

Además, ya que la CH puede tener contenidos bajos de algunos aminoácidos como la metionina, el triptófano y la fenilalanina, éstos se pueden añadir a los cultivos recalcitrantes (3 mg/litro de L-metionina, 4 mg/litro de L-triptófano, y 5 mg/litro de L-fenilalanina).

## Levadura y extracto de malta

La levadura y el extracto de malta de cebada generalmente se suministran en concentraciones respectivas de 0.5% hasta 1% y de 0.1% v/v. Estas dos sustancias se pueden considerar también como buenas fuentes de nitrógeno reducido, de precursores potenciales de las adenil-citocininas, e incluso de las mismas adenil-citocininas. Van Staden et al. (1975) identificaron en el extracto de malta Difco la ZEA y los compuestos relacionados; pero Sandstedt et al. (1960) ensayaron los L-aminoácidos en el cultivo de tejidos de tabaco, en las proporciones presentes en el extracto de levadura Bacto, y encontraron que los ácidos aspártico y glutámico podían por sí solos sustituir a la mezcla entera.

Muchos investigadores encontraron que el extracto de malta de cebada era benéfico cuando se utilizaba como un suplemento (Lowenberg et al., 1952; Gautheret, 1959). Sin embargo, en otros casos, cuando el extracto de malta de cebada se utilizaba como una fuente de nitrógeno reducido en los cultivos, los tejidos podían oscurecerse y morir. Por otra parte, las maltas de otros cereales pueden ocasionar diferentes respuestas; por ejemplo la malta del ragi (*Eleusine coracana*), un cereal ampliamente utilizado en la India, ha mostrado ser una fuerte estimuladora de algunos tejidos (Murthy Reddy et al., 1973). Por consiguiente, esto refuerza el hecho de que diversos tejidos responden diferentemente a varios suplementos.

## Vitaminas

Las plantas verdes se consideran normalmente autótrofas para las vitaminas, pero puede ser necesario añadir al medio algunas de ellas, hasta cuando los cultivos crezcan o se hayan vuelto verdes. En la mayoría de los medios, la tiamina, la piridoxina y el ácido nicotínico se consideran benéficas y se añaden de forma rutinaria, por conveniencia. Desde hace mucho tiempo se sabe que las puntas radicales escindidas son incapaces de sintetizar la tiamina y presentan un requerimiento definitivo por la misma cuando se van a cultivar continuamente. En realidad, en la planta intacta las raíces deben obtener su tiamina del vástago donde es sintetizada.

Otras vitaminas (ácido pantoténico, biotina, riboflavina y colina) pueden ser útiles pero no absolutamente necesarias. El ácido ascórbico (10 a 100 mg/litro) se considera benéfico en algunos casos, debido probablemente a su capacidad para actuar como un agente reductor y para retrasar la formación de sustancias similares a la melanina, que inhiben el crecimiento, y no debido a su papel como 'vitamina'. También se ha sugerido que los efectos estimuladores del crecimiento que tiene el jugo de tomate (Vacín et al., 1949; Nitsch, 1954) probablemente se deben a una respuesta de este tipo, y no a la presencia de alguna sustancia de división celular (Arditti, 1966).

El ácido ascórbico no parece ser tan bueno como el glutatión (10 a 100 mg/litro) para retrasar el oscurecimiento de algunos tejidos recalcitrantes, ya que se autooxida más rápidamente que este último. Otros afirman que la vitamina B12 es benéfica para el establecimiento de los cultivos de tejidos y células (Reinert et al., 1956).

En cualquiera de los suplementos mencionados hay que tener en cuenta su termolabilidad. La glutamina, la asparagina, la hipoxantina y el ácido ascórbico deben considerarse termolábiles en cualquier experimento; es decir, deberán esterilizarse por filtración y añadirse separadamente al medio enfriado, teniendo las precauciones adecuadas para mantener la esterilidad. El pantotenato de calcio, la tiamina HCl, la riboflavina, y el triptófano también se encuentran afectados por el calor, aunque su degradación se considera leve.

## **Purinas y Pirimidinas**

Generalmente se ha reconocido que la levadura, la malta y los extractos selectos de tejidos, al igual que el endosperma líquido, pueden suministrar purinas o pirimidinas. Del extracto del endosperma líquido del maíz se ha logrado el aislamiento masal de las purinas, adenina, adenosina, uracilo, xantina e isoguanina; éstas son activas separadamente o en combinación con otras fracciones del extracto de maíz (Shantz et al., 1964). Las purinas, la adenina y el uracilo también se han aislado, en forma cristalina, del AC.

Un trabajo anterior mostró que, generalmente, es posible aumentar levemente las propiedades estimuladoras del crecimiento del AC entera añadiendo adenina, adenosina o ácido adenílico. Los experimentos diseñados para determinar si la actividad de varios tipos de compuestos promotores del crecimiento se podía aumentar al combinarlos con una

mezcla general de purina, mostraron que cantidades equimolares de adenina, guanina, ácido adenílico, guanosina, xantina, hipoxantina, adenosina y ácido guanílico no tenían un efecto promotor del crecimiento cuando se añadían al medio basal en concentraciones de 20 mg/litro.

Al añadir la mezcla de purina a los compuestos estimuladores (difenilurea, *Aesculus-leucoantocianina*, ácido indol-3-acético, y ácido benzotiazolil-2-oxiacético) tampoco se aumentó de manera significativa la respuesta del crecimiento, a excepción de la correspondiente al ácido benzotiazolil-2-oxiacético. Con este último la mezcla de purina parecía ser significativamente sinérgica, aunque en presencia de la CH este efecto desapareció notoriamente.

Por lo tanto, aunque parece que no hay razón para pensar que cualquiera de los promotores específicos de la división celular corresponden directamente a cualquiera de las purinas libres o a las sustancias relacionadas con las pirimidinas que ocurren naturalmente, es dogma corriente que las sustancias asociadas con el metabolismo del ácido nucleico pueden, al menos, ser limitantes, y que por tanto se puede requerir su suministro para asegurar el crecimiento de los cultivos.

Sería razonable añadir ciertos precursores como el ácido orótico, la glicina y los compuestos de amonio. Igualmente, pueden ensayarse los derivados del ácido nucleico o análogos suyos como la KIN (6-furfurilaminopurina, 6-anilino purina, 6-succinilaminopurina), o sustancias comprometidas en la biosíntesis del ácido nucleico (por ejemplo, el ácido nicotínico o el ácido fólico) en casos especiales en que los tejidos son recalcitrantes.

El Cuadro 3.6 da la composición de tres soluciones de tales compuestos, ideadas de manera arbitraria. Se han elaborado como soluciones madre 10X en agua destilada, para usarlas en concentraciones de 1, 10 y 50 ml de solución por litro de medio basal.

En algunos casos no se observa un beneficio aparente al añadir cualquiera de los suplementos por separado o en combinación; en otros casos parece presentarse un efecto tóxico que se manifiesta por el oscurecimiento de los tejidos, y en otros casos se observa un efecto benéfico. Por consiguiente, pueden existir casos en los que combinaciones sutiles de los compuestos presentados en el Cuadro 3.6 (lo que llamamos nuestro 'coctel purina-pirimidina') resulten benéficas, pero siempre y cuando se añadan en cantidades extremadamente diluidas.

Cuadro 3.6. Mezclas de purinas y pirimidinas<sup>a</sup> que se pueden añadir a los medios de cultivo.

<b>Solución A</b>		<b>Solución B</b>	
Componentes	Contenido (mg/litro)	Componentes	Contenido (mg/litro)
Hipoxantina	25.00	Acido 5-metildesoxicitidílico	0.10
Adenosina	10.00	Acido orótico	5.00
Citocina	10.00	Acido citidílico	2.00
Uridina	0.20	Acido guanílico	5.00
Uracilo	5.00	Acido adenílico	2.00
Xantina	5.00	Acido desoxiadenílico	0.20
Guanosina	1.00	Acido desoxicitidílico	0.02
Desoxinosina	0.10	Acido desoxiguanílico	0.20
<b>Solución C</b>			
Componentes	Contenido (mg/litro)		
Cloruro de colina	10.00		
Sulfato de citidina	0.5		
5-metilcitocina	0.1		
5-metildesoxicitidina-HCl	0.1		
Timidilato de calcio	5.0		

a. Pueden elaborarse como soluciones 10X en agua destilada y emplearse solas o en combinación, usando concentraciones de 1, 10 y 50 ml por litro de medio basal. Todas las soluciones se esterilizan por filtración.

## Auxinas, Citocininas y Otros Reguladores del Crecimiento

Se sabe que las líneas habituales y los tumores son capaces de proliferar en un medio compuesto estrictamente de sales inorgánicas, una fuente de carbono y una o dos vitaminas. Por otra parte, hay una gran cantidad de tejidos que no crecen en este medio mínimo; estos últimos tejidos, que se supone son 'normales', sólo crecerán cuando se les suministre alguna sustancia reguladora del crecimiento. Las sustancias reguladoras se pueden suministrar en forma de endospermas líquidos como el AC o de compuestos químicos más definidos.

En el trabajo de cultivo de tejidos, el uso de promotores del crecimiento naturales y sintéticos está bien documentado. No se pretende revisar esta literatura tan voluminosa (Steward et al., 1971; Abeles, 1973; Crozier, 1981; Addicott, 1983; Nickell, 1983; Scott, 1984; MacMillan, 1984); sin

embargo, se harán algunas consideraciones generales sobre las diversas clases de sustancias promotoras del crecimiento que se han encontrado útiles para el establecimiento y mantenimiento de cultivos de tejidos.

## **Auxinas**

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos.

Existen varias auxinas llamadas 'naturales', que incluyen AIA, indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, indol-3-carboxialdehído, indol-3-acetaldehído, indol-3-acetamida, ácido indol-3-carboxílico, ácido indol-3-propiónico, ácido 5-hidroxiindol-3-acético, ácido indol-3-acetilaspártico, y otras; es probable que, a medida que se realicen más investigaciones, se descubran más sustancias de esta naturaleza. De las auxinas 'naturales', el AIA es el compuesto de mayor utilización (Scott, 1984).

También se utiliza ampliamente un buen número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se han producido sintéticamente; son las llamadas 'auxinas sintéticas', entre las cuales el 2,4-D, el ANA y el AIB se encuentran ampliamente disponibles y se utilizan comúnmente. También existen muchos compuestos que son derivados de los ácidos fenilacético o fenoxiacético (clorosustituidos) y han encontrado una amplia utilización.

En la práctica, el uso de las auxinas es un arte. No es posible establecer una concentración particular de la auxina que se debe utilizar en un solo caso. Sin embargo, en general se utiliza el AIA en concentraciones que varían de 0.001 a 10 mg/litro, con un punto óptimo alrededor de 0.1 a 1 mg/litro; el 2,4-D se utiliza en concentraciones que varían de 0.1 a 10 mg/litro, con un punto óptimo que frecuentemente se encuentra alrededor de 1 a 5 mg/litro; el ANA generalmente se utiliza en concentraciones levemente mayores (1 a 10 mg/litro), con un punto óptimo cerca de 2 mg/litro.

Cabe mencionar que existe una gran cantidad de literatura sobre las concentraciones adecuadas de auxinas que pueden ser necesarias para iniciar el cultivo de tejidos o de células de una determinada especie de planta (Durbin, 1979; Pierik, 1979; Evans et al., 1983; Sharp et al., 1984; Ammirato et al., 1984).

A menudo es necesaria una concentración de auxinas sustancialmente menor para mantener los cultivos. Uno de los mejores ejemplos que se conocen de un cambio nominalmente 'permanente', en relación con el requerimiento de auxina en los tejidos cultivados, es el de la 'habitación' a esta sustancia; en esta situación, tejidos que originalmente requerían un suministro exógeno de auxina para el crecimiento, pierden gradualmente este requerimiento (Gautheret, 1955; 1959). Lo mismo se aplica a las citocininas (Meins et al., 1978).

Steward et al. (1955) encontraron que el ácido benzotiazol-2-oxiacético (BTOA) es muy activo en la estimulación de la división celular en tejidos tanto de raíz de zanahoria como del tubérculo de alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*). El BTOA incluso sobrepasó la actividad del AC entera cuando se aplicó a explantes de la alcachofa de Jerusalén en un medio con agar.

Desde esa primera observación, el BTOA se ha ensayado rutinariamente para establecer nuevos cultivos, en concentraciones que varían de 0.4 mg/litro a unos 10 mg/litro (con su punto óptimo alrededor de 2 a 5 mg/litro). El BTOA nunca ha mostrado un efecto realmente sinérgico con el AC, como es el caso de 2,4-D o de ANA, pero en algunos casos puede promover un mejor crecimiento en presencia del AC.

Generalmente sólo se utiliza una auxina cada vez. Sin embargo, para algunos investigadores (Mahlberg, 1959) ocasionalmente ha sido útil el uso simultáneo de 2,4-D y ANA, por ejemplo, para el crecimiento de cultivos de *Euphorbia marginata*. Ya que varias auxinas parecen tener diferentes sitios de acción, en ciertos casos podría ser conveniente ensayarlas, incluso en combinaciones más extensivas.

En algunos casos, la adición de una de las auxinas al medio basal puede ser suficiente para iniciar y sustentar el crecimiento. Sin embargo, desde hace mucho tiempo se sabe que se puede obtener un efecto sinérgico entre una auxina y los factores de crecimiento como los encontrados en el AC (Steward et al., 1951). Por lo tanto, en la práctica sería deseable, por lo menos al principio cuando se está tratando de iniciar nuevos cultivos, contar con una serie de tratamientos con AC y otros sin esta sustancia.

### **Citocininas y sustancias similares**

Skoog et al. (1955) propusieron el término cinina como un nombre genérico para sustancias naturales y sintéticas que presentaban los mismos tipos de actividad biológica que la KIN (6-furfuril-aminopurina) (Miller et

al., 1956). Con el fin de evitar confusión con el término cinina, según se utiliza en los sistemas animales, un poco más tarde se adoptó la palabra citocinina para designar las sustancias de división celular.

La KIN ha recibido mucha atención como una sustancia estimuladora de la división celular; no se ha demostrado que esté presente como un compuesto natural y generalmente se reconoce como un artefacto. Desde el aislamiento de la KIN, en 1955, se han aislado varias sustancias a partir de preparaciones de ADN, las cuales ocurren naturalmente y están relacionadas con la KIN. Actualmente comprenden la sustancia más conocida de división celular, sustancias promotoras, y las adenilcitocininas. La ZEA (6-[4-hidroxi-ε-metil but-trans-2-enilamino] purina) se considera generalmente como el prototipo de las adenilcitocininas que ocurren naturalmente; es unas 10 veces más potente que la KIN.

Otra citocinina sintética, el BAP, se utiliza actualmente tal vez más que la KIN o la ZEA. Es un compuesto muy activo y se encuentra disponible fácilmente, a un costo más o menos razonable. Cuando se las ensayó en los sistemas del bioensayo de zanahoria y de médula de tabaco, los resultados con estas citocininas indicaron que la KIN y otras adenilcitocininas sólo tienen actividad en presencia de una auxina como AIA. En el bioensayo de zanahoria, generalmente, su actividad es pequeña comparada con el AC entera; en el tejido de alcachofa de Jerusalén, su actividad es insignificante. Sin embargo, todavía se han encontrado otras sustancias relacionadas con la azacinetina, que tienen una notable capacidad para simular el efecto del AC en tejidos de zanahoria, cuando se utilizan en presencia tanto de AIA como de CH.

En una serie de experimentos diseñados para ensayar veinte purinas sustituidas en N6-, ninguno de los compuestos mostró una actividad pronunciada en ausencia de AIA; cuando se ensayaron en combinación con 0.5 mg/litro de AIA, varios de los compuestos fueron extremadamente activos a concentraciones tan bajas como 0.01 mg/litro. Basándose en el incremento de peso fresco, se determinó que seis de estas sustancias podían clasificarse como altamente activas, con respuestas en presencia de AIA que variaban de 50 a 100% del crecimiento de los testigos con AC.

Estos compuestos altamente activos fueron: 6-anilinopurina, 6-m-cloroanilinopurina, 6-butilaminopurina, 6-hexilaminopurina, 6-cloro-hexil-metilaminopurina y 6-(3-fenoxi-propil)-aminopurina. La mayoría de los compuestos restantes mostraron una actividad leve pero significativa.

Aunque se encontró que la KIN, la ZEA, o la BAP eran necesarias para el crecimiento de tejidos escindidos de médula de tabaco, se ha encontrado que las células de tabaco crecen más vigorosamente en presencia de AC. En general, y según la experiencia del autor al utilizar la zanahoria, no se ha encontrado que las citocininas tengan ningún efecto diferente al de la AC, en relación con las propiedades estimuladoras del crecimiento; en realidad, las citocininas tienen un efecto débil o incluso inhibitorio en algunos clones. Cuando se usó la KIN en concentraciones de alrededor de 0.1 a 2.0 mg/litro, generalmente se añade AIA y 6-anilino purina en concentraciones que varían de 0.1 a 1 mg/litro del primero y 0.5 a 1 mg/litro del segundo componente. La ZEA y la BAP se utilizan generalmente a niveles similares; la ZEA se utiliza con más frecuencia a niveles más bajos, ya que es bastante activa.

## Giberelinas

Luego de su aislamiento a partir del hongo *Gibberella fujikuroi*, el ácido giberélico (AG) se convirtió en un tema de intensa investigación, aunque la adición de este compuesto a los medios de cultivo de tejidos ha sido ocasional a pesar de sus efectos fisiológicos tan amplios. Se sabe que hay varias giberelinas, relacionadas con el AG, que son productos complejos del metabolismo del hongo o de plantas superiores, y que son capaces de intervenir en el crecimiento de muchas plantas ocasionando especialmente un alargamiento celular, que de otra forma no ocurriría (Crosier, 1981; MacMillan, 1984). Particularmente, éste es el caso cuando se aplica AG a plantas genéticamente enanas, y en este aspecto las giberelinas difieren de las auxinas.

Cuando se ensaya el AG en el sistema de bioensayo de la zanahoria, estimula la división celular en lugar de producir alargamiento, especialmente en presencia de CH. También se encontró en el bioensayo de zanahoria que el AG se comporta en una forma similar a la 'fracción activa' del AC, aunque cuantitativamente menor, a pesar de que dicha fracción no contiene AG. Incluso en presencia de la 'fracción activa', el AG induce algunas divisiones celulares; puede, de hecho, acentuar el efecto de tal fracción, para que cuando se use en combinación produzca muchas más células pequeñas que cualquier sustancia que actúe por sí sola.

Se ha publicado (Steward et al., 1964) una evaluación de algunas giberelinas en cultivos de zanahoria. Ya que el AG se encuentra muy disponible y ha mostrado ser bastante activo, generalmente es el que se utiliza cuando se desea usar una giberelina; la concentración varía entre 0.01 a 1 mg/litro con un punto óptimo alrededor de 0.1 mg/litro. Schroeder et al. (1957)

encontraron que el AG (25 mg/litro) en combinación con el AIA (1 mg/litro) estimulaba la formación de callo en tejidos escindidos del mesocarpo del fruto del limón maduro (*Citrus medica*).

En la mayoría de los cultivos, los niveles de AG superiores a 1.0 mg/litro son tóxicos; por ejemplo, Blakely (1963) encontró que el AG era tóxico para los cultivos de *Haplopappus*. En resumen, las giberelinas deberían utilizarse en bajos niveles y con cautela; son termolábiles y deberían esterilizarse con filtros (van Bragt et al., 1971a).

## Compuestos Polifenólicos

En la etapa apropiada de desarrollo, tanto el endosperma sólido como el líquido de los frutos inmaduros de *Aesculus woerlitzensis* (Hippocastanaceae) producen extractos promotores del crecimiento (List et al., 1965). Los extractos de las dos regiones morfológicas deben sus propiedades promotoras del crecimiento a dos tipos de sustancias diferentes.

El endosperma más sólido se distingue porque contiene cantidades relativamente grandes de sustancias complejas que pertenecen al grupo de las leucoantocianinas; aunque no son tan activas como las sustancias del endosperma líquido, en la composición global pueden representar una actividad promotora del crecimiento muy potente. Todas las características químicas de estas sustancias, que son difíciles de purificar y no se han obtenido en forma cristalina, son consistentes con las fórmulas químicas publicadas (Steward et al., 1972).

Una vez establecido que estos compuestos promueven el crecimiento, se ensayaron un gran número de otras preparaciones de leucoantocianina, o de sus productos hidrolíticos. En un gran número de casos, las sustancias polifenólicas muestran alguna actividad en la promoción de la división celular en el sistema de ensayo de la zanahoria. Parece que se requiere un monoglucósido para un máximo de actividad, y que esta sustancia debe existir en la forma leuco, ya que la antocianina coloreada y la cianidina son relativamente inactivas.

Puesto que sería demasiado largo discutir todos los resultados acumulados de estas pruebas a través de los años, a continuación se presenta un resumen de los principales de ellos.

De un total de 166 pruebas con 63 compuestos, 123 dieron una respuesta positiva, mientras que 40 no dieron respuesta o fueron negativos. El incremento promedio en el peso fresco total sobre los testigos fue de 26%.

Sin embargo, se observó un efecto más significativo cuando las sustancias de las pruebas se clasificaron en compuestos sintéticos y preparaciones de fuentes naturales. En 46 pruebas, con 21 compuestos polifenólicos sintéticos diferentes, la respuesta total del crecimiento promedio fue de -0.3% en comparación con los testigos; en 120 pruebas con preparaciones de fuentes naturales, la respuesta promedio total fue de +37% sobre la de los testigos. Parece que las sustancias de esta naturaleza general que ocurren naturalmente (leucoantocianinas, catecoles, ácido colinérgico) pueden desempeñar un papel pequeño pero significativo en la estimulación del crecimiento en los tejidos de explantes, mediante la división celular (Nitsch et al., 1962; Lee et al., 1965; Paulet, 1970).

En resumen, existe una lógica bien documentada tras el uso de los compuestos polifenólicos en los medios de cultivo de tejidos, medios que pueden ensayarse en ciertos casos en que los tejidos son particularmente recalcitrantes. Ya que con el uso individual de estas sustancias se obtiene poco efecto por encima del esperado con el endosperma líquido de *Aesculus*, generalmente es más conveniente utilizar este último extracto.

Aunque lo dicho se relaciona predominantemente con endospermas líquidos como el de *Aesculus woerlitzensis*, las generalidades y especificidades deberían ser válidas para las sustancias de otros líquidos que se encuentran en forma natural. En realidad, se puede anticipar que los investigadores en los trópicos y subtropicos tendrán acceso a una amplia gama de líquidos estimuladores del crecimiento que son de origen novedoso, distintivo o incluso morfológicamente único (Steward et al., 1959; Shantz, 1966).

## Otras Observaciones

**Relaciones entre los componentes del medio.** A menudo es difícil ver las relaciones estructurales entre los varios compuestos químicos que poseen una actividad fisiológica, según se ha encontrado en pruebas de crecimiento ampliamente diferentes; el hecho de que tales compuestos puedan funcionar en algunos casos sugiere que se ensayen por lo menos en casos difíciles.

La mayor parte del trabajo realizado sobre cultivo de tejidos ha girado alrededor del uso del AC en presencia o en ausencia de AIA, ANA, 2,4-D o BTOA. En los casos en que los tejidos son especialmente recalcitrantes, se debería ensayar también una amplia gama de otros compuestos conocidos por sus propiedades estimuladoras del crecimiento.

**El pH y otras condiciones del cultivo.** Narayanaswamy et al. (1964) y Raghavan (1966; 1976) han revisado exhaustivamente la literatura en relación con los efectos del pH del medio, de la temperatura y la luz y de los gases en cultivos de embriones; lo mismo se aplica también a los cultivos de células y tejidos. Es suficiente decir que una especie particular puede reaccionar favorablemente a un conjunto de condiciones mientras que otras pueden no hacerlo; por consiguiente, la tarea de decidir las condiciones de cultivo adecuadas puede requerir, en algunos casos, una decisión por el método de ensayo y error (Seibert et al., 1980; Martín, 1980).

Aunque generalmente se supone que los cultivos de tejidos de plantas pueden sobrevivir en un amplio rango de pH, Steward et al. (1952b), encontraron que un medio levemente ácido (pH 6.25) era óptimo para los cultivos de zanahoria. Los pH iniciales de la mayoría de los medios son generalmente de 4.0 a 5.5, en ausencia de varios suplementos de crecimiento. En la mayoría de los casos se requerirá ajustar el pH, aumentándolo con una solución 0.01 ó 0.1 N de hidróxido de potasio o de sodio; normalmente, el ajuste del pH se hace a 5.5, 5.8 ó 6.3. Las orquídeas generalmente se desempeñan mejor en un medio levemente más ácido (Arditti, 1977).

## Referencias

- Abeles, F. B. 1973. Ethylene in plant biology. Academic Press, Nueva York.
- Addicott, F. T. (ed.). 1983. Abscicic acid. Praeger Publishers, Nueva York.
- Ammirato, P. V.; Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Yamada, Y. (eds.). 1984. Handbook of plant cell culture; 3: Crop species. MacMillan Publishing, Nueva York.
- Arditti, J. 1966. The effect of tomato juice and its fractions on the germination of orchid seeds and on seedling growth. American Orchid Society Bulletin 35(3):175-182.
- . 1977. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture: A manual. En: Arditti, J. (ed.). Orchid biology; 1: Reviews and perspectives. Cornell University Press, Nueva York. p. 203-293.
- Ball, E. 1946. Development in sterile culture of stem tips and subadjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and of *Lupinus albus* L. Am. J. Bot. 33:301-318.
- Bidwell, R. G. S.; Barr, R. A. y Steward, F. C. 1964. Protein synthesis and the fate of the protein breakdown products. Nature 203:367-373.

- Blakeley, L. M. 1963. Growth and variation of cultured plant cells. Tesis (Ph.D.). Cornell University, Ann Arbor, Michigan.
- Braun, A. C. y Wood, H. N. 1962. On the activation of certain essential biosynthetic systems in cells of *Vinca rosea* L. Proc. Nat. Acad. Sci. 48:1776-1782.
- Caplin, S. M. y Steward, F. C. 1948. Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. Science 108:655-657.
- Crozier, A. 1981. Aspects of metabolism and physiology of gibberellins. Adv. Bot. Res. 9:33-149.
- De Fossard, R. A. 1984. Tissue culture for plant propagators. 2 ed. University of New England, Department of Botany, Armidale, Australia.
- Dougall, D. K. 1972. Cultivation of plant cells. En: Rothblat, G. H. y Cristofalo, J. (eds.). Growth, nutrition and metabolism of cells in culture. Academic Press, Nueva York. p. 371-406.
- Durbin, R. D. (ed.) 1979. *Nicotiana*, procedures for experimental use. Technical bulletin 1586. U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, E.U.
- Durzan, D. J. y Steward, F. C. 1983. Nitrogen metabolism. En: Steward, F. C. y Bidwell, R. G. S. (eds.). Plant physiology: A treatise. Academic Press, Nueva York. v. 8, p. 55-265.
- Eskew, D. L.; Welch, R. M. y Cary, E. E. 1984. Nickel: An essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. Science 222:621-623.
- Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). 1983. Handbook of plant cell culture; I: Techniques and applications. MacMillan Publishing, Nueva York.
- Gamborg, O. L.; Murashige, T.; Thorpe, T. A. y Vasil, I. K. 1976. Plant tissue culture media. In vitro 12:473-478.
- Gautheret, R. J. 1955. The nutrition of plant tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 6:433-484.
- . 1959. La culture des tissus végétaux. Masson, Paris.
- George, E. F. y Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial operations. Exegetisa, Eversley, Inglaterra.
- Heller, R. 1954. Les besoins minéraux des tissus en culture. Année Biolog. 30:260-281.
- Hewitt, E. J. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. 2 ed. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, Inglaterra.

- Kruse, P. F. y Patterson, M. K. (eds.). 1973. Tissue culture: Methods and applications. Academic Press, Nueva York.
- Lauchli, A. y Bielecki, R. L. (eds.). 1983. Inorganic plant nutrition. Encyclopedia of plant physiology, new series. Springer-Verlag, Nueva York. v. 15, A y B.
- Lee, T. T. y Skoog, F. 1965. Effects of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18:386-402.
- Letham, D. S. 1958. Cultivation of apple-fruit tissue in vitro. *Nature* 182:473-474.
- . 1960. Growth requirements of some pome fruit tissues. *Nature* 188:425-426.
- . 1974. Regulators of cell division in plant tissues; 20: The cytokinins of coconut milk. *Physiol. Plant.* 2:66-70.
- ; Goodwin, P. B. y Higgins, T. J. V. (eds.). 1978. Phytohormones and related compounds: A comprehensive treatise; 2: Phytohormones and the development of higher plants. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Nueva York.
- Lin, M. y Staba, E. J. 1962. Peppermint and spearmint tissue cultures; 1: Callus formation and submerged culture. *Lloydia* 24:139-145.
- Linsmaier, E. M. y Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18:100-127.
- List, A. y Steward, F. C. 1965. The nucellus, embryo sac, endosperm and embryo of *Aesculus* and their interdependence during growth. *Ann. Bot.* 29:1-15.
- Lowenberg, J. R. y Skoog, F. 1952. Pine tissue cultures. *Physiol. Plant.* 5:33-36.
- MacMillan, J. (ed.). 1984. Hormonal regulation of development; I: Molecular aspects of plant hormones. Encyclopedia of plant physiology, new series. Springer-Verlag, Nueva York. v. 9.
- Mahlberg, P. G. 1959. Development of the non-articulated laticifer in proliferated embryos of *Euphorbia marginata* Pursh. *Phytomorphology* 9:156-162.
- Martin, S. M. 1980. Environmental factors; B: Temperature, aeration and pH. En: Staba, E. J. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 143-148.
- Meins, F. y Binns, A. N. 1978. Epigenetic variation in the requirement of plant cells for cytokinins. En: Subtelny, S. y Sussex, I. M. (eds.). The clonal basis of development: Symposium of the Society for Developmental Biology, 35th. *Memorias*. Academic Press, Nueva York. p. 185-201.
- Miller, C. O.; Skoog, F.; Okamura, F. S.; von Saltza, M. H. y Strong, F. M. 1956. The isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J. Am. Chem. Soc.* 78:1375-1380.

- Morel, G. y Wetmore, R. 1951. Tissue culture of monocotyledons. *Amer. J. Bot.* 38:138-140.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Murthy Reddy, K. B. S. y Narayana, R. 1973. Ragi malt, a growth factor for *Vigna sinensis* Endl. callus tissues. *Plant Cell Physiol.* 14:803-814.
- Narayanaswamy, S. y Norstog, K. 1964. Plant embryo culture. *Botan. Rev.* 30:587-628.
- Nickell, L. G. (ed.) 1983. Plant growth regulating chemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.
- Nitsch, J. P. 1951. Growth and development in vitro of excised ovaries. *Amer. J. Bot.* 38:566-577.
- . 1954. Action du jus de tomate sur la croissance de certains tissus et organes végétaux. *Bull. Soc. Bot. France* 101:433-440.
- y Nitsch, C. 1957. Auxin-dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues; 2: Organic nitrogenous compounds. *Amer. J. Bot.* 44:550-564.
- y ———. 1962. Composés phenoliques et croissance végétale. *Ann. Physiol. Veg.* 4:211-225.
- y ———. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85-87.
- Paulet, P. 1970. Role des composés phenoliques dans l'organogénèse: Mémoires 1970. Société Botanique de France, p. 91-94.
- Pierik, R. L. M. 1979. In vitro culture of higher plants: Bibliography. Kniphorst Scientific Bookshop, Wageningen, Holanda.
- Pollard, J. K. 1962. The use of <sup>14</sup>C-labelled compounds in metabolic studies: Effects due to autoclaving <sup>14</sup>C-urea. En: Holden, J. T. (ed.). Amino acid pools. Elsevier Press, Amsterdam, Holanda. p. 69-70.
- ; Shantz, E. M. y Steward, F. C. 1961. Hexitols in coconut milk: Their role in nurture of dividing cells. *Plant Physiol.* 36:492-501.
- Raghavan, V. 1966. Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. *Biol. Rev.* 41:1-58.
- . 1976. Experimental embryogenesis in vascular plants. Academic Press, Nueva York.
- Rehcgil, M. (ed.). 1977. CRC handbook series in nutrition and food; G: Diets, culture media, food supplements; 4: Culture media for cells, organs and embryos. CRC Press, Cleveland, Ohio, E.U.

- . 1978. CRC handbook series in nutrition and food; G: Diets, culture media, food supplements; 3: Culture media for microorganisms and plants. CRC Press, Cleveland, Ohio, E.U.
- Reinert, J. y White, P. R. 1956. The cultivation in vitro of tumor tissues and normal tissues of *Picea glauca*. *Physiol. Plant.* 9:177-189.
- Risser, P. G. y White, P. R. 1964. Nutritional requirements of spruce tumor cells in vitro. *Physiol. Plant.* 17:620-635.
- Sandstedt, R. y Skoog, F. 1960. Effects of amino acid components of yeast extract on the growth of tobacco tissues in vitro. *Physiol. Plant.* 13:250-256.
- Saric, M. R. y Loughman, B. C. (eds.). 1983. Genetic aspects of plant nutrition. Martinus Nijhoff/W. Junk, La Haya, Holanda.
- Schenk, R. U. y Hildebrandt, A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.
- Schroeder, C. A. y Spector, C. 1957. Effect of gibberellic acid and indoleacetic acid on growth of excised fruit tissue. *Science* 126:701-702.
- Scott, T. K. (ed.). 1984. Hormonal regulation of development; 2: The function of hormones from the level of the cell to the whole plant. *Encyclopedia of plant physiology, new series.* Springer-Verlag, Nueva York. v. 10.
- Seibert, N. y Kaddake, P. G. 1980. Environmental factors; A: Light. En: Staba, E. J. (ed.). *Plant tissue culture as a source of biochemicals.* CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 123-141.
- Shantz, E. M. 1966. Chemistry of naturally-occurring growth-regulatory substances. *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 17:409-438.
- y Steward, F. C. 1959. Investigations on growth and metabolism of plant cells; 7: Sources of nitrogen for tissue cultures under optimal conditions for their growth. *Ann. Bot.* 23:371-390.
- y ———. 1964. Growth promoting substances from the environment of the embryo; 2: The growth stimulating complexes of coconut milk, corn and *Aesculus* extracts. En: Nitsch, J. P. (ed.). *Les régulateurs naturels de croissance végétale.* Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. p. 59-75.
- Sharp, W. R.; Evans, D. A.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). 1984. *Handbook of plant cell culture; 2: Crop species.* MacMillan Publishing, Nueva York.
- Singh, M. y Krikorian, A. D. 1980. Related iron in culture media. *Ann. Bot.* 46:807-809.
- y ———. 1981. White's standard nutrient solution. *Ann. Bot.* 47:133-139.

- Skoog, F. y Miller, C. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-131.
- Steward, F. C. y Bleichert, E. F. 1972. Partial and complete growth promoting systems for cultured carrot explants: Synergistic and inhibitory interactions. En: Carr, D. J. (ed.). Plant growth substances. Springer-Verlag, Berlín. p. 668-678.
- y Caplin, S. M. 1951. A tissue culture from potato tuber: The synergistic action of 2,4-D and coconut milk. Science 113:518-520.
- y ———. 1952. Investigations on growth and metabolism of plant cells; 4: Evidence on the role of the coconut-milk factor in development. Ann. Bot. 16:491-504.
- y ———. 1954. The growth of carrot tissue explants and its relation to the growth factors present in coconut milk; 1: The development of the quantitative method and the factors affecting the growth of carrot tissue explants. Année Biologique 30:385-394.
- ; ——— y Millar, F. K. 1952. Investigations on growth and metabolism of plant cells; 1: New techniques for the investigation of metabolism, nutrition, and growth in undifferentiated cells. Ann. Bot. 16:57-77.
- y Krikorian, A. D. 1971. Plants, chemicals and growth. Academic Press, Nueva York.
- ; Neumann, K. H. y Rao, K. V. N. 1968. Investigations on the growth and metabolism of cultured explants of *Daucus carota*; II: Effects of iron, molybdenum and manganese on metabolism. Planta (Berlín) 81:351-371.
- ; Pollard, J. K.; Patchett, A. A. y Witkop, B. 1958. The effects of selected nitrogen compounds on the growth of plant tissue cultures. Biochem. Biophys. Acta 28:308-317.
- y Shantz, E. M. 1954. The growth of carrot tissue explants and its relation to the growth factors in coconut milk; 2: The growth-promoting properties of coconut milk for plant tissue cultures. Année Biol. 30:399-415.
- y ———. 1955. The chemical nature of growth-promoting substances in coconut milk and similar fluids: The present position. En: Wain, R. L. y Wightman, F. (eds.). The chemistry and mode of action of growth substances. Butterworths, Londres. p. 173-186.
- y ———. 1959. The chemical regulation of growth: Some substances and extracts which induce growth and morphogenesis. Ann. Rev. Pl. Physiol. 10:379-404.
- ; ———; Mapes, M. O.; Kent, A. E. y Holsten, R. D. 1964. The growth-promotion substances from the environment of the embryo; 1: The criteria and measurements of growth-promoting activity and the responses induced.

- En: Nitsch, J. P. (ed.). Les régulateurs naturels de la croissance végétale. CNRS Colloque International 123. Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris. p. 45-58.
- Street, H. E. (ed.). 1977. Plant tissue and cell culture. 2 ed. Botanical monographs. University of California Press, Los Angeles, E.U. v. 2.
- Thorpe, T. A. (ed.). 1981. Plant tissue culture, methods and application in agriculture: Proceedings of a symposium based on the UNESCO training course on plant tissue cultures, São Paulo, Brasil, 1978. Memorias. Academic Press, Nueva York.
- Vacin, E. F. y Went, F. W. 1949. Use of tomato juice in the asymbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. 111:175-183.
- Van Bragt, J. y Pierik, R. L. M. 1971a. The effect of autoclaving on the gibberellin activity of aqueous solutions containing gibberellin A3. Misc. Papers Landbouwhogeschool Wageningen 9:133-137.
- ; Mossel, D. A. A.; Pierik, R. L. M. y Veldstra, H. 1971b. Effects of sterilization on components in nutrient media. Misc. Papers Landbouwhogeschool Wageningen 9:1-147.
- Van Overbeek, J. 1942. Hormonal control of embryo and seedling growth. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 10:126-134.
- ; Conklin, M. E. y Blakeslee, A. F. 1942. Cultivation in vitro of small *Datura* embryos. Amer. J. Bot. 29:472-477.
- Van Staden, J. y Drewes, S. E. 1974. Identification of cell division inducing compounds from coconut milk. Physiol. Plant. 32:347-352.
- y ———. 1975. Isolation and identification of zeatin from malt extract. Plant Sci. Letters 4:391-394.
- Vasil, I. K. (ed.). 1984. Cell culture and somatic cell genetics of plants; 1: Laboratory procedures and applications. Academic Press, Nueva York.
- . 1985. Cell culture and somatic cell genetics of plants; 2: Growth, nutrition and preservation. Academic Press, Nueva York.
- . 1986. Cell culture and somatic cell genetics; 3: Plant regeneration and genetic variability. Academic Press, Nueva York.
- Waris, H. 1962. Neomorphosis in seed plants induced by amino acids. Physiol. Plant. 15:736-752.
- White, P. R. 1939. Glycine in the nutrition of excised tomato roots. Plant Physiol. 14:527-538.

*Medios de cultivo: generalidades...*

- . 1943. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. *Amer. J. Bot.* 30:33-36.
- . 1963. *The cultivation of animal and plant cells*. 2 ed. Ronald Press, Nueva York.
- y Grove, A. R. (ed.). 1965. *Proceedings of an international conference on plant tissue culture*. McCutchan Publishing, Berkeley, California, E.U.