiciones óptimas que encontramos, se ve que existen 5 diferencias fundamentales:

a) - Velocidad de inducción en función de tiempo.-
Cuando se parte de porciones somáticas de semillas germina--

das, la velocidad de formación de callos es lenta comparativamente con la de varias plantas dicotiledóneas (9), usando secciones de tallos de trigo y centeno se obtienen callos a las pocas semanas (5) y utilizando embriones de centeno se obtienen callos a los 8 días (4),. En este trabajo nosotros reportamos la formación de callos de trigo y centeno en 5 -- días utilizando ya sea semillas o embriones.

Estos datos indican que la dediferenciación es más rápida a partir de un tejido menos diferenciado.

b) - Concentración de 2,4-D.- Las concentraciones de 2,4-D recomendadas como óptimas dependen del tejido utilizado se requieren de 2 a 10 ppm para obtener callo de trigo a partir de raíz-tallo, segmentos de raíces, brotes, tallos y semillas (3,6-9), en el presente trabajo se reporta la obtención de callos de trigo y centeno utilizando 2,4-D en concentraciones de 2 ppm cuando se parte de semilla y 0.5 ppm cuando se utilizan embriones.

Estos datos indican que utilizando tejidos menos diferenciado la cantidad de auxina necesaria para lograr la dediferenciación es menor.

c) - Frecuencia de inducción de callos.- El más alto porcentaje de formación de callos es de 27.5% cuando se utilizan secciones de tallos (5), nuestros datos indican que si

una semilla o un embrión son viables y se encuentran en un medio adecuado producen callo en un 100%.

d) - Utilización de citoquininas.- Kinetina, benzil adenina y zeatina no muestran efecto sobre la inducción de callos o resultan inhibitorias del crecimiento a las concentraciones utilizadas de estos callos obtenidos a partir de segmentos de raíces o tallos de semillas germinadas y trozos de tallo maduro (4,6,8,10), en los resultados encontrados por nosotros la kinetina a concentraciones muy bajas (0.1 y 0.5 ppm) favorece la formación de callos a partir de semillas y embriones de trigo y centeno.

e) - Medio de cultivo.- El medio de cultivo no parece ser un factor limitante en la obtención de callos de trigo y centeno ya que se reporta su obtención en medios diferentes (3-10), en el presente trabajo se reporta una diferencia entre el medio óptimo para obtener callos de trigo a partir de embriones y el medio óptimo para obtenerlos a partir de semillas, esta diferencia es debida probablemente a la capacidad de síntesis de la semilla, para producir sustancias necesarias para el desarrollo del embrión.

V TABLAS

TABLA I Relaciones de hipoclorito de calcio y tiempo --
usados para esterilización de semillas y embri
ones de trigo y centeno.

	Ca(ClO) ₂	tiempo
semillas de trigo	10%	15 min
semillas de centeno	10%	30 min
embriones de trigo (cortados)	4%	10 min
embriones de centeno (cortados)	4%	10 min
embriones de trigo (molienda)	4%	5 min
embriones de centeno (molienda)	4%	5 min

TABLA II Relación de fitohormonas usadas para cada uno
de los medios probados para semillas y embri
ones de trigo y centeno, en ppm.

	MS ₁	MS ₂	TMS	TMS ₁	SH	SH ₁	SMITH
2,4-D	1	2		0.5	0.5		
Kinetina	0.5	0.5		0.5	0.5		
ANA			3			3	5
6-BAP			1			1	
Dif. urea							1

TABLA III Resultados en peso fresco promedio de 60 callos de trigo y centeno obtenidos a partir -- de semillas, a los 38 días de crecimiento.

MEDIO	PESO PROMEDIO DE CALLOS DE TRIGO	PESO PROMEDIO DE CALLOS DE CENTENO
MS	0.23 g	0.17 g
TMS	0.22 g	0.13 g
SH	0.17 g	0.09 g

TABLA IV Resultados en peso fresco promedio de 15 callos de trigo y centeno obtenidos en el medio MS a -- partir de semillas a los 39 días de crecimiento.

KINETINA (ppm)	2,4-D (ppm)	PESO PROMEDIO DE CALLOS DE TRIGO	PESO PROMEDIO DE CALLOS DE CENTENO
0	2	0.236 g	0.298 g
0.5	2	0.327 g	0.502 g
1	2	0.182 g	0.376 g
2	2	0.322 g	0.241 g
0.5	1	0.217 g	0.390 g
0.5	2	0.327 g	0.502 g
0.5	3	0.243 g	0.275 g
0.5	4	0.286 g	0.226 g
0.5	5	0.058 g	0.290 g

TABLA V Resultados de la medición de Viabilidad de los-
embriones de trigo y centeno.

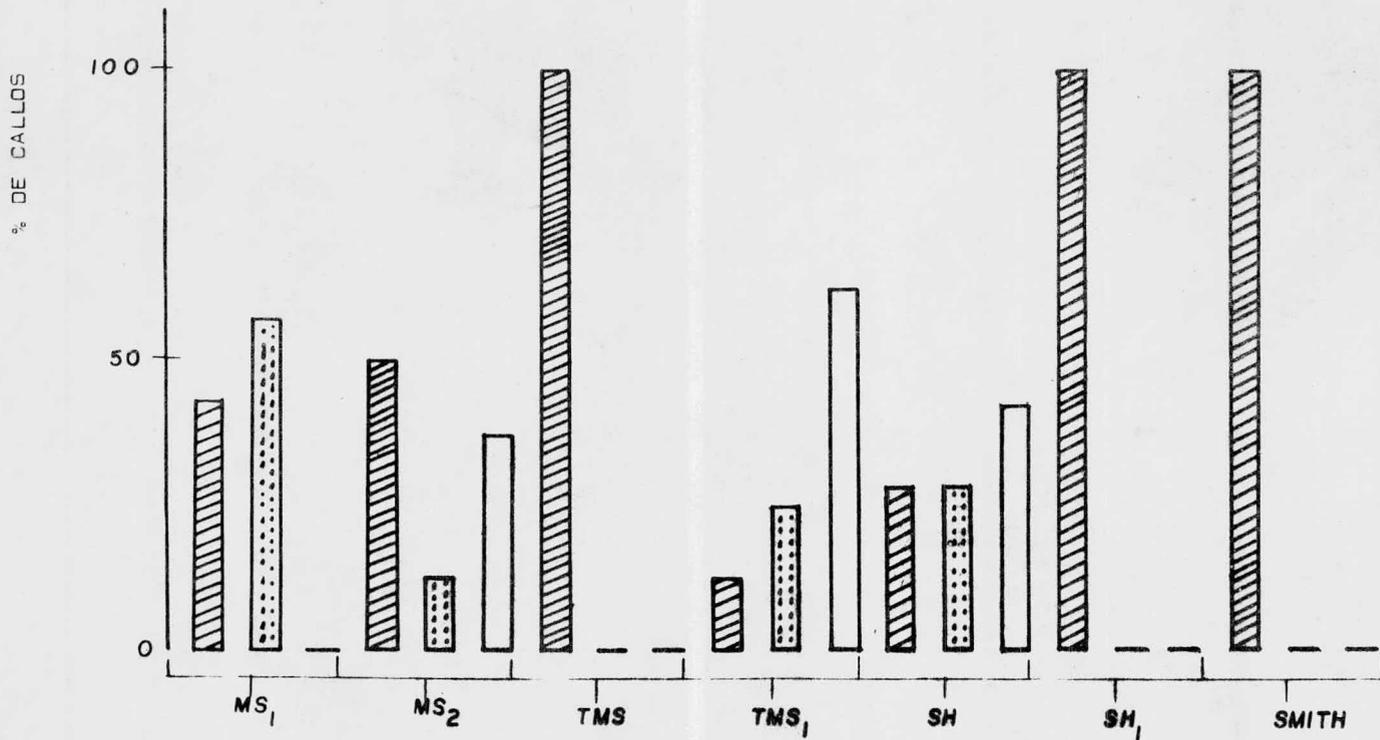
50 EMBRIONES	% DE VIABILIDAD
trigo (cortados)	100
centeno (cortados)	99
trigo (metodo molienda)	95
centeno (metodo molienda)	80

TABLA VI Resultados en peso fresco promedio de 50 ca- -
llos de trigo y centeno obtenidos a partir de -
embriones a los 46 días de crecimiento.

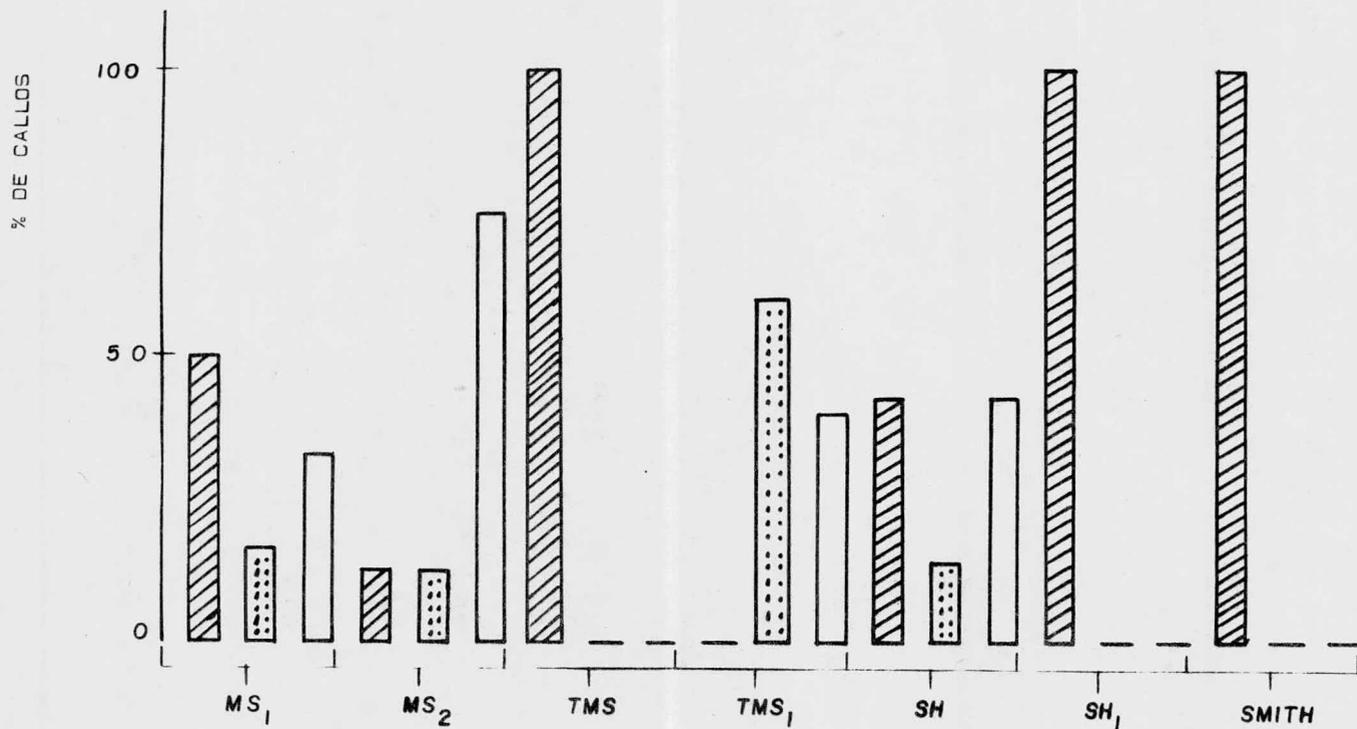
MEDIO	PESO PROMEDIO DE CALLOS DE TRIGO	PESO PROMEDIO DE CALLOS DE CENTENO
MS _{1/2}	0.070 g	0.078 g
TMS ₁	0.083 g	0.044 g
SH	0.072 g	0.059 g

TABLA VII Resultados en peso fresco promedio de 50 ca--
llos de
llos de trigo y centeno obtenidos a partir --
de embriones a los 46 días de crecimiento.

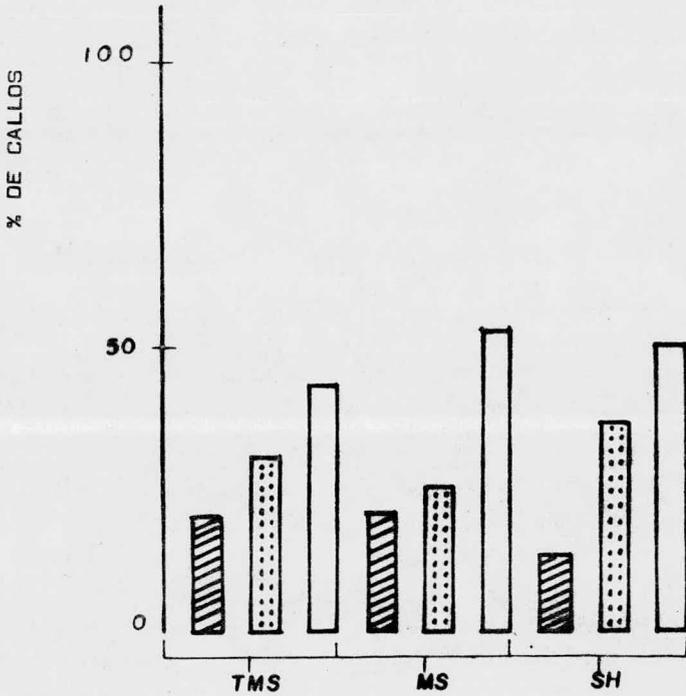
MEDIO	PESO PROMEDIO DE CALLOS DE TRIGO	PESO PROMEDIO DE CALLOS DE CENTENO
TMS ₁ 1% sacarosa)	0.083 g	0.044 g
TMS ₁ (3% sacarosa)	0.081 g	0.041 g



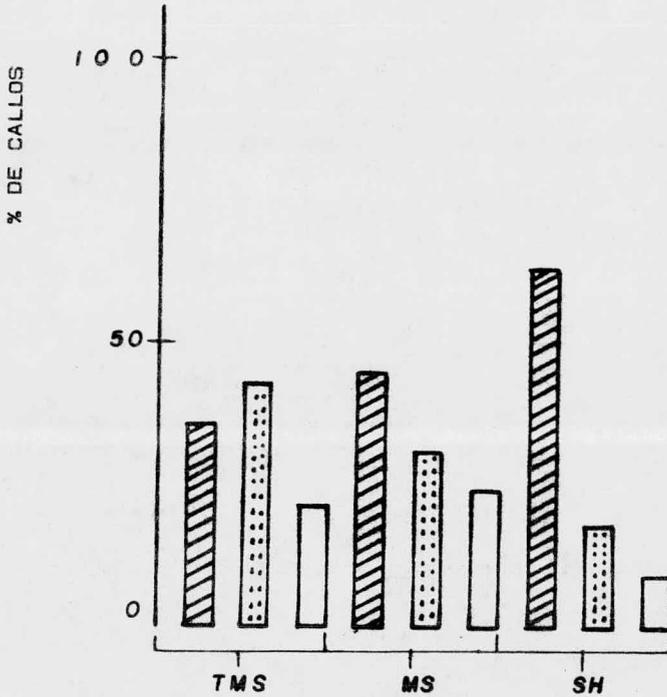
GRAFICA I.- Observación a los 24 días, del crecimiento de los callos de trigo, obtenidos de semillas utilizando los medios señalados; □ % de callos con un diámetro entre 8 y 10 mm.; ■ % de callos con un diámetro entre 5 y 7 mm.; ▨ % de callos con un diámetro entre 2 y 4 mm.



GRAFICA II.- Observación a los 24 días, del crecimiento de los callos de centeno, obtenidos de semilla utilizando los medios señalados; □ % de callos con un diámetro entre 8 y 10 mm.; ▤ % de callos con un diámetro entre 5 y 7 mm.; ▨ % de callos con un diámetro entre 2 y 4 mm. ---



GRAFICA III.- Observación a los 38 días del crecimiento de los callos de trigo, obtenidos de semilla utilizando 0.5 ppm de kinetina, 2 ppm de 2,4-D y los medios señalados: □ % de callos con un diámetro entre 8 y 10 mm.: ▤ % de callos con un diámetro entre 5 y 7 mm.: ▨ % de callos con un diámetro entre 2 y 4-



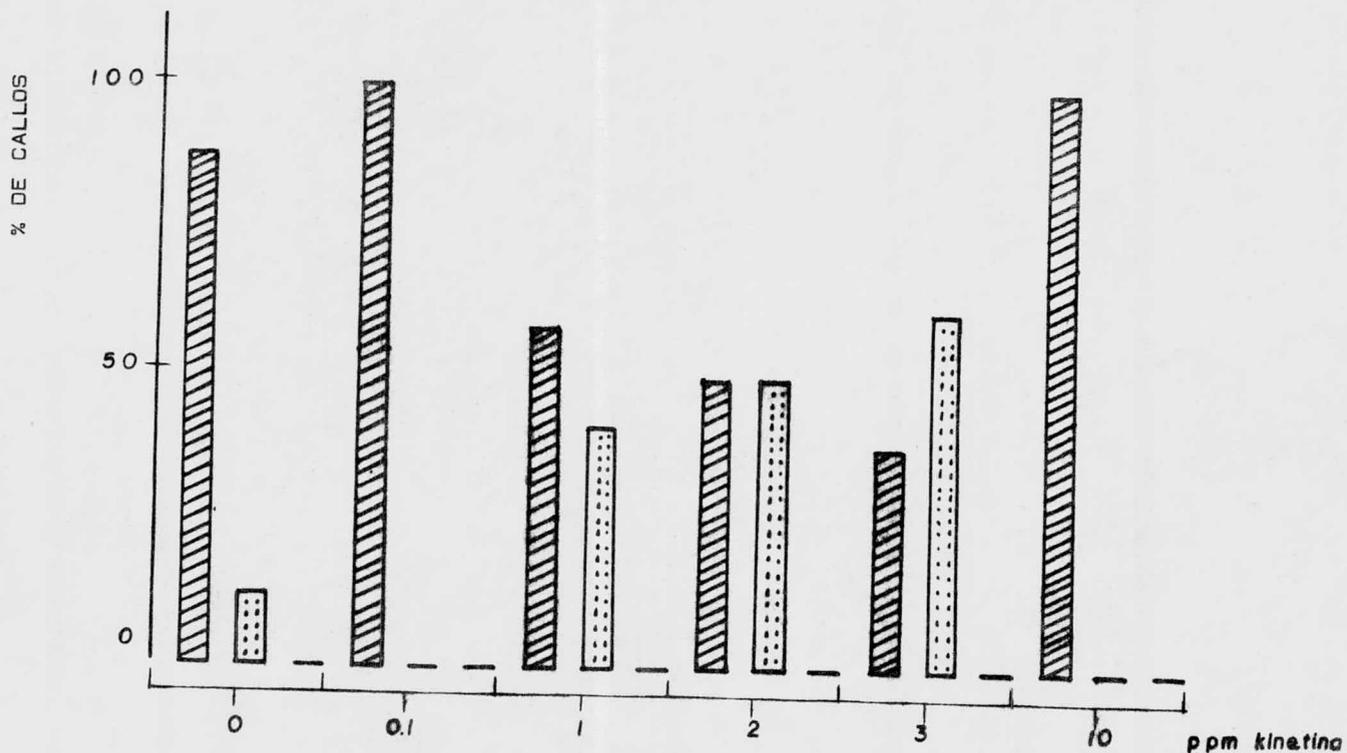
GRAFICA IV.- Observación a los 38 días, del crecimiento de los callos de centeno obtenidos de semilla utilizando 0.5 ppm de kinetina, 2 ppm de 2,4-D y los medios señalados: □ % de callos con un diámetro entre 8 y 10 mm.; ▤ % de callos con un diámetro entre 5 y 7 mm.; ▨ % de callos con un diámetro entre 2 y 4 mm.

MEDIO MS

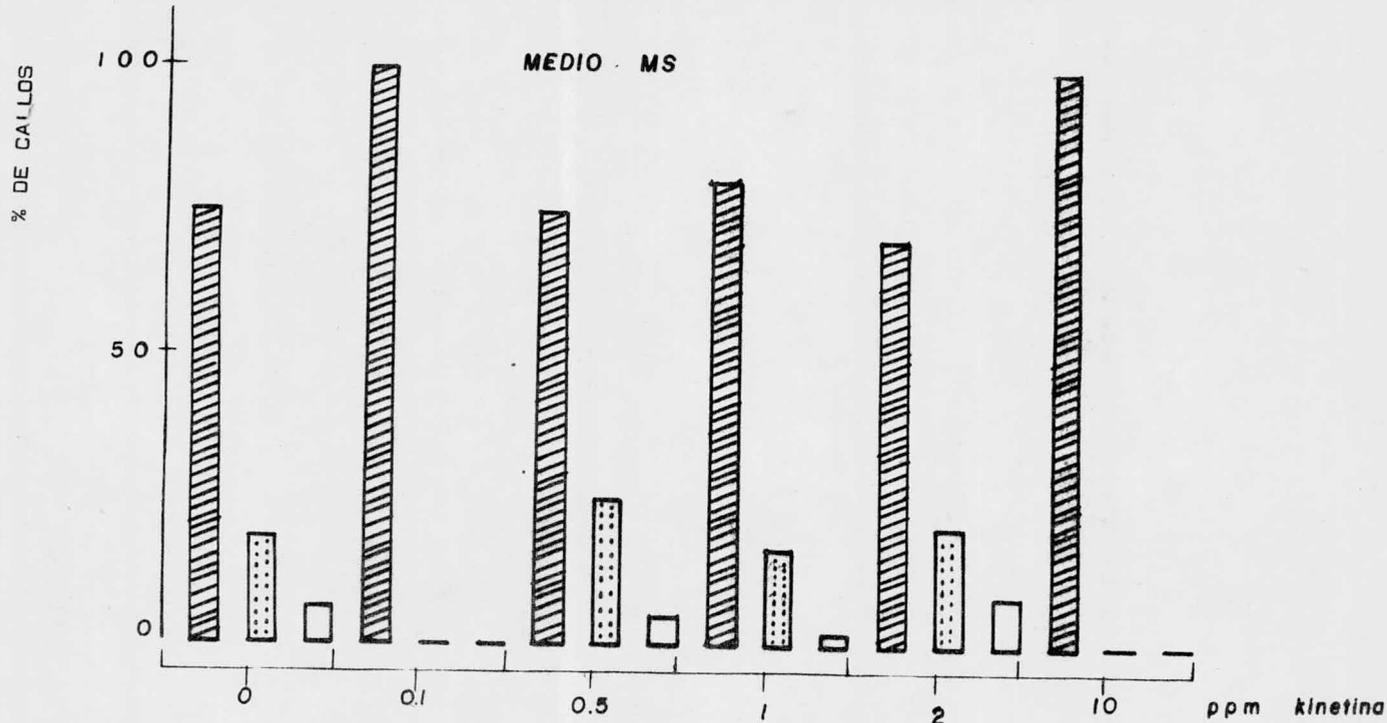


GRAFICA V.- Observación a los 24 días, del crecimiento de los callos de trigo, obtenidos de semilla utilizando 2,4-D en concentración de 1 ppm.--
 Nota.- En 2,3 y 10 ppm de kinetina se forman raíces; □ % de callos con un diámetro entre 8 y 10 mm.; ▤ % de callos con un diámetro entre 5 y 7 mm.; ▨ % de callos con un diámetro entre 2 y 4 mm.

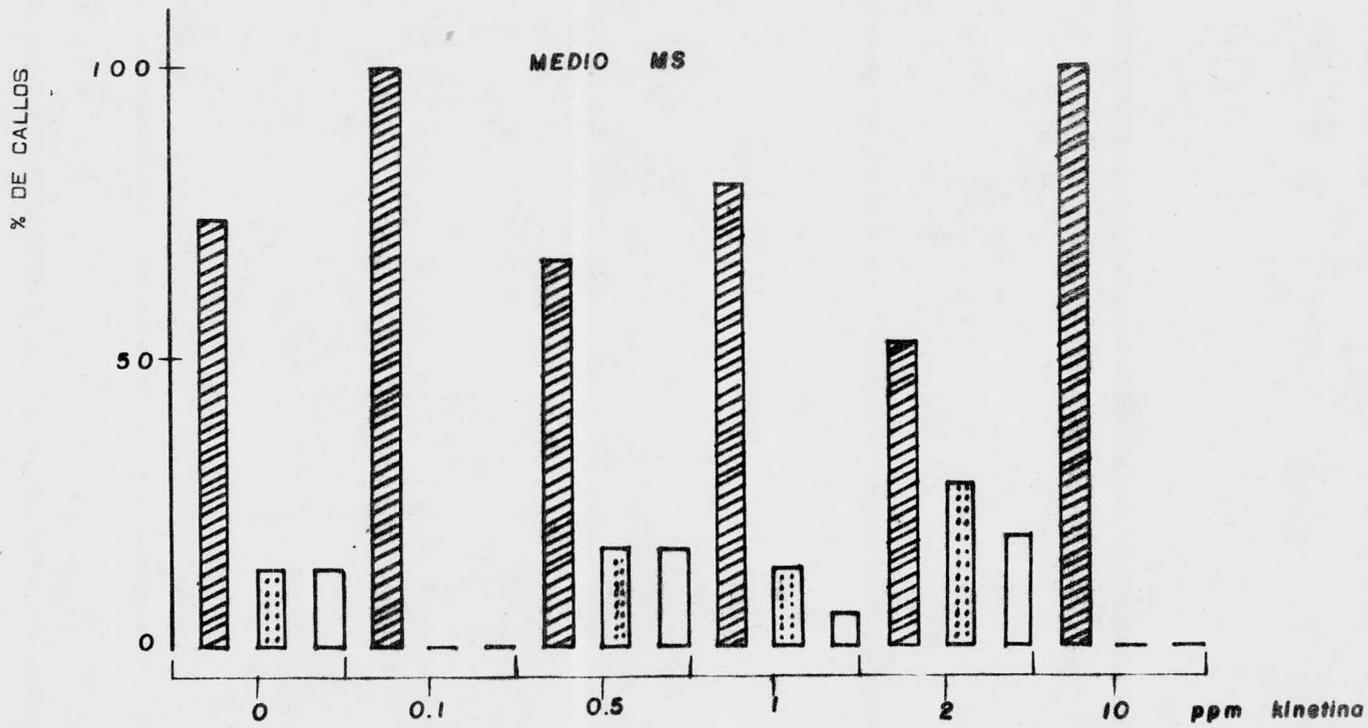
MEDIO MS



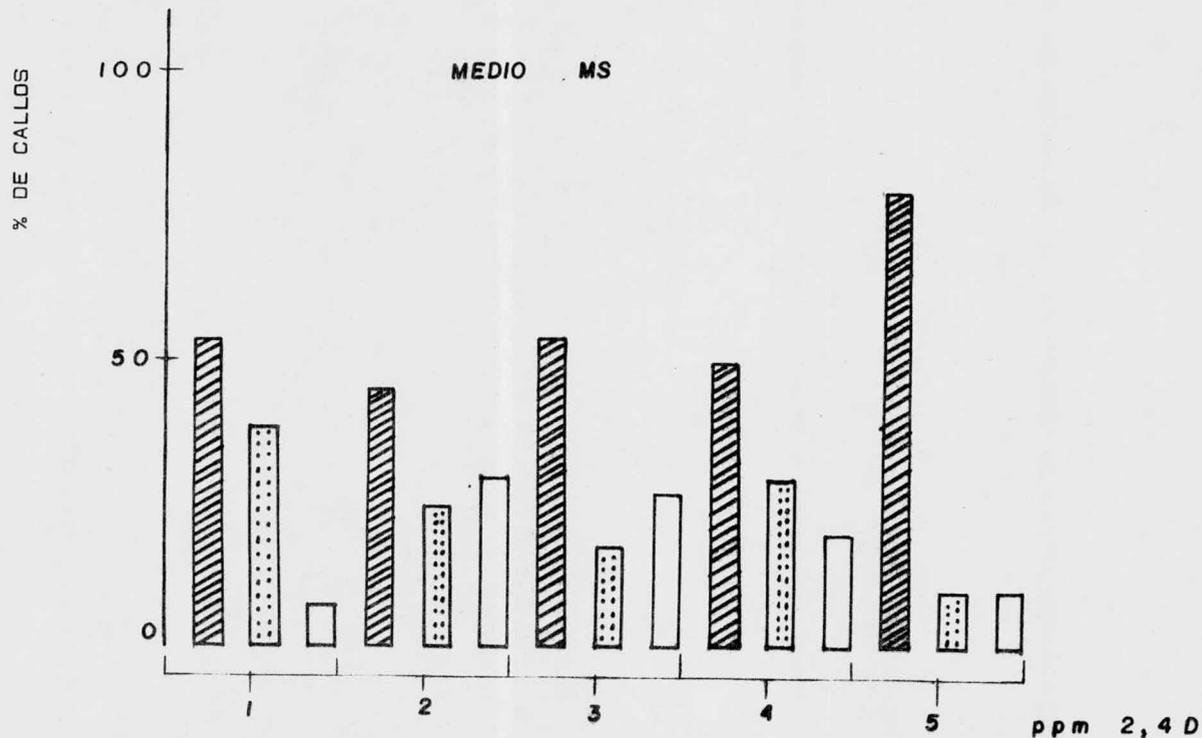
GRAFICA VI.- Observación a los 24 días, del crecimiento de los callos de trigo obtenidos de semilla utilizando 2,4-D en concentración de 2 ppm.-
 Nota.- En 2,3,10 ppm de kinetina se forman raíces; □ % de callos, con un diámetro entre 8 y 10 mm.; ▤ % de callos, con un diámetro entre 5 y 7 mm.; ▨ % de callos con un diámetro entre 2 y 4 mm.



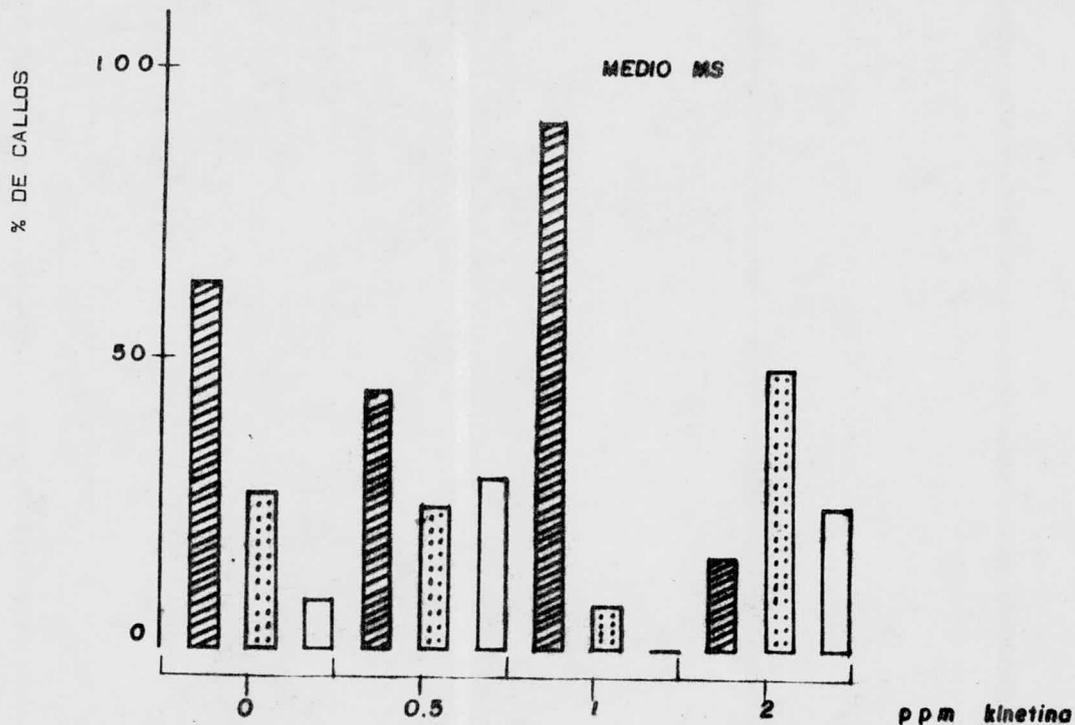
GRAFICA VII.- Observación a los 24 días, del crecimiento de los callos de centeno, obtenidos de semilla utilizando 2,4-D en concentración de -- 1 ppm. Nota.- En 2 y 10 ppm de kinetina se forman raíces; □ % de callos con un diametro entre 8 y 10 mm.; ▤ % de callos con un diametro entre 5 y 7 mm.; ▨ % de callos con un diametro entre 2 y 4 mm.



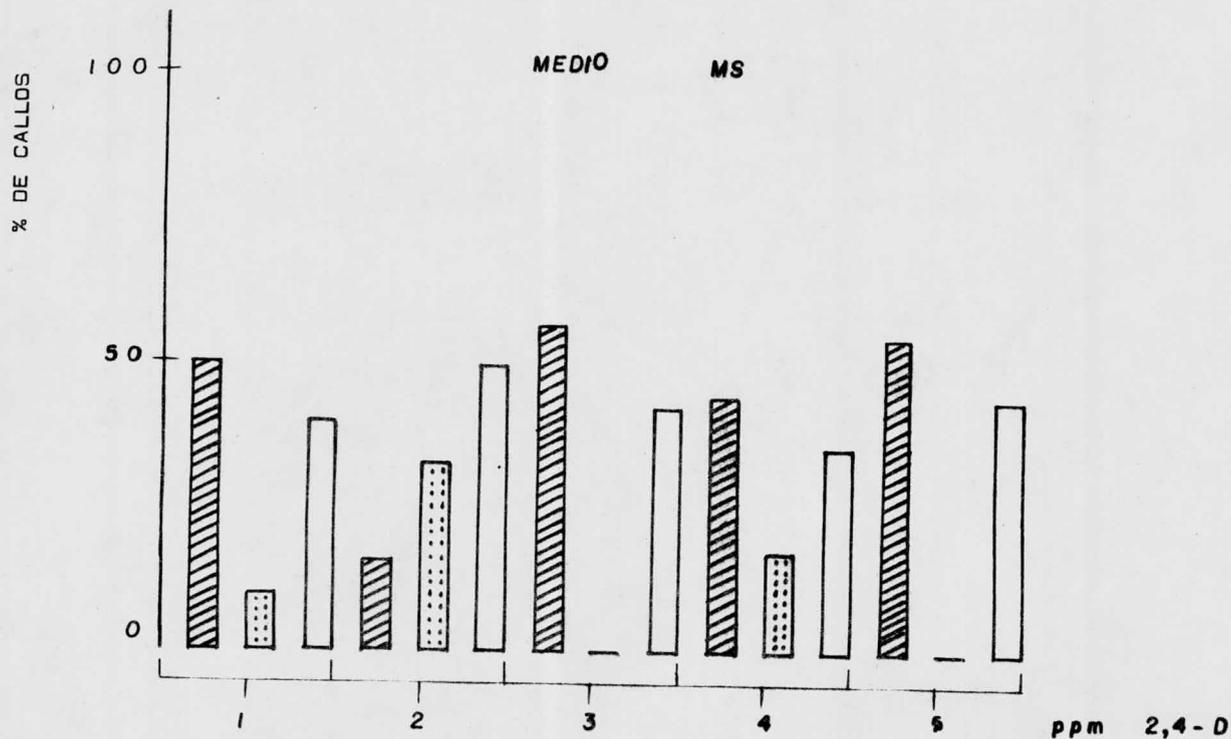
GRAFICA VIII.- Observación a los 24 días del crecimiento de los callos de centeno, obtenidos de semilla utilizando 2,4-D en concentración de 2 ppm Nota.- En 2 y 10 ppm de kinetina se forman raíces; □ % de callos con un diámetro entre 8 y 10 mm.; ▤ % de callos con un diámetro entre 5 y 7 mm.; ▨ % de callos con un diámetro entre 2 y 4 mm.



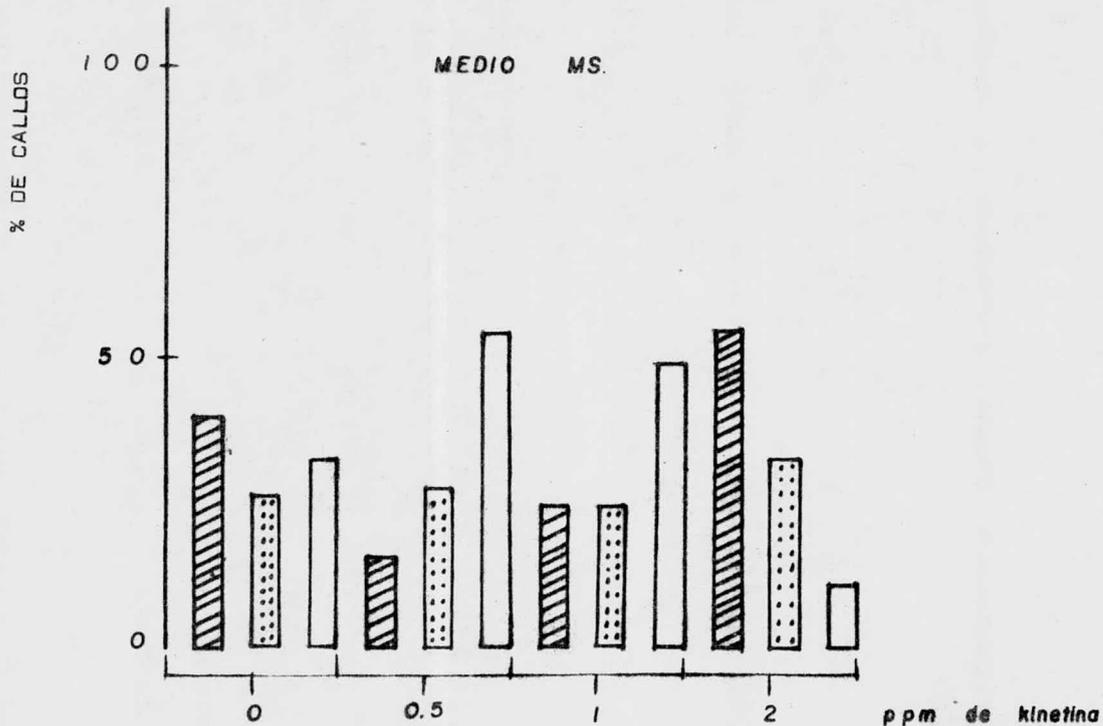
GRAFICA IX.- Observación a los 39 días, del crecimiento de los callos de trigo obtenidos de semilla utilizando kinetina en concentración de 0.5-ppm; □ % de callos con un diametro entre 8 y 10 mm.; ▤ % de callos con un diametro entre 5 y 7 mm.; ▨ % de callos con un - diametro entre 2 y 4 mm.



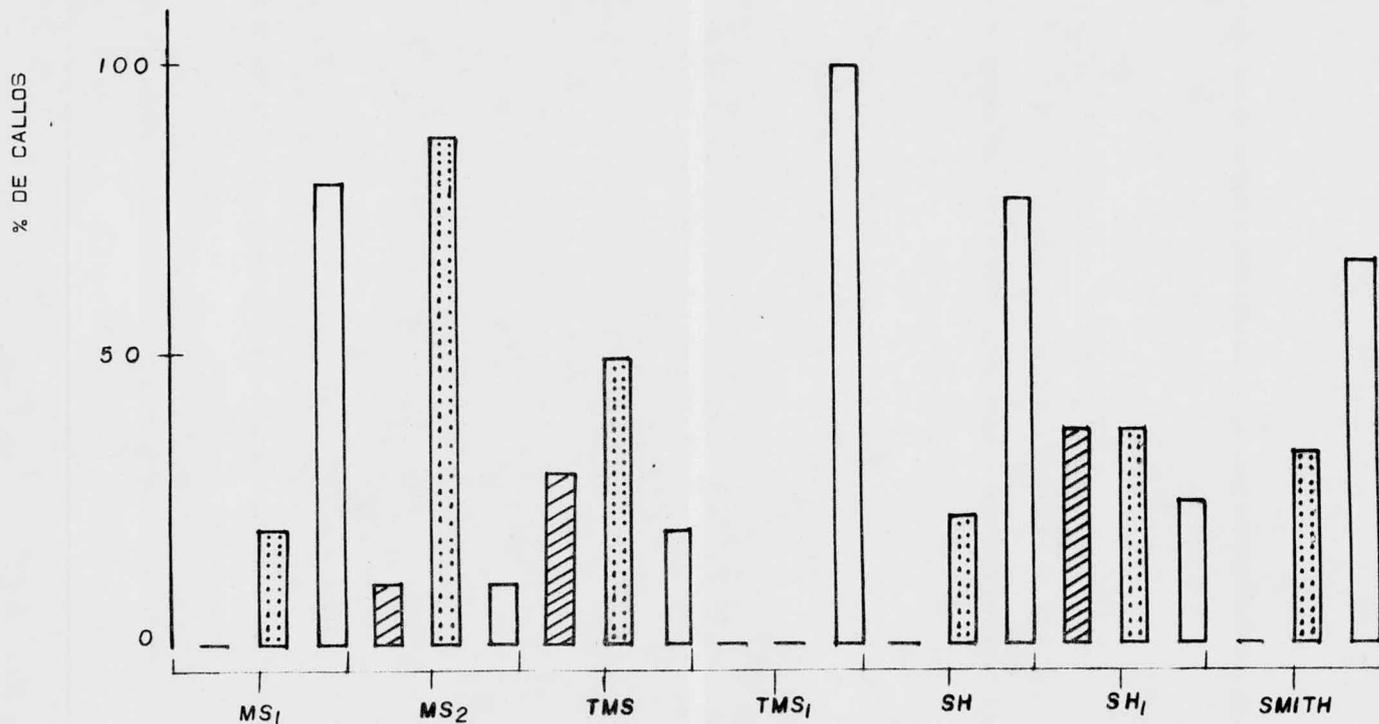
GRAFICA X.- Observación a los 39 días, del crecimiento de los callos de trigo, obtenidos de semilla utilizando 2,4-D en concentración de 2 ppm.; - □ % de callos con un diámetro entre 8 y 10 mm.; ▤ % de callos con un diámetro entre 5 y 7 mm.; ▨ % de callos con un diámetro entre 2 y 4 mm.



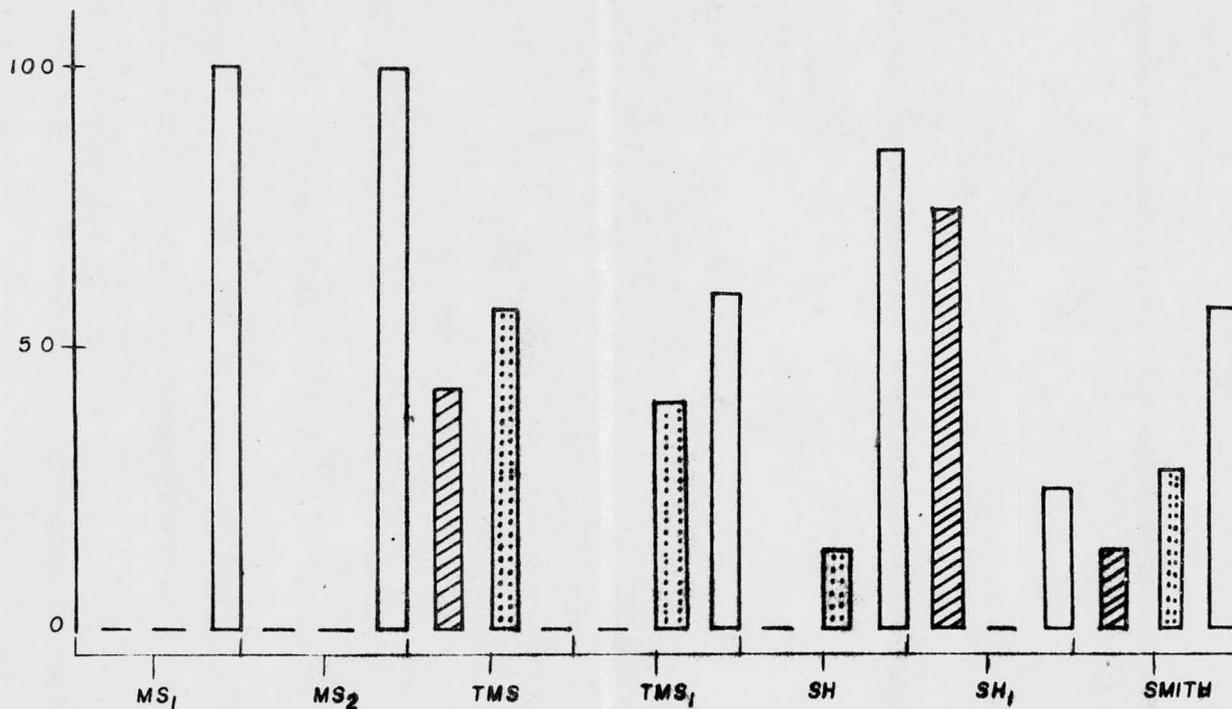
GRAFICA XI.- Observación a los 39 días, del crecimiento de los callos de centro, obtenidos de semillas utilizando kinetina en concentración de 0.5 ppm; □ % de callos con un diámetro entre 8 y 10 mm.; ▤ % de callos con un diámetro entre 5 y 7 mm.; ▨ % de callos con un diámetro entre 2 y 4 mm.



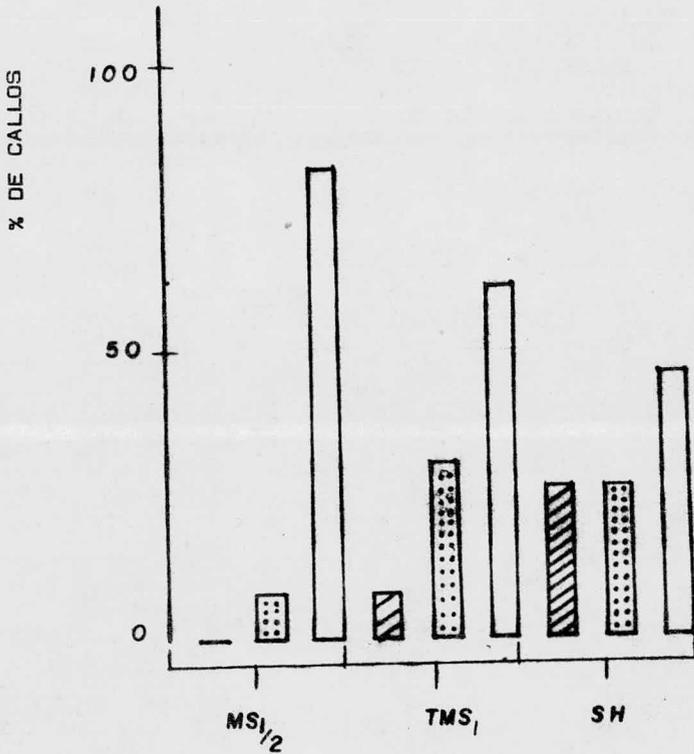
GRAFICA XII.-Observación a los 39 días, del crecimiento de los callos de cente no, obtenidos de semilla utilizando 2,4-D en concentración de 2 - ppm.; □ % de callos con un diametro entre 8 y 10 mm.; ▤ % - de callos con un diametro entre 5 y 7 mm.; ▨ % de callos con un diametro entre 2 y 4 mm.



GRAFICA XIII.-Observación a los 44 días, del crecimiento de los callos de trigo obtenidos de embrión utilizando los medios señalados. Nota.- Los callos producidos en el medio MS₂ presentan un color café oscuro; □ % de callos con un diámetro entre 5 y 6 mm.; ▤ % de callos con un diámetro entre 3 y 4 mm.; ▨ % de callos con un diámetro entre 1 y 2 mm.

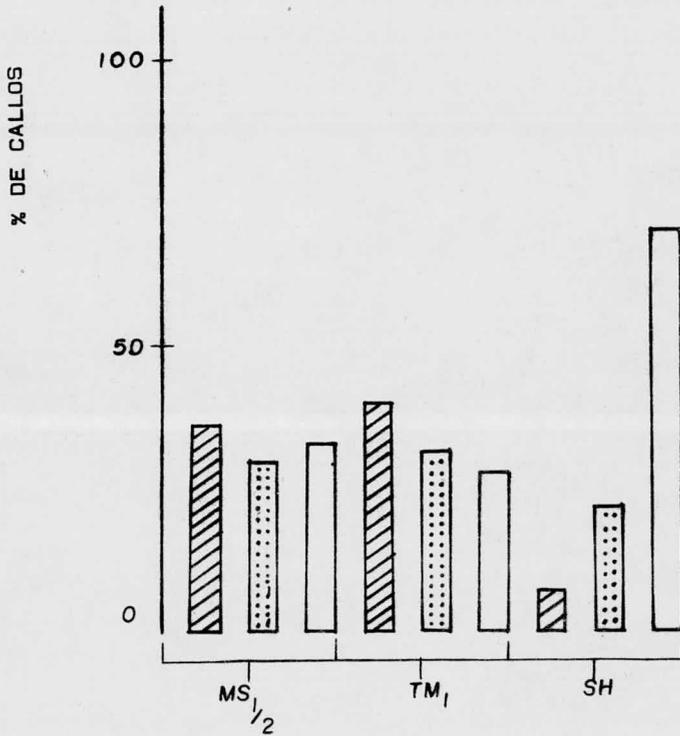


GRAFICA XIV.-Observación a los 44 días, del crecimiento de los callos de centro, obtenidos de embrion utilizando los medios señalados. Nota.-- Los callos producidos en el medio MS₂ presentaban un color café oscuro; □ % de callos con un diámetro entre 5 y 6 mm.; ▤ % de callos con un diámetro entre 3 y 4 mm.; ▨ % de callos con un diámetro entre 1 y 2 mm.



GRAFIA XV.-

Observación a los 46 días del crecimiento de los callos de trigo, obtenidos de embrion utilizando 0.1 ppm de kinetina, 0.5 ppm de 2,4-D y los medios señalados; □ % de callos con un diámetro entre 5- y 6 mm.; ▤ % de callos con un diámetro entre 3- y 4 mm.; ▨ % de callos con un diámetro entre 1- y 2 mm.



GRAFICA XVI.- Observación a los 46 días del crecimiento de los callos de centeno, obtenidos de embrion utilizando 0.1 ppm de kinetina, 0.5 ppm de 2,4-D y los medios señalados; □ % de callos con un diametro entre 5 y 6 mm.; ▤ % de callos con un diametro entre 3 y 4 mm ▨ % de callos con un diametro entre 1 y 2 mm.

VII CONCLUSIONES

- 1.- El medio de cultivo utilizado tiene un papel determinante - en la inducción de callos de trigo y centeno.
- 2.- Las fitohormonas con las que se logra una mejor inducción - de callos de trigo y centeno son 2,4-D y kinetina.
- 3.- Existe una relación de 2,4-D: kinetina diferente para inducir callos a partir de semillas y a partir de embriones de trigo y centeno, en la cual la inducción de callos es más - adecuada.
- 4.- La semilla completa produce probablemente antagonistas de - las fitohormonas 2,4-D y kinetina.
- 5.- El inducir callos a partir de embriones resulta más adecuada - do debido a que se obtiene tejido más homogéneo.
- 6.- La frecuencia con la que se logra dediferenciar un tejido - menos diferenciado es más alto y el tiempo en el que se - - logra ésto mas corto, que cuando se parte de tejido más diferenciado.

VIII BIBLIOGRAFIA

- 1.- YAMADA. Y. TISSUE CULTURE STUDIES ON CEREALS, APPLIED AND -
FUNDAMENTAL ASPECTS OF PLANT CELL, TISSUE AND -
ORGAN CULTURE. EDS. REINERT/BAJAJ. EN PRENSA.
- 2.- BASTIN R. TRATADO DE FISILOGIA VEGETAL. COMPAÑIA EDITORIAL
CONTINENTAL, S.A. PRIMERA EDICION ESPAÑOLA DE -
LA SEGUNDA EDICION BELGA. 1970.
- 3.- WARICK R.P. AND FUCHS. W. H. TISSUE CULTURES OF WHEAT ROOT-
CALLUS IN VITRO. NATURWISSENSCHAFTEN 55. Jg., -
HEFT 10:498-499 (1968).
- 4.- CAREW. D.P., SCHWARTING A.E. PRODUCTION OF RYE EMBRYO CALLUS
BOT. GAZ. 119: 233-239 (1968)
- 5.- SHERIDAN WILLIAN F. TISSUE CULTURE OF WHEAT, RYE, AND THEIR
HIBRID. PROC. 4TH. INTERNAT. WHEAT GENETICS - -
SYMPOSIUM MISSOURI AGR. EXP. STA., COLUMBIA Mo.
865-871. (1973).
- 6.- DUDITS D., NEMENT G., AND HAYDUZ. STUDY OF CALLUS GROWTH --
AND ORGAN FORMATION IN WHEAT (TRITICUM - - --
AESTIVUM) TISSUE CULTURES. CANADIAN JOURNAL OF-
BOTANY. 53 (10): 957-963 (1975).

- 7.- GAMBORG OLUF L. AND EVELEIGH D.E. CULTURE METHODS AND -- --
DETECTION OF GLUCANASES IN SUSPENSION CULTURE --
OF WHEAT AND BARLEY. CANADIAN JOURNAL OF -- --
BIOCHEMISTRY. 46: 417-421 (1968).
- 8.- SHIMADA T., SASAKUMA T., AND TSENEWAKI K.. IN VITRO CULTURE
OF WHEAT TISSUES. I CALLUS FORMATION, ORGAN -- --
REDIFFERENTIATION AND SINGLE CELL CULTURE. CAN.
J. GENET. CITOL. 11: 294-304. (1969).
- 9.- TRIONE E. J., JONES L. E., ANA METZGER R. J.. IN VITRO -- --
CULTURE OF SOMATIC WHEAT CALLUS TISSUE AMER. -- --
J. BOT. 55(5): 529-531 (1969).
- 10.- MASCARENHAS, A. F., MEERA PATHAK, HENDRE R. R. AND -- ---
JAGANNATHAN V.. TISSUE CULTURES OF MAIZE, -- --
WHEAT, RICE AND SORGHUM. PART I INITIATION OF --
VIABLE CALLUS AND ROOT CULTURES. INDIAN JOURNAL
OF EXPERIMENTAL BIOLOGY 13: 103-107 (1975).
- 11.- MEYER, ANDERSON, BDHNING AND FRATIANNE.. INTRODUCTION TO -- --
PLANT PHYSIOLOGY. D. VAN NOSTRAND COMPANY NEW --
YORK/CINCINNATI/TORONTO/LONDON/MELBOURNE -- --
COPYRIGHT C. BY LITLON EDUCATIONAL PUBLISHING,
INC. 1973.

- 12.- ANTON LANG. MAJOR PROBLEMS IN DEVELOPMENTAL BIOLOGY ED. ---
MICHAEL LOCKE. ACADEMIC PRESS N.Y. INTRACELLULAR
REGULATION IN PLANTS p. 251 (1969).
- 13.- SCHNEIDER, E. A. AND WHITMAN, ANNU. REV. PLANT PHYSIOL - -
25: 487. (1974).
- 14.- BLACK, P.S. AND R. H. HAMILTON, PLANT PHYSIOL 48: 603. - --
(1971).
- 15.- WIGHT, F. BIOCHEM. SOC. SYMP. 38: 247 (1973)
- 16.- PLOGLER, C. E. AND DAHMUS; M.E. PLANT PHISOL. 54: 88 (1974)
- 17.- KUTAEK. M., KEFELI. BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY OF PLANT -
GROWTH SUSTANCES ED. F. WIGHMAN, G. SETTERFIELD,
127-52. OTAWA RUNGE 1642 pp. (1968).
- 18.- GIBSON R. A., SCHENEIDER, E.A., WIGTMAN F. J. EXP. BOT. ---
23: 381-99 (1972).
- 19.- WIGHTMAN F. REGULATEURS NATUREIS DE LA CROISSANCE VEGETALE.
C.N.R.S. PARIS 123: 191-212 (1964).
- 20.- WIEHNER S. LIBBERT E. PHYSIOL. PLANT. 21: 227-41. (1968).
- 21.- WIEHNER S. LIBBERT E. PHYSIOL PLANT. 21: 500-509.
- 22.- IDEM 13.



- 23.- TULI, V. AND H.S. MOYED, J. MOL. BIOL. 244: 4916 (1969).
- 24.- BASU, P.S. AND V. TULI. PLANT PHYSIOL. 50: 499. (1972)
- 25.- SOTINER, T. et. al. PHYSIOL PLANT 23: 775 (1970).
- 26.- MASUDA Y AND TOMIMOTO, E., PLANT AND CELL PHYSIOL 8: 458 -
(1967).
- 27.- IHLE, J. N. AND DURE, L III BIOCHEM BIOPHYS. RES. COMM. --
38: 995 (1970).
- 28.- CHEN D. AND OSBORNE E. J. NATURE 226: 1157 (1970).
- 29.- AUDUS L.J. "IN THE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF -- -- --
HERBICIDES" ED. ACADEMIC PRESS. N.Y. (1964).
- 30.- ELNORA A. SCHEIDER AND F. WIGHTMAN. METABOLISM OF AUXIN --
IN HIGHER PLANTS. ANN. REV. PLANT. PHYSIOL 25:
487-513. (1974)
- 31.- HALL, R.H. ANNU. REV. PLANT. PHYSIOL 24: 415 (1973)
- 32.- KENDE, H. INTERNATIONAL REVIEW OF CYTOLOGY 31: 301 (1971).
- 33.- SKOOG F. ANNU. REV. PLANT. PHYSIOL 21: 359. (1970).
- 34.- LETHAM D.S. ET. AL PROC. CHEM SOC. PAG. 230. (1964).
- 35.- DAS, N.K., PATAU, K. AND SKOOG, F. PHYSIOL. PLANT 9: -- --
640-51 (1956).

- 36.- PATAU, K. DAS N.K. AND SKOOG, F. PHYSIOL. PLANT. 10: - ---
949-66 (1957).
- 37.- DYSON W. H. AND HALL R. H. PLANT. PHYSIOL 50: 116-21 (1972)
- 38.- EINSET, J.W. AND SKOOG, F. PROC NATN. ACAD. SCI. U.S.A. - -
70: 658-60 (1973).
- 39.- JOUANNEAU, J.P. PHYSIOL. PLANT. 23: 232-44 (1970).
- 40.- BERGMANN, L. PLANTA 62: 221-54 (1964).
- 41.- ALICJA SZWEYROWSKA. THE ROLE OF CYTOKININS INT THE CONTROL-
OF CELL GROWTH AND DIFFERENTIATION IN CULTURE.-
CAPITULO 19.
- 42.- RICHMOND, A.E., SACHS, B. AND OSBORNE, D.J. PHYSIOL. PLANT.
24: 176-80 (1971).
- 43.- KLAMBT, D. EINFLUB VON AUXIN UND CYTOKININ AUF DIERNA- - ---
SYNTHESE IN STERILEM TABAKGEWEBE.PLANTA 118: --
7-16 (1974).
- 44.- DIETER KLAMBT. CYTOKININ EFFECTS ON PROTEIN SYNTHESIS OF --
IN VITRO SYSTEMS OF HIGHER PLANTS. PANT CELL --
PHYSIOL. 17: 73-76 (1975).
- 45.- BERRIDGE, M., R. RALPH AND D. LETHAM: THE BINDING OF KINETIN

TO PLANT RIBOSOMES. BIOCHEM. J. 119: 75-84 --
(1970).

46.- BERRIDGE, M., R. RALPH AND D. LETHAM: ON THE SIGNIFICANCE-
OF CYTOKININ BINDING TO PLANT RIBOSOMES. PLANT
GROWTH SUBSTANCES, p. 248-255 (1970).

EDITED BY D.J. CARR. SPINGER-VERLAG, BERLING --
(1972).

47.- FOX; J.E. AND J.L. ERION: A CYTOKININ BINDING PROTEIN --
FROM HIGHER PLANT RIBOSOMES. BIOCHEM. BIOPHYS.
RES. COMMUN. 64: 694-700 (1975).

48.- IDEM. 8

49.- IDEM. 6

50.- MASAYUKI TAKEUCHI. METODO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.
SECRETARIA DE AGRICULTURA Y GANADERIA. ESCUELA
NACIONAL DE AGRICULTURA COLEGIO DE POSGRADUA--
DOS RAMA DE GENETICA (1973).

51.- MURASHIGE, T. F. SKOOG. A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH-
AND BIOASSAYS WITH TABACCO TISSUE CULTURES. --
PHYSIOLOGY PLANTARUM. 15: 473-497 (1962).

52.- NAGATA, T. I. TAKEBE. PLATING OF ISOLATED TABACCO - - -
MESOPHYL PROTOPLASTS ON AGAR MEDIUM.
PLANTA (BERL) 99: 12-20 (1971)

- 53.- SCHENK, R. U., HILDERBRANDT, A.C.: MEDIUM AND TECHNIQUES --
FOR INDUCTION AND GROWTH OF MONOCOTYLEDONOUS -
AND DICOTYLEDONOUS PLANT CELL CULTURE.
- 54.- SMITH, W.C., IN METHODS IN VIROLOGY, VOL 1, EDITED BY K. -
MARMAROSCH AND H. KOPROWAKI (ACADEMIC PRESS, -
INC., NEW YORK), 533 (1967).
- 55.- T. ELLIOT WEIER, C. RALPH STOCKING, MICHAEL G. BARBOUR --
BOTANY AN INTRODUCTION TO PLANT BIOLOGY , ---
FIFTH EDITION, UNIVERSITY OF CALIFORNIA. ---
DAVIS CALIFORNIA. EDITORIAL JOHN WILEY AND SONS
691 pp. (1974).