

SELECCIÓN DE CALLOS ORGANOGÉNICOS TOLERANTES A BAJA TEMPERATURA Y REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *Melia azedarach* L.

SELECTING LOW TEMPERATURE-TOLERANT ORGANOGENIC CALLI AND PLANT REGENERATION OF *Melia azedarach* L.

Sandra Sharry^{1*} y Walter Abedini¹

¹Centro Experimental de Propagación Vegetativa (C.E. Pro.Ve). CIC PBA. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. C.C. 31, La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina. Tel.: (54) 221423-6616. E-mail: ceprove@ceres.agro.unlp.edu.ar

* Autor responsable.

RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló durante los años 1992-1994 en el Centro Experimental de Propagación Vegetativa, ciudad de La Plata, Argentina. El objetivo del trabajo fue obtener plantas de *Melia azedarach* L. tolerantes a baja temperatura mediante la selección *in vitro* de callos organogénicos. Esta especie tiene importancia en la industria forestal y como fuente de metabolitos secundarios con propiedades insecticidas y medicinales. Su sensibilidad a heladas tardías, originada en su bajo umbral térmico de brotación, obstaculiza la extensión de su cultivo. Se utilizó la metodología general de cultivo de tejidos *in vitro* aplicando presión de selección a estrés abiótico sobre callos. Se ajustó un protocolo eficiente de regeneración de plantas vía organogénesis indirecta. Se obtuvo una sobrevivencia de 45 % de los callos sometidos a baja temperatura, con una tasa de regeneración de 1 a 5 brotes cada 250 mg de callo. Las plantas completas presentaron 85 % de sobrevivencia en condiciones de invernadero. El ácido giberélico demostró tener gran influencia en la formación de meristemoides en callos de esta especie. En conclusión, la selección de plantas tolerantes a baja temperatura a través del cultivo de tejidos *in vitro* se presenta como alternativa promisoría para complementar programas de mejoramiento de especies forestales.

Palabras clave adicionales: *Melia azedarach* L., selección *in vitro*, micropropagación, organogénesis indirecta, estrés abiótico, ácido giberélico

SUMMARY

This work was developed from 1992 to 1994 at the Vegetative Propagation Experimental Centre, La Plata City, Argentina. Our aim was to get *Melia azedarach* plants tolerant to low temperatures through the *in vitro* selection of organogenic calli. This species is important in forest industry and as a source of secondary metabolites with insecticide and medicinal properties. Its sensitivity to late frosts, originated in its low thermal threshold for shooting, makes difficult its extensive culture. The general tissue culture *in vitro* methodology was used applying selection pressure to abiotic stress from organogenic calli. An efficient method to obtain whole plants through indirect organogenesis was developed. About 45 % of calli under low temperature survived with a regeneration rate of 1 to 5 shoots every 250 mg of callus. The whole plants presented an 85 % survival under greenhouse conditions. Gibberellic acid has proved to have great influence in meristemoid formation in calli of this tree. In conclusion, the selection of plants tolerant to low temperature through the *in vitro* tissue culture is a promising alternative to complement improvement programs in forest species.

Additional index words: *Melia azedarach* L., *in vitro* selection, micropropagation, indirect organogenesis, abiotic stress, gibberellic acid.

INTRODUCCIÓN

La temperatura es uno de los principales factores ambientales que limitan la distribución de las plantas y su productividad. Cada especie tiene un rango de temperatura óptimo que generalmente es estrecho. Las plantas tropicales y subtropicales exhiben una marcada disfunción fisiológica cuando son expuestas a bajas temperaturas de alrededor de 10 a 12 °C. Esta disfunción se denomina daño por heladas, y es una limitante para el cultivo de ciertas especies de importancia fuera de regiones tropicales o subtropicales. Teóricamente la supervivencia de las plantas a bajas temperaturas puede ser incrementada modificando tanto las condiciones del ambiente donde crece, como modificando al propio individuo. La primera opción es muy costosa y generalmente imposible, principalmente en especies forestales. La modificación genética de plantas para que se adapten a ambientes desfavorables es más factible y menos costosa.

La habilidad de las plantas para crecer con estrés provocado por baja temperatura es un carácter cualitativo complejo. Esto ha limitado el progreso en el desarrollo de cultivos tolerantes a frío y congelamiento por métodos convencionales de mejoramiento. El cultivo de tejidos *in vitro* ha sido reconocido como herramienta útil para la obtención de plantas que se adapten mejor a condiciones desfavorables o de estrés (Blando y Caboni, 1995). Las técnicas de selección *in vitro* por medio de agentes selectivos adecuados (medios de presión de selección), permiten el crecimiento preferencial de variantes y facilitan la selección de un gran número de células en menor tiempo y espacio. Así mismo, se puede simular *in vitro* un ambiente desfavorable y cultivar células en tales condiciones. Las que muestren crecimiento, pueden tener características de tolerancia a tal adversidad. De estas células se

pueden regenerar plantas completas y estudiar su comportamiento en el ambiente que inicialmente se había simulado (Villalobos, 1989).

Con relación a la selección de variantes, ésta puede ser de dos tipos, negativa o positiva (Perez Molphe et al., 1999). En la selección positiva se busca aplicar una presión de selección que permita la sobrevivencia únicamente de las variantes deseadas. Muchos de los trabajos de aislamiento de variantes realizados hasta ahora son resultado de la aplicación de esta metodología (Maliga, 1980). La selección puede realizarse en cultivo de células o en cultivo de callos. En este último caso, la presión de selección se impone sobre piezas de tejido poco diferenciado (Gengenbach et al., 1975). Esta metodología se ha aplicado en los últimos años para complementar el mejoramiento tradicional, obteniéndose buenos resultados en algunas especies (Blando y Caboni, 1995).

Melia azedarach L. (Fam. Meliaceae) es un árbol subtropical multipropósito originario de Asia, resistente al ataque de hormigas. Posee diferentes principios activos, como limonoides, considerados de interés por su actividad insecticida (Nakatani et al., 1994). Además es utilizado en medicina popular, principalmente como antihelmíntico (Youngken, 1951). Está muy difundida en el mundo y se utiliza tanto en sistemas agro-silvo-pastoriles como en plantaciones forestales y en el arbolado de calles y parques de los centros urbanos. Esta especie ha adquirido importancia forestal, pero su sensibilidad a heladas tardías, originada en su bajo umbral térmico de brotación, obstaculiza la extensión de su cultivo (Abedini et al., 1991). Para resolver este problema, se planteó como objetivo obtener plantas de *Melia azedarach* L. tolerantes a bajas temperaturas mediante la selección in vitro de callos organogénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Acondicionamiento de los explantos

Se utilizaron como fuente de explantes semillas provenientes de árboles de 10 a 12 años de edad que crecen en el Arboretum de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de La Plata, situado a 34° 55' LS, 57° 57' LW y 15 m.s.n.m. Las mismas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio comercial 20 % (8 g de cloro activo por litro de agua) durante 1 hora con agitación. Se enjuagaron con agua destilada estéril y se hicieron germinar en vermiculita en condiciones ambientales controladas (22 °C y 16 horas luz). Las plántulas de aproximadamente 15 días, con 4 a 10 cm de altura, fueron desprovistas de la radícula y los cotiledones, y se seccionaron en segmentos

de 1 cm. Estos explantes (epi e hipocótilo) fueron desinfectados con fungicida (Kptan, 1500 mg/L) durante 30 minutos, hipoclorito de sodio 20 % con gotas de Tween 20 durante 10 minutos; finalmente se lavaron con solución de antibiótico Cloranfenicol (1 g cada 50 mL de agua destilada estéril).

Ensayos preliminares para la optimización de un protocolo de inducción de callos organogénicos

Los explantes se colocaron en diferentes medios de cultivo para inducir la formación de callo. Se probaron los medios basales de Greeshoff y Doy (1972) (GD); Murashige y Skoog (1962) (MS); Quoirin y Lepoivre (1977) (QL), y de Fossard (1977). Estos medios se suplementaron con diferentes complejos vitamínicos: Jacquiot (1959), de Fossard (1977), GD (1972) y MS (1962). Se utilizaron distintos reguladores de crecimiento (PGR) solos o en varias combinaciones: ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (IBA), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), bencilaminopurina (BAP), cinetina (Kin), y ácido giberélico (AG₃), en concentraciones de 0.01 mg/L a 10 mg/L. Como fuente de carbono se utilizó sacarosa (SIGMA), 5 a 40 g/L y como agente gelificante Difco Bacto Agar (6 a 8 g/L) o Gelrite (3.5 g/L). El pH de los medios fue ajustado a 6 y se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión. Se colocaron en frascos Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo cada uno. Las condiciones ambientales de cultivo fueron de 21 °C \pm 2 °C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y una irradiancia de 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los experimentos se realizaron con un diseño completamente al azar con cinco repeticiones; se tomó como unidad experimental a cada frasco Erlenmeyer con cuatro explantos homogéneos. En cada tratamiento se fue variando un sólo factor. Primero se probaron los macro y micronutrientes; luego la concentración de sacarosa; en el paso siguiente los reguladores de crecimiento, y por último las vitaminas (Cuadro 1). La eficiencia de cada tratamiento se evaluó mediante la medición del incremento de peso fresco de callos, necrosis y neoformación de estructuras (brotes y raíces).

Selección con baja temperatura

Callos organogénicos obtenidos en el medio para inducción (MIC) (Cuadro 2) fueron colocados a 4 °C y a 21 °C (testigo) en condiciones de oscuridad durante 30 días. Se utilizaron 50 callos para cada tratamiento, cuatro por frasco Erlenmeyer. Los callos no necrosados o con regiones en activo crecimiento fueron transferidos de a uno, a un medio de proliferación de brotes, MPB (Cuadro 2), en las mismas condiciones ambientales utilizadas

para la inducción de callos. Se cuantificaron la cantidad de brotes originados en cada callo por tratamiento y se realizaron observaciones macro y microscópicas.

Obtención de plantas completas

Los brotes obtenidos luego del tratamiento con frío y del tratamiento testigo, fueron colocados en medios de enraizamiento (Cuadros 1 y 2). Las plantas se traspasaron a frascos con vermiculita estéril cubiertas con polietileno y se regaron con fungicida (Benlate 1500 mg/L). Se colocaron en condiciones de cultivo controladas (21°C y 16 horas luz). A los 30 días fueron desprovistas de la cubierta de polietileno y se llevaron a invernadero con riego por neblina.

Procedimiento para el análisis de callos

Se realizaron análisis macroscópicos de los callos, considerando los siguientes aspectos: friabilidad, compactación, estructuras diferenciadas (raíces, hojas, brotes), color, tamaño, crecimiento y tipos celulares. Se realizaron cortes con micrótopo a mano alzada en diferentes zonas del mismo callo (superficie y centro) y disgregados en agua (squash).

Se tiñieron con safranina y lugol, para ser observados en lupa estereoscópica (Gemalux) y microscopio óptico (Iroscope Mod. Mx-T). Se tomaron fotografías con una cámara Seagull DF-300x.

RESULTADOS

Ensayos preliminares

Los ensayos preliminares demostraron que el mejor medio de cultivo para la inducción de callos en esta especie es el GD adicionado con vitaminas de Jacquiot (datos no presentados). Varios de los medios ensayados originan callos con distinto aspecto y color, dependiendo fundamentalmente del tipo y concentración de reguladores de crecimiento (PGR) utilizados. Se observó que en medios suplementados con 3 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP se forman callos de color blanco y vítreos (Figura 1); éstos son muy disgregables y están compuestos por células alargadas, transparentes, dispuestas en forma ordenada, sin diferenciación tisular (Figura 2). En medios con baja concentración de reguladores de crecimiento (rangos de 0.01 a 0.1 mg/L) aparecen callos compactos de color marrón, con crecimiento limitado, formados por células pequeñas, isodiamétricas y con contenido oscuro. En el medio de cultivo MIC (Cuadro 2) que contiene AG₃ se originaron callos organogénicos (Figura 3). En este mismo medio de cultivo, pero sin la adición de AG₃, los callos formados no tienen capacidad organogénica. Estos callos fueron de color amarillo-verdoso con aspecto globular, activo crecimiento y fáciles de seccionar. Pueden alcanzar gran tamaño y al microscopio se observan distintos tipos celulares: células grandes con gran cantidad de granos de almidón, células alargadas y divididas, y células muy pequeñas con citoplasma denso, que se organizan en meristemoides donde comienza la diferenciación de tejido de conducción.

Cuadro 1. Ensayos preliminares: componentes agregados en los diferentes medios de cultivo.

Componentes	Medio de cultivo Inducción de callos	Proliferación de brotes	Respuesta buscada Rizogénesis
Medio basal (macro y micronutrientes)	GD y MS	GD, QL, MS, de Fossard	MS/2 y GD
Fuente de carbono	Sacarosa (10 a 30 g/L)	Sacarosa (5 a 20 g/L)	Sacarosa (20 g/L)
Gelificante	Agar (8 g/L) Gelrite (3.5 g/L)	Agar (7 g/L)	Agar (7 g/L)
Reguladores de crecimiento	ANA (0.001 a 6 mg/L) 2,4-D (1 a 2 mg/L) BAP (0.01 a 2 mg/L) AG ₃ (3 a 5 mg/L)	Kin (2 a 5 mg/L) BAP (0.01 a 5 mg/L)	IBA (0.5 a 2 mg/L)
Vitaminas	GD, QL y Jacquiot	Jacquiot, de Fossard, GD, MS y QL	Jacquiot

SELECCIÓN DE CALLOS ORGANOGÉNICOS TOLERANTES A FRÍO



Figura 1. Callo no organogénico formado en un medio de cultivo con 3 mg/L de ANA y 1 mg/L de BAP.



Figura 2. Detalle microscópico de callo no organogénico.



Figura 3. Callo organogénico originado en un medio de cultivo con 3 mg/L de ANA, 1 mg/L de BAP y 5 mg/L de AGI.

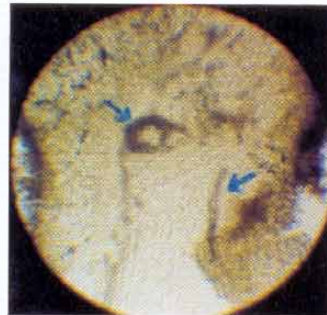


Figura 4. Detalle microscópico de callo organogénico. Formación de meristemoide.



Figura 5. Brotes originados en callos cultivados a 21 °C.

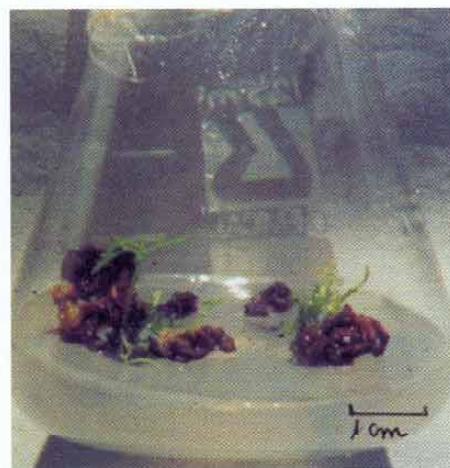


Figura 6. Brotes originados en callos cultivados 4 °C.

Inducción de callos organogénicos y proliferación de brotes

Los medios de cultivo óptimos para la inducción de callos organogénicos (MIC) y para la formación de brotes (MPB) se muestran en el Cuadro 2. El mayor número de brotes por callo se obtuvo con 4 mg/L de Kin (un promedio de 20 brotes cada 250 mg de callo) en el término de 30 días. Los brotes originados son normales, y elongan en el mismo medio de cultivo. El agregado de AG_3 en este medio provoca la necrosis de las estructuras formadas. El uso de BAP en lugar de Kin da origen a brotes anormales y vitrificados.

Tratamiento con frío

La sobrevivencia de los callos a 4 °C fue de 45 %. La baja temperatura induce necrosis celular en determinadas regiones de los callos organogénicos que sobrevivieron. Las porciones de callo que conservan activo crecimiento celular, originaron brotes cuando se subcultivan a MPB en condiciones ambientales controladas (21 °C, 16 h luz).

La cantidad de brotes originada por callo tratado con frío (1 a 5 brotes por 250 mg de callo, en promedio) fue menor (Figura 6) en comparación con los originados bajo condiciones normales de temperatura (Figura 5). Esto concuerda con las observaciones microscópicas, ya que en los callos sometidos a frío se observó una menor cantidad de meristemoides (Figura 4) que en los callos del tratamiento testigo (Figura 6).

Enraizamiento y aclimatación de las plantas completas

El medio de enraizamiento óptimo para esta especie se muestra en el Cuadro 2. La neoformación de raíces se produce a partir del callo (Figura 7) o cuando los brotes son separados del mismo, observándose nueva formación de callo en la base. Las raíces son normales, con proliferación de pelos radiculares. El tiempo total para obtener plantas completas vía organogénesis indirecta se muestra en el Diagrama 1. Se obtuvo 85% de sobrevivencia de las plantas transferidas a invernadero (Figura 8). El comportamiento en campo de las mismas está siendo evaluado.

Cuadro 2. Medios de cultivo óptimos para inducir organogénesis indirecta somática indirecta en *Melia azedarach* L.

Denominación	Medio basal*	Reguladores de crecimiento	Agar (g/L)	Sacarosa (g/L)
Inducción de callos	GD	ANA 3mg/L	6.5	30
MIC		BAP 1 mg/L		
Proliferación de brotes	GD	AG_3 5 mg/L		
MPB		Kin 4 mg/L	7	10
Enraizamiento	MS/2	IBA 2 mg/L	7	20
MR				
Mantenimiento de callos	GD	Sin	7	30
MM				

* Todos los medios fueron adicionados con vitaminas de Jacquiot (1959)

Diagrama 1. Diagrama de flujo para la obtención de plantas de *Melia azedarach* por organogénesis indirecta. Se indica el momento en que se aplicó el estrés abiótico para obtener resistencia a baja temperatura.

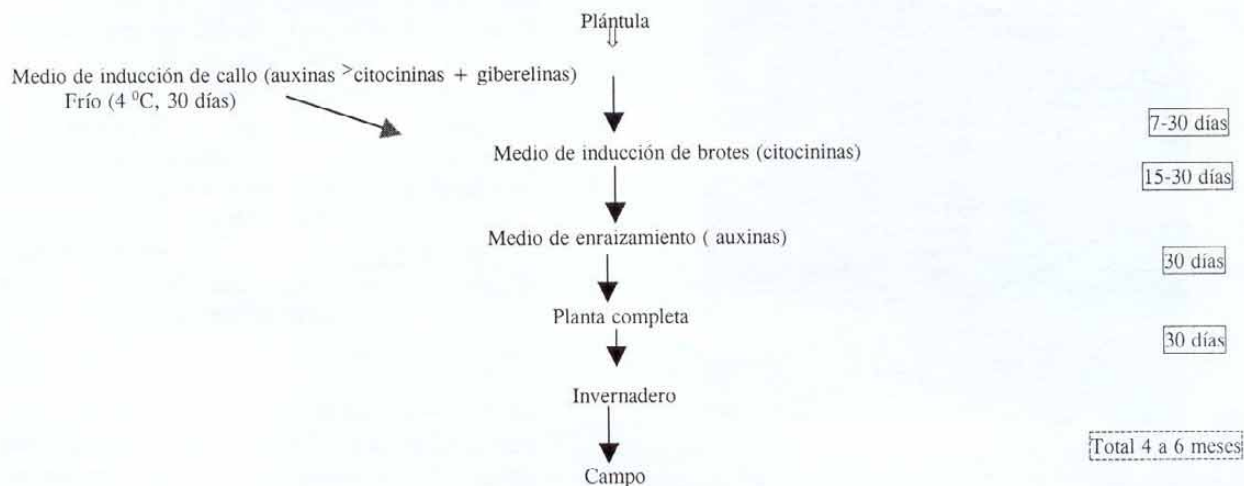




Figura 7. Planta completa de melia azedarach originada en callos sometidos a baja temperatura.

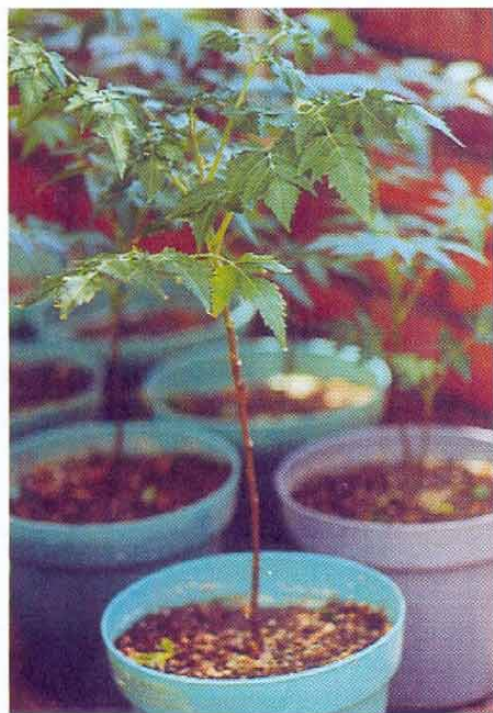


Figura 8. Plantas de Melia azedarach originadas en callos sometidos a bajas temperaturas en proceso de rusticación en invernadero

DISCUSIÓN

Se ajustó un protocolo eficiente de multiplicación de *Melia azedarach* L. mediante organogénesis indirecta. El trabajo realizado con callos de esta especie para tolerancia a baja temperatura a nivel celular ha permitido regenerar plantas con un grado de sobrevivencia alto. Es importante destacar que el fenotipo de los callos obtenidos en los diferentes medios de cultivo es un indicador de la capacidad organogénica de los mismos. Callos vítreos y muy friables no tienen capacidad organogénica; los callos organogénicos son de color marrón-verdoso y compactos en su interior, con un gran número de meristemoides.

Los diferentes reguladores de crecimiento tienen marcado efecto sobre el cultivo de tejidos. El rol de las citoquininas en el proceso de vitrificación ha sido ya mencionado por Debergh (1984). Leshem et al. (1988) sugieren que la vitrificación es una reacción de los brotes a un exceso de citoquininas. En este trabajo la concentración no fue el factor determinante, sino el tipo de citoquinina. El ácido giberélico juega un papel importante en la formación de meristemas de esta especie, ya que en los medios de cultivo sin este regulador del crecimiento se originan callos sin capacidad organogénica. La elongación de estos brotes en MPB se produce sin el agregado de AG_3 , posiblemente por el balance endógeno de este regulador de crecimiento adicionado en el medio de inducción.

Las giberelinas inhiben la diferenciación de brotes en tabaco (Murashige, 1961, 1964; Thorpe and Murashige, 1970), Plumbago (Nitsch and Nitsch, 1967), Begonia (Heide, 1969) y arroz (Maeda, 1978). En tabaco, la exposición de callos en diferenciación a AG_3 en oscuridad por un período corto de 30-60 minutos, reduce la diferenciación de yemas (Thorpe y Meier, 1973) y luego de 48 h de tratamiento con AG_3 no aparecen meristemoides ni brotes (Thorpe y Meier, 1973, 1975). Las giberelinas parecen ser más efectivas en el estado de formación de meristemoides. Una vez que los primordios de brotes se han formado, el AG_3 no inhibe su posterior desarrollo en tabaco. Una inhibición completa por AG_3 ocurre solamente en la oscuridad (Thorpe y Meier, 1973). Thorpe (1978) sugiere que la inhibición por giberelinas exógenas se debe probablemente a que los tejidos sintetizan estas hormonas en cantidades óptimas para el proceso de organogénesis. De acuerdo con esta teoría, en *Chrysanthemum* (Earle y Langhans, 1974) y *Arabidopsis* (Negrutiu et al., 1978), donde la adición de giberelinas promueve la brotación, el nivel endógeno de esta hormona debe ser subóptimo. En correspondencia con esto, es probable que en

Melia el AG₃ se encuentre en niveles subóptimos y por ello induce la formación de brotes.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la baja temperatura provocó necrosis de callos completos o alguna de sus partes. Según Ogolevets (1976), aparentemente la edad del tejido afecta su sensibilidad a las bajas temperaturas. Es así como los tejidos jóvenes son más resistentes, no sólo debido a la acumulación de sustancias protectoras sino también como resultado de un estado especial del citoplasma. En este trabajo se utilizaron tejidos juveniles como explante. Por otro lado, es evidente que la necrosis se debe a daños provocados por la baja temperatura. Se ha reportado que la disfunción de la membrana celular a bajas temperaturas está relacionada con los daños por heladas en plantas de tomate (DuPont F., 1985). Breidenbach y Waring (1977) reportaron que las células de tomate mantenidas por debajo de 10 °C durante 6 días se tornan marrones y mueren, y este amarronamiento y mortandad aumenta en la medida que la temperatura baja. Esto mismo ocurre con los callos organogénicos de Melia. Es posible también que algunas lesiones aparecidas cuando la temperatura es muy baja se produzcan por la activación de una o más enzimas (Langridge, 1962).

Es importante remarcar que el pasaje por el estadio de callo es necesario para que se produzca un proceso de desdiferenciación en el tejido de los explantes utilizados. Esto posibilita la producción de variantes en las células (Evans, 1989). Las células dentro de una pieza de callo no están uniformemente expuestas al agente de selección pues no todas están en contacto con el medio de cultivo o el medio ambiente, además están en contacto directo unas con otras, lo que permitiría un intercambio de sustancias y promovería el escape del agente de selección. Además, las células de fenotipo deseado que puedan existir en el callo pueden no ser fácilmente detectadas si están físicamente rodeadas por células sin crecimiento. Entonces, no sólo existen células menos probables de ser detectadas con la selección de callos, sino que los sectores que sobreviven están probablemente constituidos por una mezcla de poblaciones celulares que incluyen mucho más que un simple escape de la presión de selección. Por ello no es posible afirmar que se han producido variantes en los callos seleccionados.

El cultivo de callos hace posible cambiar las condiciones ambientales y regular el crecimiento con el objeto de obtener diferenciación. Esto daría solamente una idea de la resistencia a baja temperatura de las estructuras originadas.

Los resultados de este trabajo indican que es posible efectuar una selección in vitro para tolerancia a frío en Melia azedarach, utilizando la variabilidad producida en el cultivo de callos y la consiguiente regeneración de plantas. Los datos obtenidos representan una primera aproximación sobre la posibilidad de obtener plantas resistentes a bajas temperaturas. Son necesarias pruebas ulteriores para confirmar estos datos. La selección in vitro puede ser una alternativa de integración al mejoramiento genético clásico para esta especie. En todos los casos, variantes putativas identificadas en el cultivo in vitro necesitan de otras pruebas a nivel de planta regenerada y, además, es necesario un trabajo más extenso para identificar las bases genéticas del proceso de variación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abedini, W., G. Ciocchini, y R. Marlats. 1991. Resultados de la clonación de Melia azedarach y Melia toosendam resistentes a frío. Rev. Inv. Agr. Serie Sistemas y Recursos Forestales Vol. 0 (12): 193-149.
- Blando, F. and E. Caboni. 1995. Selezione in vitro di Actinidia per tolleranza a NaCl. Italus Hortus Vol. 2 (5-6): 32-36.
- Breidenbach, R. and A. Waring. 1977. Response to chilling of tomato seedlings and cells suspension cultures. Plant Physiol. 60: 190-192.
- Deberg, P. C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiol. Plant. 59: 270-276.
- De Fossard. 1977. Colloque Int. Sur la Culture in vitro des Essences Forestieres. Fontainbleu, France. AFOCEL. pp: 135-142.
- DuPont, F. and B. Mudd. 1985. Acclimation to low temperature by microsomal membranes from tomato cell cultures. Plant Physiol. 77: 74-78.
- Earle, E. and R. Langhans. 1974. Propagation of Chrysanthemum in vitro. II. Production, growth and flowering of plantlets from tissue culture. J. Am. Soc. Hort. Sci. 99: 352-358.
- Evans, D. 1989. Somaclonal variation: genetic basis and breeding applications. Trends Genet. 5 (2): 46-50.
- Gengenbach, B. and C. Green. 1975. Selection of T -cytoplasm maize callus cultures resistant to Helminthosporium maydis Race T pathotoxin. Crop Science 15: 645-649.
- Gresshoff, P. and T. Doy. 1975. Differentiation of plantlets in long-leaf pine (Pinus palustris) tissue cultured in vitro. Bot. Gaz. 136 (2): 196-200.
- Hartman, H. and D. Kester. 1998. Técnicas de micropropagación in vitro. In: Propagación de plantas: Principios y Prácticas. Cía. Ed. Continental, México. pp: 578-583.
- Heide, O. 1969. Non-reversibility of gibberellin-induced inhibition of regeneration in Begonia leaves. Physiol. Plant. 22: 671-679.
- Jacquot, C. 1950. In vitro culture of the cambial tissue of castanea vesca Gaertn. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 231: 1080-1081.
- Langridge, J. 1961. Biochemical aspects of temperature response. Ann. Rev. Plant Physiol. 27: 441-462.
- Leshem, B., D. Shalev, and S. Izhar. 1988. Cytokinin as an inducer of vitrification in melon. Ann. Bot. 61: 255-260.
- Maliga, P. 1980. Isolation, characterization and utilization of mutant cell lines in higher plants. In: Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. I.K.Vasil, (ed.) International Review of Cytology Supplement 11, Acad. Press. New York, pp: 225-250.
- Murashige, T. 1961. Suppression of shoot formation in cultured tobacco cells by gibberellic acid. Science 134: 280.

SELECCIÓN DE CALLOS ORGANOGÉNICOS TOLERANTES A FRÍO

- Murashige, T. 1964. Analysis of the inhibition of organ formation in tobacco tissue culture by gibberellin. *Physiol. Plant.* 17: 636-643.
- Meins, F. Jr., and A. Binns. 1978. Epigenetic clonal variation in the requirements of plants cells for cytokinins. In: *The clonal basis of development*. S. Subtelny and I.M. Sussex (eds.). New York, Acad. Press. pp: 185-201.
- Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-478.
- Nakatani, M., R. Chun Huang, H. Okamura, H. Naoki and T. Iwagawa. 1994. Limonoid antifedants from chinese *Melia azedarach*. *Phytochemistry* 36 (1): 39-41.
- Negrutiu, I. and M. Jacobs. 1978. Restoration of the morphogenic capacity in long term callus cultures of *Arabidopsis thaliana*. *Z. Pflanzenphysiol.* 86: 113-124.
- Nitsch, C. and J. Nitsch. 1967. The induction of flowering in vitro stem segments of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. *Planta* 72 : 355-370.
- Ogolevets, I. 1976. Hardening of isolated callus tissue of woody plants with different frost resistances. *Soviet Plant Physiol.* 23 (1): 115-119.
- Pérez Molphe, E., R. Ramírez M., H. Gordon N., y N. Ochoa A. 1999. *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. 169 p.
- Quoirin, M. and P. Lepoivre. 1977. Etude de milieux adaptés aux cultures in vitro de *Prunus*. *Acta Hort.* 78: 437-442.
- Thorpe, T. 1978. Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro. In: T.A. Thorpe (ed.). *Frontiers of Plant Tissue Culture* 1978. University of Calgary Press, Canada. pp: 49-58.
- Thorpe, T. and D. Meier. 1973. Effects of gibberellic acid and abscisic acid on shoot formation in tobacco callus cultures. *Physiol. Plant.* 29: 121-124.
- Thorpe, T. and D. Meier. 1975. Effect of gibberellic acid on starch metabolism in tobacco callus cultured under shoot-forming conditions. *Phytomorphology* 25: 238-245.
- Villalobos, V. 1989. *Fundamentos Teóricos-Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales*. CATIE, Costa Rica. pp: 45-50.
- Youngken, H. 1951. *Tratado de Farmacognosia*. (Ed.). Atlante S. A. México. pp: 665-666.