

CULTIVO «IN VITRO» DE TEJIDOS DE «PASSIFLORA CAERULEA»¹

POR FERMIN NAKAYAMA²

INTRODUCCION

Durante el crecimiento y desarrollo en los vegetales, se puede observar una variación en su aspecto externo, que comienza a manifestarse desde la formación de la cigota y continúa a través de su ciclo biológico. Un caso particular se encuentra en la forma de las hojas a lo largo del tallo, que en determinadas especies, tanto herbáceas (Ashby, 1957) como leñosas (Schaffalitzky, 1954), es pronunciadamente evidente. Esta característica, puede estar relacionada con los procesos del desarrollo ontogénico, y para algunos autores, da la medida de la edad fisiológica del tejido que lo ha formado (Krenke, 1940; Sívori, 1955), como consecuencia de modificaciones de su estructura química interna, bajo la influencia de factores externos, e internos como metabolitos provenientes de órganos preformados (Sívori, 1963). Estos productos involucrados en la diferenciación de un órgano dado, serían de naturaleza nutritiva (Allsopp, 1965) u hormonal (Went, 1951).

La complejidad del sistema metabólico en donde actúan, no permite sin embargo, establecer con claridad la participación que co-

¹ Trabajo iniciado bajo el ejercicio de una beca de perfeccionamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (marzo 1964-febrero 1965) y continuado con un contrato con la Comisión Especial de Física Atómica y Radioisótopos - Univ. Nac. de La Plata; realizado en el laboratorio de la cátedra de Fisiología Vegetal y Fitogeografía de la Fac. de Agronomía de La Plata, bajo la dirección del Ing. Agrón. Enrique M. Sívori. Trabajo recibido para su publicación el 20 de julio de 1966.

² Ingeniero agrónomo.

rresponde a cada una de ellas. Investigaciones más recientes, han logrado resolver parcialmente el problema, limitando los fenómenos de correlación, con el aislamiento de órganos, tejidos o células. *El cultivo de los mismos, en medios nutritivos artificiales, en donde reaccionan frente a determinados "factores" incorporados al medio, ha demostrado ser un medio eficaz* (Miller y Skoog, 1953; Butenko, 1960; Allsopp, 1965 y otros). Esta técnica implica necesariamente el conocimiento de las condiciones mínimas requeridas para que las mismas prosperen (Gautheret, 1959).

En el presente trabajo, se exponen los resultados obtenidos en el cultivo "in vitro" de tejidos de *Passiflora caerulea* L., "mburucuyá", una planta de manifiesto crecimiento heteroblástico (Montaldi et. al., 1963) ¹, sobre la que se han estudiado además, algunos aspectos relacionados con la morfogénesis, tanto sobre tejido original, como sobre material proveniente de sucesivos repiques, paso previo para resolver los problemas planteados.

MATERIAL Y METODO

Se utilizaron segmentos de tallo de plantas que crecen en el Jardín Botánico de la Facultad de Agronomía de La Plata. En las primeras experiencias, se tomaron de una planta de gran porte y muchos años de edad, los que evidenciaron la presencia de microorganismos en el interior de sus tejidos, que impidieron el posterior crecimiento de los cultivos, comprobación observada también en los tallos viejos de plantas jóvenes. Los mejores resultados se obtuvieron con material tomado de brotes tiernos, con crecimiento vigoroso y sin lesiones en plantas losanas. Se tomaron aproximadamente los 20 cm apicales, de tallos con hojas pentalobadas, extrayendo todos sus órganos laterales inmediatamente antes de la desinfección; la misma se efectuó con lavados con alcohol de 96°. Lo más práctico consistió en limpiar cada rama, con algodón empapado en alcohol, eliminando posteriormente la mayor parte de la corteza con bisturí, seguido de una limpieza como la anterior. Esto

¹ Esta especie comienza formando hojas enteras y progresivamente, hojas bi, tri, tetra y pentalobadas; ocasionalmente suele dar hojas exa y heptalobadas, pudiendo faltar las formas bi y tetralobadas. Se considera el estado de hoja pentalobada como adulta, al ser capaz de producir yemas florales y nunca en un estado anterior.

y los posteriores trabajos, se realizaron en condiciones de asepsia bajo una campana previamente pulverizada con alcohol de 70°; durante el transcurso del trabajo se repitió esta operación para prevenir la contaminación del exterior.

La desinfección y preparación de los segmentos, se realizaron sobre papel previamente esterilizado en autoclave; los segmentos, de aproximadamente 0,5 a 1 cm de longitud, se conservaron hasta el momento de cultivo, en cajas de Petri estéril; en cada caja se colocaron solamente los provenientes de una rama; cuando se identificaron los extremos, se hizo un corte recto en la parte basal y biselado en la apical; de las diversas posiciones ensayadas, se optó por la horizontal, levemente sumergida en el medio nutritivo.

Las determinaciones de los pesos se efectuaron en una balanza Mettler H; en el caso de los tejidos para repicar, se realizaron en condiciones de asepsia, utilizando cajas de Petri de pequeñas dimensiones previamente taradas, dividiéndose en trozos en el interior de las mismas y calculando por diferencia. Los pesos secos se tomaron luego de someter los tejidos a 100-105° C durante 48 horas en estufa.

Los instrumentos utilizados se esterilizaron con alcohol y posterior flameado.

Se ensayaron los medios minerales de Heller (Gautheret, 1959) con 3 % de sacarosa y de Fox y Miller (1959) (medio de White modificado) con 2 % de sacarosa, ambos con 1 % de "Bacto-agar" (Med. Bás.), agregándose los siguientes "factores", aisladamente o en diversas combinaciones: mezcla vitamínica con glicocola (2 mg/l glicocola; 0,1 mg/l tiamina HCl; 0,5 mg/l ác. nicotínico; 0,1 mg/l piridoxina HCl) (Mzc. vit.); ácido indol acético (AIA); cinetina (6-furfuril amino purina); extracto de maíz fermentado (E.M.f.)¹

¹ La marcha de la preparación del extracto, orientado por el trabajo de Fox y Miller (1959), fue esquemáticamente el siguiente: 100 g de harina de maíz + 100 g de maíz triturado + 177 ml de agua conteniendo 627 mg de metabisulfito de potasio en disolución; mantenido a estufa a 50-52° C durante 40-60 horas bajo ambiente con humedad a saturación; extracción posterior del líquido bajo presión; filtrado por papel de filtro; concentrado al vacío hasta 66,9 % de materia seca; agregado de alcohol de 96° hasta llevar a 80 % de etanol y filtrado con papel; eliminado del alcohol de la solución por vacío; lavado de la solución por tres veces con igual volumen de éter etílico; eliminación de restos de éste por vacío y llevado el volumen final, al correspondiente a la concentración anterior de 66,9 % de materia seca.

e hidrolisado de caseína (Hidrolis, cas.)¹; ajustándose el pH a alrededor de 6.

Los cultivos se realizaron en tubos de vidrio de 24 x 160 mm, con 10 a 25 ml de medio nutritivo, obturándose con algodón previamente esterilizado. Los tubos con los medios nutritivos completos, previo al cultivo, se esterilizaron en autoclave a 110° C durante 30 minutos. Efectuados los cultivos, a razón de uno por tubo, se conservaron a 25-27° C, ya sea a luz difusa del laboratorio o en oscuridad.

RESULTADOS

Los ensayos realizados con la finalidad de determinar el material biológico adecuado, indicaron que si bien los tejidos viejos, ya sean del brote del año o aquellos tomados de la base de la planta, poseen capacidad para originar callos, la presencia de microorganismos en su interior, que proliferan abundantemente al encontrar un medio adecuado en el cultivo, impiden el posterior desarrollo de los mismos. No se utilizaron otros desinfectantes, por cuanto la correcta limpieza con alcohol cumple satisfactoriamente la finalidad, existiendo antecedentes sobre la gran dificultad de eliminar los gérmenes internos (Jacquiot, 1964; Butenko, 1960); se comprobó, por otra parte, que no es necesario realizar un enjuague con agua estéril.

Los brotes tiernos, vigorosos y sin lesiones, evitaron el problema de contaminación interna, demostrando amplia facultad generativa.

El medio básico de Fox y Miller permitió un crecimiento más vigoroso y homogéneo que el logrado sobre el medio básico de Heller.

Cultivos de segmentos de tallo

De acuerdo a los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de cultivos iniciales, se comprobó que el medio básico por sí solo permite un pequeño crecimiento, que cesa o declina pronunciadamente al finalizar el primer mes. Dicha actividad consistió en la multiplicación celular, fundamentalmente en la zona cambio

¹ Hidrolisado ácido de caseína, libre de sales y vitaminas, polvo grado C de Calif. Bioch. Res.

vascular del extremo apical, observándose al finalizar el primer mes, un gran número de cultivos con formación pseudotálica, tanto en este extremo como en forma de pústulas lineales a lo largo del segmento; algunos formaron un pequeño callo de naturaleza más compacta en el extremo basal, pero de la misma manera que las anteriores formaciones, cesaron su actividad al poco tiempo; este comportamiento se explica por el agotamiento de algunos "factores" presentes en los tejidos originales. Como ni el agregado de hidrolizado de caseína al medio nutritivo, ni la duplicación de la concentración de sacarosa modificaron los esquemas descriptos anteriormente, se supuso que dichos factores fueron diferentes del nutritivo; esta deducción fue confirmada por los tratamientos en donde se utilizó extracto de maíz fermentado; los tejidos conservaron su vitalidad durante mucho mayor tiempo y sus características de crecimiento, determinadas por la presencia de este agregado, respondieron como si se tratara de un regulador del crecimiento. Este extracto estimuló la formación de callos indiferenciados, ya sea en forma aislada o intensificada con la cinetina, e inhibió la aparición de brotes que promueve esta última.

Con la incorporación de sustancias tales como AIA, cinetina y vitaminas, los cultivos experimentaron una serie de reacciones bien características; el AIA provocó la rizogénesis y un incremento de la actividad cambial a concentraciones de 10 mg/l y 1 mg/l; una concentración de sólo 0,1 mg/l inhibió la diferenciación de yemas que provoca 1 mg/l de cinetina.

La cinetina a una concentración de 1 mg/l, en oscuridad, estimuló la multiplicación celular de tejidos indiferenciados y la formación de yemas. La aparición del mayor número de esbozos de yemas ocurrió alrededor del trigésimo día y en número aproximado de 3-8 por segmento, en forma casi simultánea, ubicándose normalmente en el extremo apical sobre el callo formado con anterioridad (lám. I, fig. 1); se observó también la formación de los mismos esbozos, en número limitado, sobre callos originados en otra ubicación y en época muy posterior a los anteriores; el porcentaje de cultivos que manifestaron estas características fue de alrededor del 50 % a los 30 días, elevándose a 70 % a los 80 días; los brotes de mayor crecimiento alcanzaron para esta época a desplegar la quinta hoja, todas las cuales fueron enteras y de reducido tamaño (en un solo caso aparecieron brotes con hojas trilobadas); con el transcurso del tiempo las hojas inferiores se

volvieron cloróticas y se desprendieron, probablemente como consecuencia de la migración de elementos hacia los nuevos órganos en formación; en otros casos, el crecimiento fue más restringido, especialmente en los segmentos con mayor número de brotes.

La estimulación por la cinetina de la división celular de tejidos indiferenciados, que fue incrementado con el agregado de E. M. f., provocó la formación de voluminosos callos (lám. I, fig. 2), proceso que comenzó a hacerse evidente alrededor del vigésimo día, al compararse con los otros tratamientos sin cinetina, por cuanto los que no tuvieron cinetina tendieron hacia la forma pseudotálica y aquéllos prosiguieron su crecimiento; las características de los tejidos formados a partir de esta época fueron menos compactos, adquiriendo una tonalidad pardusca y creciendo a nivel del medio nutritivo en forma semisumergida. Si bien este tipo de callo proliferó a partir de los previamente formados, la mayor actividad correspondió a los del extremo basal. Con posterioridad, alrededor del quincuagésimo día, sobre los callos de este extremo de algunos cultivos comenzaron a aparecer raicillas, y también más adelante, de manera irregular en el tiempo, sobre otros callos.

El agregado de Mezc. vit. al medio básico prolongó la vitalidad y estimuló la organogénesis en algunos tejidos, pero el efecto más notorio observado consistió en la exaltación de la acción de los otros "reguladores del crecimiento", aumentando el porcentaje de cultivos que formaron brotes, el número de los mismos por segmento, la rizogénesis y el crecimiento de los callos.

Cultivos de tejidos indiferenciados

Se partió de aquellos formados en los cultivos iniciales, comprobándose que el Med. Bás. de Fox y Miller con E.M.f. y cinetina permite el crecimiento a partir de porciones del orden de los 25 mg, apreciándose los mismos resultados para los sucesivos repiques. En el cuadro I se dan los valores de peso fresco promedio alcanzado en cada uno de los repiques, en dos concentraciones de cinetina.

El crecimiento de los callos fue muy heterogéneo en los primeros subcultivos, así como las características del crecimiento y la coloración, los que tendieron a estabilizarse a través de los repiques. Al comienzo fueron más globulares, y su coloración varió

entre el crema amarillento y el anaranjado pardusco, variación encontrada también en un mismo tejido, observándose frecuentes zonas necrosadas pardas; los últimos repiques (4º y 5º) fueron más homogéneos, de una tonalidad amarillento ocre y formando una pequeña cantidad de clorofila en algunos sectores cuando fueron mantenidos a luz.

CUADRO I

Pesos fresco promedio en mg, alcanzado por tejidos indiferenciados de «mburucuyá», en los sucesivos repiques sobre medio básico de Fox y Miller con extracto de maíz fermentado, en las dos concentraciones de cinetina y durante el tiempo especificado en el cuadro.

Orden del subcultivo	Días de cultivo	Concentración de cinetina	
		0,1 mg/l	1 mg/l
1º.....	79	138,6	493,2
2º.....	142	633,0	611,7
3º.....	126	274,1	112,4
4º.....	139	1.255,8	1.052,8

La cepa cultivada en la concentración mayor de cinetina presentó una estructura globular consistente, sin disgregarse fácilmente (Gautheret, 1959, lo designa como "colonia compuesta"), mientras que en la concentración menor fue más laxa, disociándose en pequeños grupos celulares bajo una leve presión (corresponde a una forma intermedia entre la anterior y la forma de "colonia disociada" de Gautheret).

Al analizar los pesos obtenidos en el segundo repique (cuadro II), se puede deducir que la incorporación de cinetina al medio produce realmente una acción, y que el mismo varía con la concentración, tanto de la del medio de cultivo en donde crecieron, como de la del cultivo previo; se observa también una adaptación o estabilización para una misma concentración. Es evidente también la acción del E.M.f. y su capacidad de sustituir parcialmente la facultad citocinética de la cinetina.

Las deducciones obtenidas en el tercer repique coincidieron con las anteriores, agregándose la circunstancia de la aparición de brotes y raíces (lám. II, fig. 1), simultánea o independientemente. Los mayores valores para la formación de brotes correspondieron

a los subcultivos provenientes de un medio básico con 7 ml/l de E.M.f. transferidos a un medio básico sin agregados (4 sobre 10 cultivos); y a un medio con 7 ml/l de E.M.f. (3 con brotes sobre 10 cultivos).

CUADRO II

Pesos promedios obtenidos en el segundo repique de tejidos de «mburucuyá», luego de 142 días de cultivo en un medio básico de Fox y Miller con los agregados especificados, promedios de 9 cultivos por tratamiento, expresados en mg.

Agregados en el presente ensayo	Agregados en el cultivo anterior: 7ml/l E.M.f. + 0,1 mg/l cinet.+1mg/l cinet.		Peso fresco promedio	Peso seco promedio
7 ml/l E.M.f.....	507,5	126,7	307,1	37,3
14 ml/l E.M.f.....	749,0	332,0	551,4	69,7
7 ml/l E.M.f.+0,1mg/l cinetina.....	633,0	508,0	567,2	69,0
7 ml/l E.M.f. + 1mg/l cinetina.....	578,0	611,7	595,9	74,6
Peso fresco promedio..	621,5	390,5		

Dos callos con brotes, con un peso inicial de 10 y 12 mg, cultivados en cuarto repique a oscuridad, sobre Med. Bás. de Fox y Miller + E.M.f., continuaron formando nuevo tejido indiferenciado; sus brotes se necrosaron y alrededor del sexagésimo día comenzaron a diferenciar numerosos esbozos embrionales (lám. II, fig. 2); esta cepa provino de un cultivo inicial sobre Med. Bás. con E.M.f. + 1 mg/l de cinetina, siendo los medios sucesivos siguientes los detallados a continuación: Med. Bás. + E.M.f. + 0,1 mg/l de cinetina para el primer repique; Med. Bás. + E.M.f. para el segundo y Med. Bás. sin otros agregados para el tercer repique.

DISCUSION

Si bien el objetivo fundamental del trabajo consistió en determinar las condiciones requeridas para el cultivo "in vitro" de "mburucuyá" y estudiar la posibilidad de aplicar la técnica en el esclarecimiento de algunos aspectos relativos al desarrollo heteroblástico, la necesidad de orientarlo hacia la formación de órga-

nos sobre los tejidos en estudio, hechos logrados y descriptos en el desarrollo de este trabajo, han permitido llegar a ciertas comprobaciones interesantes.

En primer lugar, se destaca la capacidad caulógena de tejidos de "mburucuyá" y la acción que en ese sentido posee un derivado de la purina como lo es la cinetina. Miller y Skoog (1953) atribuyeron la posibilidad de que la adenina fuera un factor crítico en el proceso hacia la iniciación de la yema, en numerosos, si no en todos los vegetales superiores. En su amplia revisión, sin embargo, Miller (1961) puntualiza que no debe considerarse a la cinetina como "formador de yemas". Hasta el presente es restringido el número de especies sobre las que se ha observado este hecho (Cutter, 1965), existiendo citas de casos negativos (Jacquot, 1964).

De cualquier manera, en esta circunstancia se confirmaron las conclusiones de Skoog y colaboradores (1957), de que la regulación del crecimiento y morfogénesis dependen de las relaciones cuantitativas de los factores de crecimiento. Los brotes en los cultivos iniciales aparecieron al incorporarse cinetina al medio e incrementar la relación cinetina/AIA, mientras que el agregado de sólo 0,1 mg/l de AIA anuló el efecto de 1 mg/l de cinetina al disminuir esta relación.

En las experiencias realizadas con subcultivos se encontró que la composición del medio nutritivo influye notablemente sobre la forma de crecimiento de las colonias celulares, habiéndose descrito las diferencias encontradas entre cepas cultivadas en dos concentraciones diferentes de cinetina y las variaciones que ocurren cuando las transferencias se realizan sobre otras concentraciones de cinetina o E.M.f. Se mencionó también la formación de brotes, raíces y embriones cuando las modificaciones del medio nutritivo fueron más profundas. Es indudable que en las colonias de células indiferenciadas, también las relaciones cuantitativas de los factores de crecimiento son responsables de la regulación del crecimiento. No se pudo establecer con certeza estas relaciones ni las condiciones más apropiadas para la organogénesis, por cuanto aparentemente pequeñas cantidades de principio activo son transferidas juntamente con los tejidos; además, en las cepas que siempre fueron cultivadas sobre un medio de igual composición, se pudo observar una estabilización de las características externas que, agregado a la comparación de pesos (cuadro II), nos permite

entrever en las colonias una selección de células que proliferan con mayor intensidad, dando lugar a líneas más adaptadas a dicho medio. Por estas últimas razones y por los antecedentes que existen sobre la observación de respuestas a ciertos tratamientos, en subcultivos posteriores (Wiggams, 1954, y otros), así como por la interpretación de que los reajustes hormonales ocurren luego de una serie de repiques (Jacquot, 1964), se juzgó conveniente estabilizar las cepas antes de encarar su estudio en forma sistemática.

Se hizo notar, en lugar aparte, las propiedades reguladoras del E.M.f., el que, indudablemente, se trata de una mezcla compleja con propiedades diferentes a las nutritivas; un extracto semejante fue estudiado por Fox y Miller (1959) sobre *Xanthium*, quienes suponen la existencia de por lo menos dos "factores" desconocidos de promoción del crecimiento de tejidos. La capacidad de nuestro extracto para promover la división celular, tanto en cultivos iniciales como en subcultivos de "mburucuyá", fue descripta con características que recuerdan a las de la cinetina; las propiedades auxínicas también fueron enunciadas, aunque se debe recordar que las formas libres de estos compuestos deben haber sido extraídas con los tres lavados con éter, a menos que sean posteriormente sintetizados a partir de precursores, o se trate de compuestos auxínicos no solubles en éter. Estos hechos hacen ver la complejidad de los reguladores presentes en el extracto, cuya dilucidación se entrevé sumamente interesante.

Con los datos acumulados hasta el presente se considera que se han dado los pasos previos para poder establecer la medida en que el tejido es responsable en la formación de hojas cotiledonares, enteras o polilobadas, en los cultivos "in vitro"; su relación con los procesos ontogénicos normales y la participación que les corresponde a los diferentes metabolitos, cuya administración puede ser regulada en los medios nutritivos artificiales.

RESUMEN. — En el presente trabajo, se han estudiado las condiciones requeridas para el cultivo "in vitro" de tejidos de *Passiflora caerulea* L., "mburucuyá", y el comportamiento de los mismos frente a diversos "factores" agregados al medio nutritivo.

Se pudo determinar que segmentos de tallo de 0,5 a 1 cm de longitud, tomados de brotes tiernos de crecimiento vigoroso, previa desinfección con alcohol, permiten obtener resultados satisfactorios, encontrándose por el contrario gran porcentaje de infección, en aquellos provenientes de tallos o plantas viejos.

El medio básico de Fox y Miller, aportó las necesidades minerales y energéticas, en forma más eficaz que el medio de Heller.

Cultivos iniciales en medios con 1 mg/l de cinetina, provocaron la formación de brotes, estimulada por vitaminas e inhibida por 0,1 mg/l de ácido indol acético o 7 ml/l de extracto de maíz fermentado. El extracto de maíz fermentado y la cinetina favorecieron la formación de callos, observándose mayor actividad en presencia de los dos. El ácido indol acético favoreció la formación de raíces; todos los fenómenos anteriores fueron intensificados por las vitaminas.

Los repiques de callos, prosperan en diversos medios de cultivo, diferenciando yemas, raíces y embriones en algunos de ellos.

Los resultados permitieron constatar la capacidad organogenética de los tejidos de "mburucuyá" y su respuesta a los "factores" agregados a los medios nutritivos, los que aseguran las bases para proseguir los trabajos tendientes a esclarecer las incógnitas del determinismo heteroblástico.

SUMMARY. — "In vitro" culture of tissues of "Passiflora caerulea", by FERMIN NAKAYAMA. In this work the conditions required for the cultivation "in vitro" of tissues of *Passiflora caerulea* L., "mburucuyá", and the behavior of the same ones before several "factors" added to the nutritive medium have been studied.

It could be determined that segments of stems from 0,5 to 1,0 cm length, taken from shoots having a vigorous growth, after disinfection in alcohol, permit to attain satisfactory results whereas, on the contrary, a great percentage of infection was found in segments taken from old stems or plants.

Fox and Miller basic medium provided the mineral needs in a more effective way than the Heller's one.

Initial cultivations in media with 1 mg/l of kinetin, stimulated by vitamins and inhibited by 0,1 mg/l of indol acetic acid or 7 ml/l of extract of fermented corn caused the formation of buds. The extract of fermented corn and kinetin favored the outgrowth of calluses and a greater activity in the presence of both was observed. The indol acetic acid favored the formation of roots. All the foregoing phenomena were intensified by the vitamins.

The subcultivation of calluses prospered in different nutritive media, some of them showing buds, roots and embryos.

The results rendered evidence of the organogenetic capacity of the tissues of "mburucuyá" and its response to the various "factors", thus assuming the bases for prosecuting the works to elucidate the unknown of the heteroblastic determinism.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALLSOPP, A. (1965). *Heteroblastic development in cormophytes.*, Enc. Pl. Phys., Springer-Verlag., 15(1):1.171-1.221.
- ASHBY, E. (1957). *Plant Life.*, Simon & Schuster Inc., New York. Traducc. español: *La forma de las hojas*, en *La vida de las plantas*. Ed. Rev. de Occidente, Madrid 1959:123-132.

- BUTENKO, R. G. (1960). *Application of method for cultivation of isolated terminal buds to study the process of growth and organogenesis of plants*. Fiz. Rast. 7(6):715-723. Traducc. inglés (U.S.A.): Pl. Phys., 7(6):590-596.
- CUTTER, E. (1965). *Recent experimental studies of the shoot apex and shoot morphogenesis*. The Bot. Rev., 31(1):7-113.
- FOX, E. J. AND C. O. MILLER. (1959). *Factors in corn steep water promoting growth of plant tissues*., Pl. Phys., 34 (5) : 577-579.
- GAUTHERET, R. J. (1959). *La culture des tissus vegetaux*. Ed. Masson et Cie., París.
- JACQUIOT, C. (1964). *Application de la technique de culture des tissus végétaux à l'étude de quelques problèmes de la physiologie de l'arbre*., Ann. Sc. Forest., XXI (3): 311-473.
- KRENKE, N. P. (1940). Citado por ASHBY, E. (1957).
- MILLER, C. O. AND F. SKOOG. (1953). *Chemical control of bud formation in tobacco stem segments*., Am. Jour. Bot., 40 (10) : 768-773.
- MILLER, C. O. (1961). *Kinetin and related compounds in plant growth*., Ann. Rev. Pl. Phys., 12: 395-408.
- MONTALDI, E. R., O. H. CASO E I. J. LEWIN. (1963). *Algunos factores que afectan la morfología de las hojas en una planta de desarrollo heteroblástico*., Rev. Inv. Agríc., 17 (3) : 321-340.
- SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL, M. (1954). *Juvenile stages in woody plants*., Phys. Plant, 7 (4) : 782-796.
- SÍVOZI, E. M. (1955). *Procesos de "envejecimiento" en los vegetales*., Cienc. e Invest., 11 (10) : 445-454.
- (1963). *El concepto de ontogenia en las plantas superiores*. Cienc. e Invest., 19 (5) : 101-108.
- SKOOG, F. (1957). *Conference on tissue culture*., Jour. Nat. Canc. Inst., 19 (4) : 578-581.
- WENT, F. W. (1951). *The development of stems and leaves*., en *Plant growth substances*., Univ. Wisc. Press., Ed. F. Skoog. 287-298.
- WIGGAMS, C. S. (1954). *Growth and organ formation in callus tissue derived from Daucus carota*., Am. Jour. Bot., 41 (4) : 321-326.

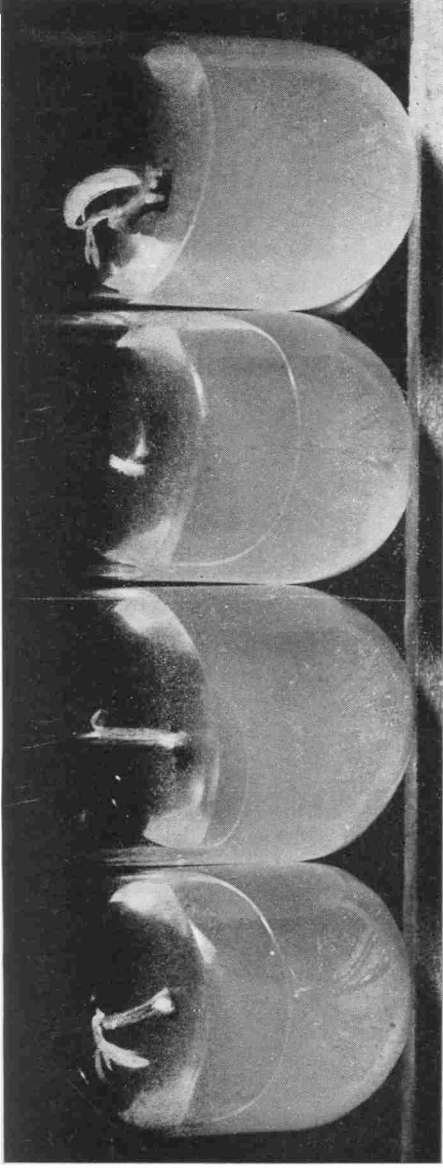


Fig. 1. — Cultivos iniciales de segmentos de tallo de « mburucuyá » en tubos de 2,5 cm de diámetro con 10 ml de medio básico de Fox y Miller + mezcla vitamínica + 1 mg/l de cinetina. Se observa la formación de brotes en el extremo apical, al 27º día de cultivo.



Fig. 2. — Callos formados sobre segmentos de tallo de « mburucuyá » en 102 días de cultivo en medio básico de Fox y Miller + 7 ml/l de extracto de maíz fermentado + 1 mg/l de cinetina.

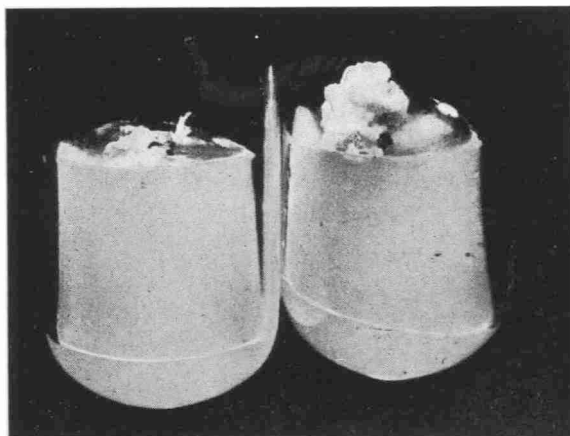


Fig. 1.— Tercer subcultivo de tejido de «mburucuyá» en tubos de 2,5 cm de diámetro con 15 ml de medio básico de Fox y Miller + 7 ml/l de extracto de maíz fermentado + 0,1 mg/l de cinetina. Se observa la formación de brote y raíz en el tubo de la izquierda y de callo en el de la derecha, a los 96 días de cultivo.

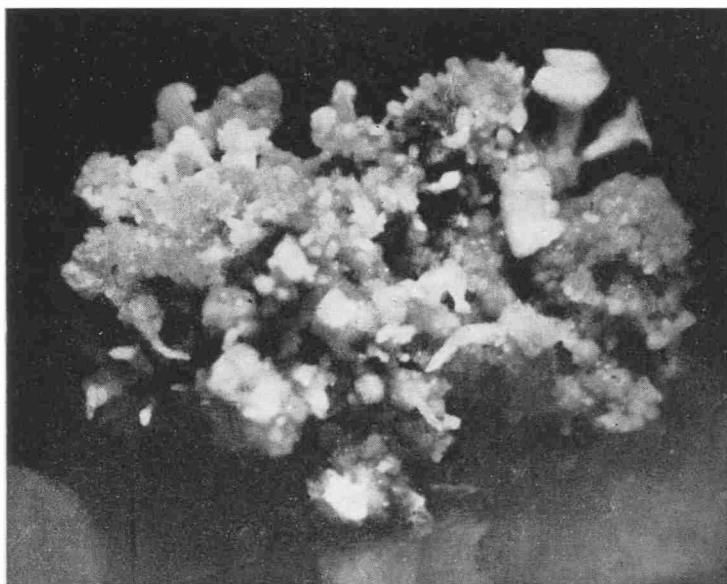


Fig. 2.— Formaciones «embrioides» sobre callo de 220 días de cultivo en medio básico de Fox y Miller + extracto de maíz fermentado, mantenidos a oscuridad.