

# Capítulo 6

## Micropropagación: conceptos, metodología y resultados

V. M. Villalobos A.\*

T. A. Thorpe\*\*

### Agradecimientos

El presente trabajo fue apoyado en parte por el proyecto PCAFBNA-021310 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. Los autores agradecen al Dr. Alfredo Carballo Quirós por las sugerencias al texto, y a Laura Valencia Enciso por el trabajo mecanográfico.

---

\* Unidad de Recursos Fitogenéticos, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.

\*\* Department of Biology, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canadá.

## **Introducción**

El concepto original de cultivo de tejidos vegetales se ha extendido moderadamente para abarcar tanto el cultivo aséptico de tejidos como el de células y órganos, dentro de un grupo de técnicas que se fundamentan en varios principios. Entre estos principios, los más importantes sin duda son la totipotencialidad celular propuesta por Haberlandt (1902) y la hipótesis del balance hormonal sugerida por Skoog et al. (1957). Aun cuando estos principios fundamentales han sido cuestionados por diferentes autores como Trewavas (1981, 1982) y Firn et al. (1980), parecen encontrar cierto grado de fundamentación en la mayoría de los modelos biológicos empleados en el estudio de la morfogénesis in vitro.

Las técnicas de cultivos asépticos han contribuido no sólo a un mejor entendimiento de los eventos de la diferenciación celular, sino a un mejor aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas. En este último aspecto vale la pena mencionar los siguientes usos de las técnicas del cultivo in vitro: a) mejoramiento genético; b) obtención de plantas libres de virus y otros patógenos; c) conservación de germoplasma; y (d) micropropagación.

Hasta la fecha, la micropropagación es la técnica que ha trascendido con éxito de los ámbitos experimentales a la aplicación práctica. La presente revisión tiene por objeto el análisis de los avances logrados en la micropropagación de especies explotadas por el hombre.

## **El Concepto de Micropropagación**

Tratando de conciliar principios anteriormente discutidos, se puede decir que cuando un inóculo con potencialidad de diferenciación se incuba en condiciones favorables (balance hormonal apropiado) regenera un nuevo individuo.

Aun cuando se ha hecho énfasis en la importancia del balance hormonal, existen otros factores que han probado jugar un papel importante en la diferenciación; sin embargo, antes de analizar estos otros factores, es pertinente definir el concepto de micropropagación. Si el cultivo de tejidos consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta, la micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva in vitro.

En la actualidad, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas (Murashige, 1978), ornamentales (Hughes, 1981) y, más recientemente, en especies leñosas (Thorpe, 1983). En algunas especies, esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación; las más importantes son:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeables.
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos.

## **Pasos en la Micropropagación**

Murashige (1974) ha propuesto tres pasos fundamentales para micropropagar eficientemente una especie: 1) el establecimiento aséptico del cultivo; 2) su multiplicación; y 3) el enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante al suelo. A continuación se discutirán estos pasos con mayor detalle.

### **Establecimiento del cultivo aséptico**

Una vez seleccionado el mejor explante (según las características que se discutirán más adelante) se requiere desinfectarlo superficialmente; la razón: en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante. Para esta desinfección se han empleado diferentes compuestos, siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, el alcohol a diferentes porcentajes, y otros. La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan, en gran medida, por las características del explante; en la práctica, se establecen experimentalmente por ensayo y error.

El explante debe responder eficientemente bajo las condiciones in vitro. Es importante considerar el hecho de que el aislamiento de un tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de estrés que altera su metabolismo celular y, en forma importante, su balance hormonal. Un buen explante es aquel cuyas células sobreviven, en una alta proporción, a la descomposición antes señalada, y que luego responde eficientemente a las condiciones in vitro.

## **Crecimiento del inóculo**

En estado de crecimiento, el explante se multiplica con la formación de callos o sin ella, según las condiciones de cultivo. La fase intermedia de formación de callos se evita cuando se tienen fines de micropropagación debido al hecho, ya ampliamente conocido, de que las plantas provenientes de callos presentan diferentes grados de variación; ésta puede ser de tipo epigenético o corresponder a mutaciones verdaderas (Lankin et al., 1981).

Es importante considerar también que la fase de crecimiento puede deberse a la división de las células, al aumento de su tamaño o a ambas cosas. A este respecto, la diferenciación de novo está asociada con la producción de nuevas células cuya organización está de acuerdo con un 'programa' influido por las condiciones in vitro y la concomitante ganancia en peso seco.

## **Enraizamiento de los brotes y preparación para su trasplante**

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados in vitro requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. El medio de Murashige et al. (1962), por ejemplo, diluido al 50% ha dado resultados positivos en diferentes especies. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citocininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, la eliminación de las citocininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical (Thorpe, 1980).

En la micropropagación a gran escala de especies ornamentales se ha observado que la diferenciación del sistema radical bajo condiciones in vitro no es económicamente costeable, por lo que en algunas empresas se ha sustituido esta fase del proceso por el enraizamiento de brotes en cámaras de humidificación.

Si el sistema radical fue diferenciado *in vitro*, las plantas no se pueden trasplantar directamente a las condiciones de invernadero sin una paulatina adaptación a las condiciones del suelo. A este período de adaptación se le ha denominado período de endurecimiento.

De acuerdo con los procedimientos seguidos por los autores de este capítulo con especies anuales, leñosas y suculentas, las plantas obtenidas *in vitro* se deben lavar cuidadosamente para eliminar todos los residuos de agar, que pueden ser una fuente de contaminación. Posteriormente, se trasplantan a recipientes con suelo estéril y se cubren con bolsas de polietileno, que se van perforando gradualmente hasta que queden eliminadas completamente en un período de 15 a 20 días; esto se hace con el objeto de adaptar paulatinamente las plantas a las condiciones del invernadero. Durante esta fase de endurecimiento, las plantas se riegan preferentemente con medio de cultivo diluido al 50% y posteriormente se sustituye esta fórmula de riego por soluciones nutritivas menos complejas.

## **Factores que Influyen en la Micropropagación**

Existen diferentes factores que determinan el éxito en los sistemas de micropropagación. A continuación se mencionan aquéllos más importantes acerca de los cuales se ha acumulado mayor información.

### **Planta que dona el explante**

El estado fisiológico de la planta que da el explante (planta madre) influye significativamente en su capacidad morfogenética. Se ha encontrado, por ejemplo, que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas (Styer et al., 1983).

Asimismo, se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos et al., 1982b). A este respecto, los meristemas apicales y axilares han sido empleados con éxito en una amplia gama de especies.

La posición relativa de las yemas es otro factor importante. Se ha observado, por ejemplo, que las yemas axilares de rosa, obtenidas de la parte media del tallo, se desarrollan más rápidamente que aquéllas obtenidas de la base o la porción apical (Bressan et al., 1982). Sin embargo, en el

espárrago y la grosella las yemas apicales son las únicas que producen plantas in vitro (Styer et al., 1983).

En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes han sido generalmente la fuente del explante (Villalobos, 1980).

## El explante

Como se mencionó anteriormente, el explante es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo. La selección del explante puede hacerse teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta.

Si las plantas que se van a micropropagar tienen reproducción por semilla, las partes embrionales o de la plántula son las fuentes más comunes de explantes; las semillas pueden ser desinfectadas superficialmente y germinar en condiciones de asepsia. Este método se usa extensivamente en coníferas y otras especies maderables (Villalobos et al., 1982a). En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos han sido generalmente la fuente de los explantes (Villalobos, 1980).

El tamaño del explante no tiene aparentemente mayor influencia. Solamente en el caso de que se pretenda obtener plantas libres de virus, los meristemas (sin primordios foliares) tienen una alta probabilidad de diferenciar plantas libres de estos patógenos; sin embargo, es más difícil regenerar de ellos plantas completas (Villalobos et al., 1982a). Para mayores detalles, consultar el Capítulo 23 de esta publicación.

## Factores físicos

Aun cuando muchos factores pueden influir en la micropropagación, los factores físicos juegan un papel determinante; la luz y la temperatura han sido los factores físicos más extensivamente estudiados. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28 °C. Se han variado los regímenes de temperatura en el día y la noche, y se ha encontrado que únicamente en un reducido número de especies tal variación es ventajosa (Chee et al., 1982).

Recientes investigaciones han comprobado que la luz es un factor fundamental en la morfogénesis (Villalobos et al., 1984). Al respecto se ha observado, en el caso de *Pinus radiata*, que la luz interacciona con una citocinina durante la diferenciación de los brotes adventicios y que la

morfogénesis no ocurre cuando falta uno de esos dos componentes. El papel de la luz en la diferenciación involucra varios componentes como son la intensidad, el fotoperíodo y la calidad; aunque se reconoce la importancia morfogenética de estos componentes, los estudios realizados con el fin de analizarlos son escasos.

## **Medio de cultivo**

De acuerdo con Gamborg et al. (1976) el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física. En el Cuadro 6.1 se presentan los medios de cultivo más comúnmente usados en la micropropagación.

## **Micropropagación de Especies Herbáceas**

Los métodos usados para micropropagar especies herbáceas se basan en cualquiera de los siguientes procesos morfogenéticos: a) estímulo de las yemas axilares, b) diferenciación de brotes adventicios, y c) embriogénesis somática.

### **Estímulo de yemas axilares**

En este caso, las condiciones in vitro estimulan el desarrollo de las yemas axilares permitiendo la formación de una planta por cada yema. La eficiencia de este sistema estriba en que el número de plantas obtenidas está determinado por el número de yemas axilares preexistentes en el inóculo; por otro lado, el sistema presenta la ventaja de que los individuos regenerados muestran una gran estabilidad genética.

En Chapingo se ha logrado micropropagar *Opuntia* spp. a partir de una yema (Escobar, 1985), siendo posible obtener plantas enraizadas después de 70 días de cultivo (ver Capítulo 30, Figura 30.1).

### **Diferenciación de brotes adventicios**

La diferenciación de brotes adventicios permite la formación de novo de estructuras unipolares; este sistema permite la regeneración de una mayor cantidad de brotes que el sistema de yemas axilares.

Los brotes adventicios tienen su origen en la formación de tejido meristemático y la posterior diferenciación de ápices, ya sea directamente o a

Cuadro 6.1. Diferentes fórmulas de medios de cultivo empleados en micropropagación.

Nutrimentos	Concentración según medio <sup>a</sup>									
	MS		ER		B5		SH		HE	
	mg/litro	mM	mg/litro	mM	mg/litro	mM	mg/litro	mM	mg/litro	mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20.6	1200	15.0						
KNO <sub>3</sub>	1900	18.8	1900	18.8	2500	25	2500	25		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	3.0	440	3.0	150	1.0	200	2.4	75	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	1.5	370	1.5	250	1.0	400	1.6	250	1.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1.25	340	2.5						
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>					134	1.0				
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>							300	2.6		
NaNO <sub>3</sub>									600	7.0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O					150	1.1			125	0.9
KCl									750	10.0
KI	0.83	5.0			0.75	4.5	1.0	6.0	0.01	0.06
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	100	0.63	10	3.0	50	5.0	80	1.0	16.2
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3	100	2.23	10					0.1	0.5
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O					10	60	10	60		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	30			2.0	7.0	1.0	3.5	1.0	3.5
Versenato de Zn			15	37						
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	1.0	0.025	0.1	0.25	1.0	0.1	0.4		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.1	0.0025	0.01	0.025	0.1	0.2	0.8	0.03	0.12
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.1	0.0025	0.01	0.025	0.1	0.1	0.4		
AlCl <sub>3</sub>									0.03	0.22
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O									0.03	0.13
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O									1.0	3.7
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	100	37.3	100	37.3	100	20	55		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	100	27.8	100	27.8	100	15	55		
Sacarosa (g)	30		40		20		30			
pH	5.7		5.8		5.5		5.8			

a. MS = Murashige y Skoog, 1962; ER = Erickson, 1965; B5 = Gamborg et al., 1965; SH = Schenk y Hildebrandt, 1972; HE = Heller's, 1953.

partir de callos originados también del explante; esto último puede traer como consecuencia la variabilidad fenotípica en los clones diferenciados. Otro factor importante en el caso de la regeneración a partir de callos es el fenómeno de habituación; al respecto se sabe que los callos que se mantienen en condiciones indiferenciadas por largos períodos limitan su capacidad morfogénica.

Existen muchas especies que han sido micropropagadas con éxito empleando este sistema; entre ellas se encuentran el clavel (Stone, 1960), la lechuga (Koevary et al., 1978), la papa (Roest y Bokelmann, 1976), el espárrago (Wilmar y Hellendoorn, 1968), el camote (Sehgal, 1978), especies de *Dioscorea* (Granada y Villalobos, 1980) y la zanahoria (Smith y Street, 1974).

### **Embriogénesis somática**

En condiciones in vitro, es factible diferenciar embriones a partir de células tanto del esporofito como del gametofito. Este proceso de diferenciación se observó por vez primera en células suspendidas de *Daucus carota* (Reinert, 1959). Desde ese primer descubrimiento se ha incrementado notablemente el número de especies que han mostrado esta capacidad regenerativa (Evans et al., 1981; Dodds et al., 1982).

Aparentemente, los factores químicos más importantes para la embriogénesis somática son las auxinas exógenas, la fuente y la concentración del nitrógeno, y algunas otras sustancias como la sacarosa. Desde el punto de vista de la propagación, la embriogénesis somática es el sistema más eficiente, si se considera la eficiencia como el número de plantas regeneradas por unidad de tiempo. Empleando este sistema se pueden obtener cantidades virtualmente ilimitadas de plantas, ya que todo hace suponer que por cada célula suspendida en el medio de cultivo se está diferenciando una planta. Debe considerarse, sin embargo, que en un cultivo de células en suspensión la mayoría de los embriones somáticos tienen su origen a partir de callos, implicando, como se indicó con anterioridad, alguna forma de variación epigenética.

### **Micropropagación de Especies Leñosas**

Dentro de las especies leñosas, las más extensivamente estudiadas en los últimos años han sido las forestales y dentro de ellas las coníferas; por esa razón, las informaciones siguientes se referirán a los estudios realizados en

árboles maderables. Skirvin (1981) ha hecho una amplia recopilación de investigaciones relacionadas con la micropropagación de frutales perennes, y Hughes (1981) lo ha hecho con algunas ornamentales.

Según datos recientes, la superficie mundial ocupada por los recursos forestales se estima entre 2500 a 2800 millones de hectáreas, lo que equivale a una cuarta parte de la superficie terrestre. No obstante, de continuar el mismo ritmo de explotación de los bosques sin reforestar las zonas taladas, esa superficie se reducirá en 70% en los próximos 50 años (Keays, 1974). Villalobos et al. (1982a) indican que en las próximas décadas la demanda de madera para las industrias de muebles, de la construcción, química y papelería, así como los estragos causados por enfermedades, parásitos e incendios forestales seguirán limitando la existencia de los bosques.

Desafortunadamente, los programas de mejoramiento genético en especies forestales no han tenido repercusiones trascendentales en esta problemática, debido principalmente al largo ciclo de estas especies desde la siembra de la semilla hasta la floración. En las gimnospermas, esta parte del ciclo requiere entre 15 y 20 años, lo que se ve reflejado en la poca continuidad de los proyectos a largo plazo.

La propagación vegetativa ha tenido un papel importante en la multiplicación de árboles 'elite' (Ivanova, 1981); sin embargo, se ha observado que las estacas pierden la capacidad para enraizar a medida que el árbol de origen es más viejo. Por otro lado, es necesario que los árboles usados como patrones sean lo suficientemente maduros para que expresen su potencial genético; asimismo, al emplear ramas maduras para el enraizamiento hay problemas de crecimiento plagiotrópico (Sweet, 1973).

Las técnicas de micropropagación han demostrado ser una importante alternativa para la solución de algunos de los problemas anteriormente referidos. El método de diferenciación de brotes adventicios es más común que la embriogénesis somática, y tiene mayor potencialidad para una propagación masiva que el estímulo de las yemas axilares. Actualmente no existen antecedentes que indiquen el éxito de la embriogénesis somática en especies forestales.

La primera especie leñosa regenerada mediante el cultivo de tejidos fue *Populus tremuloides* (triploide) a partir de callos (Winton, 1968); la primera gimnosperma fue *Pinus palustris* a partir de embriones (Sommer et al., 1975). Con posterioridad a estas investigaciones pioneras, se han publicado diversos trabajos que señalan la regeneración de plantas por sistemas similares. A la fecha existen 57 especies maderables a partir de las cuales se han podido regenerar plantas completas in vitro (Brown et al., 1974; Mott, 1981; Patel et al., 1984).

Los brotes adventicios se pueden producir a partir del explante directamente, o bien a partir de callos derivados del explante primario. Para fines de propagación, actualmente se prefiere producirlos directamente del explante, ya que a partir de callos su formación ha sido muy difícil y frecuentemente genera anomalías. En la diferenciación de brotes adventicios existe una interrelación entre el explante, el medio y las condiciones ambientales de cultivo.

El explante es extremadamente importante; su influencia en el desarrollo *in vitro* ha sido demostrada (Villalobos et al., 1984). La edad del explante es un factor crítico en las especies maderables (Bonga, 1982); en general, la micropropagación es relativamente fácil empleando tejidos juveniles, y es progresivamente más difícil con tejidos adolescentes y maduros. Sin embargo, aunque se haya delimitado la edad del material, el mejor explante se tiene que determinar experimentalmente; los explantes más comunes en coníferas, por ejemplo, han sido los embriones, partes de plántulas, los cotiledones, y los hipocótilos provenientes de semillas germinadas asépticamente.

Los componentes de los medios de cultivo han sido también objeto de estudios extensivos. Generalmente se agrupan en cinco clases de compuestos: a) macro y microelementos; b) fuentes de carbono, generalmente sacarosa; c) vitaminas; d) nitrógeno reducido, y e) reguladores del crecimiento (Cuadro 6.1). El regulador de crecimiento clave en la formación de brotes es la cinetina; sin embargo, las auxinas en bajas concentraciones han tenido respuesta en algunas especies.

Los factores físicos que se consideran son varios, siendo importantes éstos: a) la forma física del medio; b) la humedad del medio y de su atmósfera gaseosa; c) la luz; y d) la temperatura.

En muchos casos, se requiere el trasplante a un medio con otro balance hormonal y nutricional para la formación de brotes adventicios. En otras ocasiones, el trasplante a otro medio, después de formados los brotes, estimula el alargamiento de los tallos, los cuales se pueden separar y enraizar. En este caso, el trasplante continuo permite generalmente la formación de un gran número de brotes; por ejemplo, en *Pinus radiata* el número de brotes capaces de ser enraizados se ha podido incrementar desde 180 a más de 1300, haciendo el trasplante a intervalos de tres semanas durante 12 a 24 semanas (Aitken et al., 1981).

La inducción del sistema radical en angiospermas ha presentado más problemas. En general, la reducción en la concentración de sales minerales y el uso de auxinas —asociado generalmente con la disminución de la

temperatura— han mostrado resultados positivos. No obstante, la tendencia actual es la de enraizar en condiciones no estériles, esto es, estimulando en brotes diferenciados *in vitro* la formación de raíces en sustratos como la agrolita, la vermiculita y otros; esta medida es simple, más económica y frecuentemente produce mejores raíces.

Los problemas más serios encontrados en la propagación de especies arbóreas *in vitro* son la variación genética en las respuestas de regeneración y el proceso de maduración; estos dos problemas dificultan considerablemente la ejecución de sistemas prácticos de propagación de fenotipos seleccionados. Entre otros problemas están la formación de órganos y plantas aberrantes, la dificultad para erradicar las infecciones internas, y la secreción de sustancias tóxicas como fenoles y sustancias volátiles.

## **Consideraciones Finales**

En los últimos años, el cultivo de tejidos vegetales ha cobrado mayor interés debido a las expectativas que se tienen en cuanto a la biotecnología. Es de considerar, por ejemplo, la creciente importancia que el cultivo de tejidos está adquiriendo en la agricultura; se tienen predicciones de que las técnicas *in vitro* serán una importante herramienta de la agricultura del siglo XXI.

Con respecto a la micropropagación, constantemente se incrementa la lista de especies que se pueden multiplicar eficientemente empleando los métodos de aquélla. Sin embargo, tales técnicas no se han podido aplicar con los mismos resultados a las especies leñosas, y esto ha estimulado a muchos investigadores a realizar esfuerzos para elucidar el problema. Sobre la base de las consideraciones anteriores, se estima que aunque el cultivo de tejidos vegetales no resolverá todos los problemas agrícolas de los próximos años, esta técnica, complementada con otras, será de gran importancia para la solución de nuestras crecientes necesidades.

## **Referencias**

- Aitken, J.; Horgan, K. y Thorpe, T. A. 1981. Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of radiata pine. *Can. J. For. Res.* 11:112-117.

- Bonga, J. M. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. En: Bonga, J. M. y Durzan, S. N. (eds.). Tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff, Holanda. p. 387-412.
- Bressan, P. H.; Kim, Y. K.; Hyndman, S. E.; Hasegawa, P. M. y Bressan, R. A. 1982. Factors affecting in vitro propagation of rose. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107:979-990.
- Brown, C. y Sommer, H. 1974. Tissue culture technique for plantlet formation and propagation of difficult-to-root forest trees. Forest Research Progress, University of Georgia, E.U.
- Chee, R. y Pool, R. M. 1982. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultures in vitro. Scientia Hort. 16:17-27.
- Dodds, J. H. y Roberts, L. W. 1982. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, Londres. 178 p.
- Erickson, T. 1965. Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. Physiol. Plant. 18:976-993.
- Escobar, A. H. 1985. Organogénesis y propagación in vitro de *Opuntia* spp. Tesis (M.S.). Chapingo, México.
- Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Flick, C. E. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 45-114.
- Firn, R. D. y Digby, J. 1980. The establishment of tropic curvatures in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 3:131-148.
- Gamborg, O. L.; Murashige, T.; Thorpe, T. A. y Vasil, I. K. 1976. Plant tissue culture media. In vitro 12:473-478.
- Granada, C. L. y Villalobos, V. M. 1980. Propagación in vitro de *Dioscorea composita* Hemsl. Nueva Epoca (Chapingo) 21:1-7.
- Haberlandt, G. 1902. Culturversuche mit isolierten pflanzenzellen. Sitz-Ber. Mat.-Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. (Wien) 111(1):69-92.
- Hughes, K. W. 1981. Ornamental species. En: Conger, B. V. (ed.). Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.
- Ivanova, Z. 1981. Rapid vegetative propagation of conifers. Scientia Horticulturae 14:347-355.
- Keays, M. L. 1974. Full-tree and complete-tree utilization for pulp and paper. For. Prod. J. 24:13-16.

- Koevary, K.; Rappaport, L. y Morris, L. L. 1978. Tissue culture propagation of head lettuce. Hort. Science 13:39.
- Larkin, P. J. y Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation, a novel source of variability from cell cultures of plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60:1-16.
- Leung, A. W. D. 1982. In vitro propagation of gymnosperms. En: Bonga y Durzan. (eds.). Tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff, Holanda. p. 72-108.
- Mott, R. L. 1981. Trees. En: Conger, B. V. (ed.). Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 217-254.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25:135-166.
- . 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture. En: Thorpe, T.A. (ed.). Frontiers of plant tissue culture. University of Calgary, Calgary, Canadá. p. 15-26.
- y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Patel, K. R. y Thorpe, T. A. 1984. In vitro differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud). Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 3(2):131-142.
- Reinert, J. 1959. Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivaembryonen an gemebekulturen aus korotten. Planta 53:318-333.
- Roest, S. y Bokelbann, G. S. 1976. Vegetative propagation of *Solanum tuberosum* L. Potato Res. 19:173.
- Sehgal, C. B. 1978. Regeneration of plants from anther cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir) Z. Pflanzenphysiol. 88:349.
- Skirvin, R. M. 1981. Fruit crops. En: Conger, B. V. (ed.). Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 51-139.
- Skoog, F. y Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-130.
- Smith, S. M. y Street, H. E. 1974. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. Ann. Bot. 38:223.
- Sommer, H. E.; Brown, C. L. y Kormanik, P. P. 1975. Differentiation of plantlets in long-leaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured in vitro. Bot. Gaz. 136:196-200.

- Styer, D. J. y Chin, C. K. 1983. Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm conservation. *Horticultural Reviews* 5:221-277.
- Sweet, G. B. 1973. Effect of maturation on growth and form of vegetative propagules of radiata pine. *N. Z. J. For. Sci.* 3:191-210.
- Thorpe, T. A. 1980. Organogenesis in vitro: Structural, physiological and biochemical aspects. *International Review of Cytology, Supplement 11A*. Academic Press, Nueva York. p. 71-111.
- . 1983. Biotechnological applications of tissue culture to forest tree improvement. En: *Biotechnological Advances*. v. 1, p. 263-278.
- Trewavas, A. J. 1981. How do plant growth substances work? *Plant Cell Environ.* 4:203-228.
- . 1982. Growth substances sensitivity: The limiting factor in plant development. *Plant Physiol.* 55:60-72.
- Villalobos A., V. M. 1980. Plantas libres de virus. *Ciencia y Desarrollo, CONACYT (México)* 33:35-49.
- ; Thorpe, T. A. y Yeung, E. C. 1982a. El papel del cultivo de tejidos en especies forestales. *Ciencia y Desarrollo, CONACYT (México)* 51:43-59.
- y García V., A. 1982b. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) libres de virus por cultivo in vitro de meristemas y ápices vegetativos. *Agrociencia* 48:107-118.
- ; Leung, D. W. M. y Thorpe, T. A. 1984. Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. *Physiol. Plant.* 61:497-504.
- Wilmar, C. y Hellendoorn, M. 1968. Growth and morphogenesis of asparagus cells cultured in vitro. *Nature* 217:369.
- Winton, L. L. 1968. Plantlets from aspen tissue cultures. *Science* 160:1234-1235.