

# ESTABLECIMIENTO Y BROTAÇÃO *in vitro* DE YEMAS AXILARES Y ÁPICES DE GINKGO (*Ginkgo biloba* L.).

J. J. Montes-López; J. L. Rodríguez-de la O.

Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 56230. México. E-mail: jrguez@taurus1.chapingo.mx

## RESUMEN

Se evaluó el establecimiento y la brotación *in vitro* de yemas axilares y ápices de *Ginkgo biloba* L. empleando como medio básico las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) MS, suplementado con tiamina-HCL ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ ), myo-inositol  $100 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ , 3 % de sacarosa, vitaminas de Aguilar (1993),  $2 \text{ g}\cdot\text{litro}^{-1}$  de carbón activado, 0.7 % de agar-agar, Benomyl ( $400 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ ) y un pH de  $6.0 \pm 0.1$ . En la brotación y multiplicación se utilizó el medio descrito anteriormente sin la adición de carbón activado y Benomyl evaluándose diferentes concentraciones de BA ( $0, 5, 10, 15$  y  $20 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ ), incubándose bajo una intensidad luminosa de  $50.48 - 59.83 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , y un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad con una temperatura de  $26 - 24^\circ\text{C}$  (día/noche). Los resultados demostraron que la estación del año en la que se colectan los explantes, influye en el establecimiento, así como la edad del explante y su posición en la rama influyen en la brotación, lográndose las mejores respuestas en explantes de 1 año tomados de las regiones apicales. Obteniendo brotes en el tratamiento testigo (25 %) y la brotación y multiplicación en los tratamientos de 15 (60 %) y  $20 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  de BA (80 %).

**PALABRAS CLAVE:** Organogénesis, tallos, cultivo de tejidos, citocininas, contaminación.

## *In vitro* ESTABLISHMENT AND SPROUTING OF AXILLARY BUDS AND SHOOT APEX OF GINKGO (*Ginkgo biloba* L.)

## SUMMARY

The *in vitro* establishment and sprouting of axillary buds and shoot apex of *Ginkgo biloba* L. was evaluated using as a basic medium the inorganic salts of Murashige and Skoog (1962) MS, supplemented with thiamine-HCl ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ ), myo-inositol  $100 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ , 3 % sucrose, Aguilar (1993) vitamins,  $2 \text{ g}\cdot\text{liter}^{-1}$  of activated charcoal, 0.7 % agar-agar, Benomyl ( $400 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ ), and with a pH of  $6.0 \pm 0.1$ . In sprouting and proliferation, the medium described above was used without the addition of activated charcoal and Benomyl. Different concentrations of BA ( $0, 5, 10, 15$  y  $20 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ ) were evaluated. Incubation was done under a light intensity of  $50.48 - 59.83 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and a photoperiod of 16 h of light and 8 h of dark with a temperature of  $26/24^\circ\text{C}$  (day/night). The results demonstrated that the season of the year in which the explants were collected influences establishment, while the age of the explant and its position on the branch influence sprouting. The best responses were obtained in one-year-old explants taken from apical regions. Sprouting in the control was 25 %, contrasting with sprouting and proliferation in the  $15 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  treatment which was 60 % and in the  $20 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  treatment it was 80 %.

**KEY WORDS:** Organogenesis, stems, tissue culture, cytokinines, contamination.

## INTRODUCCIÓN

El *Ginkgo biloba* L. recientemente se ha convertido en una planta ornamental importante y cotizada pues son árboles que pueden alcanzar los 2000 años de edad (Václav, 1991), además de que estas plantas fueron la única especie que sobrevivió a la explosión atómica en Hiroshima (Plan, 1996). Por tal razón, los ginkgos son cultivados en muchos lugares del mundo, sobre todo en ciudades, ya que son resistentes al

ataque de insectos, bacterias, virus, insectos y contaminación (Jense y Salisbury, 1988; Raven, 1991; Plan, 1996; Life Source, 1996); aunado a que se adaptan maravillosamente al aire tropical y al frío (Kim, 1995).

Hoy en día los ginkgos, han tomado una nueva dimensión a su fama alrededor del mundo, ya que investigadores en el área de la medicina han aislado compuestos químicos de esta especie (flavonoides y

ginkgolides), que muestran efectos benéficos en el hombre. Estos compuestos regulan la circulación sanguínea en el cerebro, piernas y otras extremidades (Mannfried, 1985), enfermedades del corazón, enfermedades de los ojos, prevención y tratamiento de varios estados de demencia (Foster, 1990) y de modo muy especial mejoran la irrigación cerebral de los ancianos, lo cual se pone en evidencia por un aumento en la capacidad de atención (Mannfried, 1985); además de los niveles de regeneración de varias neuronas en el cerebro por el uso del ginkgo ayudan a contrarrestar la pérdida de memoria (síndrome de Alzheimer) y depresiones, que se pueden dar en personas de la tercera edad (Plan, 1996).

El ginkgo es una especie muy difícil de propagar en forma vegetativa. Hasta ahora no se han obtenido resultados sobresalientes en metodologías para promover el enraizamiento de estacas. Por otra parte la propagación vía sexual es un proceso largo y difícil cuando se intenta hacer fuera de su lugar de origen, así mismo esta especie es dióica por lo que, se requieren de las plantas masculina y femenina para poder obtener y multiplicar semillas, además como en todas las gimnospermas presentan largos períodos de juvenilidad. Por todo lo anterior el cultivo *in vitro* de tejidos en plantas superiores, se presenta como una alternativa para llevar a cabo su propagación, y sobre todo en aquellas especies que poseen características importantes como el *G. biloba* L. así como en otras especies que presentan dificultades para propagarse por los métodos convencionales. Para el caso del *G. biloba* L., Skirvin and Chu (1979) citados por Rohr (1989) utilizando ramas, reportaron que es posible promover tanto la brotación y el desarrollo *in vitro* en varios medios de cultivo como el de Murashige y Shoog (1962), White (1963) y la Linsmaier and Skoog (1965) suplementándolos con ANA y BAP.

El propósito de esta investigación fue establecer las condiciones *in vitro* que permitirán mediante el cultivo de yemas axilares y ápices, la obtención y multiplicación de plantas de *G. biloba* L., evaluando la influencia de la edad y posición de las yemas en la rama, así como el efecto que tiene la época de colección de los explantes y la respuesta de las diferentes concentraciones de BA en el medio de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

Como no se contaba con los antecedentes tanto para el establecimiento aséptico de yemas axilares y ápices de *G. biloba* L. se realizaron algunos bioensayos con la finalidad de establecer un procedimiento adecuado tanto para la desinfestación y cultivo de explantes.

Ensayo 1. Se probaron concentraciones de hipoclorito de sodio 10, 15 y 20 % (solución comercial con un 5 % de cloro activo) a diferentes tiempos (10, 15 y 20 minutos).

Ensayo 2. Se realizó en marzo de 1996, probándose 2 concentraciones (1 y 3 g·litro<sup>-1</sup>) de 2 fungicidas (benomyl y manzate) a 2 diferentes tiempos (10 y 20 minutos) para controlar la contaminación por hongos. Este ensayo se realizó antes de aplicar el mejor tratamiento de hipoclorito de sodio que se encontró en el ensayo 1.

Ensayo 3. El medio de cultivo empleado en estos ensayos fue sales MS al 100 % complementadas con tiamina (0.5 mg·litro<sup>-1</sup>), myo-inositol (100 mg·litro<sup>-1</sup>), sacarosa al 3 %, solución de 10 vitaminas, 400 mg·litro<sup>-1</sup> de benomyl, agar-agar al 0.7 % y se ajustó a un pH de 5.7±0.1.

Ensayo 4. Una vez establecida la metodología que permitió obtener algunos explantes *in vitro* libres de contaminantes, se procedió a realizar este bioensayo, el cual se realizó con el fin de observar la influencia de la posición de la yemas axilares y ápices en la rama (basal, media, y apical), y por consiguiente la influencia de la edad del explante, al momento del establecimiento y brotación.

Ensayo 5. Este ensayo se realizó porque era necesario desarrollar otra metodología de desinfestación que permitiera disminuir la contaminación por hongos principalmente del género *Alternaria* y *Rizoctonia*, para lo cual se empleó el bicloruro de mercurio probándose diferentes concentraciones (0.05, 0.075 y 0.100 %) a diferentes tiempos (2.5, 5 y 10 minutos) para el establecimiento aséptico.

Una vez obtenido un método de desinfestación que ofreciera tener explantes *in vitro* libres de contaminantes externos y en buen estado, se realizó un experimento con BA a diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15 y 20 mg·litro<sup>-1</sup>) para estimular la brotación y multiplicación *in vitro* de explantes tomados durante la época de verano.

Para esta etapa se utilizó el medio MS al 100 % complementado con kinetina (0.5 mg·litro<sup>-1</sup>), myo-inositol (100 mg·litro<sup>-1</sup>), sacarosa al 3 %, solución de 10 vitaminas, agar-agar al 0.7 %, y la adición de BA en diferentes concentraciones, ajustándose a un pH de 6.0±0.1 (sin adicionar carbón activado ni fungicida al medio). La siembra del material vegetal en esta etapa consistió en realizar la transferencia *in vitro* del material que se obtuvo en la última etapa de establecimiento (con 5 días de incubación) al medio de multiplicación que se estaba evaluando BA a diferentes concentraciones).

Las variables evaluadas fueron contaminación por hongos (CH), contaminación por bacterias (CB), explantes contaminados (ENC), días a brotación (DB), explantes no brotados (ENB), oxidación (O), número de días a brotación (NDB), número de brotes (NB), formación de callo (FC) porcentaje de brotación (PB), y longitud de brotes (LB).

Durante esta investigación el material *in vitro* se mantuvo en el cuarto de incubación del Laboratorio de Cultivo de Tejidos con un fotoperíodo de 16 luz y 8 oscuridad, una temperatura de 26 °C durante el día y de 22 a 24 °C durante la noche y intensidad luminosa de 50.48 y 59.83  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Para los ensayos y experimento de BA se empleó un diseño experimental completamente al azar, cinco repeticiones. Realizándose análisis estadísticos no paramétrico utilizando la prueba de Kruskal - Wallis, ya que en muchas variables se tenían solamente dos valores en escala ordinal (0=ausencia y 1=presencia). En los casos donde existieron diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación de medias (DMS), y "t" de student para rangos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ensayo 1

Todos los tratamientos utilizados para la desinfección con hipoclorito de sodio en este ensayo presentaron una contaminación por hongos del 100 %. Al realizar el análisis de varianza y no encontrar diferencias significativas se decidió utilizar el tratamiento con 10 % de hipoclorito de sodio durante 10 minutos (Cuadro 1)

### Ensayo 2

En este ensayo se observó una disminución en la contaminación por hongos debido a los efectos de la aplicación conjunta de los fungicidas empleados y el hipoclorito de sodio. Aquí se optó por el tratamiento 1 (1 g·litro<sup>-1</sup> de benomyl por 10 minutos) ya que no tuvo diferencias significativas con los demás tratamientos (Cuadro 1).

**CUADRO 1. Efecto de los tratamientos en los ensayos E1 y E2 observado en las variables contaminación con hongos (CH), contaminación con bacterias (CB), y explantes no contaminados (ENC).**

Variable	G.L.		X <sup>2</sup> c		P <sub>≥</sub> X <sup>2</sup> c	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2
CH	8	7	0.0	6.9	1.0	0.43
CB	8	7	7.1	10.9	0.5	0.14
ENC	8	7	0.0	6.1	1.0	0.52

P<sub>≥</sub>X<sup>2</sup> = Nivel de significancia observado con la chi-cuadrada en la prueba de Kruskal-Wallis. valores iguales o por debajo de P<sub>≤</sub>0.05 indican diferencias significativas para las variables observadas en los tratamientos al probar Ho: t1=t2.....tn; G.L.= grados de libertad

### Ensayo 3

Para la desinfección del material vegetal en este ensayo se aplicó el tratamiento 1 (2 g·litro<sup>-1</sup>) de benomyl

por 10 minutos) del ensayo 1, además de probar diferentes concentraciones de fungicida en el medio. se puede observar que las concentraciones de benomyl en el medio de 200, 300 y 400 mg·litro<sup>-1</sup> permitieron observar las primeras brotaciones *in vitro* de *G. biloba* L., siendo en las concentración de 400 mg donde se presentó el mayor porcentaje.

Además en el ensayo 3 se observó que la adición de 300 y 400 mg·litro<sup>-1</sup> de benomyl al medio de cultivo puede inhibir o modificar el desarrollo del explante si se deja por mucho tiempo, pues los explantes que brotaron, empezaron a tener un crecimiento amorfo a partir de los 15 días después del establecimiento. Por esta razón los explantes que se establecieron se dejaron solamente cinco días en este medio, para después colocarse dentro de un medio similar sólo que sin la adición de benomyl, lo cual les permitió un desarrollo adecuado. La utilización de benomyl (1 g por minuto), hipoclorito de sodio (10 % por minuto), y benomyl (400 mg·litro<sup>-1</sup>) permitió la desinfección de algunos explantes mientras el tejido del material vegetal estaba verde (crecimientos del mismo año y los explantes se tomaron en primavera y principios de verano), porque una vez que el tejido se lignifica (color café y aspecto leñoso) y la yema se cubre nuevamente de brácteas formando una roseta (mediados de verano, otoño e invierno), la metodología citada anteriormente vuelve a ser ineficiente y la contaminación por hongos vuelve a impedir el establecimiento *in vitro* de ginkgo. (Cuadro 2).

**CUADRO 2. Porcentaje de contaminación por hongos (CH), contaminación por bacterias (CB), explantes no contaminados (ENC), explantes brotados (EB), explantes no brotados (ENB), y número de días a la brotación (NDB), en el ensayo 3.**

Variable	G.L.	X <sup>2</sup> c	P <sub>≥</sub> X <sup>2</sup> c
CH	3	0.9047	0.8243
CB	3	4.0980	0.2511
ENC	3	3.6465	0.3023
EB	3	4.8133	0.1860
ENB	3	0.9047	0.8243
NDB	3	4.9069	0.1787

P<sub>≥</sub>X<sup>2</sup> = Nivel de significancia observado con la chi-cuadrada en la prueba de Kruskal-Wallis. Valores iguales o por debajo de P<sub>≤</sub>0.05 indican diferencias significativas para las variables observadas en los tratamientos al probar Ho: t1=t2.....tn; G.L.= grados de libertad

### Ensayo 4

Los resultados en este ensayo mostraron menor contaminación en el tratamiento de posición apical de las yemas y con crecimientos de 1 año o menos (Cuadro 3).

**CUADRO 3. Efecto de los tratamientos en el ensayo 4 observado en las variables, contaminación por hongos (CH), contaminación con bacterias (CB), explantes no contaminados (ENC), explantes brotados (EB), explantes no brotados (ENB), número de días a la brotación (NDB), oxidación (O).**

Variable	G.L	X <sup>2</sup> c	P≥X <sup>2</sup> c
CH	2	3.5000	0.1738
CB	2	0	1.0000
ENC	2	3.5000	0.1738
EB	2	2.0000	0.3679
ENB	2	2.3333	0.3114
NDB	2	2.0000	0.3679
O	2	0	1.0000

P≥X<sup>2</sup> = Nivel de significancia observado con la chi-cuadrada en la prueba de Kruskal-Wallis. Valores iguales o por debajo de P≤0.05 indican diferencias significativas para las variables observadas en los tratamientos al probar Ho: t1=t2.....tn; G.L= grados de libertad

## Ensayo 5

Para este ensayo se conjuraron todos los resultados sobresalientes de los ensayos pasados con la finalidad de encontrar una respuesta favorable para el control de hongos, ya que nuevamente impedían el establecimiento *in vitro* si se utilizaba la metodología obtenida hasta el ensayo 4 (que se obtuvo en primavera en su mayor parte). Los resultados de este ensayo muestran que el uso de bicloruro de mercurio (0.075 % por 10 minutos), hipoclorito de sodio (10 % por 10 minutos), y benomul (400 mg·litro<sup>-1</sup>) en el medio controlan la contaminación por hongo en un alto porcentaje. A partir de este ensayo se agregó al medio carbón activado (2 g·litro<sup>-1</sup>) (Cuadro 4).

**CUADRO 4. Efecto de los tratamientos en el ensayo 5, observado en las variables contaminación por hongos (CH), contaminación por bacterias (CB), explantes no contaminados (ENC), y oxidación (O).**

Variable	G.L	X <sup>2</sup> c	P≥X <sup>2</sup> c
CB	8	0	1.0000
ENC	8	21.810	0.0053
O	8	25.751	0.0012

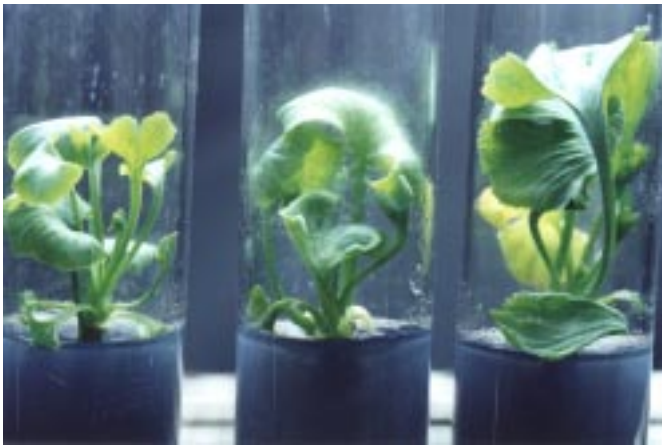
P≥X<sup>2</sup> = Nivel de significancia observado con la chi-cuadrada en la prueba de Kruskal-Wallis. Valores iguales o por debajo de P≤0.05 indican diferencias significativas para las variables observadas en los tratamientos al probar Ho: t1=t2.....tn; G.L= grados de libertad

El principal problema en el establecimiento aséptico fue la presencia de hongos (*Alternaria* y *Rhizoctonia*), que se debe básicamente a la procedencia del material vegetal utilizado puesto que era de un árbol cultivado en campo, en el cual existe más posibilidad de infección ya que está en contacto con las fuentes de contaminación (Pierik, 1990). También parte de esta contaminación se explica por la época de recolección del explante ya que como mencionaron Horlod *et al.* (1989) durante la caída de las hojas (otoño) y en invierno primordios foliares de ginkgo están recubiertos por resistencias tectrices, las cuales impiden su desinfestación en estas temporadas y además permiten la acumulación de contaminantes externos por su forma de roseta. En cuanto al explante con BA se puede observar que a media que aumenta la contaminación de BA también aumentan los explantes brotados y número de brotes. En la comparación de medias (Cuadro 5) se observó que los tratamientos de 15 y 20 mg·litro<sup>-1</sup> de BA fueron los mejores en cuanto a explantes brotados (EB) y número de brotes (NB) (Figura 1) en contaminación con el tratamiento sin BA (testigo), pero este fue mejor en cuanto al número de días a brotación (NDB).

**CUADRO 5. Efecto de benciladenina (BA) sobre algunas variables de crecimiento de ginkgo cultivado *in vitro* medias de rangos (transformaciones) con la prueba de Kruskal - Wallis (P≤ 0.05).**

Concentración de BA (mg·litro <sup>-1</sup> )	Oxidación	Número de Explantes no brotados	Número de Explantes brotados	Número de días a brotación	Brotes con formación de callo (mg)	Número de Brotes obtenidos
0	12.5 a <sup>z</sup>	15.0 a	11.5 b	10.8 a	9.5 b	11.3 b
5	15.0 a	15.0 a	9.0 b	9.0 a	9.5 b	9.0 b
10	17.5 a	12.5 a	9.0 b	9.0 a	9.5 b	9.0 ob
15	10.0 a	12.5 a	16.5 ab	16.2 ab	17.0 ab	16.6 ab
20	10.0 a	10.0 a	19.0 ab	20.0 b	19.5 a	19.1 ab
DMS			8.78	8.44	8.47	8.72

<sup>a</sup>Valores con la misma letra dentro de columna no presentan diferencias en las medias de rangos de los tratamientos; DMS= diferencia mínima significativa para la prueba de comparación de medias de rangos Kruskal y Wallis a una P≤0.05

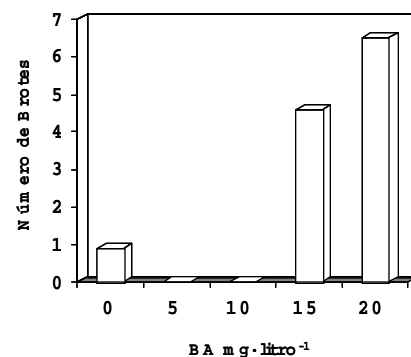


**Figura 1.** Respuesta de yemas axilares y ápices establecidos *in vitro* de *Ginkgo biloba* L., multiplicación, y crecimiento de brotes en 20 mg·litro<sup>-1</sup> de BA, después de seis semanas de incubación

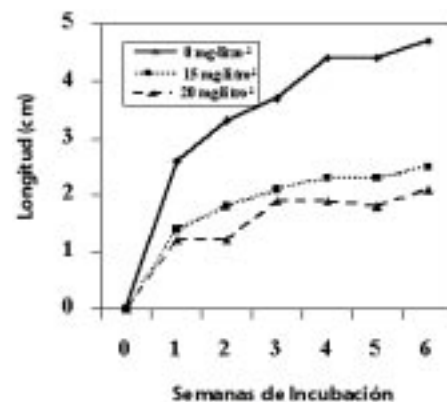
Lo anterior coincide con lo descrito por Shankar y Jagadish (1987) quienes mencionaron que al adicionar citocininas al medio de cultivo se obtiene mayor porcentaje de brotación y número de brotes. Esto puede deberse a que las citocininas estimulan el proceso de división celular (Pierik, 1990). Cabe mencionar que la brotación en el tratamiento sin BA (testigo) fue similar a las brotaciones que se presentaron en primavera (Figura 2). En lo que respecta a los tratamientos de 5 y 10 mg·litro<sup>-1</sup> de BA no se pudieron observar brotaciones ya que los explantes murieron a causa de su necrosamiento o no brotaron. Una vez obtenidos los brotes en los diferentes tratamientos evaluados a las cuatro semanas después de su establecimiento y se cambiaron de medio de cultivo. Esta labor tuvo la finalidad de que los brotes obtenidos se desarrollaran adecuadamente ya que las concentraciones de BA en el medio eran elevadas lo que promovía la formación de callos en los explantes cultivados, que impedía que los brotes que se habían desarrollado tuvieran en contacto con el medio y por lo tanto, comenzaron a morir, además de seguir las recomendaciones indicadas por Hurtado y Merino (1994), de que se deben separar los propágulos obtenidos y colocarlos aun medio fresco para la proliferación de nuevos brotes y para el desarrollo de los mismos. Se decidió por tomar la longitud acumulativa porque los tratamientos de 15 y 20 mg·litro<sup>-1</sup> de BA aunque obtuvieron un mayor número de brotes (Figura 2) estos fueron de menor longitud que el del tratamiento sin BA (testigo), entonces al momento de graficarlos los datos estos tratamientos estaban muy por abajo del tratamiento sin BA (donde sólo se obtuvo un brote pero de mayor tamaño que el de los tratamientos con BA) por lo que no eran muy representativo para observar el comportamiento de la longitud (Figura 3). Esto coincide en parte con lo obtenido en *Pinus sylvestris* por Zel y Cambh (1988) quienes encontraron que la adición de altas cantidades de BA al medio de cultivo incrementan la brotación, la inducción de yemas axilares y adventicias, pero los brotes son pequeños y muy poco alargados.

En lo que respecta a los tratamiento de 5 y 10 mg·litro<sup>-1</sup> de BA no se pudieron observar brotaciones ya que los explantes

murieron a causa de la oxidación o no brotaron. Una vez obtenidos los brotes en los diferentes tratamientos evaluados se separaron a las cuatro semanas después de su establecimiento y se cambiaron de medio de cultivo. Este traspaso tuvo la finalidad de que los brotes obtenidos se desarrollaran adecuadamente ya que las concentraciones de BA en el medio eran elevadas lo que formaba una especie de callosidad en los explantes, que no permitía que los brotes que se habían desarrollado tuvieran en contacto con el medio y por lo tanto empezaban a morir, además de seguir las recomendaciones indicadas por Hurtado y Merino (1994), de que se deben separar los propágulos obtenidos y pasarlos a medio fresco para la proliferación de nuevos brotes y para el desarrollo de los mismo. Se decidió por tomar la longitud acumulativa porque los tratamientos de 15 y 20 mg·litro<sup>-1</sup> de BA aunque obtuvieron un mayor número de brotes (Figura 2) estos fueron de menor longitud que el del tratamiento sin BA (testigo), entonces al momento de graficar los datos estos tratamientos estaban muy por abajo del tratamiento sin BA (donde sólo se obtuvo un brote pero de mayor tamaño que el de los tratamientos con BA) por lo que no era muy representativo para observar el comportamiento de la longitud (Figura 3). Esto coincide en parte con lo obtenido en *Pinus sylvestris* por Zel y Cambh (1988) quienes encontraron que la adición de altas cantidades de BA al medio de cultivo incrementan la brotación, la inducción de yemas axilares y adventicias, pero los brotes son pequeños y muy poco alargados.



**Figura 2.** Número de brotes de *Ginkgo biloba* L. obtenidos en los diferentes tratamientos de benciladenina (BA)



**Figura 3.** Comportamiento de la longitud acumulativa de los brotes de *Ginkgo biloba* L. durante seis semanas de incubación a dos concentraciones de benciladenina (BA)

## CONCLUSIONES

Los problemas debidos a la contaminación con hongos del género *Rizoctonia* y *Alternaria* en los explantes cultivados, fueron la principal limitante en las respuestas *in vitro* de *Ginkgo biloba* L.

Es más fácil lograr la desinfestación del explante a inicios de primavera, que en verano, otoño e invierno, porque no existen brácteas que cubran la yema. Además de que se puede obtener un mayor porcentaje de brotación.

El uso del medio básico de Murashige y Skoog (1962) al 100 % complementado con tiamina ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$ ), sacarosa (3 %), solución de 10 vitaminas de Aguilar (1993), pH de 6.0 0.1 y una intensidad luminosa de  $50.48$  a  $59.83 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , permitieron la brotación y el desarrollo de yemas axilares, y ápice de ramas de *Ginkgo biloba* L.

Concentraciones de BA de  $15$  y  $20 \text{ mg}\cdot\text{litro}^{-1}$  en el medio MS complementado permitieron una mayor brotación de los explantes así como un mayor número de brotes aunque de menor tamaño *Ginkgo biloba* L.

## LITERATURA CITADA

- AGUILAR D., N. M. 1993. Efecto de citocininas en organogénesis y desarrollo de vainilla (*Vanillia planifolia*) *in vitro*. Tesis de Licenciatura . Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.
- FOSTER, S. 1990. *Ginkgo*, *Ginkgo biloba* L. Botanical Serie No. 304. American Botanical Council. Texas, USA. 7 p.
- HAROLD, C.B.; CONSTANTENE, A.J.; DELEVORY, T. 1989. Morfología de las Plantas y los Hongos. OMEGA. Barcelona, España. pp. 547 - 558.
- HURTADO, M.D.; MERINO, M. E. 1994. Cultivo de Tejidos Vegetales. TRILLAS. D.F., México. 232 p.
- JENSEN, W.A.; SALISBURY, B.F. 1988. Botánica. McGraw- Hill. D.F., México. pp. 547 - 561.
- KIM, T.W. 1996. El Ginkgo. Revista Tzapingo Selección de Investigación Universidad Autónoma Chapingo, México 136: 8-9
- LIFE SOURCE. 1996. Activity of Ginkgo. Short Description and Technical Bulletin. Información de Internet (<http://www.Coline.Com/-Ischile/ginkdesc.htm>). 3 p.
- LINSMAIER, E; SKOOG, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-27.
- MANNFRIED, P. 1985. El Gran Libro de las Plantas Medicinales. Séptima Edición. EVEREST. León, España. pp. 376 - 377.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15: 473- 479.
- PIERIK, R.L.M. 1990. Cultivo *In vitro* de las Plantas Superiores. Edición Mudi - Prensa. Madrid, España. 326 p.
- PLAN, B. 1996 . Ginkgo The elixir of youth. Información de Internet (<http://ww.ncw.net/alpha/elixer.Html>). 4 p.
- RAVEN, H.P. 1991. Biología de las Plantas. Reverté. Barcelona, España. pp. 2. 350 - 351.
- ROHR, R. 1989. Maidenhair Tree (*Ginkgo biloba* L.),pp. 574-590. *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Bajaj, Y.P.S. (ed.). Vol 5. Trees II. Springer -Vearlag. Berlin Hindelberg. N. Y., London, Paris, Tokio.
- SHANKAR, V. R.; JAGADISH, K.S. 1987. Clonal propagation of *Cinnamomum zeylanicum* Breyn. by tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 9: 81 -88.
- VÁCLAV, V. 1991. Árboles y Arbustos. SUSAETA. Checoslovaquia. 311 p.
- WHITE, P.R. 1963. The Cultivation of Animal and Plant Cells, 2nd ed.: Ronald Press. New York, USA.
- ZEL, N.G.; CAMBH, M. 1988. Micropropagación of *Pinus sylvestries*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 14: 169-175.