

# Capítulo 13

## **Estabilidad genotípica en células, tejidos y plantas derivadas de cultivos in vitro**

A. D. Krikorian\*

### **Agradecimientos**

El autor reconoce de manera especial la contribución de los asistentes y asociados de investigación que a través de los años han participado en diferentes proyectos de investigación en su laboratorio. También agradece a la NASA su apoyo financiero durante un extenso período, así como a la Cambridge Philosophical Society por permitirle usar los resúmenes de Krikorian (1982).

---

\* Department of Biochemistry, State University of New York at Stony Brook (SUNY), Nueva York, E. U.

## **Introducción**

Durante muchos años se ha reconocido que los cultivos asépticos, especialmente los de callos, de células libres y de protoplastos, producen progenies que difieren considerablemente del material inicial.

Antes de que los procedimientos de multiplicación clonal por explantes con estructura organizada —como ápices caulinares o yemas laterales— se empezaran a utilizar ampliamente, la variación se consideraba, por lo general, como una consecuencia de los cambios cromosómicos ocurridos durante el proceso del cultivo. Se consideraba a menudo que el fracaso observado en los callos o en las células cultivadas para organizarse y producir plántulas era el resultado de una amplia gama de trastornos citológicos (Krikorian et al., 1983). Sin embargo, a medida que mejoraron las tecnologías de cultivo y que se observó la frecuente recuperación de plantas en el caso de algunos genotipos bastante atípicos (Gleba et al., 1984), el potencial para sacar provecho de todo tipo de variación se consideró cada vez más como un beneficio adicional de los métodos de cultivo *in vitro*.

Desde hace algún tiempo se habla sobre los beneficios prácticos que se obtendrán de la ingeniería genética del ADN recombinante en las plantas superiores (Bottino, 1975; Brock, 1977). Sin embargo, es significativo que las pocas plantas mejoradas como resultado de las 'nuevas tecnologías', y disponibles hasta el momento, provengan de variantes y mutantes espontáneos derivados de cultivos *in vitro* (Scowcroft et al., 1982; Larkin et al., 1983; Hanson, 1984; Evans et al., 1984).

Todavía hay que verificar si la mayoría de las variaciones obtenidas en las plantas productoras de semilla son heredables o no (Evans et al., 1983); en todo caso, hay un número significativo de tales plantas cuya estabilidad es suficiente para sugerir que es posible incrementar la cantidad de variantes útiles.

En los próximos años, los trabajos sobre la naturaleza y el control de la estabilidad en los sistemas de cultivo aséptico ocuparán los esfuerzos de muchos científicos. Aunque el conocimiento actual de todos estos aspectos es muy fragmentario, cada vez es más claro que en un sistema dado podrían operar uno o varios mecanismos que produzcan la variación encontrada. Entre estos mecanismos, los siguientes pueden desempeñar un papel importante: la segregación de ciertos tipos celulares presentes en el explante primario, las mutaciones o cambios ocasionados por el medio de cultivo, las presiones de selección, los reordenamientos cromosómicos y otras modificaciones del cariotipo, y las interacciones núcleo-citoplasma.

En resumen, lo que muchos denominan actualmente variación somaclonal (Brettell et al., 1979; Larkin et al., 1981; Scowcroft et al., 1982) es un fenómeno bien establecido, pero cuyas causas, hasta el momento, son oscuras y posiblemente sigan siendo temas de investigaciones especiales. Algunas de las posibles causas inmediatas de la variación fenotípica de las plantas regeneradas son:

- a. Prevalencia del cariotipo específico de plantas y tejidos polisomáticos, quiméricos y de mosaicos.
- b. Cambios en el cariotipo, debidos a una respuesta diferencial a los procedimientos de cultivo (composición del medio de cultivo o del ambiente).
- c. Aneuploides no separables en el cultivo.
- d. Cese mitótico que lleva a líneas poliploides.
- e. Reordenamiento de genes somáticos o mutaciones del cariotipo.
- f. Amplificación o disminución de genes.
- g. Reordenamiento de mutaciones en genomas de los organelos.
- h. Interacciones núcleo-citoplasma alteradas, que dan como resultado cambios de regulación.
- i. Reorganización súbita del genoma por transposones.
- j. Efectos de inversiones, traslocaciones, y otros accidentes cromosómicos.

Actualmente se vive un período inicial de comprensión de los cambios genéticos y epigenéticos que ocurren en los cultivos *in vitro* y en las plantas derivadas de tales cultivos (Earle et al., 1982; Chaleff, 1981 y 1983; Krikorian et al., 1983; Reisch, 1983).

## **Cultivo *in Vitro* como Fuente de Variación y de Nuevos Genotipos**

Como se discutió en el Capítulo 5, existen estrategias de multiplicación clonal que pueden reducir al mínimo la posibilidad de inducir cambios indeseables o inestabilidad genética; los métodos que favorecen la estabilidad son aquellos que se basan en unidades de propágulos con una organización previa, tales como meristemas, yemas laterales, nudos, y otras. En

este contexto, las estrategias de propagación se pueden considerar como equivalentes a un tipo de "horticultura en un vaso de cultivo bajo condiciones asépticas".

Swingle (1940, 1952), Dermen (1960), Dore (1965) y Hartmann et al. (1984) tratan excelentemente los principios comprometidos en la organogénesis y en la regeneración de plantas superiores, según la perspectiva de la propagación. En sus discusiones se encuentran las implicaciones para la estabilidad genética y la variación.

### **Sistemas de micropropagación a partir de explantes organizados**

Una consideración importante es que incluso cuando se utilizan propágulos tradicionales altamente organizados, como son los esquejes radicales o caulinares, hay algunas plantas que presentan mayor tendencia que otras a formar mutaciones de yemas y diversificaciones.

No existe motivo para pensar que el desempeño de tales plantas en cultivos asépticos sea muy diferente (Conger, 1977; Zimmerman, 1981). En realidad, la formación de mutantes o mutaciones en la horticultura convencional y en la agricultura se ha estudiado inadecuadamente, y se requiere más investigación en esta importante área; sin duda, la facilidad o la dificultad relativas para inducir las mutaciones útiles en forma controlada es la base del 'fitomejoramiento mutacional' (Sigurbjornsson, 1977; Broertjes et al., 1978; IAEA, 1982).

En este momento no está claro cuáles son las causas de las mutaciones bajo condiciones de cultivo en el campo. Hace algunos años se pensaba que los reguladores del crecimiento de la planta eran mutágenos per se, lo cual todavía no está tan bien establecido. (Singh et al., 1975; Carlson et al., 1983; Dolezel et al., 1984). Desde otra perspectiva, muchos investigadores están convencidos de que los monocultivos se deberían evitar, ya que aumentan la vulnerabilidad de las cosechas (Day, 1973; Marshall, 1977; Duvick, 1978); de esta manera la utilización de material variable para las siembras masivas se percibiría como una alternativa para mantener la estabilidad de las cosechas.

### **Organogénesis**

La formación de órganos en explantes de callos se conoce como la ruta de la organogénesis indirecta. Un callo sin estructura organizada puede

dar origen a brotes y raíces; el tamaño del callo del cual pueden emerger estructuras organizadas varía considerablemente.

Vasil et al. (1965) fueron quienes primero describieron la obtención de una planta de tabaco madura a partir de una sola célula cultivada inicialmente en una microcámara. La célula se mantuvo en 'microcultivo', en gota suspendida, donde se dividió progresivamente en un grupo de células y luego formó una masa de callo; ésta fue inducida a producir brotes y raíces en un medio sólido.

No hubo indicación de que ocurriese una embriogénesis somática o una embrionía adventicia similares a las que se presentaban en la zanahoria (ver el Capítulo 5, Figuras 5.3 y 5.4). Sin embargo, desde la perspectiva de la propagación clonal, la importancia particular de ese trabajo era que el genotipo alterado de las células que originaban la masa de callo se reflejaría en la planta resultante (Broertjes et al., 1980).

Por esa razón, Murashige et al. (1966) recuperaron un número de plantas de tabaco genotípicamente atípicas, incluyendo poliploides. En cualquier caso, para poder predecir la magnitud de la variación que se esperaría en la progenie de plantas de células totipotentes o de masas de callo, se tendría que establecer la magnitud del cambio, y el nivel en que ocurre, en una preparación particular de células cultivadas (Mitra et al., 1960; Muir, 1965; Partanen, 1965; Zosimovich y Kunakh, 1975; Sunderland, 1977; D'Amato et al., 1980; Krikorian et al., 1983; Constantin, 1981; Evans y Reed, 1981).

## **Embriogénesis somática**

Es indudable que los métodos utilizados en la iniciación de cultivos *in vitro* tienen una gran importancia en el desarrollo posterior de tales cultivos y en su capacidad para expresar genotipos anormales. Las posibilidades de obtener variación en las progenies son mayores en las células en crecimiento, que se convertirían en masas de callo con posibilidad de que, mediante manipulación, produzcan posteriormente brotes y raíces. Por otra parte, la generación de plántulas a partir de células, tanto por embriogénesis somática indirecta como directa, es una oportunidad para obtener altos niveles de fidelidad genética, porque permite seleccionar las deseables desde el inicio, o por lo menos desde muy temprano, en el caso de que haya una respuesta bastante uniforme.

En esencia, lo anterior significa que se está haciendo una selección para obtener uniformidad y para multiplicar más tarde las unidades no diferenciadas (ya sea células o unidades proembrionarias), de las que se generan

las plántulas. Esta selección es la base misma del 'arte' en el manejo de las suspensiones celulares morfogénicamente competentes. Sin embargo, aquí no acaba todo: el tamaño de la unidad de la que emergen los embriones somáticos tiene también gran importancia en la capacidad morfogénica.

Desde cuando aparecieron los primeros informes sobre la totipotencialidad, ha sido preocupación de muchos investigadores determinar si las plántulas se originan de embriones somáticos derivados de una sola célula o de pequeños grupos de células, cultivados en suspensión o en un medio semisólido (Krikorian, 1982). Este problema no se ha resuelto completamente todavía.

Jakob Reiner y su asociado Backs-Husemann, en la Universidad Libre de Berlín, realizaron el seguimiento cinematográfico de la formación de un embrión somático de zanahoria a partir de una célula única, usando una preparación de gota suspendida. En el laboratorio de SUNY, en Stony Brook, N. Y., también se siguió en varias ocasiones el desarrollo secuencial de muchos embriones somáticos de zanahoria provenientes de células 'marcadas' dispersas en un medio semisólido, por medio de una cámara fija, durante más de tres semanas.

Las divisiones celulares y su posterior crecimiento no son nada fáciles de seguir, debido a problemas técnicos. Por ejemplo, a causa de su distribución en el agar, la mayoría de las unidades celulares no se pueden enfocar fácilmente, ni siquiera mediante el uso de un microscopio invertido. Ciertas unidades celulares, que se encuentran en las primeras etapas de su desarrollo, pueden ser súbitamente sobrepasadas por unidades adyacentes que en principio estaban en reposo; aún más, otras unidades que tenían un aparente potencial para desarrollar embriones, no se desarrollan finalmente en embriones sino en callos.

Algunas veces se desarrolla primero una estructura proembrionaria globular, y se produce rápidamente un embrión en forma de corazón; en otros casos, las células se dividen y dan origen a una masa globular, dentro o en la periferia, de la cual una sola célula se divide y origina uno o varios embriones somáticos; debido a que esto último ocurre con más frecuencia, todavía sigue abierta la insistente pregunta sobre la frecuencia del desarrollo de una estructura similar a un suspensor.

En la mayoría de las preparaciones realizadas en SUNY, Stony Brook, se encuentra con más frecuencia un pequeño glóbulo del que emerge y crece un embrión somático de una sola célula. Parece que la opinión de otros investigadores, de que los embriones de zanahoria ineludiblemente

se desarrollan en la superficie a partir de grupos de células relativamente grandes, refleja simplemente una falla porque empiezan con suspensiones celulares finamente filtradas (Smith y Street, 1974). De cualquier manera, no hay duda de que en una sola preparación pueden presentarse, lo que ocurre a menudo, varias posibilidades de desarrollo.

La Figura 13.1 resume algunas de las vías mencionadas para la embriogénesis somática de *Daucus carota*; los eventos indicados debajo de la línea diagonal del diagrama representan las secuencias en el medio semisólido, y los dibujados encima representan los que se llevan a cabo en los cultivos líquidos. En ambos casos, un explante primario (1) se puede estimular para producir células en suspensión (2, 3) o una masa de callo.

Las células que se dividen pueden derivarse de células cambiales epidérmicas, subepidérmicas, corticales o perivasculares. La secuencia 1 a 7'' de la figura representa un sistema más directo que el de 3'' a 10 en el área inferior. Las células en suspensión (2) pueden multiplicarse y producir masas celulares proembrionarias o complejas (3) que, a su vez, se comprometen en un curso de embriogénesis somática (4,5,6). La etapa en forma de corazón (6) crece y forma un embrión bipolar normal (7).

Un complejo celular proembrionario, o una estructura similar a un suspensor, es evidente en 7' y 7'' pero falta en 7. El embrión somático en 7' muestra las yemas embrionarias adventicias que se forman del eje, las cuales pueden ser 'descamadas' en el medio (como lo indica la dirección de la flecha) y dar origen a otras plántulas no cigóticas (6,5,4).

En realidad, las células proembrionarias, que aparecen como células formadas en 7' y 7'', pueden también ser descamadas y así se convierten en la fuente de otras células totipotentes (2,3) o de grandes grupos celulares (3'). Las masas celulares en 3' pueden descomponerse en grupos menores de células (3), o pueden originar embriones somáticos discretos (que muestran la estructura similar al suspensor).

En el medio semisólido parece haber una mayor tendencia a que los grupos celulares proembrionarios (3'') no se separen, tal vez porque no se agitan ni se someten a filtración; así dan lugar frecuentemente a complejos celulares de los que pueden originarse uno o más embriones mediante un proceso de formación de yemas (8'); éstas se pueden remover y el complejo celular proembrionario estará una vez más en evidencia (8'').

La gran masa de callo que aparece en el centro (8) muestra un rango de eventos morfogénicos en el proceso. Se aprecian grupos adventicios de células con estructuras organizadas, de donde se pueden formar brotes o

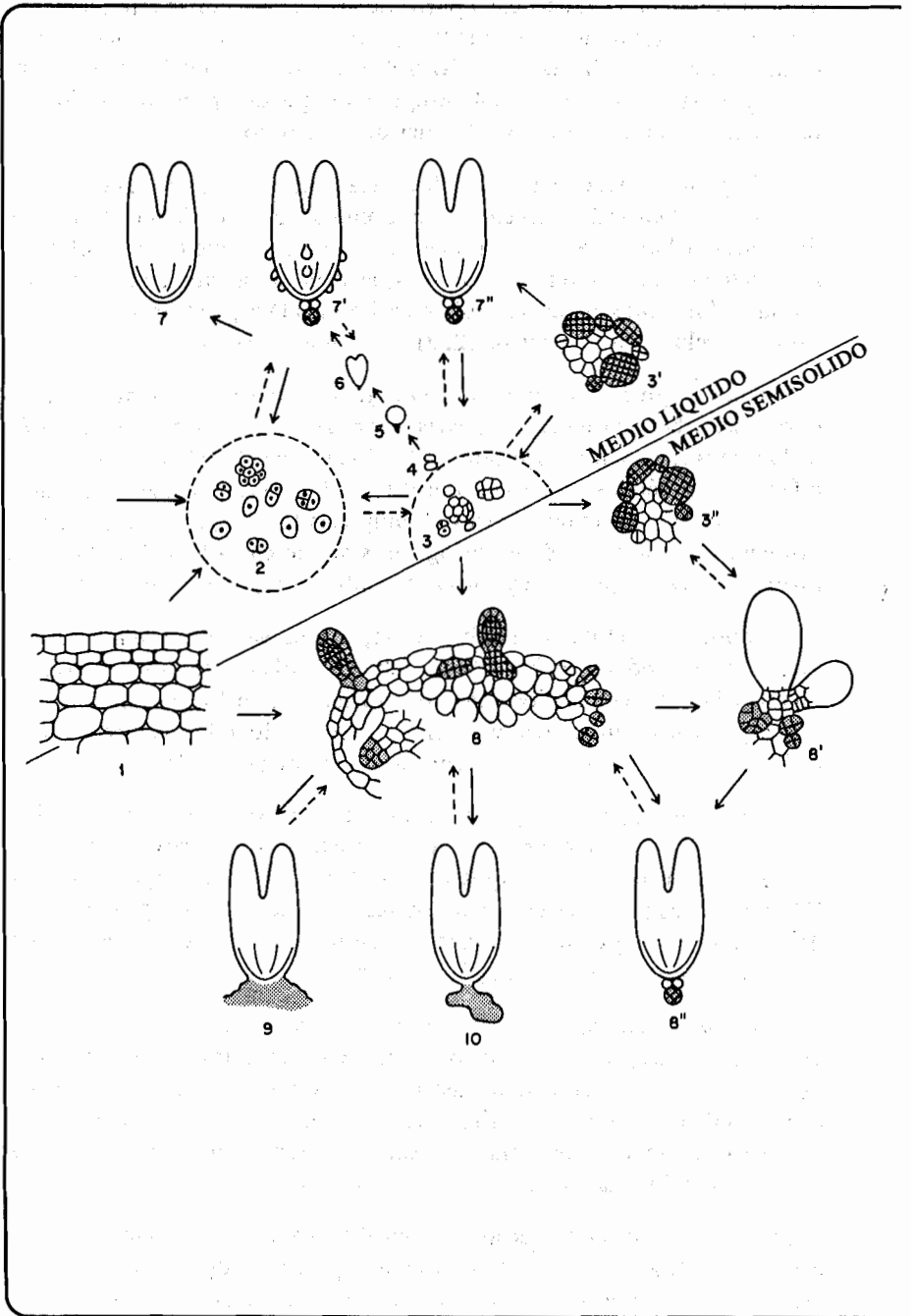




Figura 13.1. Algunos eventos morfogénéticos en el cultivo in vitro de zanahoria (*Daucus carota*), usando medio líquido (área superior respecto a la línea diagonal) y medio semisólido (área inferior respecto a esa línea). Este diagrama se basa en Haccius (1973) pero fue modificado con detalles surgidos de la experiencia del autor de este capítulo.

- |   |  |
|---|--|
| 1 = explante primario   |  |
| 2 = células en suspensión   |  |
| 3 = masas celulares proembrionarias                                     |  |
| 4 = primera división embriogénica                                       | ] Ruta de embriogénesis somática               |
| 5 = embrión globular  |  |
| 6 = embrión acorazonado   |  |
| 7 = embrión bipolar normal  |  |
| 3' = grupo celular grande   | ] Vías embriogénicas alternas en medio sólido  |
| 7' = embrión somático (con células proembrionarias y yemas adventicias) |  |
| 7'' = embrión somático (con células proembrionarias)                    |  |
| 8 = masa de callo con embriones inducidos (embriogénesis indirecta)     |  |
| 9 = embrión no cigótico (con polos cerrados)                            | ] Embriones bipolares normales                 |
| 10 = embrión no cigótico (con polos cerrados)                           |  |
| 3'' = masas proembrionarias   | ] Vías embriogénicas alternas en medio líquido |
| 8' = complejo celular (origina embriones formando yemas)                |  |
| 8'' = embrión no cigótico (con células proembrionarias)                 |  |

raíces; los centros de crecimiento epidérmicos o subepidérmicos y los corticales aparecen también en diferentes etapas de división, y los complejos proembrionarios que ellos originan producen embriones no cigóticos con polos cerrados (8",9,10), es decir, sin filamentos vasculares de conexión entre el embrión y el callo progenitor. Sin embargo, el número de células en el complejo proembrionario puede tener una relación significativa en la composición genómica del cultivo, ya que es posible que esas células no sean genéticamente idénticas o de origen uniforme.

El esfuerzo que se ha hecho para aclarar el origen preciso de los embriones somáticos, especialmente los de células cultivadas en suspensión, no ha sido particularmente efectivo, ya que ni los cigotos *in situ* ni las células somáticas puras en cultivo pueden convertirse en embriones sin pasar primero por un estado de proembrión multicelular, pequeño y globular.

## **Base Cariológica de la Variación**

En el Capítulo 5 se recalcó que, desde el punto de vista práctico de la multiplicación clonal, determinar si los embriones somáticos se originan de una sola o de varias células es un problema de naturaleza académica, ya que mientras la capacidad de expresión coordinada del genoma permanezca inalterada en cada célula, incluso las unidades que comprendan muchas células originarían, en teoría, plantas genética y fenotípicamente uniformes.

Sin embargo, desde el punto de vista de la ingeniería genética es muy importante diferenciar ese origen; en este caso, sería esencial manipular o modificar las células aisladas o los protoplastos, y obtener de las células así modificadas (nominalmente idénticas) la generación clonal de un gran número de plantas. La producción de embriones somáticos bipolares sería el medio preferido de multiplicación clonal masiva (Krikorian, 1982).

Si el investigador se limita a modificar una sola célula y a producir de ella una masa de callo, debe aplicar un tratamiento adicional para inducir un crecimiento organizado que conduzca a la regeneración de la planta entera directamente; este proceso está restringido a métodos de organogénesis adventicia a partir de callos, de puntas de brote obtenidas por excisión, o de una ramificación axilar precoz, hasta lograr la multiplicación clonal.

Si no hubiera seguridad de trabajar con una sola célula, podrían presentarse serios problemas adicionales. Si el genoma cromosómico y extracromosómico variase de una célula a otra dentro de una masa, la obtención

de un mosaico o una quimera estaría virtualmente garantizada (Cramer, 1954; Neilson-Jones, 1969; Broertjes et al., 1980; Norris et al., 1983; Marcotrigiano y Stewart, 1984).

Las poblaciones celulares cuyos componentes difieren en sus números cromosómicos en el mismo individuo (mixoploides) no son tan raras como se supondría (Dermen, 1960; Bennett, 1984); son muy comunes, en especial en aquellas plantas que se propagan principalmente por medios vegetativos (Nagl, 1978). El papel del desarrollo, si acaso existe, de las células euploides y aneuploides dentro de un individuo —que en otras condiciones sería diploide— no ha sido aún determinado rigurosamente (Khush, 1973).

Es claro que estos tipos de alteraciones somáticas son también responsables de dar origen a individuos genotípicamente diferentes. Esto está bien documentado en especies de plantas comestibles del género *Colocasia*, propagadas vegetativamente (Sharma y Sarkar, 1963).

Se está de acuerdo, generalmente, en que uno de los tipos específicos de mixoploides —el fenómeno de la polisomatía o endopoliploidización— debería preocupar también a quienes buscan utilizar los cultivos celulares como un medio de multiplicación clonal. Hace mucho tiempo, D'Amato (1952) revisó la relación entre la endopoliploidía y la diferenciación en plantas que normalmente serían diploides; desde entonces se ha demostrado continuamente que aun los cultivos frescos establecidos sin el uso de reguladores de crecimiento pueden contener células poliploides (Nagl, 1978). Algunos investigadores pensaron inicialmente que este hecho se debía a la presencia de hormonas añadidas al medio, pero ahora es claro que refleja el estado del explante primario (Partanen, 1963a, 1963b; 1965).

## **Estrategias para Modificar la Variabilidad**

No hay duda de que las aberraciones cromosómicas, especialmente la aneuploidía y la poliploidía, son comunes en células y tejidos cultivados asépticamente (D'Amato, 1975, 1977; Sunderland, 1977; D'Amato et al., 1980; Bayliss, 1980). Por esta razón, muchos investigadores insisten en que se hagan todos los esfuerzos posibles para evitar el estado de callo, ya sea en medios semisólidos o en medios líquidos.

Actualmente, muchos investigadores sostienen que la única estrategia realista para mantener la estabilidad genotípica es adoptar sistemas que estimulen la tendencia natural de algunas plantas de producir ramas axilares precoces, o yemas adventicias, en un explante primario. Se argumenta que hay demasiados riesgos de que ocurran cambios cromosómicos

al inducir callos, y que incluso sería un desastre considerar la inducción de embriones somáticos a partir de suspensiones celulares para lograr los objetivos de la micropropagación clonal.

No se puede negar que tal vez las técnicas más fáciles y seguras en la multiplicación clonal incluyan las llamadas técnicas de micropropagación (véase el Capítulo 5); pero si se desea que el área del cultivo de tejidos vegetales progrese, no se debe dudar de trabajar con células genéticamente uniformes. Ya se han mencionado las importantes implicaciones de este trabajo según la forma en que se establecen los cultivos.

Aunque se desee pasar por alto el argumento anterior, no se puede generalizar la idea de evitar el callo y las células libres, ya que hay insuficiencia de datos críticos sobre la estabilidad genética en varios tipos de suspensiones celulares capaces de producir plántulas. No existe, por tanto, una base adecuada para tal generalización. Gran parte de la literatura trata del callo y de las células cultivadas o de las raíces derivadas del callo, en vez de tratar de las plántulas que de ellos se originan (Muir, 1965; Torrey, 1967; D'Amato et al., 1980; Bayliss, 1980).

Se han realizado muy pocos estudios cuidadosos sobre el cariotipo de las células al momento de su colocación en cultivo, sobre su cariotipo posterior como células libres o callos, y sobre las plántulas producidas por éstos. Muy pocas veces se han presentado datos sobre la edad de los cultivos de los que se derivan las plantas anormales (D'Amato, 1977; Evans et al., 1981; Reisch, 1983). Sólo por esa razón hay suficientes bases para considerar que, si se encuentran cambios cromosómicos en cultivos sin estructura organizada, la diferencia no se trasmite a las plántulas producidas.

En realidad, se han hecho trabajos en esos casos y en otros en que los embriones somáticos o estructuras organizadas parecen desarrollarse preferencialmente de células que tienen complementos cromosómicos normales. Un ejemplo extremo de esto lo representa el trabajo de Sheridan (1975), quien durante más de 14 años ha mantenido en un medio líquido líneas celulares morfogenéticamente competentes de *Lillium*; estos cultivos han conservado su ploidía normal y han formado plantas normales durante un tiempo más prolongado que cualquier otro cultivo registrado.

Desde hace varios años se sabe que las suspensiones celulares de zanahoria pueden conservarse de tal manera que den origen preferencialmente a una progenie normal. Steward y sus colaboradores, basados en la fidelidad del fenotipo expresado por las plantas de esa especie que ellos produjeron, sospecharon desde muy temprano que se trataba de clones en el sentido estricto de la palabra. Rápidamente se iniciaron trabajos citológicos al respecto.

Aunque había cierta diversidad en la constitución nuclear de algunas de las poblaciones de células de zanahoria multiplicadas en medio líquido, no se pudieron detectar aberraciones cromosómicas en las plántulas derivadas de las suspensiones; bajo estas condiciones, aparentemente sólo aquellas células con genotipo normal condujeron al desarrollo de embriones somáticos. Después de un estudio con ápices de raíces de 200 plantas, se observó que las plantas regeneradas parecían ser diploides cariológicamente normales, y se abandonó el plan original de examinar un total de 1000 ápices (Mitra et al., 1960); desafortunadamente, las técnicas disponibles en ese momento no permitían realizar determinaciones críticas del cariotipo.

Aunque todavía permanece abierta la pregunta del genotipo levemente alterado sin consecuencias detectables, es improbable que se presenten serios problemas, ya que todos los detalles fenotípicos se manifiestan con precisión en la zanahoria, aun la presencia de vesículas que contienen antocianina en una inflorescencia que de otra manera sería blanca (Steward et al., 1964).

También Mok et al. (1976) <sup>1</sup> ... informado sobre la recuperación, aunque en menor escala, de plantas diploides normales obtenidas de callos radicales de zanahoria, aunque también existían en esos cultivos células con números variables de cromosomas.

Estudios sin publicar, efectuados en el laboratorio de SUNY, Stony Brook, revelan que las plantas cultivadas de zanahoria presentan siempre un fenotipo normal a lo largo de su ciclo completo de desarrollo (de plantas jóvenes a plantas maduras con flores y semillas), si las suspensiones de las que se derivan las células iniciadoras de los embriones se mantienen en cultivo durante períodos relativamente cortos (menores de un año). Las plantas originadas de células que se mantuvieron en suspensión durante períodos largos mostraron cierto número de aberraciones fenotípicas. Se utilizaron varios caracteres morfológicos estándar como base para comparar las plantas regeneradas con la planta de la que se tomó el explante primario.

Por lo tanto, se podría sugerir que el proceso de regeneración de plántulas a partir de células sería, en algunos casos, un método para seleccionar genotipos específicos, ya sea del 'tipo silvestre' o del 'mutante', ya que son éstos los que preferentemente originan la planta. Según esta opinión, entre los millones de células contenidas en un solo matraz de regeneración, sólo aquéllas que presentan esta capacidad genética para el desarrollo se verían favorecidas y seleccionadas en términos de un crecimiento adicional y de su supervivencia.

Otros trabajos, que muestran la existencia de aberraciones cromosómicas, aumentos potencialmente indiseables en la ploidía, y otros fenómenos (Murashige et al., 1966; Malnassy et al., 1970; Syono et al., 1972), presentan hallazgos experimentales según los cuales ni siquiera reordenamientos cromosómicos extremos, como las traslocaciones, ejercen una influencia cualitativa o cuantitativa en la morfología o en la fisiología.

En estos casos, la posición de la ruptura de los cromosomas parece ser más importante que la longitud de los segmentos intercambiados. Así, según el criterio de la multiplicación clonal, la relación entre el tipo de embrión somático y la planta que éste origina sería estrictamente clonal. Las poblaciones clonales de genotipo idéntico serían de mayor interés teórico, ya que el estudio del comportamiento de las células cultivadas debe incluir trabajos cada vez más frecuentes sobre los factores que estabilizan o rompen la ploidía normal o el genotipo (Van't Hof, 1974; Vig et al., 1981; Nilan et al., 1981; Rieger et al., 1981).

Si existe una comprensión profunda de la planta que se va a multiplicar, cualquier tendencia hacia la producción de aberraciones cromosómicas en las células cultivadas o en los tejidos puede reducirse al mínimo, o incluso eliminarse, seleccionando el sitio del que se toma el explante primario, o usando los reguladores del crecimiento, o acortando el período de cultivo (Sunderland, 1977; Bayliss, 1977, 1980; Skirvin, 1978; Krikorian et al., 1983).

El restablecimiento frecuente de cultivos frescos obtenidos de embriones somáticos citológicamente normales, o de plántulas que todavía se conserven asépticas, no sólo evitaría cualquier dificultad potencial causada por aberraciones citológicas sino que sería una práctica conveniente, ya que a menudo es difícil obtener explantes axénicos primarios de plantas cultivadas en el campo o en recipientes.

Actualmente se trabaja con miras al desarrollo de métodos criogénicos que permitan mantener bancos de genes en estado congelado; si las líneas celulares totipotentes pudieran mantenerse congeladas y restablecerse después, se podría avanzar hacia la preservación de cualidades genéticas, en una línea específica.

Hay situaciones en que el uso de técnicas como el bandeo cromosómico permitiría también a los investigadores detectar los cambios. Dependiendo del pronóstico de las poblaciones de células totipotentes examinadas, las suspensiones celulares se podrían descartar o las plántulas se podrían cultivar a voluntad. Después de todo, los investigadores discriminan por lo regular las plantas que no concuerdan fenotípicamente (y también, se

presume, genotípicamente) incluso cuando hacen la multiplicación vegetativa mediante técnicas no asépticas de cultivo; es la 'variación casual' en términos hortícolas.

A pesar de esta última opción, no se deberían subestimar los problemas imprevistos. En efecto, debe hacerse hincapié en que los análisis de cariotipo o los cromosómicos globales (o aun detallados) presentan graves limitaciones, ya que por ese medio se pueden detectar solamente cambios sustanciales, anomalías o aberraciones; Krikorian et al. (1983) discuten los procedimientos metodológicos de esos análisis. Sin embargo, en las plantas propagadas vegetativamente, en las cuales el análisis genético convencional no puede efectuarse, el investigador estaría limitado a hacer un análisis isoenzimático y, por último, estaría obligado a cultivar las plántulas hasta su madurez, para su evaluación en el campo o en el invernadero. Sin duda, esto es costoso y requiere mucho tiempo.

También se encontrarán otros problemas, incluyendo el reto de establecer o refinar la interpretación de lo que quiere decir la palabra clon (ver Capítulo 5). Más importante aún sería que la 'programación' del genoma (Sibi, 1976) y la modificación de su expresión según el desarrollo (Raman et al., 1980) fuera lo que caracterizara el estado clonal; así, las técnicas de cultivo nunca originarían material estrictamente clonal como generalmente se considera.

A medida que se aprende más sobre el genoma de las plantas y sobre cómo 'trabaja' la genética en su desarrollo, cambiaría también nuestra apreciación de lo que significa el estado clonal. Claramente, hay mucha plasticidad en el genoma de las plantas (Morisset y Boutin, 1984).

Por otra parte, se sabe que los efectos epigenéticos pueden observarse en las plantas cultivadas y en los productos de células cultivadas que son cariológicamente normales (Sibi, 1976; Siminovitch, 1976). Un ejemplo de un efecto epigenético expresado en el cultivo es la producción de formas foliares adultas o juveniles según la fuente del explante primario (Brink, 1962; Stoutemeyer et al., 1965; Marcavillaca et al., 1967; Banks, 1979).

Otro ejemplo sería el plagiotropismo del brote en plantas leñosas derivadas del cultivo *in vitro*; esto es particularmente válido para las coníferas. Aunque es posible recuperar plantas con brotes ortótropos de plantas derivadas de cultivos que presentan plagiotropismo, el procedimiento consume tiempo y recursos humanos (Franclet, 1977; Franclet et al., 1980).

También se pueden encontrar efectos estrictamente fisiológicos en el fenotipo. En la azucena amarilla cultivada en condiciones controladas se

pueden inducir fenotipos maduros en plántulas muy jóvenes, mediante la limitación del intercambio gaseoso (Fitter et al., 1985). Igualmente, Hussey et al. (1981) han llamado la atención sobre 'la morfología del etileno' en clones de papa multiplicados en recipientes de cultivo sellados. Los nudos de estas plántulas fenotípicamente diferentes producen brotes normales cuando se transfieren a recipientes con tapones poco ajustados. A diferencia de lo que ocurre con la papa, en la azucena amarilla el efecto abarca toda la planta, y se produce un cambio del fenotipo foliar de juvenil a maduro, lo que también se refleja en la morfología radical.

Los cambios en la morfología de *Hemerocallis* sp. y de la papa no son permanentes, es decir, se pueden revertir rápidamente; esto indica que tales cambios son fisiológicos y no epigenéticos (Brink, 1962).

## **Variación Espontánea y Aumentada: Variación Somaclonal**

Si los cambios cromosómicos y no cromosómicos persisten en las plántulas regeneradas, tal vez se pueda sacar provecho de este resultado no sólo desde el punto de vista científico —en términos de comprensión del desarrollo— sino desde el práctico, considerándolo una fuente potencialmente valiosa de variación intraclonal. Ya que se puede seleccionar un gran número de células totipotentes en una situación dada, las oportunidades de que se presenten estas variaciones serían así mayores que si se utilizasen masas de callo o esquejes (Skirvin, 1978; Meredith y Carlson, 1978).

En realidad, los sistemas celulares, en combinación con el uso de mutágenos como el etil-metano-sulfonato, permitirían inducir numerosas mutaciones y algunas al menos serían útiles. Aunque la selección plantea todavía un problema real, debería ser posible seleccionar, a largo plazo, un número significativo de 'mutaciones' deseables.

Un ejemplo de variación somaclonal se puede encontrar en la caña de azúcar (Krishnamurthi, 1981; 1982). Las plantas derivadas de callos mostraron resistencia a la enfermedad de Fiji cuando Krishnamurthi et al. (1974) evaluaron el desempeño de esos clones bajo condiciones de campo. Antes de las técnicas de cultivo de tejidos no era posible la duplicación del número de cromosomas de la caña de azúcar por medio de métodos convencionales. Los poliploides derivados de cultivos in vitro han abierto la vía para el desarrollo de una serie aneuploide que permite verificar el



potencial de rendimiento de plantas que, por el número de cromosomas, no estaban anteriormente disponibles (Heinz y Mee, 1970; Mee, 1977; Nickell, 1977).

Posiblemente no se puede sacar provecho de las variaciones inducidas por el cultivo in vitro en otras especies, como parece suceder con la caña de azúcar (Heinz et al., 1977; Lat et al., 1976; Liu et al., 1978; Larkin et al., 1983); no obstante, una cuidadosa selección de los organismos de prueba podría dar resultados inesperados o favorables. La regeneración de un geranio perfumado diferente, a partir de una quimera, es sólo un ejemplo (Skirvin et al., 1976; Janick et al., 1977; Sigurbjornsson, 1977; IAEA, 1982).

Los protoplastos ofrecen tal vez el mayor potencial para recuperar plantas de diferentes genotipos. Aunque las técnicas para el manejo de protoplastos se están desarrollando y evaluando todavía, se han obtenido resultados significativos en unas pocas especies (Giles, 1983). Tal vez el caso que recibió más publicidad es el de la papa (*Solanum* spp.) especie en la cual es posible producir los protoplastos de células foliares, regenerar sus paredes, y desarrollar plántulas de callos (Shepard, 1981, 1982; Sree Ramalu et al., 1983).

En un gran número de plantas de papa sometidas a pruebas de campo se ha observado una variación considerable en la progenie derivada del cultivo, especialmente en términos del fenotipo y de la susceptibilidad a las enfermedades. Todavía no se ha investigado totalmente si las diferencias observadas derivan de que las plántulas se regeneraron de células que genéticamente no eran homogéneas, o porque se presentó ya sea una fusión espontánea o agregación durante la primera etapa de regeneración de la pared y en su posterior división o ya un 'reajuste' del genoma durante el cultivo. Más adelante se hacen algunos comentarios adicionales.

Un aspecto crítico en la evaluación de las causas de la variación somaclonal es el factor tiempo. Como se mencionó antes, los cambios en el cariotipo ocurren a medida que los cultivos se mantienen durante períodos de tiempo cada vez mayores; por consiguiente, se podría esperar un aumento en las anomalías concomitante con esos períodos. Sin embargo, recuérdese que las plantas regeneradas no siempre reflejan totalmente las anomalías de las células cultivadas; puede ocurrir una selección antes de la regeneración.

La situación se complica en este campo de la investigación, ya que en plantas derivadas de cultivos hay tantos recuentos de estabilidad como de

inestabilidad. Un buen ejemplo de este conflicto es el cultivo de protoplastos de papa, especie en la cual Wenzel et al. (1979) observaron uniformidad en plantas derivadas de protoplastos. Unas pocas plantas presentaron variación en la forma del tubérculo, pero esto sucedió sólo después de un largo período de cultivo. La leve variación observada se explicó como una aneuploidía inducida por el cultivo.

Utilizando el cultivar de papa 'Russet Burbank' para seleccionar 10,000 clones derivados de protoplastos, Shepard (1981) encontró variación en la forma de los tubérculos, en el rendimiento, en la morfología general de las plantas, y en la resistencia al añublo o tizón temprano y al tardío; no se determinó la base genética de esa variación. En un análisis adicional de 65 clones, Secor et al. (1981) estudiaron 35 características fenotípicas; cada clon se diferenciaba del progenitor Russet Burbank por lo menos en una característica.

Las diferencias entre los resultados de los estudios mencionados pueden explicarse así: mientras que Wenzel seleccionó relativamente pocos clones (211), Shepard seleccionó más de 10,000. Las fuentes de protoplastos eran diferentes: mientras Shepard utilizó mesófilo foliar, Wenzel usó cultivos de punta de tallo; los niveles de ploidía también eran diferentes: Shepard utilizó 4X, y Wenzel 2X.

Se sabe que la fuente del explante tiene a veces un efecto significativo en el nivel y en el tipo de la variación observada en los regenerantes. Plantas de piña (*Ananas comosus* [L. Merr.]) se regeneraron de callos derivados de cuatro fuentes diferentes de explantes (sincarpo, vástago, corona y yemas axilares) y mostraron diferentes tipos y grados de variación (Wakasa, 1979). Así, la selección adecuada del explante sería, en ciertas situaciones, el factor determinante en el aumento o en la disminución de la frecuencia de la variación somaclonal.

Ya se han mencionado las variantes somaclonales que muestran tolerancia o resistencia a varias enfermedades causadas por hongos o virus; cabe mencionar también un mutante de tomate que presenta un aumento en la acumulación de materia seca (Evans et al., 1984). Se hace hincapié en que es esencial hacer la selección de las variantes somaclonales entre plantas agrónomicamente importantes, con un equipo profesional de fitomejoradores o agrónomos; sus integrantes deben estar tan familiarizados con la planta en cuestión, que serán capaces de detectar las variantes rápidamente (casi por prueba selectiva), basados esencialmente en el fenotipo. No se trata necesariamente de buscar respuestas o variación de 'todo o nada'; los cambios sutiles, pero reales, son exactamente los que se desea hallar.

Las variantes que se deben buscar en un somaclón para que éste sea potencialmente útil requieren un conocimiento práctico del cultivo. El descubrimiento de la tolerancia a unos grados adicionales de temperatura alta en una población de maíz o de soya, en el campo, podría ser un adelanto importante; igualmente, la tolerancia a una disminución de varios grados de temperatura en una de las especies tropicales o subtropicales de *Eucalyptus* podría ser bien acogida en las zonas templadas. Un aumento del 5% en la materia sólida del fruto del tomate es a menudo suficiente para que ese tomate tenga una gran importancia en la industria de enlatados; y así sucesivamente.

Esto significa que el investigador debe establecer los límites tolerables de la variación somaclonal, en consulta con los expertos de campo y también con los economistas y administradores de empresas.

## Referencias

- Banks, M. A. 1979. Plant regeneration from callus from the growth phases of English ivy, *Hedera helix* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 92:349-353.
- Bayliss, M. W. 1977. Factors affecting the frequency of tetraploid cells in predominantly diploid suspensions of *Daucus carota*. *Protoplasma* 92:109-115.
- . 1980. Chromosomal variation in plant tissues in culture. En: Vasil, I. K. (ed.). *Perspectives in plant cell and tissue culture*. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11A:113-144.
- Bennett, M. D. 1984. The genome, the natural karyotype, and biosystematics. En: Grant, W. F. (ed.). *Plant biosystematics*. Academic Press, Nueva York. p. 41-66.
- Bottino, P. J. 1975. The potential of genetic manipulation in plant cell cultures for plant breeding. *Radiation Botany* 15:1-16.
- Brettell, R. I. S. e Ingram, D. S. 1979. Tissue culture in the production of novel disease-resistant crop plants. *Bio. Rev.* 54:329-345.
- Brink, R. A. 1962. Phase change in higher plants and somatic cell heredity. *Quarterly Review of Biology* 37:1-22.
- Brock, R. D. 1977. Genetic engineering and plant improvement. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Sciences* 43:14-21.
- Broertjes, C. y van Harten, A. M. 1978. Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops: An interpretative literature review. Elsevier Scientific Publishing, Nueva York.

- y Keen, A. 1980. Adventitious shoots: Do they develop from one cell? *Euphytica* 29:73-87.
- Carlson, E. A.; Cicarrone, D. H.; Jay, G. D.; Moss, L. J.; Levy, R. S. y Meyers, T. K. 1983. Effets biologiques des phénoxyherbicides sur le *Drosophila melanogaster*. En: Comité National d'Investigation des Consequences de la Guerre Chimique Americaine au Viet Nam; Les herbicides et defoliants employés dans la guerre: Les effets a long terme sur l'homme et la nature. Ha Noi, Viet Nam. v. 3, p. 190-199.
- Chaleff, R. S. 1981. Genetics of higher plants: Applications of cell culture. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.
- . 1983. Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. *Science* 219:676-682.
- Conger, B. V. (ed.). 1977. Principles and practices of cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Raton, Florida, E.U.
- Constantin, M. J. 1981. Chromosome instability in cell and tissue cultures and regenerated plants. *Environ. Exptl. Botany* 21:359-368.
- Cramer, P. J. S. 1954. Chimeras. *Bibliographia Genetica* 16:193-381.
- D'Amato, F. 1952. Polyploidy in the differentiation and function of tissues and cells of plants. *Caryologia* 4:311-358.
- . 1975. The problem of genetic stability in plant cell and tissue cultures. En: Crop genetic resources for today and tomorrow. IBP 2. University Press, Cambridge, Inglaterra. p. 335-348.
- . 1977. Cytogenetics of genetic stability in plant cell and tissue cultures. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Nueva York. p. 333-374.
- ; Bennici, A.; Cionni, P. G.; Baroncelli, S. y Lupi, M. C. 1980. Nuclear fragmentation followed by mitosis as mechanism for wide chromosome number variation in tissue cultures: It's implications for plantlet regeneration. En: Sala, F.; Parisi, R.; Cella, R. y Ciferri, O. (eds.). Plant cell cultures: Results and perspectives. Elsevier, Nueva York. p. 67-72.
- Day, P. R. 1973. Genetic variability of crops. *Ann. Rev. Phytopathol.* 11:293-312.
- Dermen, H. 1960. Nature of plant sports. *American Horticulture Magazine* 39:123-173.
- Dolezel, J. y Novak, F. J. 1984. Effect of plant tissue culture media on the frequency of somatic mutations in *Tradescantia* stamen hairs. *Z. Pflanzenphysiol.* 114:51-58.
- Doré, J. 1965. Physiology of regeneration in cormophytes. En: Ruhland, W. (ed.). *Encyclopedia of plant physiology*. Springer-Verlag, Berlin. 15(2):1-91.

- Duvick, D. N. 1978. Risks of monoculture via clonal propagation. En: Hughes, K.; Henke, R. y Constantin, M. (eds.). Propagation of higher plants through tissue culture. U.S. Department of Energy, Technical Information Center, Washington, D.C. p. 73-83.
- Earle, E. D. y Demarly, Y. (eds.) 1982. Variability in plants regenerated from tissue culture. Praeger Publishers, Nueva York.
- Evans, D. A. y Reed, S. M. 1981. Cytogenetic techniques. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 213-240.
- y Sharp, W. R. 1983. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science* 221:949-951.
- ; Sharp, W. R. y Medina-Filho, H. P. 1984. Somaclonal variation and gametoclonal variation. *Am. J. Bot.* 71:759-774.
- Fitter, M. S. y Krikorian, A. D. 1985. Mature phenotype in *Hemerocallis* plantlets generated *in vitro*. *Journal of Plant Physiology* 121(2):97-101.
- Francllet, A. 1977. Manipulation des pieds-mères et amélioration de la qualité des boutures. *Etudes et recherches de l' Association Forêt-Cellulose (AFOCEL)*, no. 8. 22 p.
- ; David, A.; David, H. y Boulay, M. 1980. Première mise en évidence morphologique d'un rajeunissement de méristemes primaires caulinares de pin maritime agé (*Pinus pinaster* Sol.). *Comptes Rendus a l'Academie des Sciences Paris* 290 D:927-930.
- Giles, K. L. (ed.) 1983. Plant protoplasts. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 16. Academic Press, Nueva York.
- Gleba, Y. Y. y Sytnik, K. M. 1984. Protoplast fusion: Genetic engineering in higher plants. *Monographs in theoretical and applied genetics* 8. Springer-Verlag, Nueva York.
- Haccius, B. 1973. Les premiers stades des embryons végétaux zygotiques et somatiques sont-ils différents ou non? *Soc. Bot. Fr. Mémoires* 1973. p. 201-206.
- Hanson, M. P. 1984. Cell culture and recombinant DNA methods for understanding and improving salt tolerance of plants. En: Staples R. C. y Toenniessen, G. H. (eds.). *Salinity tolerance in plants*. John Wiley, Nueva York. p. 335-359.
- Hartmann, H. T. y Kester, D. E. 1984. *Plant propagation: Principles and practices*. 4 ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., E.U.
- Heinz, D. J. y Mee, G. W. P. 1970. Colchicine-induced polyploids from cell suspension cultures of sugarcane. *Crop Science* 10:696-699.

- ; Krishnamurthi, M.; Nickell, L. G. y Maretzki, A. 1977. Cell, tissue and organ culture in sugarcane improvement. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Nueva York. p. 3-17.
- Hussey, G. y Stacey, N. J. 1981. In vitro propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). Ann. Bot. 48:787-796.
- IAEA (International Atomic Energy Agency). 1982. Induced mutations in vegetatively propagated plants; 2: Proceedings of the Final Research Co-ordination Meeting on the Improvement of Vegetatively Propagated Crops and Tree Crops through Induced Mutations, Coimbatore, India, 1980. Viena.
- Janick, J.; Skirvin, R. M. y Janders, R. B. 1977. Comparison of in vitro tissue culture systems in scented geranium. J. Hered. 68:62-64.
- Khush, G. S. 1973. Cytogenetics of aneuploids. Academic Press, Nueva York.
- Krikorian, A. D. 1982. Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. Biol. Rev. 57:151-218.
- ; O'Connor, S. A. y Fitter, M. S. 1983. Chromosome number variation and karyotype stability in cultures and culture-derived plants. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1, p. 541-581.
- Krishnamurthi, M. 1981. Sugarcane improvement through tissue culture and review of progress. En: Rao, A. N. (ed.). Tissue culture of economically important plants. Asian Network for Biological Sciences y Committee on Science and Technology in Developing Countries (COSTED), Singapur. p. 70-77.
- . 1982. Disease resistance in sugarcane developed through tissue culture. En: Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue culture 1982. Jap. Assoc. Plant Tissue Cult. (Tokio) p. 769-770.
- y Tlaskal, J. 1974. Fiji disease resistant *Saccharum officinarum* var. Pindar sub-clones from tissue culture. Proc. Int. Soc. Sugarcane Technol. 15: 130-137.
- Larkin, P. J. y Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation: A novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theoret. Appl. Genet. 60:197-214.
- y — . 1983. Somaclonal variation and eyespot toxin tolerance in sugarcane. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2:111-121.
- Lat, J. B. y Lantin, M. M. 1976. Agronomic performance of sugarcane clones derived from callus tissue. Philippine Journal of Crop Science 1:117-123.

- Liu, M. C. y Chen, W. H. 1978. Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding; 2: Performance and yield potential of callus derived lines. *Euphytica* 27:273-282.
- Malnassy, P. y Ellison, J.H. 1970. Asparagus tetraploids from callus tissue. *HortScience* 5:444-445.
- Marcavillaca, M. C. y Montaldi, E. R. 1967. Diferentes formas de hojas producidas por yemas adventicias inducidas experimentalmente en hojas aisladas de *Nicotiana tabacum* L. y *Passiflora caerulea* L. *Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA (Buenos Aires)* 2(4):1-7.
- Marcotrigiano, M. y Stewart, R. N. 1984. All variegated plants are not chimeras. *Science* 223:505.
- Marshall, D. R. 1977. The advantages and hazards of genetic homogeneity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 287:1-20.
- Mee, G. W. P. 1977. Production of triploid sugarcane clones. *Hawaiian Sugarcane Planters Association Annual Report for 1977*. p. 8-9.
- Meredith, C. P. y Carlson, P. S. 1978. Genetic variation in cultured plant cells. En: Hughes, K.; Henke, R. y Constantin, M. (eds.). *Propagation of higher plants through tissue culture*. U.S. Department of Energy, Technical Information Center, Washington, D. C. p. 166-176.
- Mitra, J.; Mapes, M. O. y Steward, F. C. 1960. Growth and organized development of cultured cells; 4: The behavior of the nucleus. *Amer. J. Bot.* 47:357-368.
- Mok, M.; Gabelman, W. H. y Skoog, F. 1976. Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucus carota* L. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101:442-449.
- Morisset, P. y Boutin, C. 1984. The biosystematic importance of phenotypic plasticity. En: Grant, W. F. (ed.). *Plant biosystematics*. Academic Press, Nueva York. p. 293-306.
- Muir, W. H. 1965. Influence of variation in chromosome number on differentiation in plant tissue cultures. En: White, P. R. y Grove, A. R. (eds.). *Proceedings of the International Conference on Plant Tissue Culture*, Pennsylvania State University, 1963. McCutchan Publishing, Berkeley, California, E.U. p. 485-492.
- Murashige, T. y Nakano, R. 1966. Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. *Journal of Heredity* 57:115-118.
- Nagl, W. 1978. *Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution*. North-Holland Publishing, Amsterdam, Holanda.
- Neilson-Jones, W. 1969. *Plant chimeras*. Methuen and Company, Nueva York.
- Nickell, L. G. 1977. Crop improvement in sugarcane: Studies using in vitro methods. *Crop Science* 17:717-719.

- Nilan, R. A. y Veleminsky, J. 1981. Mutagenicity of selected chemicals in barley test systems. En: DeSerres, F. J. y Shelby, M. D. (eds.). Comparative chemical mutagenesis. Plenum Press, Nueva York. p. 291-320.
- Norris, R.; Smith, R. H. y Vaughn, K. C. 1983. Plant chimeras used to establish de novo origin of shoots. *Science* 220:75-76.
- Partanen, C. R. 1963a. Plant tissue culture in relation to developmental cytology. *Int. Rev. Cytol.* 15:215-243.
- . 1963b. The validity of auxin-induced divisions in plants as evidence of endopolyploidy. *Exptl. Cell Res.* 31:597-599.
- . 1965. Cytological behavior of plant tissues in vitro as a reflection of potentialities *in vivo*. En: White, P. R. y Grove, A. R. (eds.). Proceedings of an international conference on plant tissue culture. McCutchan Publishing, Berkeley, California, E.U. p. 463-471.
- Raman, K.; Walden, D. B. y Greyson, R. I. 1980. Propagation of *Zea mays* L. by shoot tip culture: A feasibility study. *Ann. Bot.* 45:183-189.
- Reisch, B. 1983. Genetic variability in regenerated plants. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1, p. 748-769.
- Rieger, R.; Michaelis, A.; Schubert, I.; Kaina, B. y Heindorff, K. 1981. Mutagenicity of selected chemicals in *Vicia faba* and *Allium cepa* test systems. En: De Serres, F. J. y Shelby, M. D. (eds.). Comparative chemical mutagenesis. Plenum Press, Nueva York. p. 339-351.
- Scowcroft, W. R. y Larkin, P. J. 1982. Somaclonal variation: A new option for plant improvement. En: Vasil, I. K.; Scowcroft, W. R. y Frey, K. J. (eds.). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press, Nueva York. p. 159-178.
- Secor, G. A. y Shepard, J. F. 1981. Variability of protoplast-derived potato clones. *Crop Science* 21:102-105.
- Sharma, A. y Sarkar, A. K. 1963. Cytological analysis of different cytotypes of *Colocasia antiquorum*. *Botanical Society of Bengal Bulletin (Calcuta)* 17:16-22.
- Shepard, J. F. 1981. Protoplasts as sources of disease resistance in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19:145-155.
- . 1982. The regeneration of potato plants from leaf-cell protoplasts. *Sci. Amer.* 246:154-166.
- Sheridan, W. F. 1975. Plant generation and chromosome stability in tissue cultures. En: Ledoux, L. (ed.). Genetic manipulations with plant material. Plenum Publishing, Nueva York. p. 263-295.



- Sibi, M. 1976. La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs; 2: Aspect expérimental; obtention de variants par cultures de tissus *in vitro* sur *Lactuca sativa* L. Ann. Amélior. Plantes (Paris) 26:523-547.
- Sigurbjornsson, B. (ed.) 1977. Manual on mutation breeding. 2 ed. Technical reports series, no. 119. International Atomic Energy Agency (IAEA), Viena.
- Siminovitch, L. 1976. On the nature of heritable variation in cultured somatic cells. Cell 7:1-11.
- Singh, B. O. y Harvey, B. L. 1975. Does 2,4-D induce mitotic irregularities in plant tissue culture? Experientia 32:785-787.
- Skirvin, R. M. 1978. Natural and induced variation in tissue culture. Euphytica 27:241-266.
- y Janick, J. 1976. 'Velvet Rose' *Pelargonium*, a scented geranium. Hort-Science 11:61-62.
- 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. 38:223-241.
- Sree Ramulu, K.; Dijkhuis, P. y Roest, S. 1983. Phenotypic variation and ploidy level of plants regenerated from protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Bintje). Theoret. Appl. Genet. 65:329-338.
- Steward, F. C.; Mapes, M. O.; Kent, A. E. y Holsten, R. D. 1964. Growth and development of cultured plant cells. Science 143:20-27.
- Stoutemeyer, V. T. y Britt, O. K. 1965. The behavior of tissue cultures from English and Algerian ivy in different growth phases. Amer. J. Bot. 52:805-810.
- Sunderland, N. 1977. Nuclear cytology. En: Street, H. E. (ed.). Plant tissue and cell culture. 2 ed. University of California Press, Berkeley, E.U. p. 177-205.
- Swingle, C. F. 1940. Regeneration and vegetative propagation. Bot. Rev. 6:301-355.
- . 1952. Regeneration and vegetative propagation. Bot. Rev. 18:1-13.
- Syono, K. y Furuya, T. 1972. Abnormal flower formation of tobacco plants regenerated from callus culture. Botan. Mag. (Tokio) 85:273-283.
- Torrey, J. G. 1967. Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long term-plant tissue cultures. Physiol. Plant. 20:265-275.
- Van't Hof, J. 1974. Control of the cell cycle in higher plants. En: Padilla, G. M.; Cameron, I. L. y Zimmerman, A. (eds.). Cell cycle controls. Academic Press, Nueva York. p. 77-85.
- Vasil, I. K. y Hildebrandt, A. C. 1965. Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microculture. Science 150:889-892.

- Vig, B. K. y Sung, R. 1981. Mutagenicity of selected chemicals in soybean test systems. En: De Serres, F. J. y Shelby, M. D. (eds.). Comparative chemical mutagenesis. Plenum Press, Nueva York. p. 257-290.
- Wakasa, K. 1979. Variation in the plants differentiated from tissue culture of pineapple. Jpn. J. Breed. 29:13-22.
- Wenzel, G.; Schieder, O.; Przewozny, T.; Sopory, S.K. y Melchers, G. 1979. A comparison of single cell derived *Solanum tuberosum* plants and a model for their application in breeding programs. Theor. Appl. Genet. 55:49-55.
- Zimmerman, R. H. 1981. Genetic stability of horticultural plants propagated by tissue culture. Int. Plant Propag. Soc. Proc. 31:118-126.
- Zosimovich, V. P. y Kunakh, V. A. 1975. Levels, types, and origin of chromosome aberrations in cultures of isolated plant tissues. Sov. Genet. 11:685-693.