

Capítulo 7

Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis

R. E. Litz*

R. L. Jarret*

* Tropical Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Homestead, Florida, E. U.

Introducción

En 1902, Haberlandt propuso la teoría de que todas las células vegetales tienen capacidad para formar plantas completas, es decir, que tienen totipotencialidad. Sin embargo, esta hipótesis no pudo ser demostrada en aquel tiempo (Krikorian et al., 1969).

White (1939) informó acerca de la inducción de yemas adventicias in vitro a partir de callos de *Nicotiana glauca* x *N. langsdorfii*, y Nobecourt (1939) obtuvo raíces adventicias de un callo de zanahoria (*Daucus carota*). Estos experimentos respaldaron indirectamente la teoría de totipotencialidad celular.

Posteriormente, y en forma simultánea, Reinert (1958) y Steward et al. (1958) informaron acerca de la producción de embriones somáticos (embriones adventicios originados en células somáticas); más tarde se demostró que estos embriones eran originados a partir de células aisladas (Backs-Husemann et al., 1970; Reinert et al., 1971), demostrándose la totipotencialidad de las células vegetales.

La regeneración de plantas directamente de los explantes, o a partir de callos, por medio de la organogénesis o de la embriogénesis somática se ha utilizado como una alternativa en los métodos de propagación; sin embargo, esa aplicación ha sido limitada a causa de la poca estabilidad genética en los cultivos de callos. Hay, en cambio, necesidad de regenerar plantas a partir de células selectas, como también necesidad de establecer métodos genéticos celulares aplicables en el mejoramiento de las plantas y en la recuperación de variantes somaclonales; en consecuencia, existe un considerable interés en definir las vías de regeneración para varias plantas de importancia económica.

La presente revisión se ha enfocado hacia la parte teórica y aplicada de esos dos fenómenos de regeneración. Existen otras revisiones recientes sobre la embriogénesis somática (Tisserat et al., 1979; Ammirato, 1983; Raghavan, 1976; Evans et al., 1981; Vasil, 1982) o sobre la organogénesis (Flick et al., 1983; Thorpe, 1980; 1983; Evans et al., 1981).

Embriogénesis Somática

Como embriones somáticos, asexuales o adventicios se han definido los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Tisserat et al., 1979). Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, y

no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares deben ser también capaces de crecer y formar plantas normales.

Aspectos teóricos

La embrionía adventicia es un evento morfogénético que ocurre in vivo a partir de las nucelas en algunas especies de ciertos géneros de plantas, por ejemplo, *Citrus* spp., *Mangifera indica*, *Eugenia* spp., *Garcinia mangostana* y *Lansium domesticum*, o a partir de los integumentos del óvulo como ocurre en *Eugenia malaccensis*. También se origina de las sinérgidas (Cooper, 1943), del suspensor (Crete, 1938), y de otros tejidos localizados dentro del ovario como el endosperma (Muniyamma, 1977), las antípodas, o el cigoto (Cameron y Garber, 1968). La embrionía adventicia también ocurre en los ápices de las hojas de la orquídea *Malaxis palmosa* (Taylor, 1967).

La totipotencialidad de las células vegetales cultivadas in vitro fue establecida por Reinert (1958) y Steward et al. (1958), quienes describieron la inducción de embriones somáticos a partir de callos derivados del ápice radical de la zanahoria *Daucus carota*. También se ha obtenido la regeneración de plantas in vitro por medio de la embriogénesis somática a partir de células generativas, por ejemplo, en cultivos microspóricos de *Datura innoxia* (Guha et al., 1964) y en *Nicotiana tabacum* (Nitsch, 1969), como también a partir de células de endosperma cultivadas in vitro como en *Santalum album* (Lakshmi Sita et al., 1979).

En ciertos aspectos, los embriones somáticos mantienen una similitud con los embriones cigóticos; sin embargo, tanto in vivo como in vitro pueden ocurrir algunas anormalidades en el desarrollo, por ejemplo, la fasciación y la fusión de los cotiledones.

En los estudios de embriogénesis somática se sigue utilizando la zanahoria como un sistema modelo (Sung et al., 1984) no solamente para estudios sobre control de desarrollo, sino también para determinar los eventos bioquímicos que controlan la morfogénesis.

Inicialmente, Steward et al. (1958) consideraron que para la inducción de la embriogénesis somática era esencial un ingrediente no identificado en el agua de coco (AC); sin embargo, posteriormente se demostró que el AC, aunque era beneficiosa, no era necesaria para inducir embriogénesis (Reinert, 1958). El AC todavía se utiliza frecuentemente en los medios de cultivo, no solamente para estimular la producción de embriones somáticos, sino también para la maduración de los mismos (Thomas et al., 1977; Vasil et al., 1980, 1981a, 1981b).

Steward et al. (1958) consideraban también que el aislamiento físico de las células a partir de tejidos de plantas maduras era la causa de que ellas se convirtieran en embriogénicas; sin embargo, las evidencias no apoyan este punto de vista. Las células que dan origen a los proembriones son ricas en almidón y poseen una vacuola pequeña (Halperin, 1970).

Se necesita la presencia de una auxina para la iniciación de un callo embriogénico. Usualmente se emplea el 2,4-D, el cual aparentemente brinda el estímulo o inicia la inducción de la embriogénesis somática en el callo. Sin embargo, la maduración de los embriones y la germinación no ocurren en presencia de 2,4-D (Halperin et al., 1964); en consecuencia, hay que remover la auxina, o usarla en concentraciones más bajas. Tanto la inducción de la embriogénesis somática como el desarrollo de los estados subsiguientes de los embriones dependen de la presencia de nitrógeno reducido (Halperin et al., 1965a; Halperin, 1966; Ammirato et al., 1971).

Steward et al. (1964) creyeron inicialmente que la diferenciación o la formación del callo ocurría en un medio con auxina, y que la formación de embriones y su desarrollo ocurre después de subcultivar el callo en un medio libre de la auxina; actualmente es evidente que la inducción de embriones ocurre en presencia de la auxina (Halperin, 1966). Los cultivos en suspensión mantenidos mediante el subcultivo continuo en medios con auxinas están conformados por embriones globulares.

Hay varias interpretaciones acerca de la naturaleza de la diferenciación que da como resultado la embriogénesis somática. Se cree que dentro de un explante ciertas células están precondicionadas para los eventos morfo-genéticos que llevan a esta embriogénesis (Thorpe, 1980; Tisserat et al., 1979). Por tal razón, la presencia de reguladores exógenos de crecimiento, usualmente el 2,4-D, no solamente inicia el desarrollo de los embriones somáticos, sino que también estimula la multiplicación clonal de las células predeterminadas. Evans et al. (1981), sin embargo, creen que la embriogénesis puede derivarse también de tipos diferenciados de células por medio de la predeterminación; este patrón de desarrollo induce la embriogénesis en determinadas células, y se basa en la suposición de que ciertas células que conducen a la embriogénesis somática han sido reprogramadas *in vitro*.

Obviamente estas interpretaciones han sido difíciles de demostrar, a causa de los problemas para determinar las células potencialmente embriogénicas dentro del explante y del callo.

Las interpretaciones de los eventos que ocurren tempranamente en las células y que traen consigo la diferenciación de plantas a partir de callos

siguen siendo hipotéticas. Steward et al. (1958; 1964) propusieron que la diferenciación dependía del aislamiento físico o fisiológico de las células en cultivo; sin embargo, los estudios ultraestructurales de la embriogénesis somática en callos de zanahoria no respaldan esta interpretación (Street et al., 1974).

Las células cultivadas que forman estructuras poliembriónicas poseen paredes celulares gruesas (Button et al., 1974). Las primeras interpretaciones tempranas del fenómeno regenerativo efectuadas por Skoog et al. (1948 y 1957) sugirieron que la organización era dependiente de las interacciones cuantitativas entre los reguladores de crecimiento y otros factores. De esta manera, dentro de un cultivo puede haber gradientes fisiológicos que determinen la diferenciación.

Street (1976) propuso que las células pequeñas isodiamétricas, con un núcleo prominente y con vacuolas pequeñas que poseen potencialidad para la diferenciación, tienen cierto patrón de expresión genética y se diferenciarán cuando sean expuestas a las señales apropiadas; esto implica un cambio a un nuevo patrón de expresión del gene. Thorpe (1980) ha propuesto tres requerimientos para un desarrollo organizado de novo: la diferenciación celular, la interacción celular y una respuesta a las señales específicas.

Hay por lo menos dos factores que pueden controlar la formación de centros organizados (Street, 1976). Las células en división activa pueden estimular la división en las células adyacentes, y este grupo de células, que se dividen rápidamente, viene a ser como un recipiente de nutrimentos o metabolitos de las células ubicadas junto a él, impidiendo que éstas se dividan.

Factores que afectan la embriogénesis somática

Explante. Virtualmente, todos los tejidos vegetales tienen capacidad para formar callos in vitro; sin embargo, relativamente pocos explantes tienen la habilidad para producir callos embriogénicos. Comúnmente se han usado como explantes partes de plántulas como cotiledones, hipocótilos y embriones; adicionalmente, se han usado ápices caulinares, segmentos de tallos, hojas, raíces e inflorescencias inmaduras. Según Ammirato (1983), estos explantes se han usado con éxito para obtener callos embriogénicos en varias especies de la mayoría de las familias de plantas.

Los embriones inmaduros se usan generalmente en los pastos (Gamborg et al., 1970) y en los cereales (Vasil et al., 1980); sin embargo, también se ha

empleado la porción basal de las hojas jóvenes del mijo (Haydu et al., 1981) y del sorgo (Wernicke et al., 1980), así como las inflorescencias jóvenes (Vasil, 1982). En las gramíneas es importante la posición de los embriones cigóticos en el cultivo; el eje embrionario debe estar en contacto con el medio.

Con las plantas leñosas, la selección del explante se hace en forma muy restringida. Se ha inducido embriogénesis somática en nucelas aisladas de *Citrus* sp. (Rangan et al., 1968) y de *Mangifera indica* (Litz, 1984a) y a partir de la nucela de óvulos cultivados de *Citrus* sp. (Button et al., 1977), *Vitis vinifera* (Mullins et al., 1976), *Ribes rubrum* (Zatyko et al., 1975), *Malus domesticum* (Eichholtz et al., 1979), *Mangifera indica* (Litz et al., 1982), especies de *Eugenia* (Litz, 1984b) y *Myrciaria cauliflora* (Litz, 1984c).

Se ha estimulado el desarrollo de callos embriogénicos a partir de varios tipos de explantes obtenidos de palmas; entre ellos están los embriones cigóticos (Rabechault et al., 1970), las hojas jóvenes (Pannetier et al., 1982), las inflorescencias (Branton et al., 1983), los ápices radicales (Smith et al., 1970) y los ápices de los retoños de palma datilera (Reynolds et al., 1979).

También se ha informado que la embriogénesis somática ocurre en el endosperma de *Croton bonplandeanum* (Bhojwani, 1966) y de *Santalum album* (Lakshmi Sita et al., 1980), dando como resultado plantas triploides. También como resultado de la embriogénesis somática se han recuperado plantas haploides de varias especies como *Datura innoxia* (Guha et al., 1964) y *Nicotiana tabacum* (Nitsch, 1969), a partir de anteras cultivadas in vitro.

La respuesta embriogénica del callo depende del genotipo de la planta. Algunos cultivares se pueden regenerar fácilmente en un medio específico, mientras que otros cultivares no responden en el mismo medio (Litz, 1984a). El estado de desarrollo de la planta madre afecta la respuesta morfológica del explante; Banks (1979) observó que los explantes obtenidos a partir de plantas maduras de *Hedera helix* formaban callos embriogénicos, mientras que ello no ocurría con explantes de plantas jóvenes.

Medio de cultivo. Generalmente se ha usado el medio desarrollado por Murashige et al. (1962) o la modificación de esta formulación (Evans et al., 1981); la concentración alta de sales de este medio parece ser muy benéfica para el crecimiento de embriones somáticos (Ammirato, 1983).

Wetherell (1984) ha demostrado que es posible aumentar el potencial embriogénico de los callos de zanahoria exponiéndolos a niveles altos de

sacarosa o de manitol; la sacarosa se usa en concentraciones de 2% a 3% y hasta 12%. El nitrógeno, suministrado como nitrato o como ion amonio, es esencial (Halperin et al., 1965a; Reinert, 1967); el nitrógeno orgánico provisto por la glutamina y la alanina (Wetherell et al., 1976; Kato et al., 1966), por la caseína hidrolizada (Ammirato et al., 1971) o por el AC (Steward et al., 1959) es también beneficioso y puede remplazar el nitrógeno inorgánico en el medio. El hierro es también esencial para la embriogénesis somática (Havranek et al., 1979) ya que en ausencia de ese elemento, los embriones somáticos globulares no son capaces de desarrollarse hasta la madurez.

Los niveles altos de sacarosa parecen tener un efecto comparable al producido por el ácido abscísico. Las concentraciones altas de esta sustancia estimulan la formación de los callos embriogénicos (Lu et al., 1982) y reducen la frecuencia de anormalidades de desarrollo tales como la formación de embriones secundarios, la fasciación y la formación de policotiledones; también inhiben la germinación precoz (Ammirato et al., 1971).

El carbón activado se ha usado para superar problemas específicos de oxidación, los cuales se asocian con el cultivo de tejidos de palmas (Reynolds et al., 1979). La adición de esta sustancia a los cultivos embriogénicos promueve su desarrollo cuando éste ha sido inhibido, ya que al parecer absorbe del medio los compuestos fenólicos (Fridborg et al., 1978), las auxinas y citocininas (Weatherhead et al., 1978) que inhiben el desarrollo del embrión somático. Además, permite la germinación y la maduración de los embriones (Litz et al., 1980; Fridborg et al., 1975).

En estudios recientes se ha demostrado que el uso de poliaminas tales como la espermina, la putrescina y la espermidina está relacionado con el control de la embriogénesis somática en *Daucus carota* (Fienberg et al., 1985). Las poliaminas, incorporadas al medio de callos embriogénicos de zanahoria, inhiben el desarrollo de los embriones somáticos; los subcultivos, en cambio, en un medio libre de poliaminas pero que contenga arginina, permiten el desarrollo normal del embrión (Bradley et al., 1984).

Reguladores del crecimiento. De acuerdo con Evans et al. (1981) la mayoría de los sistemas embriogénicos requieren, para la inducción de los embriones, de una concentración alta de auxina (generalmente 2,4-D) en el medio. Para las gramíneas, el 2,4-D es la única auxina que se usa. En *Daucus carota* han sido efectivas varias auxinas, por ejemplo ANA (Ammirato et al., 1971), AIA (Sussex et al., 1968) y 2,4-D (Halperin et al., 1965b). Otras auxinas sintéticas tales como el picloram, el 2,4,5-T, el ácido 2-benzothiazol acético, y el ácido paraclorofenoxiacético han demostrado ser bastante efectivas.

La concentración usual de 2,4-D está dentro del rango de 0.5-27.6 μM (Evans et al., 1981), aunque se deben usar concentraciones más altas, por ejemplo 450 μM de 2,4-D, en caso de que el carbón activado se incorpore al medio (Reynolds et al., 1979).

El papel de las citocininas en el medio primario o inductor del embrión es menos claro, aunque normalmente este medio incluye una de ellas. Evans et al. (1981) muestran que las citocininas se usan en el medio primario para el 65.4% de las especies explotadas por el hombre y para 21.4% de las especies no cultivadas; el uso de estas sustancias en el medio de subcultivo es menos frecuente (en 34.6% de las especies explotadas por el hombre y en 14.1% en las especies no cultivadas). Fujimura et al. (1980) han sugerido que las citocininas pueden ser esenciales para la maduración y la germinación de los embriones somáticos.

El ácido giberélico (AG) también se ha incorporado al medio con el fin de ayudar a la maduración normal y a la germinación de los embriones somáticos de *Panicum maximum* (Lu et al., 1981), *Santalum album* (Lakshmi Sita et al., 1979) y *Citrus sinensis* (Kochba et al., 1974).

Se han usado inhibidores del crecimiento tales como el ácido abscísico (ABA), el cual reprime la embriogénesis somática y reduce la frecuencia de anomalías de desarrollo como son la formación secundaria de embriones a partir de embriones somáticos y la germinación precoz (Ammirato, 1973; 1974); las concentraciones de ABA más usadas fluctúan entre 0.1 y 1.0 μM . Las antiauxinas han sido efectivas de la misma forma que el ABA (Fujimura et al., 1979).

Condiciones del medio ambiente. En contraste con la cantidad de información que se ha divulgado sobre la optimización de los medios de cultivo y del uso de sustancias de crecimiento, poca atención se ha dedicado a los parámetros físicos que influyen en el crecimiento y el desarrollo in vitro.

Una alta intensidad lumínica ha sido esencial para obtener embriogénesis somática en *Nicotiana tabacum* (Haccius et al., 1965), aunque en *Daucus carota* (Ammirato et al., 1971) y en *Carum* sp. (Ammirato, 1974) fue necesaria la oscuridad para el desarrollo y la maduración normal de los embriones. Pretratamientos con frío se han usado rutinariamente para estimular la embriogénesis somática a partir de anteras cultivadas (Nitsch, 1974).

Los medios de cultivo semisólidos se han empleado para el crecimiento de callos y para estimular la embriogénesis somática; Ammirato (1983)

demonstró que cuando se utilizan medios líquidos, el tipo de recipiente usado para el cultivo tiene un efecto muy grande sobre la embriogénesis. Es preferible agitar suavemente el medio porque así se obtienen menos anomalías en el desarrollo que cuando se agita vigorosamente. La adición de ABA previene el desarrollo anormal, sin importar el tipo de recipiente o el grado de agitación.

Otros factores. Es difícil obtener una sincronización en los cultivos en suspensión. Para obtener una suspensión homogénea, los cultivos se pasan usualmente por una serie de filtros. También es posible alcanzar un cierto grado de sincronización por medio de una exposición previa de los cultivos al ABA o a las poliaminas. Tal como lo indicó Ammirato (1983), es difícil demostrar el control sobre la maduración y la germinación; estos estados son altamente plásticos (adaptables) dependiendo del genotipo y de las condiciones de cultivo.

Después de un período prolongado de cultivo, el potencial embriogénico del callo declina; Halperin (1966) y Smith et al. (1974) asociaron este hecho con una acumulación de cambios genéticos que ocurrían en las células en cultivo. Algunas veces es posible restaurar el potencial embriogénico de los cultivos incrementando la concentración de sacarosa (Jones, 1974), o alterando las proporciones de nitrógeno y de auxina (Reinert, 1973).

Fuera del grupo de las angiospermas se han dado muy pocos ejemplos de embriogénesis somática, aunque es posible la regeneración de plantas de *Pinus palustris* (Sommer et al., 1975) y de *Zamia integrifolia* (Norstog et al., 1967). Las especies de plantas leñosas, en general, han sido difíciles de regenerar in vitro; se exceptúan aquellas especies que pueden producir callos embriogénicos a partir de la nucela.

Procedimiento para inducir la embriogénesis somática en zanahoria

Comúnmente se describen dos modelos de los sistemas típicos para inducir embriogénesis somática in vitro. El primer sistema, que se desarrolló a partir de las nucelas de *Citrus*, es un ejemplo de embriogénesis somática de células preembriónicas; en el Capítulo 8 se describe un sistema similar para el mango.

Otro sistema modelo es el de la zanahoria (*Daucus carota*), que se ha usado para estudiar la inducción, el desarrollo y la bioquímica de los embriones somáticos. El siguiente es el procedimiento que comúnmente se

emplea para establecer callos embriogénicos y para estudiar el desarrollo embrionario:

- 1) Esterilice superficialmente los pecíolos (1.0 cm de largo) o los ápices radicales (0.5 cm de diámetro) de zanahoria (*Daucus carota*). Para ello, sumerja estos tejidos en una solución al 10% de NaOCl (utilice productos de uso doméstico al 10%); esta solución debe contener 2 gotas de Tween-20 por cada 100 ml de solución. Diez minutos después, enjuague tres veces con agua destilada estéril.
- 2) Cultive los explantes en cajas Petri en el medio sólido de Murashige et al. (1962), suplementado con 1 a 2 mg/litro de 2,4-D y 30 mg/litro de sacarosa. La formación de callos ocurre a los pocos días.
- 3) Inicie los cultivos en suspensión después de 4 a 5 semanas, cuando haya suficientes callos. Inocule aproximadamente 30 g de callo en un Erlenmeyer de 250 ml que contenga 50 ml de medio líquido suplementado con 1 a 2 mg/litro de 2,4-D. Todas estas operaciones se deben efectuar bajo condiciones estériles, en una cámara de aislamiento.
- 4) Incube los cultivos en un agitador giratorio (150 rpm), a 25 °C, con un fotoperíodo de 16 h (1000 lux).
- 5) Para estimular el desarrollo embrionario, colecte los cultivos en suspensión filtrando a través de un filtro 'Millipore' estéril. Subcultive a intervalos regulares, usualmente cada 2 ó 3 semanas. Subcultive las células en suspensión en un medio líquido sin 2,4-D.
- 6) Después de 2 a 3 semanas, transfiera las suspensiones a un medio sólido para permitir el desarrollo y la germinación de los embriones somáticos.
- 7) Transfiera las plántulas resultantes a una mezcla de perlita y arena (1:1) o a una mezcla 'Jiffy' y colóquelas bajo rocío intermitente durante 10 días, hasta cuando estén en condiciones de ser cultivadas en invernadero.

Organogénesis

En contraste con la embriogénesis somática, la organogénesis comprende el desarrollo de yemas o de meristemas radicales a partir de los explantes directamente o a partir de los callos.

Aspectos teóricos

Después de las primeras observaciones sobre formación de raíces adventicias (White, 1939) y de raíces principales (Nobecourt, 1939) en cultivos de tejidos, Skoog (1944) demostró el efecto estimulante de las auxinas en la formación de raíces y su efecto inhibidor en la formación de yemas. El estímulo en la formación de raíces adventicias se puede cambiar usando concentraciones altas de sacarosa o de fosfatos inorgánicos en el medio.

Skoog et al. (1948) demostraron que el sulfato de adenina promueve el desarrollo de yemas, lo cual indicó la posibilidad de obtener un cierto control en la formación de órganos *in vitro*. Más tarde se demostró que la organogénesis dependía de la concentración y de la proporción de estos constituyentes en el medio (Skoog et al., 1951).

El hallazgo del factor que promovía la división celular en preparaciones degradadas de ADN, identificado como cinetina (Miller et al., 1955), condujo al estudio realizado por Skoog et al. (1957), en el que se demostró la importancia de las proporciones de auxina:citocinina en la determinación de la respuesta morfogénica *in vitro*. Una proporción alta de auxina comparada con la de citocinina favorecía la formación de raíces, mientras una proporción baja favorecía la formación de yemas. Por otra parte, la adición al medio de ciertos compuestos tales como la caseína hidrolizada (CH) modificaba la actividad reguladora de las proporciones de auxina:citocinina. Esto sugirió que el balance de ciertos factores afectaría el proceso de diferenciación y se consideraba como la base para el desarrollo de un medio definido de organogénesis *in vitro*.

Varias partes de una planta pueden responder diferentemente a idénticas condiciones de cultivo, y tales diferencias reflejan el estado fisiológico de la fuente del explante (Tran Thanh Van, 1980). El estado fisiológico determinará además los factores exógenos que se deben añadir al medio de cultivo, o que deben sustraerse de él, para poder inducir la respuesta morfogénica requerida. Los factores endógenos podrán variar cuantitativamente de acuerdo con las condiciones ambientales, el genotipo, el tipo de célula, y otros aspectos.

A causa de esta complejidad de las interacciones entre un gran número de variables que pueden afectar la respuesta de un explante, las influencias del medio ambiente y los efectos del tejido no se pueden examinar individualmente.

Para que la organogénesis ocurra a partir de un callo, se deben producir cambios que conduzcan a la organización celular. Thorpe (1980) ha propuesto que este proceso involucra diferenciación celular, interacción celular y reacción a señales específicas.

El término organogénesis de novo en el cultivo de tejidos se refiere a la diferenciación dentro del explante (Thorpe, 1980). Por ejemplo, a partir del floema externo de segmentos de tallo de tabaco cultivado in vitro se desarrollan meristemas primarios (Sterling, 1951), mientras que del protoxilema de raíces de explantes de *Convolvulus* spp. se desarrollan raíces y primordios de yemas (Bonnett y Torrey, 1966).

La capacidad morfogenética de algunos tejidos puede pasar desapercibida debido a la asociación de éstos con tejidos diferenciados que están dentro de un sistema organizado (Chlyah, 1974a). En contraste, la organogénesis a partir de callos subcultivados no ocurre generalmente en asociación con las estructuras preexistentes.

Nakano et al. (1974) distinguieron morfológicamente, entre varios tipos específicos de callos de arroz, el que era capaz de producir organogénesis. Se ha informado que divisiones al azar de las células pueden dar como resultado la formación de hileras radiales del tejido; las regiones de mayor división celular forman 'meristemoides' que hacen que el callo tenga una apariencia nodular (Thorpe, 1980).

En la epidermis de explantes de *Torenia* sp. las regiones de rápida división celular se inician a partir de algunas células que, eventualmente, estimulan la división de las células circundantes (Chlyah, 1974b); las células que se encuentran hacia adentro de estos grupos se dividen rápidamente, mientras que las de la periferia se dividen lentamente.

Estas zonas de división celular resultan de la capacidad misma de células activamente divisorias, las cuales a su vez estimulan la división en las células adyacentes; éstas toman nutrimentos y metabolitos a partir de las células periféricas, limitando la potencialidad divisoria de estas últimas (Street, 1976).

Una función primaria de la mitosis en la organogénesis es la formación de un número crítico de células en división activa; éstas son capaces de responder a las señales de desarrollo (Thorpe, 1983).

Los meristemoides o regiones localizadas de células en división activa (Torrey, 1966) se componen de células pequeñas, isodiamétricas, con un citoplasma denso, vacuolas pequeñas y núcleos prominentes; usualmente contienen varios orgánulos (Asbell, 1977) y grandes cantidades de almidón

(Thorpe, 1983), del cual requieren en cantidad considerable durante su diferenciación (Thorpe et al., 1970).

La mayoría de estos meristemoides se asemejan a meristemas verdaderos y poseen conexiones vasculares con el callo o el tejido circundante. Bajo condiciones apropiadas de cultivo pueden formar yemas o raíces primarias (Bonnett et al., 1966); esta plasticidad está de acuerdo con las primeras observaciones de Skoog et al. (1957).

Las proporciones internas de los reguladores de crecimiento y los efectos del tejido dentro de un callo pueden afectar profundamente el desarrollo (Ross et al., 1973). Así, concentraciones de 0.05-46 μM de citocininas, KIN o BAP por ejemplo, han sido efectivas en el 75% de las especies de plantas que han formado vástagos a partir de callos (Evans et al., 1981), mientras que las auxinas, por ejemplo AIA y ANA, han sido más efectivas en concentraciones de 0.06 a 27 μM . Los meristemoides periféricos del cultivo de *Petunia inflata* dan lugar a la formación de raíces y vástagos (Handro et al., 1973); en los callos de arroz y de escarola, en cambio, se forman vástagos de la superficie de los meristemoides, mientras que de la sub-superficie se forman raíces.

Factores que afectan la organogénesis

Murashige (1974) y Narayanaswamy (1977) han descrito ciertos factores que deben ser considerados para la manipulación exitosa de la organogénesis. Se incluyen factores relacionados con el explante (su edad fisiológica y ontogénica, su tamaño, el tejido u órgano del que es extraído) así como con el estado fisiológico de la planta madre y con la época del año en que se realiza el cultivo.

Cualquiera de estos factores, o su combinación, puede afectar profundamente la respuesta morfogénica, y es necesario realizar una evaluación sistemática de tales efectos con el fin de establecer un sistema característico de experimentación.

Explante. Virtualmente todas las partes de la planta se han utilizado como explantes para la iniciación de callo (Flick et al., 1983; Murashige, 1974; Evans et al., 1981); no obstante, los tejidos juveniles poseen un alto grado de actividad meristemática y tienden a tener más plasticidad in vitro.

Los explantes que se han utilizado exitosamente incluyen ramas en floración (Tran Thanh Van et al., 1978), pedúnculos florales (Pelletier et al., 1969), embriones inmaduros (Bajaj et al., 1981), meristemas (Bush et al., 1976), epicótilos (Malmberg, 1979), yemas florales (Konar et al., 1966),

partes de rizomas (Loewenger, 1969), carióspsides (Conger et al., 1978), mesocótilos (Rangan, 1976), raquis (Dudits et al., 1975), bulbos (Fridborg, 1971), hojas de coníferas (Jansson et al., 1980), óvulos (Hussey, 1975), tubérculos (Jarret et al., 1980) y raíces (Norton y Ball, 1954).

La variación en la respuesta de ciertos explantes pertenecientes a la misma especie vegetal puede ser considerable (Flick et al., 1983; Murashige, 1974). Más aún, puede haber variación en los requerimientos de los reguladores de crecimiento para la organogénesis según el tipo de tejido usado como explante (Litz et al., 1983). El conocimiento de la morfología de las especies usadas es de mucho provecho para identificar los explantes potencialmente morfogenéticos.

El tamaño de un explante puede determinar la respuesta in vitro (Okazawa et al., 1967; Gukasyan et al., 1977). Los explantes grandes son más difíciles de esterilizar que los pequeños, pero generalmente los primeros poseen un potencial regenerador considerablemente mayor; la viabilidad y la capacidad regenerativa de explantes muy pequeños tiende a ser baja. Sin embargo, se han usado exitosamente delgadas capas de células como sistemas experimentales, con el fin de estudiar los efectos de factores exógenos y endógenos sobre la morfogénesis cuando no hay influencia de tejidos circundantes (Tran Thanh Van, 1980). Los explantes pequeños tienden, además, a ser dañados más fácilmente.

El potencial organogenético de un explante es inversamente proporcional a su edad fisiológica (Alleweldt et al., 1962). A partir de secciones de tallo cercanas a los ápices caulinares se puede producir mayor cantidad de meristemoides que a partir de la porción baja del tallo. En su trabajo con discos de hojas de *Echeverria elegans*, Raju et al. (1970) demostraron que los tejidos inmaduros, los parcialmente maduros y los maduros producían raíces, raíces o yemas y yemas respectivamente. Pierik et al. (1974) indujeron únicamente la formación de callos a partir de tejidos inmaduros de *Anthurium* sp. Se han hecho observaciones similares usando tejidos de frutos de fresa (Asahira et al., 1977), escamas de bulbos de *Lilium* (Hackett, 1969), secciones de pecíolos de *Lunaria annua* (Pierik, 1972) y segmentos del tallo de rododendro (Pierik et al., 1975).

El estado de la planta madre y la estación durante la cual el explante es extraído también pueden afectar notablemente el potencial organogenético (Murashige, 1974). Los efectos limitantes de la estación y la calidad de este fenómeno no han sido bien estudiados.

Medio de cultivo. Los medios usados más frecuentemente para promover la organogénesis son los de Murashige et al. (1962), White (1963),

Gamborg et al. (1968), Linsmaier et al. (1965), Schenk et al. (1972) y Heller (1953). En una revisión reciente, Flick et al. (1983) hicieron énfasis en que el medio Murashige et al. (1962) se usa muy a menudo en estudios que se relacionan con la organogénesis para cualquier tipo de planta; sin embargo, se ha preferido el medio de Campbell y Durzan (1975) para estudios con gimnospermas.

La sacarosa es generalmente la fuente carbonada que se usa en los estudios de organogénesis, aunque en algunas circunstancias se ha sustituido por glucosa o fructuosa. La concentración de sacarosa puede alterar la pigmentación del callo (Narayanaswamy, 1977) --también lo hace la proporción auxina:citocinina-- favoreciendo la formación de yemas (Zwagerman et al., 1979); puede asimismo la sacarosa estimular la formación de callos (Takayama et al., 1979) y cambiar la textura de los mismos.

Puesto que la concentración de carbohidratos también afecta el potencial osmótico del medio, la sacarosa ha sido sustituida por sorbitol en el medio para callos de plantas de la familia Rosaceae (Coffin et al., 1976). Brown et al. (1979) concluyeron que aproximadamente una tercera parte de la sacarosa en el medio mantiene el potencial osmótico requerido para la formación de callos en tabaco; el manitol puede sustituir a la sacarosa sin causar pérdidas en la capacidad de formación de las yemas (Brown et al., 1979).

En los medios de cultivo de tejidos se han incluido varias vitaminas, aunque generalmente se acepta que únicamente la tiamina es esencial para el crecimiento continuo (Murashige, 1974). El inositol, que también está presente en el AC (Pollard et al., 1961), puede ser un componente esencial para el crecimiento y la diferenciación de los callos (Wolter et al., 1966; Kaul et al., 1975). Como medida de precaución se han usado mezclas complejas de vitaminas, las cuales pueden ser benéficas para el cultivo de explantes muy pequeños o para cultivar células en bajas densidades (Gamborg et al., 1981). En estas circunstancias, la adición de ácido paraaminobenzoico, ácido fólico, cloruro de colina, riboflavina o ácido ascórbico puede estimular el crecimiento.

El nitrógeno orgánico, en forma de CH o de glutamina, es algunas veces benéfico para la iniciación y crecimiento de los callos; la glutamina ha sido sustituida por la CH (Gamborg et al., 1981). Entre los aminoácidos, únicamente son activos los de las formas L; la presencia de las formas D puede contrarrestar los efectos benéficos de las primeras si los aminoácidos se usan como mezcla racémica (Murashige, 1974). Tanto la tirosina como la fenilalanina estimulan la organogénesis en callos de tabaco (Skoog et al., 1957).