

Cuadro 5.1. Características de la regeneración vegetativa y de la multiplicación y el desarrollo especializado de órganos que pueden servir como indicios para la propagación in vitro.

Característica general	Casos específicos	Observaciones
Brotos con yemas, que enraizan	Tallos, acodos y macollas que enraizan en los nudos	
	Brotos rastreros	Brotos plagiótropos o postrados, que se pueden establecer en el extremo o en zonas seleccionadas, y originar una nueva planta.
	Estolones	Tallos de crecimiento horizontal, producidos en nudos basales de la planta progenitora; en los nudos se producen raíces adventicias y pueden desarrollarse terminalmente nuevas plantas o tubérculos.
	Rizomas	Tallos subterráneos con yemas en las axilas de hojas pequeñas (escamas); generalmente son horizontales y con muchos nudos.
Brotos con base modificada	Tubérculos del tallo	Porciones subterráneas y ensanchadas de los tallos, que actúan como órganos de perennidad.
	Bulbos	Bases foliares carnosas o engrosadas o grupos de escamas a un nivel levemente subterráneo y unidas a un tallo aplanado o altamente comprimido; las yemas axilares pueden desarrollarse como bulbos hijos llamados acodos.
	Cormos	Tallos engrosados, con yemas latentes en las axilas foliares a menudo similares a escamas; como en los bulbos, se presentan en la base del brote.

(Continúa)

Cuadro 5.1. Continuación.

Característica general	Casos específicos	Observaciones
Macolla radical	Macollas	Brotos que, por medios diversos, se originan en las raíces (pueden ser raíces trepadoras, raíces principales, tubérculos radicales, etc.)
Apomixis	Gametofítica	Se forma un saco embrionario no reducido.
	Partenogénesis o apogamia	Formación del embrión sin fertilización del óvulo u otra célula del gametofito.
	Adventicia (nuclear) y embriónica	Embriones que se originan directamente del tejido esporofítico en el óvulo.

Cultivo de embriones y esporas

Desde 1920 se ha mostrado que a veces se puede estimular el crecimiento de ciertos embriones en cultivos asépticos, crecimiento que de otra forma sería inalcanzable o errático (Raghavan, 1966; 1976).

En algunos casos, los embriones cuyas reservas alimenticias estaban deficientemente desarrolladas no germinaron porque dependían de fuentes externas de nutrimentos. Por ejemplo, las semillas de orquídeas contienen un embrión pequeño que sólo incluye una masa sencilla de algunos cientos de células; para germinar, este embrión depende totalmente del azúcar exógeno, el cual es suministrado en la naturaleza por una relación simbiótica con micorrizas (Arditti, 1982). Otro ejemplo muy conocido de fracasos en la germinación de embriones es el causado por la síntesis de inhibidores en la semilla; en estos casos, a menudo los embriones pueden germinar sólo después de un período apropiado de latencia.

En algunas plantas, como el *Iris* sp., es posible eliminar tanto el requerimiento de latencia como el efecto de los inhibidores de la germinación, presentes en la semilla de algunos híbridos, mediante la excisión de los embriones y su siembra en cultivo aséptico hasta cuando alcanzan un tamaño suficiente para ser trasplantados al suelo.

El cultivo aséptico se ha convertido en un procedimiento ampliamente utilizado y de rutina para el 'rescate' de los embriones que normalmente no crecen ni se convierten en plántulas. En un sentido estricto, el material no se está multiplicando clonalmente, pero sí se está multiplicando el germoplasma que de otra manera se perdería; por lo tanto, tal vez se justifique incluir este sistema en la lista de estrategias para la multiplicación.

Emérta de Guzmán y sus asociados en la Universidad de Filipinas, en Los Baños, obtuvieron un impacto considerable con el cultivo de un mutante de coco llamado 'Makapuno'. Bajo condiciones naturales, el endosperma de las semillas Makapuno se pudre y, por lo tanto, priva al embrión en desarrollo de los nutrimentos necesarios. Al remover los embriones individuales, en cambio, y suministrarles un medio apropiado con nutrimentos, aquéllos se pueden cultivar hasta que adquieran un tamaño suficiente para sembrarlos en el campo (IAEA, 1982).

La división longitudinal de los embriones es otro medio que podría utilizarse para la multiplicación; obviamente, en este caso las mitades de la planta son idénticas o clonales.

En ciertas orquídeas las semillas germinan asépticamente y las plántulas se pueden desarrollar, incluso en ausencia de reguladores exógenos de

crecimiento, a partir de masas de protocormos que a su vez se subdividen y se multiplican utilizando las técnicas convencionales de mericloneo. Así, se pueden derivar poblaciones de un solo embrión y esto constituye, por supuesto, una población clonal.

En casos tales como el de las orquídeas terrestres que son escasas o se encuentran en vías de extinción y en las cuales sólo se puede disponer de semillas, ésta sería una estrategia razonable para la multiplicación clonal, a menos que se puedan adoptar otros medios de obtención no destructiva del explante.

Como una forma de aumentar la tasa de multiplicación de los helechos, durante varios años se han propagado éstos a partir de esporas sembradas asépticamente en un medio de cultivo. Recientemente, el protalo se ha regenerado de las esporas, las cuales se dividen para proporcionar una fuente de tejido gametofítico; este tejido puede desintegrarse mediante procedimientos extremos tales como la acción de corte de un mezclador eléctrico y formará, a su vez, esporofitos. Durante mucho tiempo, los helechos han sido tema favorito para el estudio de la apogamia, es decir, el desarrollo de un esporofito a partir de tejido gametofítico.

Desde finales de los años 50 y principios de la década del 60 se ha explotado la androgénesis, o sea la producción de plántulas a partir de anteras como fuente de células haploides. En el tabaco, por ejemplo, es posible iniciar cultivos de anteras que contienen granos de polen inmaduros en los cuales el núcleo vegetativo —todavía dentro de la pared original del grano— se divide para dar origen al proembrión. Aún en otros casos ha sido posible inducir el crecimiento de los granos de polen aislados para formar embriones somáticos.

Nuevamente, es posible que las plantas producidas mediante estos procedimientos sean disímiles de sus progenitores y que, en consecuencia, no correspondan estrictamente a la multiplicación clonal. Pero existen casos seleccionados en los que se logró realmente una multiplicación clonal del individuo (Nitzsche et al., 1977; Johri, 1982).

Por otra parte se tiene la ginogénesis, que es el proceso por el cual se producen plantas haploides in vitro mediante la inducción de tejidos haploides del gametofito femenino (Yang et al., 1982).

Etapas de la Propagación in Vitro

Murashige (1974; 1977a,b) y otros encontraron que era útil destacar la secuencia de eventos asociados con la multiplicación de plantas mediante las técnicas de cultivo aséptico, de la siguiente manera:

- Etapas I.** Es la etapa de iniciación o de establecimiento, en la cual se establece el cultivo inicial o primario.
- Etapas II.** Es la etapa de multiplicación de brotes, o multiplicación simplemente.
- Etapas III.** Corresponde al enraizamiento o etapa de pretrasplante; tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo.

Frecuentemente, las condiciones específicas del medio o del cultivo aséptico están asociadas con cada una de las etapas mencionadas y, cuando sea posible, conviene organizar una estrategia de multiplicación basada en la interpretación de dichas condiciones. Sin embargo, no se debe llegar a la deducción de que estas etapas son siempre completamente distintas y separables.

Además de las tres etapas mencionadas (propuestas inicialmente por Murashige, 1974) pueden considerarse otras dos como parte integral del procedimiento:

- Etapas IV.** Traslado final a la etapa de medio ambiente.
- Etapas 0.** Etapa inicial, que comprende la selección de la planta madre y la selección de una modalidad de pretratamiento para volver funcional la estrategia que se adopte.

Propagación Vegetativa Convencional y su Aplicación a la Propagación Clonal

El primero de varios requisitos que tienen que cumplirse cuando se desea lograr una manipulación exitosa en el cultivo aséptico es familiarizarse, tanto como sea posible, con la biología de la planta con la cual se trabaja. Esto significa que los aspectos de la regeneración vegetativa convencional tienen particular importancia cuando se trata de multiplicar clonalmente las plantas mediante cualquiera de las técnicas de cultivo aséptico mencionadas hasta el momento.

El desarrollo de modalidades de crecimiento especializado o de órganos para la regeneración es particularmente significativo, ya que si el explante se hace en el momento adecuado y si se le suministra el medio de cultivo correcto, puede dar origen a un sistema in vitro que imita o simula el natural. Esto significa que las habilidades en la propagación vegetativa son de provecho para la persona que trabaja en el cultivo de tejidos (Browse, 1979; Hartmann et al., 1984; Cook, 1984).

Igualmente, es esencial tener una buena comprensión de los reguladores del crecimiento (Abeles, 1973; Pilet, 1977; Plant Growth Regulator Working Group, 1977; Skoog, 1980; Wareing, 1982; Nickell, 1982; 1983) y de las relaciones hormonales (Steward et al., 1971; Thimann, 1977; Letham et al., 1978; Jacobs, 1979; Thimann, 1980; Crozier, 1981; MacMillan, 1984; Scott, 1984).

En el Cuadro 5.1 se presentó una lista de características de la reproducción vegetativa que tienen importancia para la multiplicación in vitro. En teoría, todas las células de las plantas son totipotentes, o sea capaces de dar origen a una planta entera; aunque hasta el momento las puntas del tallo han tenido mayor importancia para la multiplicación clonal en varias especies, también se han utilizado otros explantes como hojas, ovarios, y capullos de flores para obtener plántulas. La capacidad que tienen los distintos explantes cultivados in vitro para regenerar plantas está correlacionada, aunque no invariablemente, con el hecho de que incluso bajo condiciones corrientes —es decir, condiciones de cultivo no aséptico— pueden responder en forma similar.

Desde mucho antes de que las técnicas de cultivo axénico se pusieran en práctica a nivel de laboratorio, los botánicos estimaron que el desarrollo del cuerpo de la planta superior implicaba la supresión de muchos primordios reales o potenciales y el desarrollo de relativamente pocos de ellos. En realidad, los factores que controlan la expresión del potencial han sido y siguen siendo desconocidos. Las células totipotentes, capaces de producir nuevas regiones de crecimiento, tejidos, órganos e incluso nuevas plantas, se han mantenido claramente controladas por las influencias correlativas y las inhibiciones. Algunas veces, éstas pueden liberarse fácilmente, y en otros casos no.

El conocimiento que tenga el investigador sobre el papel de la regulación del crecimiento de las plantas por medio de sustancias químicas será decisivo para su trabajo. Algunas referencias importantes, no citadas específicamente en este texto, corresponden a la serie de multivolumenes publicados con el nombre de *Handbook of Plant Cell Culture* (Evans et al., 1983; Sharp et al., 1984; Ammirato et al., 1984) y al *Cell Culture and*

Somatic Cell Genetics of Plants editado por Vasil (1984 y sig.); la obra de un solo volumen de George et al. (1984) es especialmente completa y debería estar disponible para todos las personas que trabajan en estos temas. Otras obras más antiguas, consideradas actualmente clásicas, son también valiosas ya que los principios que están bien establecidos nunca cambian (Gautheret, 1959; White, 1963; Butenko, 1968; Steward, 1969; Wilt et al., 1976).

En realidad, se debería recordar que, en un tema tan amplio como el de la propagación clonal in vitro, es posible tener muchas variaciones y diferentes enfoques. Los investigadores actualizados saben que no hay reglas inquebrantables para el éxito, y que a menudo es necesario ajustar y reajustar la composición del medio de cultivo, e incluso el medio ambiente, para que se pueda inducir el crecimiento en los cultivos y una posterior organización en la forma deseada. Cada una de las etapas tiene sus propios problemas y no hay manera de suministrar directrices precisas para cada una de ellas.

Concepto de micropropagación. Cuando se considera que la mayoría de las plantas que se propagan mediante el cultivo aséptico se originan generalmente en pequeños esquejes, se puede apreciar rápidamente que no hay nada fundamentalmente nuevo acerca de la multiplicación de las plantas por medio del cultivo de tejidos. En realidad, la palabra micropropagación, utilizada por primera vez en 1968 por Hartmann y Kester en su conocido libro sobre propagación de plantas, parece haber ganado una amplia aceptación como término general para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación in vitro.

Originalmente, la micropropagación se definió como 'cualquier' procedimiento aséptico que comprenda la manipulación, en las plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente.

La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se produce pueda crecer y ser fenotípica y genotípicamente idéntica a la planta original de la que se deriva. Hasta el momento, las puntas de tallos y las yemas laterales han sido los explantes más comúnmente utilizados para la Etapa I. Por esta razón, cuando se usa la palabra micropropagación muy raras veces se piensa en el uso de callos, de células libres o de otros sistemas de tejidos más exigentes.

Sin embargo, hay un hecho claro en todo esto: las plantas que pueden multiplicarse o propagarse por medios vegetativos convencionales no

siempre responden igualmente bien a los métodos artificiales de propagación vegetativa. Incluso en el caso de las plantas que se propagan con facilidad, ocurre generalmente que cuanto menor sea el segmento utilizado mayor será la dificultad que se encuentra para fomentar la producción de brotes y raíces.

Los progresos en la ciencia han aumentado la comprensión de la función y de la composición de los organismos; igualmente han aumentado las esperanzas acerca de la multiplicación clonal de plantas a partir de pedazos cada vez más pequeños y hasta de células individuales (Krikorian, 1982). Desde la perspectiva de aquellos que buscan la multiplicación clonal, la estrategia comprende el uso de células para la embriogénesis somática; es una estrategia aún experimental y está orientada hacia la investigación, y de ninguna forma está en la etapa de 'desarrollo' de rutina.

Estrategias Adicionales para la Propagación Clonal

Es importante adoptar una estrategia que sea funcional y se ajuste a las necesidades y expectativas del investigador.

La economía no es una consideración de poca importancia en el proceso de decisión. Aunque este capítulo ha hecho hincapié en las técnicas del cultivo aséptico, también llama la atención sobre las posibilidades que tiene el uso de estrategias de micropropagación sin el componente del cultivo aséptico.

Un ejemplo de ello está en el método de Pateña et al. (1979) para la propagación rápida de yuca utilizando esquejes de yema. Los esquejes se toman de plantas cultivadas en el campo, se sumergen en un fungicida y en AIB, y se les permite enraizar bajo nebulización; una vez enraizados pueden fortalecerse en un medio ambiente de alta humedad antes de que sean sembrados en el campo. Se ha calculado que de una planta madura con 500 hojas sanas se pueden producir 4 millones de plantas; a medida que la planta recién propagada crece y produce hojas adicionales con yemas, se tiene disponible nuevo material para la propagación.

Igualmente, ciertas coníferas especialmente árboles de los géneros *Pinus*, *Picea*, *Tsuga*, *Pseudotsuga*, *Thuja*, *Juniperus*, *Sequoia* y *Araucaria* pueden manipularse exitosamente con una combinación de estrategias convencionales y de cultivo aséptico. Una de las estrategias comprende el tratamiento repetitivo del árbol vivo con citocinina a niveles muy altos (del orden de 200 mg/litro); esto se hace durante periodos de crecimiento

óptimo para inducir yemas o brotes, generalmente de meristemas de yemas axilares latentes localizadas en la base de un conglomerado de agujas o en el ápice de los fascículos. Estos brotes inducidos son juveniles en su morfología y en algunos casos se asemejan sobremanera a plántulas germinadas. Los brotes se extraen y se cultivan nuevamente in vitro para producir yemas adicionales que a la vez se separan y enraizan en el medio de enraizamiento.

Todo esto señala que las estrategias se pueden derivar de un número de enfoques interconectados con hechos biológicos básicos pertinentes al espécimen(es) en cuestión. En efecto, los investigadores deberían estar alerta y buscar constantemente la aplicación de los procedimientos innovativos a su sistema, basados en el conocimiento especial que tienen de las plantas en cuestión.

Referencias

- Abeles, F. B. 1973. Ethylene in plant biology. Academic Press, Nueva York.
- Addicott, F. T. (ed.). 1983. Absciscic acid, Praeger Publishers, Nueva York.
- AFOCEL (Association Forêt-Cellulose). 1979. Micropropagation d'arbres forestiers. AFOCEL Etudes et Recherches no. 12.
- Alfermann, A. W. y Reinhard, E. (eds.). 1978. Production of natural compounds by cell culture methods: Proceedings of the International Symposium on Plant Cell Culture held at the University of Tubingen, 1977. Memorias. Tubingen, República Federal de Alemania.
- American Orchid Society Bulletin (eds.). 1960-1968. Meristem tissue culture: A selection of articles from the AOSB. American Orchid Society, Botanical Museum, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, E.U.
- Ammirato, P. V.; Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Yamada, Y. (eds.). 1984. Handbook of plant cell culture; 3: Crop species. MacMillan Publishing, Nueva York.
- Arditti, J. 1977. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture: A manual. En: Arditti, J. (ed.). Orchid biology; I: Reviews and perspectives. Cornell University Press, Nueva York. p. 203-293.
- . 1982. Orchid seed germination and seedling culture: A manual. En: Arditti, J. (ed.). Orchid biology; II: Reviews and perspectives. Cornell University Press, Nueva York. p. 242-370.

- y Straus, M. S. 1979. Taro tissue culture manual. South Pacific Commission information document no. 44. South Pacific Commission, Noumea, Nueva Caledonia.
- Barz, W.; Reinhard, W. y Zenk, M.H. (eds.). 1977. Plant tissue culture and its bio-technological applications: Proceedings of the First International Congress on Medicinal Plant Research held at the University of Munich, Alemania, 1976. Memorias, sección B. Springer-Verlag, Nueva York.
- Bhojwani, S. S. y Razdan, M. K. 1983. Plant tissue culture: Theory and practice. Elsevier Scientific, Amsterdam, Holanda.
- Bonga, J. M. y Durzan, D. J. (eds.). 1982. Tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff y W. Junk Publishers, La Haya, Holanda.
- Broertjes, C. y Van Harten, A. M. 1978. Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops: An interpretive literature review. Elsevier Scientific, Nueva York.
- Brown, C. L. y Sommer, H. E. 1975. An atlas of gymnosperms cultured in vitro: 1924-1974. Georgia Forest Research Council, Macon, Georgia, E. U.
- Browse, P. M. 1979. Plant propagation: Seeds, roots, bulbs and corms, layering, stem cuttings, leaf cuttings, budding and grafting. Mitchell Beazley Pub. (Simon and Schuster), Nueva York.
- Butcher, D. N. e Ingram, D. B. 1976. Plant tissue culture. University Park Press, Baltimore, Maryland, E.U.
- Butenko, R. G. 1968. Plant tissue culture and plant morphogenesis. (Traducido del ruso por Israel Program for Scientific Translation). Jerusalén.
- Conger, B. V. (ed.). 1981. Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.
- Constantin, M. J.; Henke, R. R.; Hughes, K. W. y Conger, B. V. (eds.). 1981. Propagation of higher plants through tissue culture: Emerging technologies and strategies. Proceedings of a symposium at the University of Tennessee, 1980. Memorias (publicación especial). Environ. Exp. Bot. 21(3-4):269-452.
- Cook, A. D. (ed.). 1984. Propagation for the home gardener. Plants and Gardens 40(1):1-76.
- Crozier, A. 1981. Aspects of metabolism and physiology of gibberellins. Advances in Bot. Res. 9:33-149.
- Chaleff, R. S. 1981. Genetics of higher plants: Applications of cell culture. Cambridge University Press, Nueva York.
- Chaturvedi, H. C. 1979. Tissue culture of economic plants. En: Khoshoo, T. N. y Nair, P. K. K. (eds.). Progress in plant research; 1: National Botanical Research Institute, Nueva Delhi, India. p. 265-288.

- DeFossard, R. A. 1976. Tissue culture for plant propagators. 2 ed. Department of Botany, University of New England, Armidale, Australia.
- Dodds, J. H. (ed.). 1983. Tissue culture of trees. AVI Publishing, Westport, Connecticut, E.U.
- y Roberts, L. H. 1982. Plant tissue culture. Cambridge University Press, Nueva York. 178 p.
- Doré, C. (ed.). 1980. Application de la culture in vitro a l'amélioration des plantes potagères: Réunion EUCARPIA Section Legumes, Versailles, 1980. Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, Institut National de Recherches Agronomiques (INRA), Versailles, Francia.
- Dudits, D.; Farkas, G. L. y Maliga, P. 1976. Cell genetics in higher plants: Proceedings of a UNDP/UNESCO/ICRO training course, 1976. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungria.
- Durbin, R. D. (ed.). 1979. *Nicotiana*: Procedures for experimental use. Technical bulletin 1586. U. S. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, E.U.
- Earle, E. D. y Demarly, Y. (eds.). 1983. Variability in plants regenerated from tissue culture. Praeger Publisher, Nueva York.
- Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). 1983. Handbook of plant cell culture; 1: Techniques and applications. MacMillan Publishing, Nueva York.
- Fiechter, A. (ed.). 1980. Advances in biochemical engineering. Springer-Verlag, Nueva York. v. 16, p. 1-143.
- Fitter, M. S. y Krikorian, A. D. 1983. Plant protoplasts: Some guidelines for their preparations and manipulation in culture. Calbiochem-Behring, American Hoechst, La Jolla, California, E.U.
- Gamborg, O. L. y Wetter, L. R. 1975. Plant tissue culture methods. National Research Council of Canada (NRC), Ottawa, Canadá.
- Garner, R. J.; Chaidru, S. A. et al. 1976. The propagation of tropical fruit trees. Horticultural review no. 4. FAO y Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, Inglaterra.
- Gautheret, R. J. 1959. La culture des tissus végétaux: Techniques et réalisations. Masson, París. 863 p.
- (ed.). 1977. La culture de tissus et des cellules des végétaux: Résultats généraux et réalisations pratiques. Masson, París.
- George, E. F. y Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics, Eversley, Basingstoke, Inglaterra. (Manual y directorio comercial.)

- Gleba, Y. Y. y Sytnik, K. M. 1984. Protoplast fusion; 8: Genetic engineering in higher plants. Monographs on theoretical and applied genetics. Springer-Verlag, Nueva York.
- Hartmann, H. T. y Kester, D. E. 1984. Plant propagation: Principles and practices. Englewood Cliffs, Nueva Jersey, E.U.
- Helgeson, J. P. y Deverall, B. J. (eds.). 1983. Use of tissue culture and protoplasts in plant pathology. Academic Press, Nueva York.
- Hewitt, E. J. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. 2 ed. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, Inglaterra.
- Hughes, K.; Henke, R. y Constantin, M. 1978. Propagation of higher plants through tissue cultures. Technical Information Center, U.S. Department of Energy, Washington, D.C.
- Hussey, G. 1978. The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. *Science Progress (Oxford)* 65:185-208.
- . 1981. Propagation of some members of the *Liliaceae*, *Iridaceae* and *Amaryllidaceae* by tissue culture. En: Brickell, C. D.; Cutler, D. F. y Gregory, M. (eds.). *Petaloid monocotyledons*. Linnean Society Symposium Series, 8th, Academic Press, Londres. p. 33-42.
- 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.
- Ingram, D. S. y Helgeson, J. P. 1980. Tissue culture methods for plant pathologists. Blackwell Scientific, Oxford, Inglaterra. v. 1.
- y ———. 1981. Tissue culture methods for plant pathologists organized by the British Plant Pathologists. John Wiley, Nueva York. v. 2.
- Institute of Genetics of the Academia Sinica at Beijing e IRRI (International Rice Research Institute), 1983. Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. *Memorias*. Science Press, Beijing, República Popular de China e IRRI, Manila, Filipinas.
- IRRI (International Rice Research Institute). 1982. Rice tissue culture planning conference. Los Baños, Filipinas.
- Islam, A. S. (ed.). 1981. Proceedings of the International Workshop on Improvement of Tropical Crops through Tissue Culture, Dacca University, 1981. Asiatic Press, Dacca, Bangladesh. 137 p.
- Jacobs, W. P. 1979. Plant hormones and plant development. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.

- Johri, B. M. (ed.). 1982. Experimental embryology of vascular plants. Springer-Verlag, Nueva York.
- Krikorian, A. D. 1982. Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. *Biol. Rev.* 57:151-218.
- Letham, D. S.; Goodwin, P. B. y Higgins, T. J. V. (eds.). 1978. Phytohormones and related compounds: A comprehensive treatise; 2: Phytohormones and the development of higher plants. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Nueva York.
- Litz, R. E.; Moore, G. A. y Srinivasan, C. (1985). In vitro systems for propagation and improvement of tropical fruit and nut crops. *Horticultural Reviews*. (En impresión.)
- MacMillan, J. 1984. Hormonal regulation of development; 1: Molecular aspects of plant hormones. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*, new series. Springer-Verlag, Nueva York. v. 9.
- Mantell, S. H. y Haque, S. Q. 1979. Disease-free yams: Their production, maintenance and performance. Yam Virus Project bulletin no. 2. Caribbean Agricultural Research and Development Institute (CARDI), University Campus, St. Augustine, Trinidad.
- ; ——— y Whitehall, A. P. 1979. A rapid propagation system for yams. Yam Virus Project bulletin no.1. Caribbean Agricultural Research and Development Institute (CARDI), University Campus, St. Augustine, Trinidad.
- y Smith, H. (eds.). 1983. *Plant biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Morel, G. M. 1974. Clonal multiplication of orchids. En: Withner, C. L. (ed.). *The orchids: Scientific studies*. Wiley, Nueva York. p. 169-222.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.
- . 1977a. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of the Academia Sinica* 18:1-24.
- . 1977b. Clonal crops through tissue culture. En: Barz, W.; Reinhard, E. y Zenk, M. H. (eds.). *Tissue culture and its biotechnological application*. Nueva York. p. 392-403.
- Nickell, L. G. 1982. *Plant growth regulators: Agricultural uses*. Springer-Verlag, Nueva York.
- (ed.). 1983. *Plant growth regulating chemicals*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.
- Nitzsche, W. y Wenzel, G. 1977. Haploids in plant breeding. *Fortschritte der Pflanzenzuchtung (Advances in Plant Breeding) Supplement* 8:1-101.

- Pateña, L. F. y Barba, R. C. 1979. Rapid propagation of cassava by leaf-bud cuttings. *Phil. Jour. Crop Sci.* 4(2-3):53-62.
- Pierik, R. L. M. 1979. *In vitro* culture of higher plants: Bibliography. Knipphorst Scientific Bookshop, Wageningen, Holanda.
- Pilet, P. E. (ed.). 1977. *Plant growth regulation: Proceedings of the 9th International Conference on Plant Growth Substances, Lausanne, 1976.* Springer-Verlag, Nueva York.
- Plant Growth Regulator Working Group. 1977. *Plant growth regulator handbook.* Great Western Sugar, Agricultural Research Center, Longmont, Colorado, E.U.
- Potrykus, I.; Harms, C. T.; Hinnen, A.; Hutter, R.; King, P. J. y Shillito, R.D. (eds.). 1983. *Protoplasts 1983: Proceedings of the Sixth International Protoplast Symposium, Basel, 1983.* Experimentis Supplementum Birkhauser Verlag, Basilea, Suiza. v. 46.
- Proceedings of Sino-Australian Plant Tissue Culture Symposium.* 1978. Science Press, Pekín, China.
- Raghavan, V. 1966. Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. *Biol. Rev.* 41:1-58.
- . 1976. *Experimental embryogenesis in vascular plants.* Academic Press, Londres.
- Ramakrishnan, C. V. (ed.). 1965. *Tissue culture: Proceedings of the seminar held in Baroda, India, 1965.* W. Junk Publishers, La Haya, Holanda.
- Rao, A. N. (ed.). 1982. *Tissue culture of economically important plants: Proceedings of an international symposium held at the National University of Singapore, 1981.* Committee on Science and Technology in Developing Countries (COSTED) y Asian Network for Biological Sciences (ANBS), Singapur, Singapur.
- ; Heble, M. R. y Chadha, M. S. (eds.). 1980. *Plant tissue culture, genetic manipulation and somatic hybridization of plant cells: Proceedings of a national symposium held at Bhabha Atomic Research Centre, 1980.* Bombay, India.
- Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). 1977. *Plant cell, tissue, and organ culture: Applied and fundamental aspects.* Springer-Verlag, Nueva York.
- y Yeoman, M. M. 1982. *Plant cell and tissue culture: A laboratory manual.* Springer-Verlag, Nueva York. 83 p.
- Roca, W. M. 1980. *El cultivo de meristemas de yuca: Guía de estudio.* Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

- . 1982. El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca: Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
- Sala, F.; Parisi, B.; Cella, R. y Ciferri, O. (eds.). Plant cell cultures: Results and perspectives. Proceedings of an international workshop held in Pavia, Italia, 1979. Elsevier, Nueva York.
- Scott, T. K. 1984. Hormonal regulation of development; 2: The function of hormones from the level of the cell to the whole plant. En: Encyclopedia of Plant Physiology, new series. Springer-Verlag, Nueva York. v. 10.
- Sen, S. K. y Giles, K. (eds.). 1983. Plant cell culture in crop improvement. Plenum Press, Nueva York.
- Sharp, W. R.; Larsen, P. O.; Paddock, E. F. y Raghavan, V. (eds.). 1979. Plant cell and tissue culture: Principles and applications. Ohio State University Press, Columbus, E.U.
- ; Evans, D. A.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). 1984. Handbook of plant cell culture; 2: Crop species. MacMillan Publishing, Nueva York.
- ; ———; Flick, E. C. y Sommer, H. E. 1983. Strategies and specifications for management of in vitro plant propagation. En: Meudt, W. J. (ed.). Strategies of plant reproduction: Proceedings of the Sixth Beltsville Symposium in Agricultural Research. Allanhead-Osman Publishers, Londres.
- Skoog, F. (ed.). 1980. Plant growth substances 1979: Proceedings of the 10th International Conference on Plant Growth Substances, Madison, Wisconsin, 1979. Springer-Verlag, Nueva York.
- Smith, R. 1982. In vitro propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. Avery Publishing Group, Wayne, New Jersey.
- Staba, E. J. (ed.). 1980. Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.
- Steward, F. C. (ed.). 1969. Plant physiology: A treatise; 5-B: Analysis of growth: The responses of cells and tissues in culture. Academic Press, Nueva York.
- y Krikorian, A. D. 1971. Plants, chemicals and growth. Academic Press, Nueva York.
- Street, H. E. (ed.). 1977. Plant tissue and cell culture. 2 ed. University of California Press, Los Angeles, E.U.
- y Butcher, D. N. 1964. Excised root culture. Bot. Rev. 30:513-586.
- Styer, D. J. y Chin, C. K. 1983. Meristem and shoot tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm preservation. Horticultural Reviews 5:221-277.

- Thimann, K. V. 1977. Hormone action in the whole life of plants. The University of Massachusetts Press, Amherst, Mass, E.U.
- (ed.). 1980. Senescence in plants. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.
- Thomas, E. y Davey, M. R. 1975. From single cells to plants. Wykeham Publications, Londres. 171 p.
- Thorpe, T. A. (ed.). 1978. Frontiers of plant tissue culture: Proceedings of the 4th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture held at the University of Calgary, Canadá, 1978. University of Calgary, Calgary, Alberta, Canadá.
- (ed.). 1981. Plant tissue culture methods and applications in agriculture: Proceedings of a symposium based on the UNESCO training course on plant tissue culture, São Paulo, Brasil, 1978. Academic Press, Nueva York.
- Tomes, D. T.; Ellis, B. E.; Harney, R. M.; Kasha, K. J. y Peterson, R. L. (eds.). 1982. Application of plant cell and tissue culture to agriculture and industry. University of Guelph, Guelph, Canadá.
- Vasil, I. K. (ed.). 1980. Perspectives in plant cell and tissue culture. Supplement 11A and 11B to International Review of Cytology. Academic Press, Nueva York.
- (ed.). 1984. Cell culture and somatic cell genetics of plants; 1: Laboratory procedures and applications. Academic Press, Nueva York.
- (ed.). 1985. Cell culture and somatic cell genetics of plants; 2: Growth, nutrition and preservation. Academic Press, Nueva York.
- (ed.). 1986. Cell culture and somatic cell genetics; 3: Plant regeneration and genetic variability. Academic Press, Nueva York.
- ; Scowcroft, W. R. y Frey, K. J. (eds.). 1982. Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press, Nueva York.
- Wareing, P. F. (ed.). 1982. Plant growth substances 1982: Proceedings of the 11th International Conference on Plant Growth Substances, Aberystwyth, Wales, 1982. Academic Press, Nueva York.
- Wetherell, D. F. 1982. Introduction to *in vitro* propagation. Avery Publishing Group, Terrace, Wayne, Nueva Jersey, E.U.
- Wetter, R. y Constabel, F. (eds.). 1982. Plant tissue culture methods. 2 ed. rev. National Research Council of Canada (NRC), Saskatoon, Canadá. 145 p.
- White, P. R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. 2 ed. Ronald Press, Nueva York.
- y Grove, A. R. (ed.). 1965. Proceedings of an international conference on plant tissue culture. McCutchan Publishing, Berkeley, California.

- Wilt, F. H. y Wessels, N. K. (eds.). 1976. *Methods in developmental biology*. Thomas Y. Crowell, Nueva York.
- Withers, L. A. y Williams, J. T. (eds.). 1982. *Crop genetic resources: The conservation of difficult material*. IUBS/IBPGR Joint Publication. Nottingham University School of Agriculture, Sutton Bonington, Leicestershire, Inglaterra.
- Yang, H. Y. y Zhou, C. 1982. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. *Theor. Appl. Genet.* 63:97-104.
- Yeoman, M. M. y Truman, D. E. S. 1982. *Differentiation in vitro*. British Society for Cell Biology Symposium. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.
- Zimmerman, R. H. (ed.). 1980. *Nursery production of fruit plants through tissue culture applications and feasibility: Proceedings of a conference held at Beltsville, E.U.* 1980. Department of Agriculture, Science and Education Administration. Beltsville, Maryland, E.U.